



2022
vol.10 n.1

**JOURNAL OF
BIOTECHNOLOGY AND
BIODIVERSITY**

JBB

ISSN: 2179-4804

EDITORIAL

Dentre das missões do Journal of Biotechnology and Biodiversity (JBB) está a importância da comunicação científica no desenvolvimento das ciências e o acesso aos resultados pela sociedade. Esta missão nunca esteve tão em voga como nos últimos anos onde confiar na ciência se torna o imperativo não somente do segmento da comunidade científica como para sociedade em geral.

Com esse viés, o JBB reafirma o seu compromisso com a qualidade de suas publicações, buscando ampliar sua atuação e reconhecimento como periódico científico consolidado que visa garantir o cumprimento da missão institucional da Universidade Federal do Tocantins, enaltecendo, ainda, o papel que o acesso ao conhecimento tem e o comprometimento dos pesquisadores, ora autores, em manter as contribuições para com a sociedade.

Neste contexto, o corpo editorial do JBB tem mantido os esforços no contínuo fortalecimento do trabalho para o propósito deste periódico de promover o conhecimento e o debate de temas relevantes. Para tanto, apresentamos o primeiro número de 2022, marcando a décima edição deste periódico, contendo artigos científicos de reconhecido conteúdo, englobando a interdisciplinaridade que vem norteando o envolvimento da comunidade científica mundial.

Agradecemos aos Conselhos Científicos pela atuação para com esta produção, garantindo a manutenção de sua qualidade. De forma especial, agradecemos aos pesquisadores(as) que submeteram seus manuscritos e aos avaliadores pela dedicação de sempre.

Marcos Giongo
Jader Nunes Cachoeira

2022
vol.10 n.1

EDITOR GERAL

Marcos Giongo, Universidade Federal do Tocantins, Brasil (atual)

Gessiel Scheidt, Universidade Federal do Tocantins, Brasil (2010-2014)

EDITORES CIENTÍFICOS - Ciências Agrárias

Alexandre Beutling, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

Aloísio Freitas Chagas Júnior, Universidade Federal do Tocantins

Anabel Aparecida de Mello, Universidade Federal de Sergipe

Antonio Carlos Batista, Universidade Federal do Paraná

Cristiano Bueno de Moraes, Universidade Federal do Tocantins

Gil Rodrigues dos Santos, Universidade Federal do Tocantins

Henrique Soares Koehler, Universidade Federal do Paraná

Lillian França Borges Chagas, Universidade Federal do Tocantins

Juliana Barilli, Universidade Federal do Tocantins

EDITORES CIENTÍFICOS - Biotecnologia

Alexsandro Sobreira Galdino, Universidade Federal de São João del-Rei

Augustus Céser Franke Portella, Universidade Federal do Tocantins

Daniel Ângelo Sganzerla Graichen, Universidade Federal de Santa Maria

Ildon Rodrigues do Nascimento, Universidade Federal do Tocantins

Jackeline do Socorro Benassuly Barbosa, Instituto Federal de Brasília

Kleber Franke Portella, Universidade Federal do Paraná

Raimundo Wagner de Souza Aguiar, Universidade Federal do Tocantins

EDITORES CIENTÍFICOS - Química

Damiana Beatriz da Silva, Universidade Federal do Tocantins

Douglas Henrique Pereira, Universidade Federal do Tocantins

Grasiele Soares Cavallini, Universidade Federal do Tocantins

Nelson Luis Gonçalves Dias de Souza, Universidade Federal do Tocantins

EDITORES CIENTÍFICOS - Biodiversidade e Meio Ambiente

Alexandre França Tetto, Universidade Federal do Paraná

Aline Silvestre Pereira Dornelas, Universidade Federal do Tocantins

Damiana Beatriz da Silva, Universidade Federal do Tocantins

Jader Nunes Cachoeira, Universidade Federal do Tocantins

Lorena Stolle, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

Maria Cristina Bueno Coelho, Universidade Federal do Tocantins

Mauro Luiz Erpen, Instituto Federal do Tocantins

Rafael Rode, Universidade Federal do Oeste do Pará

2022
vol.10 n.1

COMITÊ DE CONSULTORES - 2021

Adelaide de Sousa Veras
Adriana Santos Neves Ribeiro
Airton César da Silva Araújo
Aline Silvestre Pereira Dornelas
Alisson Macendo Amaral
Ana Clara Carneiro Fonseca
Ana Cristina de Menezes
Ana Paula Martins Guimarães
Ana Paula Monteiro da Silva Ribeiro
Andresa Priscila de Souza Ramos
André Ferreira dos Santos
Antonio Carlos
Bruna Tavares da Silva Brito Sousa
Claudio J. Barbedo
Daniel Ramos de Souza
Daniel Santana Colares
Daniela de Oliveira Luciano
Daniela Biondi
Damiana Beatriz da Silva
Débora C. M. de Moura
Débora dos Santos Rodrigues
Douglas Henrique Pereira
Eduardo da Silva Santos
Eduardo Henrique Rezende
Eliane Dalva Godoy Danesi
Felipe Camargo de Campos Lima
Gabriella Rayssa A da Silva Oliveira
Francisnei Pedrosa da Silva
Héberly Fernandes Braga
Hellen Cristina de Freitas
Irineu Ferreira da Silva Neto
Isabella Batista Barros
Isabella Monteiro Silva Galvão Dias
Jáder Nunes Cachoeira
Jamilie Brito de Castro
Janieri dos Santos Cardoso
Jhéssyka Yasminni L F F Felício
Jhonathan Moraes Resplandes

João Lucas Aires Dias
João Pedro Noletto
Josefa Andresa da S M Marinho
Joseila Maldaner
Josué Luiz Marinho Junior
Leanne Teles Pereira
Livia Santos Livia M de Lima Santos
Lorrainy Azevedo de Carvalho
Lorena Camargos de Souza
Luan Ramos da Silva
Luana Bezerra Montelo
Luana da Silva Botelho
Manuel Tomaz Ataíde Junior
Marcelo Tavares de Castro
Maria Eugenia Ortiz Escobar
Mathaus Messias Coimbra Limeira
Manuella Souza Silverio
Octavio Henrique Bernardes Barros
Pablo Timóteo da Silva
Paulo Alexandre Lima Santiago
Rafael Costa Schaidhauer de Almeida
Rafael Dal Bosco Ducatti
Rafael Rode
Raphael Nogueira Rezende
Rodolfo Medeiros Trinetto
Rodrigo Nunes da Rocha
Rita de Cássia Pompeu de Sousa
Samila Bezerra Lima
Schirley Aparecida Costalonga
Teian Zaheer
Thaiana Brunes Feitosa
Thiago Bitencourt
Thiago César Santos
Valdirene Neves Monteiro
Wendel dos Santos Moraes
Yusuky de Sousa Gomes

2022
vol.10 n.1

COMITÊ DE CONSULTORES - 2022

Aline Silvestre Pereira Dornelas
Ana Paula Martins Guimarães
Ana Paula Monteiro da Silva Ribeiro
Antonio Carlos Pereira de Menezes Filho
Carolina Rafaela Barroco Soares
Cylles Zara
Cristiano Bellé
Cristóvam Colombo Belfort Belfort
Dayane May
Douglas Azevedo Castro
Grasiele Soares Cavallini
João Henrique Silva da Luz
Leonardo Castro
Lívia Santos Lívia Maria de Lima Santos
Olavo da Costa Leite
Orivaldo Arf
Patrick Peres Oliveira
Pedro Alexandre da Cruz
Rodrigo Nunes da Rocha
Schirley Aparecida Costalonga
Warley Gonçalves
William Gustavo Sganzerla Jhéssyka
Yasminni L F F Felicio
Jhonathan Morais Resplandes

2022
vol.10 n.1

2022

JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY AND
BIODIVERSITY

JBB

páginas

Determinantes socioeconômicos da participação dos caçadores no comércio de carne de caça no estado de Ibadan Oyo, Nigéria

001-007

Bright Olunusi, Gbolagade Akeem Lameed, Patience Abosede Olunusi, Akinyode Timothy Olawumi

Estufa automatizada com circulação forçada de ar para secagem vertical de placas de Fibroína

008-015

Mayra Campista Corteletti, Pablo Prata de Almeida, Gerlane de Souza Pereira da Costa, Ewerton Lyrio Nascimento

Respostas fisiológicas de *Aechmea setigera* Mart. ex Schult. & Schult. f. (Bromeliaceae) cultivada in vitro

016-025

Tatiane Carine da Silva, Caroline Luiz, Maiby Teodoro de Oliveira, Marcelo Borghezán, Rosete Pescador, Paulo Cesar Poeta Fermino Junior

Aplicação de tanase obtida de *Aspergillus tamarii* URM 7115 e seu efeito em suco de caju integral

026-033

Miqueas Jamesse Gouveia, Marcelo Rodrigues Figueira de Mello, Tatiely Gomes Bernardes, Tonny Cley Campos Leite, Amanda Reges de Sena

Avaliação fitoquímica e atividades biológicas do extrato do exocarpo do fruto de *Protium spruceanum*

034-043

Antonio Carlos Pereira de Menezes Filho

Análise bioeconômica da relação custo-benefício de dois protocolos de IATF utilizados em vacas zebuínas

044-050

Jorge Luís Ferreira, Matheus Henrique Dias Rodrigues, Gabriel Almeida Peres, Murilo Ferreira da Silva Junior, Mário Antônio Vilches Júnior, Helcileia Dias Santos, José Bento Serman Ferraz

2022
vol.10 n.1

Foto: Cristine Vanz Borges

2022

JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY AND
BIODIVERSITY

JBB

páginas

**Germinação de sementes de *Handroanthus serratifolius* (Vahl) S. O.
Grose em substrato contendo resíduos agroindustriais**

051-060

Carolina Rafaela Barroco Soares, Karen Janones da Rocha, Kenia Michele de Quadros Tronco

**Rendimento do filé de tucunaré (*Cichla cf. monoculus*) Osteichthyes,
Cichlidae em diferentes cortes da cabeça**

061-067

Shirley Silva Cosme, Alex Guimarães Sanches, Maryelle Barros da Silva, Elaine Gleice Silva Moreira, Carlos Alberto Martins Cordeiro

**Alternativas ao paraquat para o controle químico de azevém, aveia e
buva**

068-074

Alfredo Junior Paiola Albrecht, Leandro Paiola Albrecht, Mauricio Paulo Batistella Pasini, André Felipe Moreira Silva, Willian Felipe Larini, Debora Cristine Neuberger

**Doses de nitrogênio em cultivares de feijão-comum em sistema plantio
direto recém-instalado**

075-083

Almir Salvador Neto, Anderson Prates Coelho, Orlando Ferreira Morello, Leandro Borges Lemos, Fabio Luiz Checchio Mingotte

**Biocontrole de *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense por *Pseudomonas*
spp. em banana "Prata anã"**

084-093

Biocontrol of *Fusarium oxysporum* in banana by *Pseudomonas*

Lara Cristine da Silva Vieira, Cristine Vanz Borges, Shirley Nascimento Costa, Zalmar Santana Gonçalves, Bruno Laecio da Silva Pereira, Fernando Haddad

**Efeito do nitrogênio mineralizado através da decomposição de resíduos
vegetais na absorção de milho (*Zea mays* L.) na zona ecológica da sava-
na sudanesa da Nigéria**

094-101

Noah Alabi Oyebamiji, Oluwatoyin Abimbola Babalola, David Olusegun Adelani

2022
vol.10 n.1

Foto: Cristine Vanz Borges



Socioeconomic determinants of hunters' participation in bush meat trade in Ibadan Oyo State Nigeria

Bright Olunusi^{a*}, Gbolagade Akeem Lameed^a, Patience Abosede Olunusi^b, Akinyode Timothy Olawumi^b

^a University of Ibadan, Nigeria

^b Tai Solarin University of Education, Nigeria

* Autor correspondente (bolunusi212@gmail.com)

INFO

Keywords

profit
drivers
wild meat
wildlife trade

ABSTRACT

This study investigated the socio-economic determinants of hunters' participation in bush meat trade in Ibadan metropolis. Egbeda Local Government and Oluyole Local Government were purposively selected based on the intensity of bush meat trade there. Thirty percent of the population of registered hunters in these Local Government areas were randomly selected. A total of 126 respondents were interviewed through the use of a semi-structured questionnaire. Data obtained were analyzed through descriptive statistics and inferential analysis. The result revealed that (100%) of the respondents were men with majority (93.7%) of them within the age of 20-50 years. Majority (61%) had primary education while others (38%) had secondary education. Forty-four percent, 35% and 21% had 11-15, above 15 and below 10 years working experience respectively. More than half (61.5%) of the respondents engaged in hunting as their primary occupation while 14.3% combined farming with hunting. The average weekly profit made by hunters' ranges from N4,000 to N50,000. Pearson Correlation analysis shows no significant relationship between years of experience and weekly profit ($p < 0.05$). It also showed a statistically significant relationship between weekly profit and the months of highest abundance of bush meat to hunters ($p < 0.05$). The study concludes that wildlife trade in the study area is influenced by level of education, limited alternate source of income and the profitability of the trade. The study recommends that the Government should implement working policies that will help to regulate and reduce over exploitation of wildlife; enhance the efficiency of wildlife trade and ensure its continuity.

RESUMO

Palavras-chaves

lucro
motoristas
carne silvestre
comércio da vida selvagem

Determinantes socioeconômicos da participação dos caçadores no comércio de carne de caça no estado de Ibadan Oyo, Nigéria. Este estudo investigou os determinantes socioeconômicos da participação dos caçadores no comércio de carne de caça na metrópole de Ibadan. O Governo Local de Egbeda e o Governo Local de Oluyole foram propositalmente selecionados com base na intensidade do comércio de carne de caça lá. Trinta por cento da população de caçadores registrados nessas áreas do Governo Local foram selecionados aleatoriamente. Um total de 126 respondentes foram entrevistados por meio de um questionário semiestruturado. Os dados obtidos foram analisados por meio de estatística descritiva e análise inferencial. O resultado revelou que (100%) dos entrevistados eram homens com maioria (93,7%) deles na faixa etária de 20 a 50 anos. A maioria (61%) tinha o ensino fundamental e os demais (38%) o ensino médio. Quarenta e quatro por cento, 35% e 21% tinham 11-15, acima de 15 e abaixo de 10 anos de experiência de trabalho, respectivamente. Mais da metade (61,5%) dos entrevistados tinha a caça como ocupação principal, enquanto 14,3% combinavam a agricultura com a caça. O lucro médio semanal dos caçadores varia de N4.000 a N50.000. A análise de correlação de Pearson não mostra relação significativa entre anos de experiência e lucro semanal ($p < 0,05$). Também mostrou uma relação estatisticamente significativa entre o lucro semanal e os meses de maior abundância de carne de caça aos caçadores ($p < 0,05$). O estudo conclui que o comércio de vida selvagem na área de estudo é influenciado pelo nível de educação, fonte alternativa limitada de renda e a lucratividade do comércio. O estudo recomenda que o Governo implemente políticas de trabalho que ajudem a regular e reduzir a exploração excessiva da vida selvagem; aumentar a eficiência do comércio de vida selvagem e garantir a sua continuidade.

Received 13 September 2021; Received in revised from 25 January 2022; Accepted 15 February 2022



INTRODUCTION

Bush meat is one of the most valued non timber forest products especially in Africa. It ranges from small sized terrestrial wild animal like bush rat to very big sized terrestrial wild animal like the Elephant. We also have some aquatic freshwater animals like the crocodile that are regarded as Bush meat. It has served as a vital source of animal protein, helping to fight against food insecurity in areas with little or no alternatives sources of protein (Fa and Nasi, 2015).

Bush meat has also served as a major source of income to hunters who engage in bush meat trade (Loibooki et al., 2013). This trade in its economic sense, has helped a lot of rural dwellers to afford to live above the poverty level or to supplement their other means of livelihood. The prices of wild animal and the profit made from the trade by the hunters is a source of motivation to continue trading.

However, this increase in bush meat trade has led to a major threat to the population of wild animals in existence. Wittemeyer et al. (2014) stated that wildlife populations in Africa is currently being faced with a lot of anthropogenic threats ranging from human population growth leading to land encroachment, habitat destruction and illegal hunting of wildlife. Akinsoratan et al. (2020) noted that the major urge for commercial scale bush meat trade goes beyond hunting for consumption but for the market sales derived by the hunters. Such turn out of event is a bigger threat to conservation beyond subsistence hunting (Duffy et al., 2016).

The need to study the social and economic drivers of hunters for participating in bush meat trade cannot be overemphasized. Unemployment or underemployment of hunters (Lindsey et al., 2011) are key economic factor that motivates bush meat hunting and trade. Some social factors that drives bush meat hunting and trade are ethnic groups, social status, taste and preferences. There is variance in the level of trade among different ethnic groups in Africa (Ceppi and Nielsen, 2014). Some also believe that they garner more prestige and social status from the copious number and enormous sizes of bush meat they are able to hunt (Lindsey et al., 2013). Gender is another predominant factor that drives hunting and trade of bush meat. Hunters are predominantly male, therefore, male children born into the family of a hunter automatically becomes the next hunter in line to continue the family business (Guy et al., 2004).

The main thrust of this research is to examine the social and economic factors that serves as determinants of hunters' participation in wildlife trade in Ibadan ranging from the age, gender, tribe,

educational background, marital status, occupation and profit.

MATERIAL AND METHODS

This study was carried out in Egbeda Local Government and Oluyole Local Government within Ibadan metropolis. The areas were purposively selected based on the predominance of bush meat trade in those local governments. Ibadan is at longitude 7° 2' and 7°40'E and latitude 3° 35' and 4° 10'N is the largest indigenous city in tropical Africa and it is the capital of Oyo State, Nigeria. Ibadan is 128 km north-east of Lagos and 345 km south-west of Abuja, the Federal Capital Territory (Oduntan et al., 2016).

Egbeda Local Government is at longitude 3° 58' and 2° 88'E and latitude 7° 22' and 46.55'N. It was carved out of Lagelu Local Government in 1989 with the administrative headquarters at Egbeda. The Local Government Area shares boundaries with Osun to the East, Lagelu Local Government to the North, Ibadan North east Local Government to the west and Ona Ara Local Government to the South. Egbeda Local Government consist of eleven wards and Asejire market is located within this Local Government.

Oluyole Local Government is at latitude 7°13'59.99" N and longitude 3°52'0.01" E. It is one of the oldest Local Government council in Oyo State. The Local Government has its headquarters at Idi-Ayunre Old Lagos/Ibadan road. It shares boundaries with four Local Government Area which are; Ibadan South-West, Ibadan South-East, Ona-Ara and Ido all within Ibadan Metropolis. While it shares boarders with Ogun State through Egbeda-Obafemi, Odeda and Ijebu-North Local Government Areas. There are ten wards within the local government which includes Odo ona kekere where we can find one of the major bushmeat market in Ibadan.

Both primary and secondary data were used for this study. Primary data were obtained from hunters using semi-structured questionnaire. There are 11 wards at Egbeda Local Government, and 10 wards at Oluyole Local Government. This makes a total of 21 wards. We have an average number of 20 registered hunters in each wards. Therefore, the total estimated number of hunters in Oluyole and Egbeda Local Government is 420. Thirty percent of these population of registered hunters (n=126) was selected using random sampling. Data generated were analyzed using Statistical Package for Social Sciences (version 21). It was subjected to: Descriptive statistics such as frequency and percentage; Inferential statistics such as Correlation, ANOVA and Regression and the

RESULTS AND DISCUSSION

Table 1 shows the socio-demographic characteristics of respondents. All (100%) of the

actors involved in bush meat hunting are males. This is in line with the findings of Guy et al. (2004) in a survey of bush meat commodity chain in West Africa that states that all hunters are male.

Table 1 - Frequency distribution on demographic characteristics of bush meat hunters

Background Information	Label	Frequency (f)	Percentage
Sex	Male	126	100
	Female	0	0
Age	<20	-	-
	20-30	25	20
	31-40	55	43.7
	41-50	38	30
	>50	8	6.3
Education	Primary education	78	61.9
	Secondary education	48	38.1
Years of experience	<6	9	7
	6-10	18	14
	11-15	55	44
	16-20	20	16
	21-25	16	13
	>25	8	6

Majority (93.7%) of the bush meat hunters in the study area are within the economically active age of 20-50 years with those within the range of 31-40 (43.7%) predominating. This was also confirmed by the research carried out by Akinsorotan et al. (2020) in his research on dynamics and socio economic drivers of illegal hunting of wild animals for consumption in Oba Hills Forest Reserves in Southwestern Nigeria stating that majority of the hunters fell within the active age group of 31-40.

Over 61% of the respondents had primary school leaving certificates while about 38% had the senior secondary school certificates. None of the respondents had tertiary education. This is in contrast with the findings of Adedapo and Adekunle (2013) that stated that most (76.7%) of those involved in bush meat sales in South-Eastern Nigeria had tertiary education. This will in a large way have a diverse effect on wildlife trade and also, it will tell on the level of understanding of the respondents about the term “Conservation”. Osunsina et al. (2016) in the research on “Bush meat Harvest and Trade in Ikorodu Local

Government” and also Adekunle et al. (2012) discussed that there is a significant relationship between level of education and the knowledge of wildlife conservation and sustainable use. The more educated those involved in the trade are, the more willing they are to conserve and sustainably utilize the wildlife resources.

Furthermore, it is shown in table 1 above that 44% of the respondents had working experience of 11-15 years, 35% had 16 years or more experience, 14% had working experience ranging from 6-10 years while a few (7%) of them had less than 6 years working experience. This is similar to the result of Adefalu et al. (2012) that explained that majority (95%) of those involved in the trade of wildlife has more than 5 years working experience and this makes their perception about wildlife valid enough to be reckoned with.

Figure 3 below shows that more than half (65.1%) of the respondents' primary occupation is hunting only while 14.3% combined hunting with farming, 6.3% are primarily mechanics while another 6.3 are basically are truck drivers.

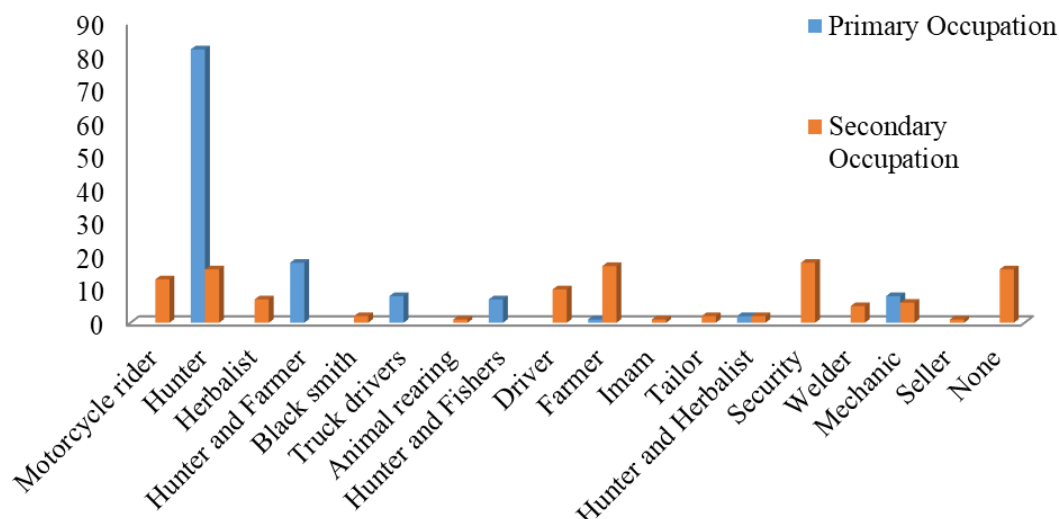


Figure 3 - Hunters' occupation

It also revealed that most of the respondents have one form of secondary occupation or the other that serves as subsidiary source of income to them apart from hunting and only 16 (12.7%) have no other source of income. Considering the diversity in the alternate sources of income amidst the respondent, we can infer that the income gotten from the other sources is not enough to sustain them hence, the need to keep hunting. The low level of education does not afford them the opportunity to get well paid jobs that could enhance their income earning abilities (Akinsorotan et al., 2020). This corroborate the findings that the more educated ones do not engage in hunting as much as those that

are not so educated (Wilfred and MacColl, 2010; Moro et al., 2012).

Duffy et al. (2016) and Lindsey et al. (2013) also explained that most people involved in farming will most likely involve in hunting, using the money garnered from farming to get better hunting equipment. This is evidenced in the result in Figure 3 above that majority (14.3%) of those who chose farming as their primary occupation coupled it with hunting.

Figure 4 revealed that most (90.5%) of the hunters have abundant bush meat catch between December to March while the others (9.5%) said they have such abundance between April to July.

■ December- March ■ April-July

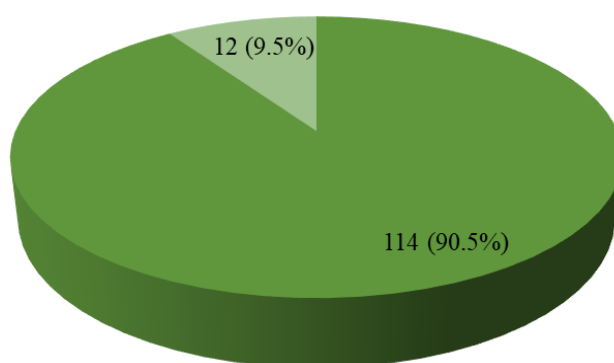


Figure 4 - Month of abundance of bushmeat

It shows that the highest sales do occur at Dry season and this is because at that season, there is little or no rain. The animals are forced to come out and search for food and water, making them highly exposed to predators (Bifarin et al., 2008). High degree of bush burning that occurs at dry season is

also a reason for habitat loss of animals and this in turn make them more visible to the hunters.

Results in Table 2 above also revealed that the weekly profit made by bush meat hunters ranges from N4,000 (\$9.69) to N 50,000 (\$121).

Table 2 - Frequency distribution showing profit made by Hunters

Questions	Response (₦)	Frequency	Percentage
How much do you make per week (Profit)	4,000	5	4.0
	5,000	5	4.0
	6,000	3	2.4
	7,000	3	2.4
	10,000	21	16.7
	12,000	10	7.9
	15,000	16	12.7
	20,000	24	19.0
	25,000	4	3.2
	30,000	9	7.1
	40,000	13	10.3
	50,000	4	3.2
	I can't say	6	4.8
	Depend on how well I kill	3	2.4

This reveals that trade in bush meat is very lucrative. Hence, a lot of bush meat traders will long to continue such business to help improve their means of livelihood. This is corroborated by the work of Osunsina et al. (2016). Adefalu et al. (2012) also stated that the range of profit made by bush meat traders ranges from as little as N5000 to above N 20,000. This further shows how profitable the trade of wildlife can be. However, if not

properly managed can cause a great decline in number of animals in the wild and can result in extinction. This will in turn affect the bushmeat trade (Tee et al., 2012).

The results of Pearson Product Correlation in Table 3 shows that there is no statistically significant linear relationship ($P < 0.05$) between the years of experience and weekly profit had.

Table 3 - Pearson correlations

Variables	R	N	P-value	Decision
Year of experience vs amount make per week	0.011	117	.909	Not Sig
Month of abundance of bush meat vs. Amount made per week	0.224	117	.015	Sig

Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).

The Pearson correlation ($r = 0.11$) shows that though the magnitude of association is positive, it is weak. It also revealed that there is a statistically significant linear relationship ($P < 0.05$) between the month (December-March) hunters experience abundance of bush meat and the weekly profit they have. It showed that the two variables are positively correlated ($r = 0.224$), that is during the month of December till March there will be increase in the weekly profits made due to abundance of bush meat at such times.

CONCLUSIONS

The study concludes that, with the current scale of operation, wildlife trade in the study area is influenced by level of education, lack of substantial alternate source of income and the high profitability

of the trade. The trade is highly profitable and has great potentials in contributing to the economic wellbeing of traders engaged it. The study recommends that the Government should implement working policies that will help to regulate and reduce over exploitation of wildlife and enhance the efficiency of wildlife trade as well as ensure the continuity of such trade.

REFERENCES

- Adedapo AA, Adekunle AO. Economic aspects of grass cutter farming in southwest Nigeria: implications for sustained adoption and conservation. *International Journal of Scientific and Engineering Research*, v.4, n.10, p.17-23, 2013.
- Adefalu LL, Oladipo FO, Usman BA, Babalola FD, Amusa TO, Egere S. Rural women perception on bushmeat trade

- around Kainji Lake National Park, Niger State, Nigeria. *Ethiopian Journal of Environmental Studies and Management*, v.5, n.1, p.20-25, 2012. <https://doi.org/10.4314/ejesm.v5i1.3>
- Adekunle MF, Shotuyo ALA, Osunsina IOO, Odebiyi BR. Economic valuation of wild animal species in Odeda local government area, Ogun State, Nigeria. *Journal of Agriculture, Forestry and the Social Sciences Wild (JOAFSS)*, v.10, n.1, p.227-238, 2012. <https://doi.org/10.4314/joafss.v10i1.22>
- Arkkelin D. Using SPSS to understand research and data analysis. *Psychology Curricular Material*, v. 1. 2014.
- Akinsorotan O, Olaniyi O, Oguntuase B, Raheem T. Dynamics and socioeconomic drivers of illegal hunting of wildlife animal for consumption in Oba Hills forest reserve in Southwest Nigeria. *Journal of Applied Science Environmental Management*, v.24, n.2, p.287-298, 2020. <https://doi.org/10.4314/jasem.v24i2.15>
- Bifarin JO, Ajibola ME, Fadiyimu AA. Analysis of marketing bushmeat in Idanre local government area of Ondo State, Nigeria. *African Journal of Agricultural Research*, v.3, n.10, p.667-671, 2008.
- Cepi SL, Nielsen MR. A comparative study on bushmeat consumption patterns in ten tribes in Tanzania. *Tropical Conservation Science*, v.7, n.2, p.272-287, 2014. <https://doi.org/10.1177/194008291400700208>
- Duffy R, St John FA, Buscher B, Brockington D. Towards a new understanding of the links between poverty and illegal wildlife hunting. *Conservation Biology*, v.30, n.1, p.14-22, 2016. <https://doi.org/10.1111/cobi.12622>
- Fa JE, Nasi R. The role of bush meat in food security and nutrition. XIV World Forestry Congress, Durban, South Africa, p.1-11, 2015. <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.3510.1926>
- Guy C, Samantha M, Rowcliffe JM. The Bushmeat Commodity Chain: patterns of trade and sustainability in a mature urban market in West Africa. *Wildlife Policy Briefing*, n.7 p.1-4, 2004.
- Lindsey PA, Romañach SS, Matema S, Matema C, Mupamhadzi I, Mvengwi J. Dynamics and underlying causes of illegal bushmeat trade in Zimbabwe. *Oryx*, v.45, n.1, p.84-95, 2011. <https://doi.org/10.1017/S0030605310001274>
- Lindsey PA, Balme G, Becker M, Begg C, Bento C, Borchino C, Dickman A, Diggle RW, Eves H, Henschel P, Lewis D, Marnewick K, Mattheus J, McNutt W, McRobb R, Midlane N, Milanzi J, Morley R, Murphree M, Opyene V, Phadima J, Purchase G, Rentsch D, Roche C, Shaw J, Westhuizen HVD, Vliet NV, Zisadza-Gandiwa P. The bushmeat trade in African savannas: impacts, drivers, and possible solutions. *Biological Conservation*, v.160, p.80-96, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2012.12.020>
- Loibooki M, Hofer H, Campbell K, East M. Bushmeat hunting by communities adjacent to the Serengeti National Park, Tanzania: the importance of livestock ownership and alternative sources of protein and income. *Environmental Conservation*, v.29, n.3, 2002. <https://doi.org/10.1017/S0376892902000279>
- Moro M, Fischer A, Czajkowski M, Brennan D, Lowassa A, Naiman LC, Hanley N. An investigation using the choice experiment method into options for reducing illegal bushmeat hunting in western Serengeti. *Conservation Letters*, v.6 n.1, p.37-45, 2012. <https://doi.org/10.1111/j.1755-263X.2012.00284.x>
- Osunsina IOO, Soaga JA, Oduntan OO, Yisau MA, Kamoju MM. Bushmeat harvest and trade in Ikorodu Local Government Area of Lagos State, Nigeria. *African Journal of Agriculture, Technology and Environment*, v.5, n.1, p.15-28, 2016.
- Tee TN, Ikpa TF, Tortange V. Bush meat trade in Makurdi Metropolis; implications for the conservation of wildlife in Nigeria. *Journal of Applied Biosciences*, v.52, p.3704-3715, 2012.
- Wilfred P, MacColl ADC. Income sources and their relation to wildlife poaching in Ugalla ecosystem, Western Tanzania. *African Journal of Environmental Science and Technology*, v.4, n.12, p.886-896, 2010.
- Wittemyer G, Northrup JM, Blanc J, Douglas-Hamilton I, Omondi P, Burnham KP. Illegal killing for ivory drives global decline in African Elephants. *Proceedings of The National Academy of Sciences USA*, v.111, n.36, p.13117-13121, 2014. <https://doi.org/10.1073/pnas.1403984111>



Automated greenhouse with forced air circulation for vertical drying of Fibroin plates

Mayra Campista Corteletti^{a*}, Pablo Prata de Almeida^b, Gerlane de Souza Pereira da Costa^b, Ewerton Lyrio Nascimento^c

^a Multivix Serra - Ensino, Pesquisa e Extensão Ltda, Brasil

^b Escola Superior São Francisco de Assis, Brasil

^c Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Espírito Santo, Brasil

* Autor correspondente (mayra.corteletti@gmail.com)

INFO

Keywords

device
automation
greenhouse
fibroin

ABSTRACT

In processing applied to drying samples that require a parameter with greater specificity, the internal temperature control and the homogenization of the equipment chamber is fundamental in reducing the risks of modifications to active principles, which makes greenhouses with forced air circulation widely used and viable for such applications. The present project aims to the elaboration and construction of greenhouse with forced air circulation through of easily accessible materials, with automation by Arduino, being developed for vertical drying of Fibroin plates. In addition to conducting specific tests and statistical applications for validation of the same. Characterized in an experimental study, with material selection and appropriate equipments, elaboration and construction of the system in an economically viable way with standardized and controlled operation. In view of the aspects observed, achieved the development of a prototype of the equipment, verifying its functionality within the objectified parameters. Featuring a good alternative in the performance of the drying process of fibroin plates with good control of the estimated factors.

RESUMO

Palavras-chaves

dispositivo
automação
estufa
fibroína

Estufa automatizada com circulação forçada de ar para secagem vertical de placas de Fibroína.

Em processamentos aplicados a secagem de amostras que exigem um parâmetro com maior especificidade, o controle da temperatura interna e a homogeneização da câmara do equipamento é fundamental na redução de riscos de modificações aos princípios ativos, o que torna as Estufas com circulação forçada de ar amplamente utilizadas e viáveis para tais aplicações. O presente projeto tem como objetivo a elaboração e a construção de estufa com circulação forçada de ar a partir de materiais de fácil acesso, com automação por Arduino, sendo desenvolvida para secagem vertical de placas de Fibroína. Além da realização de testes específicos e aplicações estatísticas para validação. Caracterizando em um estudo experimental, com seleção de materiais e equipamentos apropriados, elaboração e construção do sistema de forma economicamente viável com funcionamento padronizado e controlado. Tendo em vista os aspectos observados, alcançou-se o desenvolvimento de um protótipo do equipamento, constataando sua funcionalidade dentro dos parâmetros objetivados. Apresentando uma boa alternativa na atuação do processo de secagem das placas de Fibroína com um bom controle dos fatores estimados.

Received 06 November 2020; Received in revised from 26 December 2020; Accepted 21 February 2022



INTRODUCTION

Greenhouses with forced air circulation are widely used in procedures with greater internal temperature control and homogenization of the camera. Generally applied in the drying of plant samples allowing the reduction of risks of modifications to the active principles during processing.

By functional standard, the structure of greenhouses are basically constituted by a stainless steel camera with shelves, internal access door with silicone sealing and a set control system, what for the most part is composed of resistance, thermostat, engine for forced air circulation, temperature sensor and electronic controller.

Therefore, the main objective of the project is the development of greenhouse with forced air circulation for vertical drying of Fibroin plates obtained from silkworm cocoons (*Bombyx mori*), constructed with easy obtaining and low cost materials, being automated by means of the ATmega 2560 microcontroller, contained in arduino Mega 2560 board, with programming developed in the software Arduino Integrated Development Environment (IDE).

Arduino is the most popular tool in the development of IoT products from open source hardware and software, becoming the main one in the segment in the world. Widely used by hundreds of thousands of people, from the students to large corporations in the application of intelligent systems (Banzi, 2010; Monk, 2017).

Specifically the Arduino Mega 2560 has interesting capabilities for applications in more elaborate projects. Based on the 8 bit ATmega2560 microcontroller, possessing 256 KB of Flash memory with 8 KB addition to bootloader, , 8 KB of RAM and 4 KB of EEPROM, with 16 MIPS operating at 16 MHz. Having 16 analog inputs, 54 digital pins, in which 15 with PWM feature, 4 serial communication ports, having yet SPI and I2C communication, in addition to 6 external interrupt pins (MONK, 2017).

The Fibroin plates to be dried in the greenhouse, are obtained through a series of processes in an elaborate equipment and sampled in a previous study. In which, among the steps, constitutes the process of removing Sericin, rinse for removal of waste from the process and formation of the plates.

The silk thread of *Bombyx mori* is formed by two protein monofilaments, called brins, wet in a Sericina cover. Brins are filaments of Fibroin consisting of bundles of nanofibrils, arranged side by side to the fiber shaft, and are believed to interact with each other strongly (Altman et al., 2003; Hakimi et al., 2007).

Bombyx mori Fibroin is composed mainly of

glycine (43%), alanine (30%) and serine (12%), formed by two polypeptide chains: a short one with approximately 26 kDa, and a long one with approximately 390 kDa, present in a 1:1 ratio, united by disulfide bond (Macintosh et al., 2008; Zhou, 2000).

Currently, several studies explore their potential in biomedical applications aiming develop substitutes for various tissues of the human body. Featuring numerous desirable features for application in tissue engineering due to its biocompatibility, low immunogenicity, limited bacterial adhesion and tunable biodegradability. With FDA approval, The silk is one of the best natural biopolymers for dressings (Ma, 2004).

In this way, aimed at such applications, becomes essential the edification of a system with high processing capacity and control of process parameters ensuring standardization of samples according to the specified settings.

MATERIALS AND METHODS

Experimental study focused on the elaboration and development greenhouse with forced circulation of automated by means of an Arduino Mega 2560 microcontroller board, programmed through the software Arduino Integrated Development Environment (IDE) translated into C++ programming language accordance with the established parameters, monitored by means of temperature and humidity sensor, determining the activation of the heating system and air circulation according to temperature requirements and processing time selected by means of push-buttons.

Initially, focused on the elaboration of three-dimensional projective drawings with markers and geometric orientations specific to the system, directing your assembly order and structural distributions. Using an electronic design automation tool, through Fritzing software is elaborated the schematic diagram of connection of the system components and the squeamatic for production of the printed circuit board of the control panel.

For building the greenhouse in an economically viable way and in a way that would make it possible to evaluate its aspects of functionality and applications, focused on the search for easily accessible materials and compatible properties for its construction, for example: plywood, external power supplies, 12V cooler, push-buttons, electrical sockets and connectors, wires of several millimeters, crystal hoses siliconized and spiral flexible conduits.

With the proper materials selected the materialization of the greenhouse was achieved,

carrying out its construction from a rectangular three-dimensional structure of plywood coated internally with layers of aluminum foil. On its front extremity, an aluminum door with glass has been installed for access and better viewing during the procedure with the aid of a light attached to the background.

The heating system, has been installed in the lower and upper part of the box a 127V electrical resistance bar with 800W of power. The airflow circulation system was carried out with the installation of a 12V fan with seven blade propeller coupled, centrally installed to the bottom of the structure.

The vertical drying of fibroin plates is carried out by means of a grid with horizontal bars, allowing coupling with an attachment system of individual bars with specific spacing hooks for attaching the plates, ensuring greater ease in handling the samples, increasing your internal capacity and facilitating air circulation inside the box.

The reading of the temperature and internal humidity of the greenhouse is evaluated by means of a centrally installed AM2302 DHT22 model sensor. With humidity measurement range of 0 the 100% with accuracy of $\pm 2\%$ and with temperature measurement range between 233.15 K the 353.15 K with accuracy of ± 0.50 in an average response time of 2 seconds.

For system validation, statistical analyses is performed with Minitab 19 software, using time series studies to look for patterns and observe the behavior of temperature and humidity data over

time, in addition to determining the mean time required for internal stabilization of the factors. Through control charts, will be determined whether the process is stable and under statistical control, allowing detect the presence of special causes or unexpected variations that affect the process. Through the construction of histograms, will be examined the way and dispersion of the data using bars to show the frequency of each range. Contour plot will be elaborated to examine the relationship between a response variable (Humidity) and two predictor variables (Time and Temperature), allowing to correlate both through discrete contours of the predicted response variable.

The data collection and sample size, is carried out according to the recommendations of the software itself for each type of analysis, also taking into account, characteristics of the process. Therefore, focused on evaluating the process characteristics of the greenhouse operating in its maximum temperature setting set for the drying process, providing indicative values to calibration adjustments and functional capacity assessment.

RESULTS AND DISCUSSION

Following the proposed planning, the functionality of the greenhouse with forced air circulation was verified according to the objective. The Figure 1, demonstrates the built greenhouse and its control and monitoring panel. However, they are attached to another structure belonging to an external equipment under development.

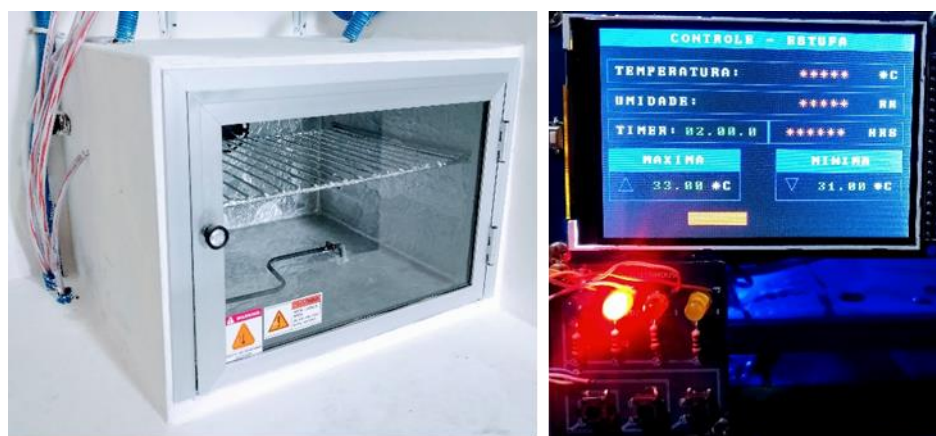


Figure 1 - Developed greenhouse and control panel and monitoring

Through Fritzing software, It's been designed the schematic diagram of connection of the system

components (Figure 2) and the schematic of the printed circuit board of the control panel.

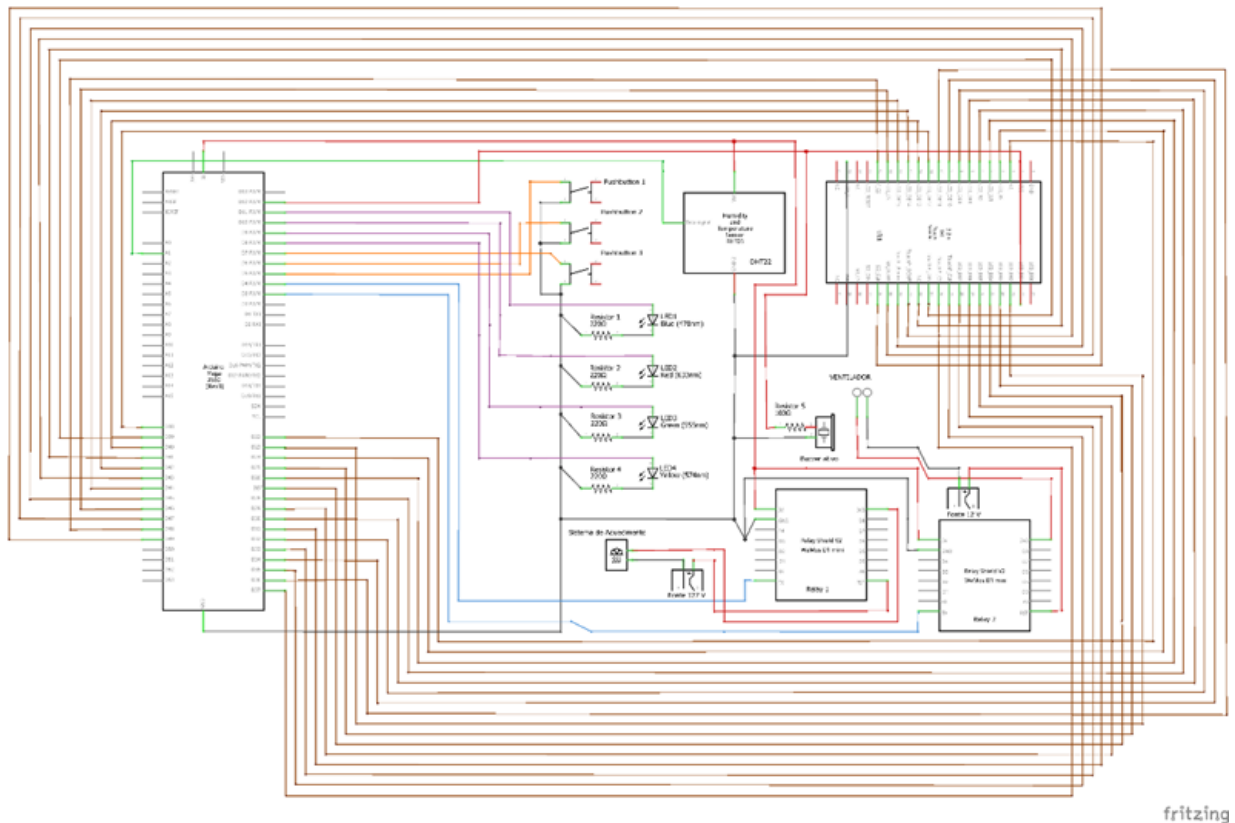


Figure 2 - Schematic diagram of connection of system components

The printed circuit board is designed in a simple face with 0.8 mm diameter drilling and 0.3 mm of thickness of the ring, which was made through the squematic (Figure 3 A) laser printed on a sheet of high glossy photo paper 180 gm², transferred to a copper clad board by heat. Subsequently, using an iron perchlorate solution in concentration of 42 %, the copper clad board was submerged for 1800 seconds for copper corrosion. Drilling was carried

out with a specific diameter drill and with the aid of an aluminum sponge the printed drawing has been removed, leaving so only the projected copper tracks.

The top surface of the printed circuit board (Figure 3 B) was printed on a sheet of adhesive paper and fixed aligned with rails and holes about the copper clad board, allowing better orientation for attaching electronic components.

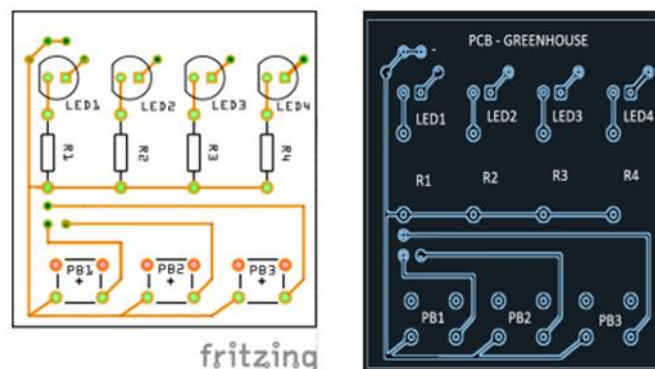


Figure 3 - (A) Squeamatic printed circuit board, bottom surface (B) printed circuit board, top surface

It was elaborated a control panel for settings and processing monitoring, consisting basically of three push-buttons connected in INPUT PULLUP mode on digital doors of the Arduino Mega 2560 and on its GND. Being a push-button for setting processing time, other for maximum internal temperature

setting and finally the system actuating.

For indication, a set of LEDs was installed connecting their anode type terminals to digital doors of the Arduino Mega 2560 and the catodo type terminals connected to resistors of 220 ohms connecting on your GND, in which the blue LED

indicates the activation of the heating system, red LED indicating that the equipment is not in running mode, Green LED indicating that the equipment is in running mode and yellow LED indicating that the procedure has been completed. It is also possible to monitor the situation of the equipment through the display of vital information on a TFT 3.2" ILI9341 LCD Display with resolution of 240×320 pixels with direct coupling on the microcontroller.

The installation of the AM2302 DHT22 sensor consisted of connecting your VCC terminal connected to the 5 V of the Arduino Mega 2560 and another terminal connected to the GND. Being the data transition accomplished by a connection between the DATA terminal with an analog port.

The activation of the heating system is carried out by means of a rele module with output voltage of 250 VAC and 30 A, connected to the 5 V, GND and digital pin of the Arduino Mega 2560. In your common terminal (Represented only for illustration in the squematic as RST port) has been connected to the VCC from a 127 V external power supply, In followed coming out a cable of the normally open terminal (Represented only for illustration in the squematic as 3V3 port) linking directly to the VCC of electrical resistance. The GND terminal of electrical resistance is connected directly to the GND of the external power supply.

While in the second module rele with output voltage from 30 VDC to 10 A or 250 VAC to 10 A, is installed the airflow system, in which the VCC terminal of the 12 V fan is connected to the normally open terminal (Represented only for illustration in the squematic as 3V3 port) of the rele. In your common terminal (Represented only for illustration in the squematic as RST port) has been connected to the VCC from an external 12 V power supply. The GND terminal of fan is connected directly to the GND of the external power supply.

The programming developed allows the selection of the processing time of the greenhouse, also displaying a timer for monitoring the remaining time for finalization, with indicative audible alarm triggering. Allowing the definition of maximum operating temperature with staggered addition of 2 ranging from 303.15 to 323.15 K (Temperature range established for the process), in which the current internal temperature and humidity is displayed with an update rate of 2 seconds. In this way, with the parameters set the microcontroller takes control of operation through the control of the reles connecting and unplugging the air circulation systems and heating so that it always remains under the defined conditions.

All procedure record can be tracked on the Serial monitor of the Arduino Integrated Development

Environment software, in which fundamental data on the executing of programming is presented, recording the time of initiation and completion of the procedure, temperature, internal humidity of the greenhouse, activation and shutdown of the reles throughout the process, thus enabling, the providing of data for statistical analysis of the process, interpretation of procedure and assessment for equipment calibration.

The equipment designed has a safety system in case of error during the process. In the event of failure to transfer data from the temperature and humidity sensor, the system immediately registers informing the interval of events of the error, in addition to pausing the activation of the reles, thus preventing the internal temperature from exceeding the selected temperature, returning its operation after data return. If the transmission fails, representative figures is displayed on the display, in addition to the activation of all indicative LEDs and audible alarm activation.

The data collection for statistical control, consisted of evaluating the operation of the equipment over a time period of 4800 seconds. During the process, the data was recorded on the serial monitor Arduino Integrated Development Environment software at an average interval of 2 seconds (DHT22 sensor response time). Subsequently, copied to a TXT file, imported into Excel for organization and table generation.

For time series analysis, the initial period of 3600 seconds of the process was isolated, to determine the objective parameters. Due to the registration of the DHT22 sensor not occurring in an exact time interval, a total sample of 1680 registered data was generated, which were divided into subgroups of 15 data and calculated your average, simulating a record every 30 seconds, generating a final sample with 112 record averages. The same process, was applied for data generation used in control charts, histogram and contour plot, however, using the final 3600 seconds period of the process, for verification of stability and suitability of the same.

The average data was calculated, due to the fact that the record happens in a relatively short interval, which generates data with small variances from each other during the 30:00 seconds period, thus enabling better fit of the sample size to be worked and plotted in the graphs.

The Figure 4 shows the time series charts generated for temperature and humidity. In which, on the left side is plotted the total set of samples. While on the right side the samples were plotted from the starting point of stabilization, enabling an magnification of the distribution visualization over the analyzed time.

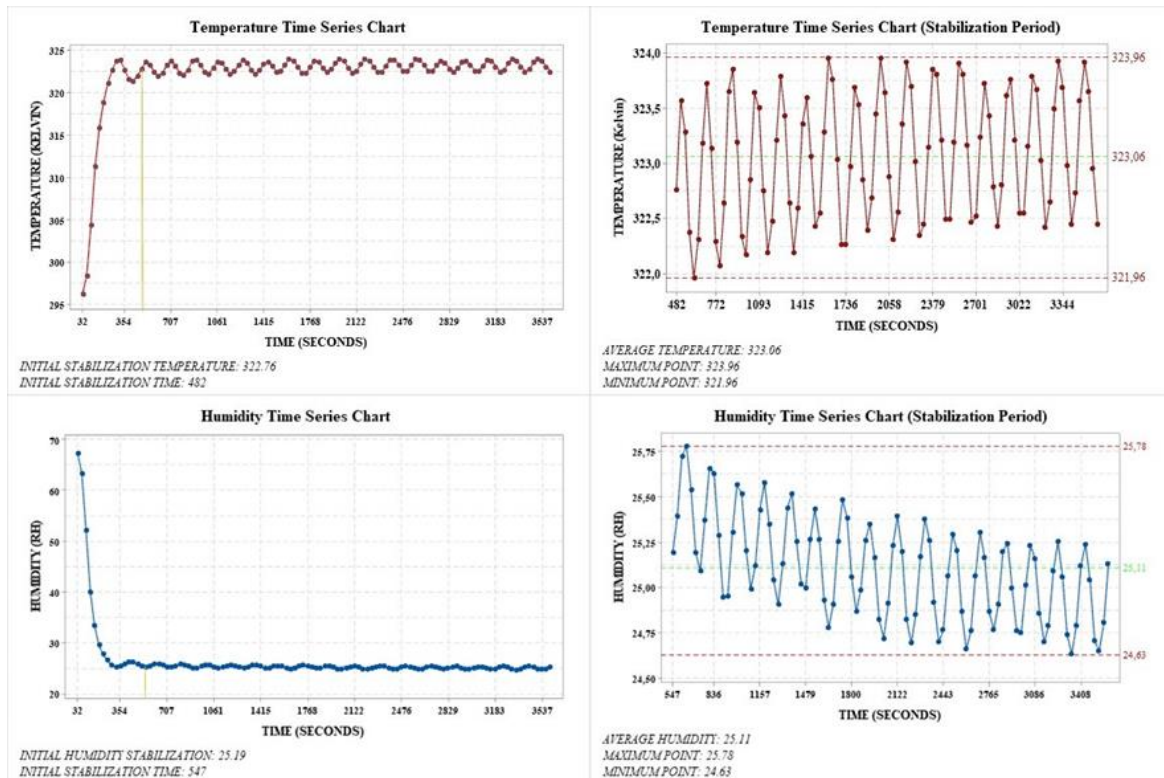


Figure 4 - Temperature and humidity time series chart

The determination of the stabilisation point was performed by observing the value closest to the overall mean of the samples in the final process period, taking into account the graphic behavior, being selected from the oscillation wave higher relative to the target value at the beginning of the process.

It was observed that the initial temperature stabilization period was 482 seconds (08:03 minutes) so that inside the camera reached an average temperature of 322.76 K. While humidity stabilized from 547 seconds (09:12 minutes) reaching an average range of 25.19 RH.

Analyzing the time series chart plotted from the stabilization period, it is possible to observe that over the evaluated time, the temperature is distributed around the average of 323.06 K, with a maximum point of 323.96 K and a minimum of 321.96 K. However, observing the distribution process over time, it was verified that only two points presented average temperature below 322.15 K, occurred in the initial waves of the stabilization period.

With this, it turns out that the process in its initial period after stabilisation, disregarding the two initial peaks below, has an average oscillation of temperature distributed within a limitation range of ± 0.90 compared to the target value of 323.15 K, more precisely a deviation of 0.81 above and 1.00 below the target value.

Analyzing the time series chart plotted from the

humidity stabilization period, it is possible to observe that over the estimated time, the same is distributed around the average of 25.11 RH, with a maximum point of 25.78 RH and a minimum of 24.63 RH. When the distribution process over time is observed, it can be seen that the same presents peaks of higher values initially with a tendency to distribute around the average in a smaller interval as the processing time increases until a certain period, can be compared with the average moisture value in the final period to determine the mean range of the process. Therefore, it turns out that in its initial period the process has an average oscillation of humidity distributed within the limitation range of ± 1.15 RH.

With samples from the final processing period, I-AM control charts were generated, allowing to monitor the average and variation of the process for temperature and humidity factors. To check for special causes in the process, type 1 tests were applied, evaluating a point greater than three standard deviations from the center line; type 2, evaluating nine consecutive points on the same side of the center line; type 7, evaluating fifteen consecutive points within a standard deviation of the center line on both sides.

The Figure 5, the left shows the charts I-AM (Individual; Amplitude). While the right is generated the histogram to examine how data is dispersed using bars to show the frequency of each range.

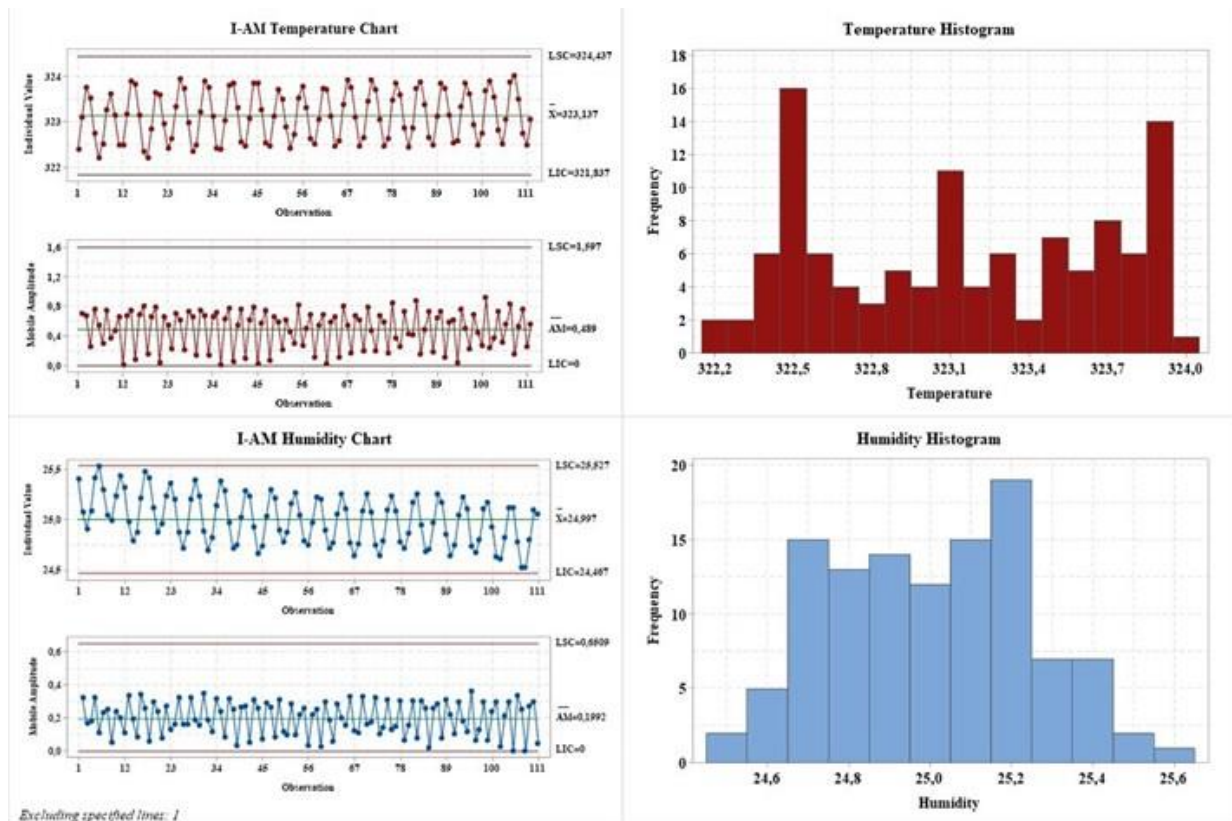


Figure 5 - Charts I-AM and histogram referring to temperature and humidity

Examining the temperature charts, it is observed that the mobile amplitude chart shows that the variation of the process is under statistical control, concluding that the control limits of chart I are accurate. The individual value chart shows that the process operated with an average estimate of 323.14 K. The limits of control, are fixed at a distance of 3 standard deviations above and below the center line, showing the amount of variation that is expected from the individual samples. Ranging from among upper control limit of 324.44 K and a lower control limit of 321.84 K. Being possible to verify that the process is under statistical control.

Through the histogram, it is possible to observe a higher frequency at the ends in relation to the target value, specifically at temperatures with a range of 322.40 to 322.50 K and 323.70 to 323.80 K, what can be justified, due to the operation of the programme, since it assesses the need or not to actuating the heating system, interpreting data at calibrated intervals for the process when the temperature is below or above the objectified value, but remaining within the estimated range.

Evaluating the humidity charts, it is observed that the mobile amplitude chart shows that the variation of the process is under control, indicating

that the control limits of chart I are accurate. However, on the individual value chart the point 1 presented a value greater than three standard deviations above the center line, indicating is under special cause, probably explained by the fact that it is in the initial phase of the stabilization process. Therefore, after the identification of the cause, its value was omitted so as not to influence the estimates of the process parameters and it was possible to verify that humidity follows a process under control in line with the temperature. Presenting an approximate average of 25.00 RH, with upper control limit of 25.53 RH and lower limit of 24.47 RH. The histogram allows us to observe that the process presented higher frequency of distribution in the range between 25.15 and 25.25 RH and with considerable distribution around the process average.

Through the contour plot of humidity versus temperature; final phase time (Figure 6), it was found that it tends to present lower humidity ranges between 25.00 and 24.60 RH with temperature around 323.15 K. Being than temperatures below 322.35 K the humidity values tend to present themselves greater than 25.40 RH. Maintaining a good distribution over the final processing period.

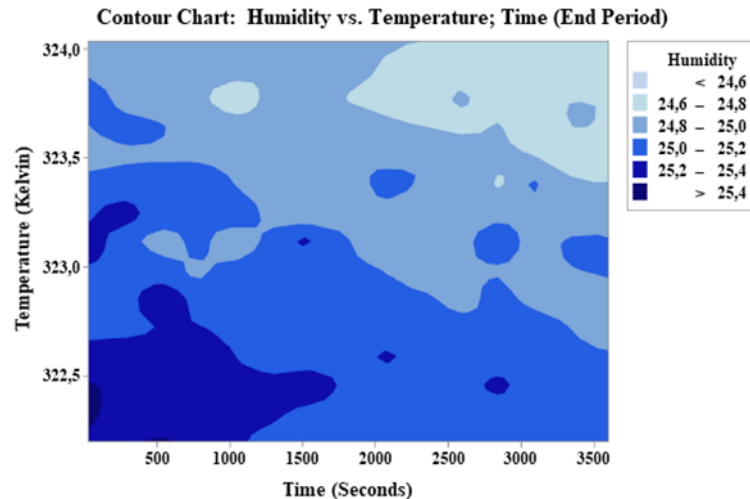


Figure 6 - Contour Plot for humidity response in initial processing period

CONCLUSION

In view of the established objectives, through the study, the structural projection was carried out and operational programming with control limits within the range determined specifically for the process. In which carried out the construction of the greenhouse with forced air circulation for vertical drying of Fibroin plates, automated by means of the ATmega 2560 microcontroller, contained in arduino Mega 2560 board. Developing a prototype in an economically viable way and with functionalities within the objective pattern. Evaluated by means of specific statistical tests.

Through the applied tests, it was found that the process kept under control throughout the operating period of the equipment at its maximum power, operating at a general average after stabilization at a temperature of 323.10 K with a variation of ± 01.00 around the target value. While humidity remained in the mean range of 25.05 RH acting in line with temperature variation. Both factors, for stabilization inside the camera require an average time of 8:57 minutes (514 seconds), starting from a average initial temperature of 296.16 K and humidity of 67.36 RH.

In this way, the elaborated equipment presents a good alternative in the performance of the drying process of fibroin plates with good control of the parameters determined. Allowing a higher number of samples inside the camera and enabling better ambient circulation, ensuring the stability and distribution of the process. However, internal homogeneity studies of the camera are needed to determine the overall distribution capacity.

REFERENCES BIBLIOGRAPHICAL

- Altman GH, Diaz F, Jakuba C, Calabro T, Horan LR, Chen J, Lu H, Richmond J, Kaplan DL. Silk-based biomaterials. *Biomaterials*, v.24, n.3, p.401-416, 2003. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(02\)00353-8](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(02)00353-8)
- Banzi M. *Primeiros Passos com o Arduino* (Primeira ed.). São Paulo, Novatec Editora Ltda, 152p. 2010.
- Hakimi O, Knight DP, Vollrath F, Vadgama P. Spider and mulberry silkworm silks as compatible biomaterials. *Composites Part B: Engineering*, v.38, n.3, p.324-337, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.compositesb.2006.06.012>
- Ma D, Wang Y, Dai W. Silk fibroin-based biomaterials for musculoskeletal tissue engineering. *Materials Science and Engineering: C*, v.89, n.1, p.456-469, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.04.062>
- MacIntosh AC, Kearns VR, Crawford A, Hatton PV. Skeletal tissue engineering using silk biomaterials. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, v.2, n.2-3, p.70-80, 2008. <https://doi.org/10.1002/term.68>
- Monk S. *Programação com arduino: começando com sketches*. Edição 2. Porto Alegre, Bookman Editora Ltda, 200p. 2017.
- Zhou CZ, Confalonieri F, Jacquet M, Perasso R, Li ZG, Janin J. Silk fibroin: structural implications of a remarkable amino acid sequence. *Proteins*, v.44, n.2, p.119-122, 2001. <https://doi.org/10.1002/prot.1078>



Physiological responses of *Aechmea setigera* Mart. ex Schult. & Schult. f. (Bromeliaceae) in vitro cultured

Tatiane Carine da Silva^a, Caroline Luiz^a, Maiby Teodoro de Oliveira^a, Marcelo Borghezani^a, Rosete Pescador^a, Paulo Cesar Poeta Fermino Junior^{a*}

^a Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil

* Autor correspondente (paulo.fermino@ufsc.br)

INFO

Keywords

micropropagation
biotechnology
chlorophyll
carbohydrates
phenolic compounds

ABSTRACT

In vitro propagation of bromeliads is widely used to produce plantlets intended for conservation. This study aims at evaluating physiological responses of *Aechmea setigera* *in vitro* cultured under different concentrations of 6-benzylaminopurine (BAP). The experiment was conducted in completely randomized design with five treatments (0, 1.0, 2.0, 4.0 and 8.0 mg L⁻¹ of BAP). After 90 days of *in vitro* cultured in stationary liquid MS culture medium it were assessed morphological and biochemical parameters. The BAP increment increased stomatal density, reduced plant size and root number, but increased the number of shoots. There was significant effect of BAP dose on fresh and dry mass. High BAP doses (4.0 and 8.0 mg L⁻¹) promoted the reduction of chlorophyll *a* and total chlorophyll content, but there was no change of chlorophyll *b* and carotenoids. The concentration of starch and total soluble carbohydrates decreased above 2.0 and 4.0 mg L⁻¹ of BAP, respectively. The total phenolic content decreased with increasing BAP concentrations. Evaluated changes in metabolism elucidate the phenotypic plasticity for *in vitro* multiplication process in *A. setigera*.

RESUMO

Respostas fisiológicas de *Aechmea setigera* Mart. ex Schult. & Schult. f. (Bromeliaceae) cultivada *in vitro*. A propagação *in vitro* de bromélias é amplamente utilizada para produzir plantas visando a conservação. O objetivo desse trabalho foi avaliar as respostas fisiológicas de *Aechmea setigera* cultivada *in vitro* sob diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP). O experimento foi conduzido em delineamento completamente casualizados com cinco tratamentos (0; 1,0; 2,0; 4,0 e 8,0 mg L⁻¹ de BAP). Após 90 dias de cultivo *in vitro* em meio de cultura MS líquido estacionário, foram avaliados parâmetros morfológicos e bioquímicos. O aumento das concentrações de BAP promoveu aumento da densidade estomática, redução do tamanho da planta e do número de raízes, mas aumentou o número de brotos. Existiu efeito significativo entre as doses de BAP e as massas fresca e seca. Elevadas doses de BAP (4,0 e 8,0 mg L⁻¹) promoveu a redução dos teores de clorofila *a* e total, mas não alterou os teores de clorofila *b* e carotenóides. As concentrações de amido e carboidratos solúveis diminuíram com o uso de concentrações acima de 2,0 e 4,0 mg L⁻¹ de BAP, respectivamente. O teor de compostos fenólicos totais diminuiu com o aumento da concentração de BAP. As modificações avaliadas no metabolismo elucidam a plasticidade fenotípica nos processos de multiplicação *in vitro* de *A. setigera*.

Palavras-chaves

micropropagação
biotecnologia
clorofilas
carboidratos
compostos fenólicos

Received 12 August 2021; Received in revised from 26 November 2021; Accepted 21 February 2022



INTRODUCTION

The *Aechmea setigera* Mart. ex Schult. & Schult. f. (Figure 1A), epiphytic plant of Bromeliaceae family, is found in Panama, Colombia, Venezuela, Guyana and Brazil between 70 and 550 meters of altitude (Missouri Botanical Garden, 2021). In Brazil, this plant occurrence has been recorded in Acre, Amazonas, Pará, Mato Grosso and in the State of São Paulo (Brito et al., 2019). However, the massive deforestation dramatically damaged this species population and currently, *A. setigera* is considered unique in the Amazonian region. This species is epiphytic, with leaves up to 1 meter in length, peduncular bracts with a spiny margin and curved inflorescence (Koch et al., 2015). *A. setigera* has large, intense green and succulent leaves, and because of its beauty, it has ornamental potential (Leão et al., 2014).

In general, bromeliad species in the Amazon are poorly known (Quaresma and Jardim, 2012), and can be considered threatened due to deforestation. In view of existing threats to populations of plant species, biotechnological techniques have been surveyed aiming at conservation and clonal propagation, such as *in vitro* culture (Guerra and Dal Vesco, 2010). *In vitro* techniques have been widely used for propagation and as alternative to minimize the extraction of a high number of bromeliads, which are rare or endangered (Guerra and Dal Vesco, 2010). According Silva et al. (2020) the germplasm conservation of bromeliads needs to consider the genetic diversity of the species' natural conditions, therefore, the use of *in vitro* germinated seeds is essential for the maintenance of diversity aiming at *in vitro* conservation.

The combination of growth regulators and explant type is defined according to the desired morphogenetic responses (Faria et al., 2018), which are activated by complex metabolic pathways. Thus, plant growth regulators can lead to various responses, generate metabolic pathway activation and promote the accumulation or reduction of compounds essential for plant development (Rosa et al., 2018). Guerra and Dal Vesco (2010) suggest the use of growth regulators such as naphthaleneacetic acid (NAA) and 6-

benzylaminopurine (BAP) in the *in vitro* multiplication phase of bromeliads in general. Biochemical responses, assessing the content of soluble carbohydrates, starch and soluble proteins were performed at *A. blanchetiana* *in vitro* cultured under the effect of different auxins (Chuet et al., 2010).

Cytokinins especially BAP are used in different concentrations and combinations in order to facilitate the development of plant micropropagation techniques for inducing organogenesis (Maláet al., 2013), especially in bromeliads (Silva et al., 2020). Micropropagation studies using BAP of *A. setigera* are still recent (Leão et al., 2014; Vasconcelos et al., 2015).

This study aims at evaluating the physiological responses of *A. setigera* *in vitro* cultured under different BAP concentrations.

MATERIAL AND METHODS

The fruits of *Aechmea setigera* Mart.Ex Schult. & Schult. f. (Figure 1) at physiological maturity stage were collected from adult plants in natural population on the AC-90 Road, km 10, at 01°16.9'S and 67°55'26.6"W in Rio Branco (AC). The collections took place in November (the Amazon rainy season), with the manual removal of the fruits and stored in a refrigerator (4 °C) for 30 days. For species identification, exsiccates in duplicates were sent to the deposit in the Herbarium of the Rio de Janeiro Botanical Garden (Herbarium RB) under the number Rb550638. Seeds were manually removed and disinfected for 2 min in 70% ethanol, followed by 25 min immersion in commercial bleach solution (2.0-2.5% active chlorine) and added a drop of Tween 20 in each 100 mL of solution, according to Leão et al. (2014). Then, seeds were rinsed three times in sterile and distilled water and inoculated into canned-type glass (340 mL) containing 30 ml of MS culture medium (Murashige and Skoog, 1962) supplemented with vitamins of Morel (Morel and Wetmore, 1951), 30 g L⁻¹ of sucrose and gelled with 6 g L⁻¹ of agar. The pH of culture medium was adjusted to 5.8 prior to sterilization for 15 min at 1.3 kgf cm⁻². From *in vitro* introduction, plants multiplication was preceded.

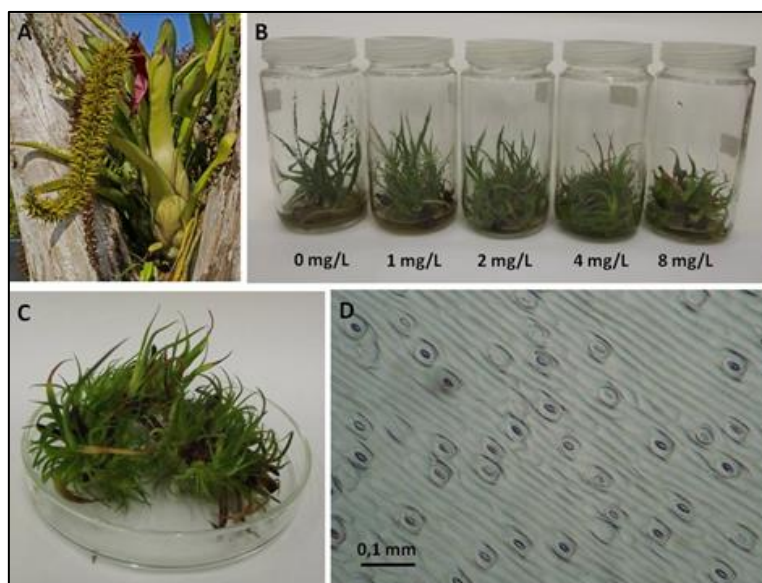


Figure 1 - *Aechmea setigera* Mart. ex Schult. & Schult. f. (Bromeliaceae) under natural conditions - image by Andrés Hernández with Smithsonian permission - www.si.edu (A), *in vitro* plants treated with different BAP concentrations (B), 4.0 mg L⁻¹ treatment explant detail (C) and leaf abaxial surface image with stomata distribution (D).

Plants with 60 days of culture containing young leaves of about 1 cm in length were excised and inoculated into glass bottles containing MS culture medium (Murashige and Skoog, 1962) in a stationary liquid phase with vitamins of Morel (Morel and Wetmore, 1951) sucrose (30 g L⁻¹) and 6-benzylaminopurine (BAP) at 0; 1.0; 2.0; 4.0 and 8.0 mg L⁻¹ concentrations. After 90 days of culture (Figure 1B and 1C), assessments for biomass accumulation, stomatal density, leaf pigment contents and chemical compounds were performed.

Biomass accumulation was estimated from the number of shoots formed in each of the plants contained in the bottles. The length of the longest leaf and the largest root was measured using a caliper. The numbers of leaves in the largest shoot and the number of leaves per shoot were obtained from counting in each shoot. The fresh biomass of shoots and roots was determined in analytical precision balance (Kern 430-21, Kern, Balingen, Germany). The dry biomass of shoot and roots was performed after drying in greenhouse under air circulation at 65 °C for 72 hours. The total fresh and total dry biomasses were estimated by summing those in the shoot and roots.

The stomatal density was determined using the modeling technique with colorless enamel. The dry enamel was subsequently removed with clear adhesive tape and fixed on slides. Three leaves of different plants were randomly collected in each bottle, totaling 15 counts per treatment. Abaxial (Figure 1D) and adaxial photomicrographs of surfaces of leaves were performed under optical

microscope (Feldmann Wild Leitz 1500 FWL T) with attached camera. With ANATI QUANTI software (version 2.0, Plant Anatomy Laboratory/UFV, Viçosa, Brazil), the number of stomata was determined (Aguiar et al., 2007).

The leaf pigment content was estimated using the SPAD index, measured by a chlorophyll portable meter (SPAD 502 Plus Chlorophyll Meter, Spectrum technologies, Bridgend, United Kingdom). Readings were performed on three leaves randomly selected of different plants in each replication, totaling 15 counts per treatment. The assessment of chlorophyll *a* and *b*, total chlorophyll and total carotenoids content was performed according to the methodology described by Hiscox and Israelstam (1979). Samples of 100 mg fresh, healthy, full leaves were incubated in water bath with 7 mL of dimethylsulfoxide (DMSO) for two hours at 65 °C, with no maceration. After filtering, the total volume was adjusted to 10 mL. The values were obtained by visible-UV spectrophotometry in microplate (SpectraMax Paradigm Multi-mode Detection Platform Microplate Reader, Molecular Devices, Sunnyvale, USA) considering the optical density measured at 480 nm, 649 nm and 665 nm. The estimate of chlorophyll and carotenoid contents was performed using the equations (Wellburn, 1994): Chlorophyll *a* (Chla) = [(12.19 x A665) - (3.45 x A649)]; Chlorophyll *b* (Chlb) = [(21.99 x A649) - (5.32 x A665)]; Total chlorophyll = (Chla + Chlb) and Total carotenoids = [(1,000 x A480) - (2.14 x Chla) - (70.16 x Chlb)] / 220.

The total soluble carbohydrate content was determined by phenol-sulfuric method (Dubois et al., 1956). Samples containing about 1 g of fresh mass were macerated with liquid nitrogen (-196 °C) using mortar and pestle and then subjected to a triple extraction by boiling in water bath (100°C) with 80% ethanol for 5 minutes. Extracts were centrifuged at 3000 rpm at 20 °C for 10 minutes and filtered through glass wool. From the combination of the three alcoholic extracts was obtained a corresponding portion to soluble sugar fraction, adjusting final volume to 10 mL with 80% ethanol. In 10 mL testing tubes was pipetted 50µl extract and added 450 µl distilled water, 0.5 mL phenol (5%) and 2.5 mL concentrated sulfuric acid (98%). The reading was carried out in visible-UV spectrophotometer in microplate (SpectraMax Paradigm Multi-mode Detection Platform Microplate Reader, Molecular Devices, Sunnyvale, USA) at 490 nm absorbance. The total carbohydrate content was estimated from a standard curve determined based on a standard carbohydrate (glucose), and the analysis performed in triplicate.

The starch extraction was carried out according to the methodology of McCready et al. (1950). To the precipitated residue from total soluble carbohydrates extraction was added 2 mL ice-cold distilled water (4 °C) and 2.6 mL perchloric acid (52%) iced, being stirred with a glass rod for 15 minutes. A total of 4 mL ice-cold distilled water was added and centrifuged at 3000 rpm for 15 minutes. The supernatant was filtered through glass wool and to precipitate was added 1 mL of ice-cold distilled water, followed by adding 1.3 mL of 52% cold perchloric acid, and being stirred with a glass rod for 15 minutes. It was centrifuged again at 3000 rpm for 15 minutes and the supernatant filtered through glass wool, joining all extract fractions, volume was adjusted to 20 mL with distilled water, and then homogenized. A fraction of 50µl was removed from the extract and added 450µl distilled water, 0.5 mL of phenol (5%) and 2.5 mL of concentrated sulfuric acid (98%). The total carbohydrate content was estimated from a standard curve determined based on a standard carbohydrate (glucose), and the analysis performed in triplicate. Quantification of starch content was according to the methodology of Dubois et al. (1956) in visible-UV spectrophotometer in microplate (SpectraMax Paradigm Multi-mode Detection Platform Microplate Reader, Molecular Devices, Sunnyvale, USA) at 490 nm absorbance.

The total polyphenol content was determined using the Folin-Ciocalteu method described by Singleton and Rossi (1965). The mass of 1 gram of

fresh plant material was macerated in liquid nitrogen (-196°C) with mortar and pestle. The sample was placed in a test tube and added 10 mL of 80% methanol, followed by stirring for 2 minutes. Samples remained for 24 hours in the dark at 4 °C. The extract was filtered on vacuum pump. It was added 200 µL of sample extract and 1 mL of Folin-Ciocalteu reagent (diluted 1:9 v/v) in test tubes, followed by 800 µL of sodium carbonate (7.5%). Test tubes were covered with PVC film and kept away from light for 30 minutes. The test tube corresponding to blank received 200 µL of 80% methanol instead of sample. After incubation, absorbance was determined in visible-UV spectrophotometer in microplate (SpectraMax Paradigm Multi-mode Detection Platform Microplate Reader, Molecular Devices, Sunnyvale, USA) at 765 nm and analysis performed in triplicate. The total polyphenol content was estimated from a standard curve determined based on a standard phenolic compound (Gallic acid).

The experiment was conducted in completely randomized design with 5 treatments and 5 replications, and one glass bottle with 4 plants was the experimental unit. The results were subjected to analysis of variance and regression, using the statistical software Sisvar® 4.3 (5% error probability).

RESULTS

The length of the longest leaf of *Aechmea setigera* decreased linearly ($R^2=0.80$) with increased BAP concentration. Plant leaves in medium without growth regulator and highest BAP concentration showed 10.0 cm and 4.2 cm length, respectively. The length of the longest root has followed a similar trend to the leaf size, with exponential decrease ($R^2=0.89$) (Figure 2A). The number of leaves with higher shoot was not significantly changed by cytokinin addition to the culture medium. However, the total number of roots showed linear decrease with increased BAP concentration (Figure 2B). Culture medium supplementation with growth regulator favored shoot induction during *in vitro* culture of *A. setigera* (Figure 2C). The cultivation of plants in the absence of BAP resulted in low multiplication rate (2.2 shoots per explant). The increased concentration of growth regulator promoted linear increase in the number of shoots per explant ($R^2 = 0.90$) with 20.6 shoots per explant at 8.0 mg L⁻¹. The average number of leaves per shoot suffered no significant effect of BAP addition, being close to four in all treatments.

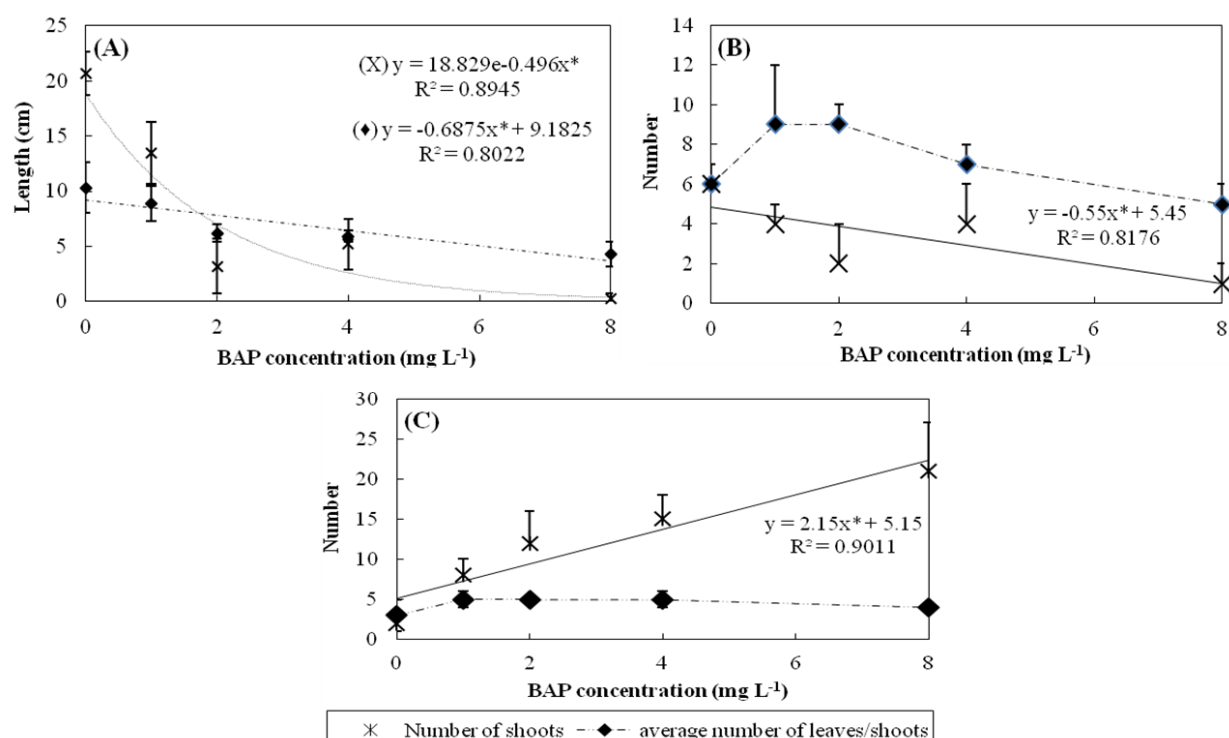


Figure 2 - Morphological parameters of *Aechmea setigera* Mart. ex Schult. & Schult. f.in vitro cultured under different concentrations of 6-benzylaminopurine (BAP). (A) Leaf and root length of the largest shoot. (B) Number of leaves and roots of the largest shoot. (C) Number of shoots and average number of leaves per shoot. Error bars indicate standard deviation. *Significant at 5% error probability ($p < 0.05$)

BAP influenced the fresh and dry biomass accumulation besides modifying the number and length of shoots, (Figure 3). The shoot fresh matter was significantly increased ($R^2=0.88$), following a polynomial model and increasing cytokinin concentration to the culture medium, while root system fresh matter was exponentially reduced ($R^2=0.92$) (Figure 3A). The accumulation of shoot fresh matter resulted from the expressive increased

number of shoot (Figure 2C). In the dry biomass the same trend was observed (Figure 3B). However, there was no effect on the total biomass accumulation of *A. setigera* in vitro cultured, which showed average of 2.28 g fresh matter per explant and 0.18 g of dry matter per explant. The average of 7.7% dry matter was observed on the total biomass of explants.

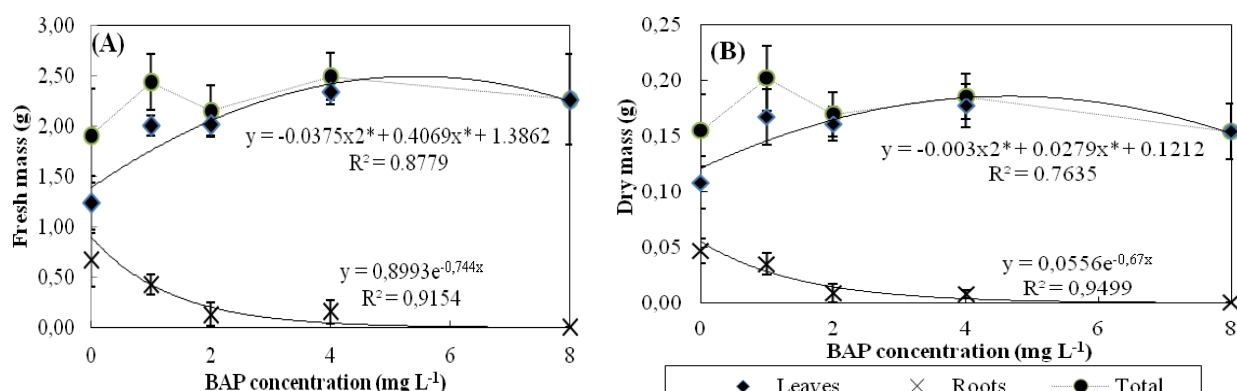


Figure 3 - Fresh matter of shoots, roots and total fresh matter (A) and dry matter of shoots, roots and total dry matter (B) of *Aechmea setigera* Mart. ex Schult. & Schult. f.in vitro cultured under different concentrations of 6-benzylaminopurine (BAP). Error bars indicate standard deviation. * Significant at 5% error probability ($p < 0.05$)

The increased cytokinin concentration in the culture medium resulted in linear increase ($R^2=0.89$) in stomatal density on the leaves abaxial surface of *A. setigera* (Figure 4). Plants cultivated with 8.0 mgL^{-1} BAP addition presented on average of 212 stomata mm^{-2} , three times over the density observed in plants kept without this growth regulator ($71 \text{ stomata mm}^{-2}$).

The SPAD index is a direct and non-destructive measurement that represents an estimate of green pigments present in leaves. As the total chlorophyll

content, SPAD index was influenced by the BAP addition to the culture medium, showing significant reduction with increased cytokinin concentration (Figure 4). The reduction followed a polynomial mathematical model ($R^2=0.84$). These results indicate that high concentrations of cytokinin in the culture medium can be harmful to the photosynthetic apparatus. However, these losses are compensated by the addition of sugars to the culture medium, allowing the multiplication of plants.

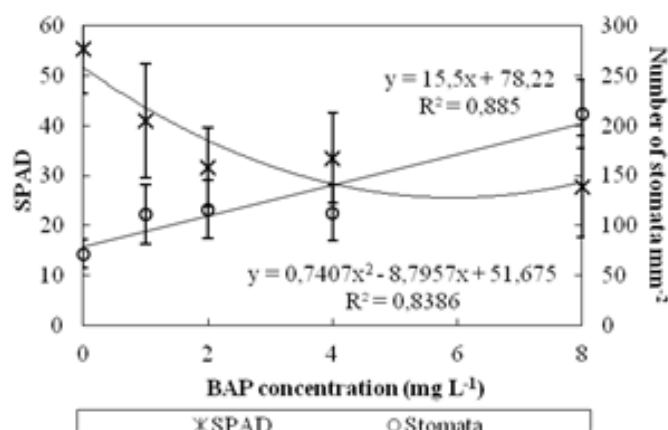


Figure 4 - Stomatal density (stomata mm^{-2}) in the leaf abaxial surface and SPAD index of *Aechmea setigera* Mart. ex Schult. & Schult. f.in vitro cultured under different concentrations of 6-benzylaminopurine (BAP). Error bars indicate the standard deviation. *Significant at 5% error probability ($p < 0.05$)

Total chlorophyll content ($R^2=0.87$) and chlorophyll *a* ($R^2=0.89$) in leaves of *A. setigera* were significantly reduced with increasing BAP concentrations. The reduction of leaf pigments followed linear pattern and the chlorophyll *b* and total carotenoids content have no differences in plants cultivated in culture medium with varied BAP concentrations (Figure 5). The total

chlorophyll content ranged from 0.65 to 1.0 mg g^{-1} of fresh matter. Chlorophylls represented on average 87% of the pigments present in leaves, on average ratio of 7.0 between total chlorophyll and carotenoids. The content of chlorophyll *a* was equivalent to 73% of the total chlorophyll and average ratio of 2.8 chlorophyll *a/b*.

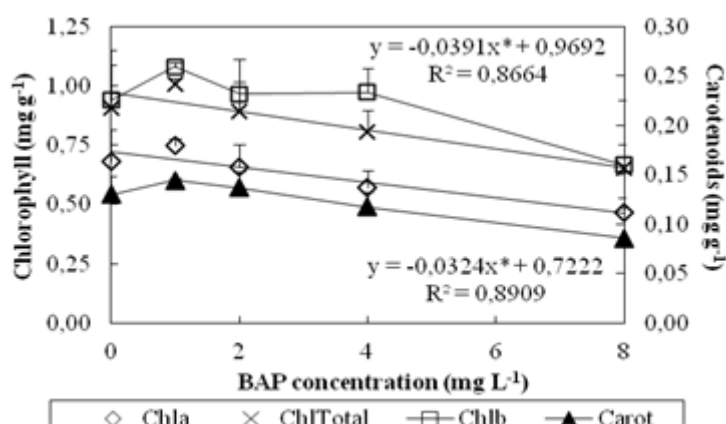


Figure 5 - Chlorophyll contents (*a*, *b*, total) and carotenoids in leaves of *Aechmea setigera* Mart. ex Schult. & Schult. f.in vitro cultured under different concentrations of 6-benzylaminopurine (BAP). Error bars indicate the standard deviation. *Significant at 5% error probability ($p < 0.05$)

The analysis of starch content showed that BAP addition changed this polysaccharide amount in *A. setigera* leaves (Figure 6), with marked reduction above the use of 2.0 mg L⁻¹ BAP. The BAP addition altered significantly the total content of soluble carbohydrates in leaves of *A. setigera* (Figure 6). There was increase in the carbohydrate content

with increasing concentration up to 4.0 mg L⁻¹ BAP. Plants cultivated in the presence of BAP had average carbohydrate content 3.2 times higher than those maintained in medium without regulator addition. Concentrations above 4.0 mg L⁻¹ BAP resulted in decreased soluble sugar content.

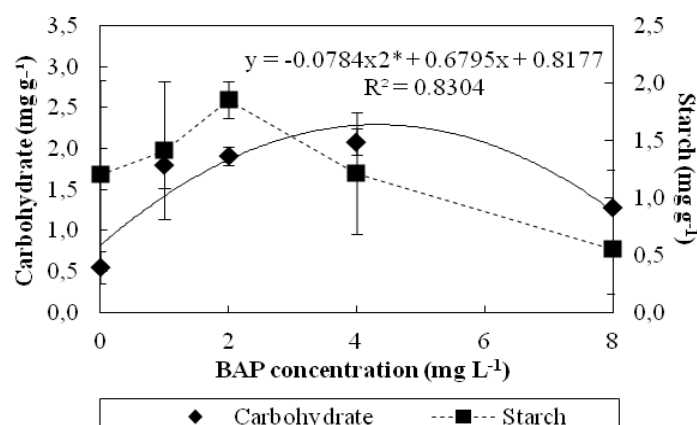


Figure 6 - Soluble carbohydrates and starch content in leaves of *Aechmea setigera* Mart. ex Schult. & Schult. f.in vitro cultured under different concentrations of 6-benzylaminopurine (BAP). Error bars indicate the standard deviation. *Significant at 5% error probability ($p < 0.05$)

The total phenolic compounds content was significantly reduced ($R^2=0.91$) with increase of BAP concentration to the culture medium (Figure 7). *A. setigera* plants maintained without growth

regulator showed about 30% more phenolic compounds compared to plants under higher BAP concentrations (8.0 mg L⁻¹).

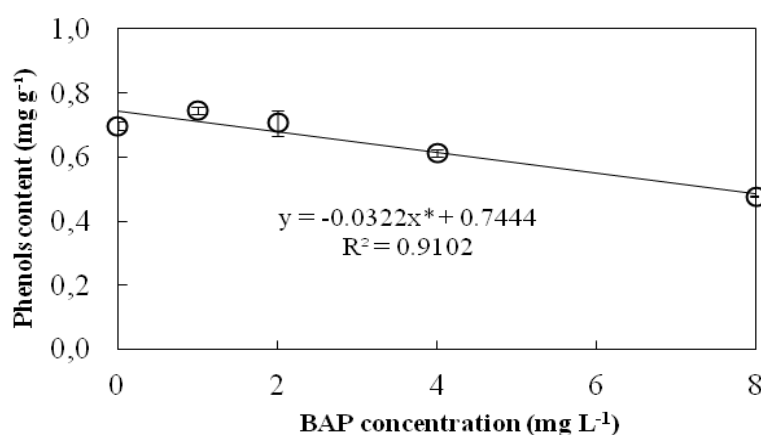


Figure 7 - Total phenolic compounds content in leaves of *Aechmea setigera* Mart. ex Schult. & Schult. f.in vitro cultured under different concentrations of 6-benzylaminopurine (BAP). Error bars indicate the standard deviation. *Significant at 5% error probability ($p < 0.05$)

DISCUSSION

The increased BAP concentration promoted increase in shoot number and lower growth of them. This observation was also verified in other studies on *in vitro* plants with the activation of lateral meristems and beginning of new shoot formation (Galvanese et al., 2007; Faria et al.,

2018). In studies on micropropagation using *Nidularium innocentii* and *N. procerum* bromeliads, the increased BAP concentration also promoted increase in the number of regenerated shoots (Silva et al., 2012). Santa-Rosa et al. (2013) studying bromeliads of *Aechmea* genera, observed that the BAP addition to the culture medium

resulted in shoot formation without roots or with poorly developed roots. This observation is in accordance to the trend observed in this study. The addition of BAP growth regulator to the culture medium changed the hormonal balance of *A. setigera* explants by modifying the investment in plant development, with more expressiveness in the formation of shoots as increased BAP concentration. Consequently, growth of leaves and roots reduced in the highest concentrations of phytoregulator.

The results observed for the number and length of leaves or roots and the biomass accumulation confirmed that the increased BAP concentration favored *A. setigera* multiplication rather than the growth of plant organs. Similar results with the use of BAP and ANA were obtained with bromeliad *Alcantarea nahoumii* (Silva et al., 2020), indicating that the use of this cytokinin in higher concentrations increases the multiplication rate, an important characteristic for the propagation and conservation of the species.

Stomata in plants *in vitro* cultured are significantly related to the photosynthetic capacity and to the acclimatization process (Borghezan et al., 2003; Tavares et al., 2015; Aliniaieifard et al., 2020). The cytokinins act in many morphogenic processes such as the vascular system development (Aloni, 2001), formation and maintenance of the photosynthetic apparatus (Rosa et al., 2018), and stomata functionality (Pospíšilová et al., 1999; Veselova et al., 2005). Plants maintained *in vitro* environment typically have unique characteristics, such as increase in size and stomatal density and reduced control on the opening and closing mechanism of stomatal pores (Hazarika, 2006). However, it has not been reported cytokinins action on the stomata formation, although it is widely known the role of these regulators on the control of stomatal conductance (Pospíšilová et al., 1999; Veselova et al., 2005). In this study, the increase in stomatal density by increasing BAP concentration may be related to the probable increase of gas exchange for the most metabolic activity. Such relation is supported by the increased formation, also with linear pattern, of the number of shoots regenerated with increasing BAP concentrations (Figure 2C).

Leaf pigments contents and ratios between pigments are in agreement with the values observed for other bromeliad species (Kurita and Tamaki, 2014; Martins et al., 2015). Although growth regulator addition has resulted in significant reduction of chlorophyll content, the highest BAP concentrations were not limiting for the multiplication of *in vitro* plants, considering that a carbon source (sucrose) was added to the culture

medium. Cytokinins are growth regulators widely used in micropropagation of axillary and adventitious shoot (Dobránszki and Silva, 2010), which plays important role in the formation and development of chloroplasts (Rosa et al., 2018).

In order to minimize plant mortality during the acclimatization phase, the use of an intermediate culture medium with lower concentrations of both growth regulators and sugars stimulating root development is an important step for the propagation of bromeliads as established by Guerra and Dal Vesco (2010) and Leão et al. (2014).

Total content of soluble carbohydrates results reflect the balance between the source (photosynthesis and added source) and sinks (growth, multiplication and maintenance) of carbon at *in vitro* conditions. These sprouting were smaller and in higher number, using sugars rapidly, when compared with plants in medium without BAP. Similar pattern of response was observed by Leão et al. (2014), who suggest that intense metabolic activity of shoots justifies the most direct use of carbohydrates and lower stored content (starch).

The results disagree with other authors, who observed that culture medium with highest concentrations of growth regulators induced higher production of phenolic compounds (Dias et al., 2016). These authors report that *in vitro* cultured, produced phenolic compounds can be oxidized, causing blackening of the culture medium and later explants. These oxidized compounds become toxic to cells, negatively affecting plant development, compromising the action of enzymes and can lead to death and loss of cultures. However, for the *in vitro* culture of *A. setigera*, the content of phenolic compounds caused no change in coloring of the culture medium and did not reach toxic levels, without affecting the growth of plants.

The *in vitro* propagation system of bromeliads of *Aechmea* genera performed from shoots presented viability and can be used as a biotechnology strategy for the conservation of bromeliads, minimizing the extractive activity, as suggested by other authors (Santa-Rosa et al., 2013; Leão et al., 2014, Silva et al., 2020). This system can also be used for clonal propagation of plants with ornamental potential (Guerra and Dal Vesco, 2010; Faria et al., 2018). In addition to use in propagation and conservation systems, the results of this study contributed to extend the understanding of the BAP effect on the physiological behavior and metabolism of *A. setigera* plants.

CONCLUSIONS

The addition of cytokinin 6-benzylaminopurine (BAP) to MS culture medium promotes increased

multiplication of *A. setigera* and the greater investment in the shoots. The stomatal density in leaves increases with BAP concentration. Starch and total soluble carbohydrates concentration decrease above 2.0 and 4.0 mg L⁻¹ BAP, respectively. The content of total phenolic compounds decreases with increased BAP concentrations. *A. setigera* has facility at *in vitro* propagation and the addition of 8 mg L⁻¹ BAP favored the multiplication rate without affecting the explants development, therefore, the best concentration for micropropagation and conservation.

ACKNOWLEDGMENT

We thank CNPQ for the financial assistance.

REFERENCES

- Aguiar TV, Santanna-Santos BF, Azevedo AA, Ferreira RS. ANATI QUANTI: Software de análises quantitativas para estudos em anatomia vegetal. *Planta Daninha*, v.25, n.4, p.649-659, 2007. <https://doi.org/10.1590/S0100-83582007000400001>
- Aliniaiefard S, Asayesh ZM, Driver J, Vahdati K. Stomatal features and desiccation responses of Persian walnut leaf as caused by *in vitro* stimuli aimed at stomatal closure. *Trees*, v.34, p.1219-1232, 2020. <https://doi.org/10.1007/s00468-020-01992-x>
- Aloni R. Foliar and axial aspects of vascular differentiation: Hypotheses and evidence. *Journal of Plant Growth Regulation*, v.20, n.1, p.22-34, 2001. <https://doi.org/10.1007/s003440010001>
- Borghезan M, Moraes LKA, Moreira FM, Silva AL. Propagação *in vitro* e avaliação de parâmetros morfofisiológicos de porta-enxertos de videira. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.38, n.7, p.185-194, 2003
- Brito EG, Sousa JS, Carvalho WV, Gurgel ESC. Estudo taxonômico das angiospermas epífitas de Belém, Pará, Brasil. *Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi. Ciências Naturais*, v.14, n.3, p.363-389, 2019. <https://doi.org/10.46357/bcnaturais.v14i3.222>
- Chu EP, Tavares AR, Kanashiro S, Giampaoli P, Yokota ES. Effects of auxins on soluble carbohydrates, starch and soluble protein content in *Aechmea blanchetiana* (Bromeliaceae) cultured *in vitro*. *Scientia Horticulturae*, v.125, n.3, p.451-455, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2010.04.021>
- Cortleven A, Noben JP, Valcke R. Analysis of the photosynthetic apparatus in transgenic tobacco plants with altered endogenous cytokinin content: a proteomic study. *Proteome Science*, v.9, n.1, p.1-14, 2011.
- Dias MO, Sousa MJ, Alves RC, Ferreira ICFR. Exploring plant tissue culture to improve the production of phenolic compounds: A review. *Industrial Crops and Products*, v.82, p.9-22, 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.12.016>
- Dobránszki J, Silva JAT. Micropropagation of apple - A review. *Biotechnology Advances*, v.28, n.4, p.462-488, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.02.008>
- Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, v.28, p.350-356, 1956.
- Faria DV, Simão MJ, Cipriano R, Werner ET, Soares TCB, Aoyama EM, Lima-Gontijo ABP. *In vitro* morphogenesis and micropropagation of *Aechmea ramosa* var. *ramosa* Mart. Ex Schult. f. (Bromeliaceae) from leaf explants. *In Vitro Cellular & Developmental Biology- Plant*, v.54, p.530-536, 2018. <https://doi.org/10.1007/s11627-018-9907-0>
- Galvanese MS, Tavares AR, Aguiar FFA, Kanashiro S, Chu EP, Stancato GC, Harder ICF. Efeito de ANA, 6-BA e Agar na propagação *in vitro* de *Aechmea blanchetiana* (Baker) L.B. Smith, bromélia nativa da Mata Atlântica. *Ceres*, v.54, n.311, p.63-67, 2007.
- Guerra MP, Dal Vesco LL. Strategies for the micropropagation of bromeliads. In: Jain, S.M.; Ochatt, S.J. (ed.). *Protocols for in Vitro Propagation of Ornamental Plants, Methods in Molecular Biology*, v.589, p.47-66, 2010. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-114-1_6
- Hazarika BN. Morpho-physiological disorders *in vitro* culture of plants. *Scientia Horticulturae*, v.108, n.2, p.105-120, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2006.01.038>
- Hiscox JD, Israelstam GF. A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. *Canadian Journal of Botany*, v.57, n.12, p.1332-1334, 1979. <https://doi.org/10.1139/b79-163>
- Koch AK, Monteiro RF, Ilkiu-Borges AL. Checklist de Bromeliaceae da região da Volta Grande do Xingu, Pará, Brasil. *Rodriguésia*, v.66, n.2, p.455-464, 2015. <https://doi.org/10.1590/2175-7860201566213>
- Kurita FMK, Tamaki V. *In vitro* growth of the bromeliad *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms with different concentrations of nitrogen. *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, v.36, n.3, p.279-285, 2014. <https://doi.org/10.4025/actascibiolsoci.v36i3.22933>
- Leão JRA, Vasconcelos JM, Beltrão RT, Raposo A, Fermino Jr PCP. Micropropagação de *Aechmea setigera* Mart. ex Schult. e Schult. f.: uma bromélia endêmica da Amazônia Ocidental. *Biota Amazônia*, v.4, n.3, p.117-123, 2014. <http://dx.doi.org/10.18561/2179-5746/biotaamazonia.v4n2p117-123>
- Malá J, Máchová R, Cvrcková H, Karady M, Novák O, Mikulík J, Dostál J, Strnad M, Doležal K. The role of cytokinins during micropropagation of wych elm. *Biologia Plantarum*, v.57, p.174-178, 2013. <https://doi.org/10.1007/s10535-012-0252-6>
- Martins JPR, Pasqual M, Martins AD, Rineira SF. Effects of salts and sucrose concentration on *in vitro* propagation of *Billbergia zebrina* (Herbert) Lindley (Bromeliaceae). *Australian Journal of Crop Science*, v.9, n.1, p.85-91, 2015.
- McCready RM, Guggolz J, Silviera V, Owens HS. Determination of starch and amylose in vegetables. *Analytical Chemistry*, v.22, n.9, p.1156-1158, 1950. <https://doi.org/10.1021/ac60045a016>

- Missouri Botanical Garden, 2021. Tropicos.org. Disponível em: <http://www.tropicos.org>. Acesso em: 20 outubro 2021.
- Morel GM, Wetmore RH. Tissue culture of monocotyledons. American Journal of Botany, v.38, n.2, p.138-140, 1951.
- Murashige T, Skoog FA. Revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum, v.15, p.473-497, 1962.
- Pospíšilová J, Tichá I, Kadleček P, Haisel D, Plzánková Š. Acclimatization of micropropagated plants to *ex vitro* conditions. Biologia Plantarum, v.42, p.481-497, 1999. <https://doi.org/10.1023/A:1002688208758>
- Quaresma AC, Jardim MA. Diversidade de bromeliáceas epífitas na Área de Proteção Ambiental Ilha do Combu, Belém, Pará, Brasil. Acta Botanica Brasilica, v.26, n.2, p.290-294, 2012. <https://doi.org/10.1590/S0102-33062012000200006>
- Rosa WS, Martins JPR, Rodrigues ES, Rodrigues LCA, Gontijo ABPL, Falqueto AR. Photosynthetic apparatus performance in function of the cytokinins used during the *in vitro* multiplication of *Aechmea blanchetiana* (Bromeliaceae). Plant Cell, Tissue and Organ Culture, v.133, p.339-350, 2018. <https://doi.org/10.1007/s11240-018-1385-x>
- Santa-Rosa S, Souza FVD, Vidal ÁM, Ledo CAS, Santana JRF. Micropropagation of the ornamental vulnerable bromeliads *Aechmea blanchetiana* and *Aechmea distichantha*. Horticultura Brasileira, v.31, p.112-118, 2013. <https://doi.org/10.1590/S0102-05362013000100018>
- Silva LL, Costa JL, Alcantara GB, Carvalho DC, SchuckMR, Biasi LA, Scheidt GN, Soccol CR. Micropropagation of *Nidularium innocentii* Lem. and *Nidularium procerum* Lindm. (Bromeliaceae). Pakistan Journal of Botany, v.44, n.3, p.1095-1101, 2012.
- Silva SSS, Souza EH, Nepomuceno CF, Souza FVD, Costa MAPC. Micropropagation and *in vitro* conservation of *Alcantarea nahoumii* (Bromeliaceae), an endemic and endangered species of the Brazilian Atlantic Forest. Acta Scientiarum. Biological Sciences, v. 42, e52940, 2020. <https://doi.org/10.4025/actascibiolsci.v42i1.52940>
- Singleton VL, Rossi JA. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. American Journal of Enology and Viticulture, v.16, p.144-158, 1965.
- Tavares AR, Giampaoli P, Machado J, Kanashiro S, Chu EP, Pita PB. Structural analysis of the foliar epidermis during acclimatization of *Aechmea blanchetiana* (Bromeliaceae) *in vitro* cultured. Horticultura Brasileira, v.33, n.1, p.45-50, 2015. <https://doi.org/10.1590/S0102-053620150000100008>
- Vasconcelos JM, Leão JRA, Raposo A, Fermino Junior PCP. Sistemas de cultivo *in vitro* e aclimatização de *Aechmea setigera* Mart. ex Schult. & Schult. f. (Bromeliaceae). Scientia Agraria Paranaensis, v.14, n.4, p.240-246, 2015.
- Veselova SV, Farhutdinov RG, Veselov SY, Kudoyarova GR, Veselov DS, Hartung W. The effect of root cooling on hormone content, leaf conductance and root hydraulic conductivity of durum wheat seedlings (*Triticum durum* L.). Journal of Plant Physiology, v.162, n.1, p.21-26, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2004.06.001>
- Wellburn AR. The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. Journal of Plant Physiology, v.144, n.3, p.307-313, 1994. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(11\)81192-2](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(11)81192-2)



Aplicação de tanase obtida de *Aspergillus tamarii* URM 7115 e seu efeito em suco de caju integral

Miqueas Jamesse Gouveia^a, Marcelo Rodrigues Figueira de Mello^a, Tatiely Gomes Bernardes^a
Tonny Cley Campos Leite^a, Amanda Reges de Sena^{a*}

^a Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Pernambuco, Brasil

* Autor correspondente (amandareges@barreiros.ifpe.edu.br)

INFO

Keywords

Anarcadium occidentale L.
antioxidant activity
TanninAcylHydrolase

ABSTRACT

Application of tannase obtained from Aspergillus tamarii URM 7115 and its effect on whole cashew juice. Tannin Acyl Hydrolase is an enzyme that catalyzes the hydrolysis of hydrolysable tannins and can be used in several industrial areas, such as food and pharmaceutical. The present work had as objective to produce tannase obtained from *Aspergillus tamarii* URM 7115 under submerged fermentation and to verify its effect on the integral cashew juice. The total tannins, total phenolics, antioxidant activity and some physical-chemical parameters (pH, °Brix, vitamin C and total acidity) were analyzed before and after application of the enzyme. The tests showed a reduction of at least 50% of the total tannin content, 47-54% increase in phenolics and an increase in total antioxidant activity of 20 to 23%. In addition, the samples of cashew juice before and after enzymatic application presented acceptable results for pH, °Brix, vitamin C and total acidity. The treatment with tannase in whole cashew juice, in addition to reducing astringency, other advantages were observed, such as increased antioxidant activity, less turbidity and maintenance of nutritional and physicochemical quality.

RESUMO

Palavras-chaves

Anarcadium occidentale L.
atividade antioxidante
Tanino acil hidrolase

Tanino Acil Hidrolase é uma enzima que catalisa a hidrólise de taninos hidrolisáveis e pode ser utilizada em diversas áreas industriais, como alimentícia e farmacêutica. O presente trabalho teve como objetivo produzir tanase obtida de *Aspergillus tamarii* URM 7115 sob fermentação submersa e verificar seu efeito no suco de caju integral. Foram analisados os teores de taninos totais, fenólicos totais, atividade antioxidante e alguns parâmetros físico-químicos (pH, °Brix, vitamina C e acidez total) antes e pós aplicação da enzima. Os ensaios demonstraram uma redução de no mínimo 50 % do teor total de taninos, aumento entre 47 a 54 % no teor de fenólicos totais além de ser verificado um aumento na atividade antioxidante total de 20 a 23 %. Ademais, as amostras do suco de caju integral antes e após aplicação enzimática apresentaram resultados aceitáveis para pH, Brix, vitamina C e acidez total. O tratamento com a tanase em suco de caju integral, além da redução da adstringência foi observada outras vantagens como aumento da atividade antioxidante, menor turvação e manutenção da qualidade nutricional e físico-química.

Received 20October 2021; Received in revised from 30October2021; Accepted 17January2022



INTRODUÇÃO

Os taninos são compostos que fazem parte do sistema de defesa vegetal e classificados como polímeros fenólicos do metabolismo secundário dos vegetais, atuando como agentes antimicrobianos e fago-inibidores para herbívoros. A terminologia tanino é utilizada pelas literaturas botânicas devido à palavra “tenante” que está associada a sua aplicação no curtimento de couro (Haslam, 1988; Monteiro, 2005).

Tais substâncias estão presentes em muitos frutos e produtos de origem vegetal para o consumo humano, dando a estes produtos um sabor adstringente causado pela precipitação de proteínas salivares, sendo desta forma uma das características específicas dos taninos (Bruneton, 1991; Monteiro, 2005).

Estes compostos fenólicos são classificados em taninos complexos, condensados e hidrolisáveis (galotaninos e elagitaninos), sendo estes últimos facilmente hidrolisados em meios ácidos ou básicos, ou por ação enzimática (Khanbabaee e Ree, 2001).

Tanino acil hidrolase (E.C. 3.1.1.20), conhecida como tanase, é uma enzima extracelular, induzível, produzida por micro-organismos, como bactérias, fungos filamentosos e leveduras, principalmente os fungos do gênero *Aspergillus* e *Penicillium* na presença de ácido tânico (Aguilar, 1999). Essa enzima hidrolisa os ésteres e ligações laterais de taninos hidrolisáveis (Banerjee et al., 2001). O ácido tânico é um típico tanino hidrolisável, também chamado de galotanino, que pode ser hidrolisado pela tanase em ácido gálico e glicose (Helbig et al., 2003). Essa enzima é amplamente utilizada na indústria de alimentos, sucos, cervejarias, farmacêutica e química. Ela é principalmente aplicada para produção de ácido gálico, chás instantâneos, na estabilização da cor do vinho, refrigerantes a base de café, processo de tratamento de couro, remoção de adstringência em bebidas (Lekha e Lonsane, 1997).

A aplicação da tanase em sucos proporciona a diminuição da concentração dos taninos presentes no meio, os quais são responsáveis pelo surgimento de turbidez, sabor amargo e adstringência, características estas muitas vezes indesejáveis. Além disso, a hidrólise destes compostos provoca alterações nutricionais e sensoriais desejáveis, uma vez que a liberação do grupo galoil tem um efeito retardante na oxidação do ácido ascórbico aumentando a sua ação antioxidante (Rout e Banerjee, 2006; Srivastava, 2009).

O efeito da aplicação de enzimas obtidas de micro-organismos em sucos e bebidas já vem sendo reportado por outros pesquisadores tais

como: Rout e Benerjee (2006), Srivastava e Kar (2010), Selwal et al. (2011) e Sharma et al. (2014) onde verificaram tanto a diminuição do teor de tanino quanto o aumento da concentração de ácido gálico.

O pseudofruto do cajueiro (*Anacardium occidentale* L.), conhecido como caju, é consumido não só pelas características organolépticas, mas também pela sua qualidade nutricional, que está associado ao alto teor de vitamina C. A polpa tem o seu mercado pequeno devido ao seu alto teor de taninos, que além da adstringência indesejável, causam instabilidade durante o armazenamento (Couri, 2002). Quando retirada as características indesejáveis do suco, o mesmo pode servir de matéria-prima para a elaboração de suco concentrado, refrigerantes, vinhos e outros produtos (Paula et al., 1995).

Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi aplicar tanase obtida de *Aspergillus tamarii* URM 7115, sob fermentação submersa, e verificar seu efeito no suco de caju integral.

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Pernambuco, Campus Barreiros. O fungo foi obtido da Coleção de Cultura Micoteca URM do Departamento de Micologia, do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco e no IFPE/Campus Barreiros foi preservado, a 4°C, em água destilada esterilizada em frascos de penicilina (Castellani, 1939). Durante o experimento foi realizado o repique do fungo semanalmente, em tubos de ensaios inclinados.

Produção de tanase

A produção enzimática ocorreu em frascos Erlenmeyers de 125 mL contendo 25 mL de meio de fermentação (0,3 % de nitrato de sódio (NaNO₃); 0,1 % de fosfato de potássio (K₂HPO₄); 0,05 % de sulfato de magnésio (MgSO₄); 0,05 % de cloreto de potássio (KCl); 0,0001 % de sulfato de ferro (FeSO₄); 1 % de ácido tânico, pH 5,0). Após a autoclavagem e arrefecimento do meio, o mesmo foi adicionado de ácido tânico (5 %, p/v) após passar em membranas de 0,45 µm. O meio foi então inoculado com suspensão de 1x10⁶ esporos/mL. A suspensão foi feita após remoção dos esporos com solução de Tween (0,3 %, p/v), previamente esterilizada, contendo NaCl (0,9 %, p/v). Os esporos foram contados em câmara de Neubauer. Após a inoculação os meios foram incubados a 26°C em Shaker a 67 h/100 rpm (Sena et al., 2017). Após fermentação, as soluções foram filtradas e centrifugadas a 10000 rpm por 15

minutos a 4°C e o sobrenadante, considerado extrato enzimático bruto, foi adicionado na relação de (1:1) a uma solução de gelatinas dissolvida a 2,5 % durante 30 minutos e depois centrifugado para remoção do ácido tânico residual. O sobrenadante foi congelado para posterior análise da atividade enzimática e aplicação. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

Determinação da atividade enzimática

A atividade da tanase foi estimada pelo método de Sharma et al. (2000) modificado por Pinto, Couri e Gonçalves (2006), onde se utilizou rodanina etanólica e ácido tânico como substrato. O meio reacional consistiu em 250 µL do substrato, dissolvido em tampão citrato 0,05 M (pH 5), e 250 µL da amostra enzimática, ficando estes em contato por 5 minutos a 30 °C. A reação enzimática foi paralisada pela adição de 300 µL de rodanina etanólica 0,667% (p/v). Após 5 minutos a 30 °C, 200 µL de hidróxido de potássio 0,5 N foram adicionados, formando um cromógeno de coloração violeta. Ao passar 5 minutos, na temperatura supracitada, o volume obtido foi diluído adicionando 4 mL de água destilada em cada reação. Tubos designados de controles (extrato enzimático adicionado no final da reação) foram usados simultaneamente. Após 10 minutos a 30 °C procedeu-se a leitura em espectrofotômetro a 520 nm. A unidade de atividade tanásica (U/mL) foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1 µmol de ácido gálico por minuto nas condições de ensaio. Foi utilizado ácido gálico como padrão para a curva de calibração. Todos os testes foram realizados em triplicata.

Preparo do suco de caju integral

Os frutos da pitomba foram obtidos no pomar da Instituição e encaminhados ao Laboratório de Frutas e Hortaliças do campus. Os mesmos foram selecionados e higienizados em água clorada a 50 ppm durante 30 minutos. Em seguida foi feito o enxágüe dos frutos, os mesmos foram despolpados em despolpadeira industrial e o suco obtido foi filtrado.

Biotransformação do suco de caju integral por tanase de *Aspergillus tamarii* URM 7115

Em frascos Erlenmeyers (125 mL) foram adicionados 30 mL do suco, aos quais foram acrescidos de 6 % (v/v) de extrato enzimático. Como controle foi utilizado o suco sem adição da enzima. Em seguida, os frascos foram mantidos em agitador rotativo a 150 rpm com temperatura ajustada para 30 °C, durante 4 horas. Os ensaios foram realizados em triplicata. Após aplicação, a

enzima foi desnaturada a 70 °C durante 10 min (Rout e Banerjee, 2006).

Análises físico-químicas do suco de caju integral antes e após aplicação enzimática

- pH

O pH do suco obtido foi determinado após filtração e aferição direta em pHmetro antecipadamente calibrado (Ial, 2008).

- Sólido solúveis em °Brix, a 20°C

Os sólidos solúveis foram determinados por refratômetro digital gotejando duas gotas da amostra na superfície do aparelho previamente calibrado (Ial, 2008).

- Acidez titulável por potenciometria

Foram pesados 10 g do suco de caju integral, filtrado e homogeneizado em béquer de 300 mL, posteriormente este foi diluído em 100 mL de água destilada e agitados. Logo após foi introduzido o eletrodo na solução e em seguida a mesma foi titulada com solução de hidróxido de sódio 0,1 M até o pH permanecer entre 8,2 e 8,4 (Ial, 2008). O potenciômetro foi calibrado antes das análises com soluções tampão de pH 7 e 4.

- Vitamina C

Para determinar o teor de vitamina C transferiu-se a amostra (10 g) para um Erlenmeyer de 300 mL com auxílio de 50 mL de água. Após homogeneização da solução foram adicionados 10 mL de solução de ácido sulfúrico 20 % (v/v). A amostra foi homogeneizada e logo após foram adicionados 1 mL da solução de iodato de potássio (0,02 M) e 1 mL da solução de amido 1 %. Em seguida foi realizada a titulação com solução de iodato de potássio até atingir coloração azul (Ial, 2008). Todas as análises foram executadas em triplicata.

Determinação do teor de taninos totais do suco de caju integral antes e após aplicação enzimática

A estimativa do teor de taninos totais foi feita pelo método de precipitação proteica (Haggerman e Butler, 1978) utilizando o ácido tânico como padrão. Um mL do suco foi posto em contato com 3 mL de solução de Albumina de Soro Bovino (1 mg/mL) e mantida durante 15 minutos a temperatura ambiente. Os tubos foram centrifugados a 5500 rpm por 15 minutos, o sobrenadante descartado e o precipitado dissolvido em 3 mL da solução de dodecil sulfato de sódio (1 %, p/v) contendo trietanolamina (5 %, v/v). Um mL de solução de FeCl₃ (0,01 M) foi adicionado e mantido durante 15 minutos à temperatura

ambiente para a estabilização da cor. Após este período procedeu-se a leitura em espectrofotômetro a 510 nm contra um branco. Os resultados foram representados em porcentagem de redução de taninos. Todos os testes foram realizados em triplicata.

Determinação de fenólicos totais do suco de caju integral antes e após aplicação enzimática

Para determinar o teor de compostos fenólicos totais foram pipetados, em tubos de ensaio, 50 µL da amostra e 125 µL do reagente Folin Ciocalteu, diluído na proporção de 1:10. Os tubos foram agitados e mantidos em repouso por 3 minutos. Após o período de tempo, foi adicionado 1 mL de carbonato de sódio (7,5 %, m/v) e 1,35 mL de água destilada. Os tubos foram mantidos por 2 horas ao abrigo da luz. Após o período de reação, o espectrofotômetro foi zerado com o controle (branco) e em seguida realizadas as leituras a 765 nm (Singleton et al., 1999). Os valores obtidos foram comparados com a curva padrão de ácido gálico (5 a 100 mg/100 g). O conteúdo total de fenólicos foi expresso em mg equivalente de ácido gálico por 100 g de suco.

Determinação da atividade antioxidante do suco de caju integral antes e após aplicação enzimática

Para análise de atividade antioxidante foram pipetados, para tubos de ensaios, 100 µL da amostra e 3,9 mL de 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) a 60 µM (diluídos em metanol). Os tubos foram agitados e mantidos por 20 minutos ao abrigo da luz (Brand-Williams et al., 1995). Um controle negativo foi utilizado, trocando-se a amostra por metanol. Controles positivos foram analisados, trocando-se a amostra por ácido gálico. Decorrido o tempo foram medidas as absorbâncias das amostras a 517 nm. A capacidade de sequestro de radical DPPH foi calculada de acordo com a equação: $[(A_0 - A_1)/A_0] * 100$

Onde A_0 foi a absorbância do controle negativo e A_1 a absorbância na presença do composto (amostra e controle positivo).

Análises estatísticas

Após obtenção dos resultados, realizou-se a comparação de médias pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade por meio do programa Sistema de Análise de Variância (SISVAR) (Ferreira, 2011).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Atividade enzimática

Após a fermentação do *Aspergillus tamaritii* URM 7115 verificou-se que a atividade enzimática média da tanase nas condições destes ensaios foi de $34,23 \pm 0,17$ U/mL.

Em outro trabalho com produção de tanase, Nascimento et al. (2014) realizaram estudos para seleção de 14 amostras de *Aspergillus* sp isoladas do solo da Caatinga de Pernambuco, para produção de tanase em meios contendo resíduos agroindustriais oriundos da indústria de sucos e bebidas (cascas de café, tangerina e uva). As fermentações submersas ocorreram a 30 °C, 150 rpm, 120 horas. Os resultados obtidos para a atividade enzimática foi de 4,0 U/mL. Em outra pesquisa desenvolvida por Costa et al. (2012) a produção de tanase por *Aspergillus tamaritii* foi estudada em culturas submersas. O fungo produziu tanase após dois dias de crescimento em meio mineral contendo ácido tânico e ácido gálico a 2 % como fonte de carbono, o melhor resultado foi 20,4 U/mL. Sharma et al. (2015) tiveram como objetivo produzir tanase de *Aspergillus* sp isolados de solos de diferentes localidades. Após fermentação submersa com substrato rico em tanino, acrescido de 1 % de ácido tânico, os autores obtiveram uma atividade enzimática de 20 U/mL. Tendo como base os trabalhos supracitados verifica-se que a atividade enzimática da tanase obtida neste trabalho foi superior, isso pode estar relacionado tanto com as condições da fermentação quanto a quantidade de indutor (ácido tânico) utilizado na fermentação.

A enzima obtida foi utilizada na biotransformação do suco de caju integral.

Aplicação enzimática no suco de caju integral e análises físico-químicas

A enzima obtida foi adicionada ao suco de caju integral e em seguida foram analisados o teor de taninos totais, fenólicos totais, atividade antioxidante e alguns parâmetros físico-químicos (pH, Brix, vitamina C e acidez total). A avaliação físico-química se faz necessária uma vez que a biotransformação não pode influenciar a perda de qualidade no que diz respeito aos padrões mínimos preestabelecidos para o Padrão de Identidade e Qualidade de um produto específico, neste caso o suco de caju integral. Os resultados dos parâmetros físico-químicos estão distribuídos na Tabela 1.

Tabela 1 - Parâmetros físico-químicos do suco de caju integral antes e após aplicação enzimática

Determinações físico-químicas	Suco integral antes da aplicação	Suco integral após aplicação enzimática	Legislação (BRASIL, 2018)	
			Mínimo	Máximo
pH	3,46 a	3,45 a	3,80	-
Sólidos solúveis totais (°Brix) a 20 °C	10,23 ± 0,32 a	10,10 ± 0,17 a	10	-
Vitamina C (mg/100 g)	109,80 ± 0,34 a	103,42 ± 0,55 a	80	-
Acidez total expressa em ácido cítrico (g/100 g)	0,74 ± 0,017 a	0,72 ± 0,005 a	0,18	-

Médias seguidas por letras distintas na horizontal diferem entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Os resultados foram comparados com os valores exigidos em legislação (Brasil, 2018). Como pode ser verificado todos os parâmetros avaliados para o suco antes e após aplicação foram estatisticamente iguais. Em relação ao pH as amostras do suco de caju integral antes (3,46) e após aplicação enzimática (3,45) apresentaram resultados aceitáveis. Considerando que é permitido até 20 % de variação, as amostras encontram-se dentro do padrão. O suco tratado enzimaticamente apresentou um valor de 10,10 °Brix, encontrando-se dentro das especificações pré-estabelecidas em legislação vigente. A concentração de vitamina C no suco sem (109,80 g/100g) e com tratamento enzimático (103,42 g/100 g) foram estatisticamente iguais entre si e encontram-se em conformidade com a quantidade exigida na legislação. Segundo Sharma et al. (2017), o ácido ascórbico oxida durante incubação e a oxidação será proporcional à temperatura de incubação. Em relação à acidez total, em ácido cítrico, verificou-se que o suco sem tratamento enzimático apresentou conteúdo de 0,72 g/100g e o suco com tratamento enzimático um valor de 0,74 g/100g.

A partir dos resultados pode ser evidenciado que a aplicação da tanase no suco de caju integral não afetou significativamente os parâmetros

avaliados no que diz respeito aos padrões de identidade e qualidade do produto.

Abdullah et al. (2020) avaliaram a eficiência da aplicação de tanase, produzida por *Aspergillus ficuum*, na degradação de taninos presentes em suco de caju. Após a aplicação da enzima os autores verificaram que o valor de pH manteve-se inalterado. No entanto, o conteúdo em vitamina C teve uma diminuição. Trabalho desenvolvido por Monteiro et al. (2021) após avaliar a biotransformação do suco de pitanga integral verificaram que o suco tratado com tanase não teve seus parâmetros físico-químicos alterados quando comparado com a legislação vigente.

Redução de taninos totais

Existem várias aplicações para a tanase e entre elas, a sua utilização na diminuição da adstringência de sucos de frutas devido ao conteúdo de taninos presentes nos mesmos. A tanase extraída de *Aspergillus tamarii* URM 7115 hidrolisou os taninos presentes no suco de caju. A Tabela 2 indica seu efeito após aplicação. A partir de três repetições das condições de aplicação (6% de extrato enzimático, 30 °C, 150 rpm por 4 h) foi verificada uma redução média de 50 % no teor total.

Tabela 2 - Aplicação de extrato enzimático, contendo tanase de *Aspergillus tamarii* URM 7115, para a redução de taninos em suco de caju integral

Ensaios	Redução de taninos experimental (%)
1	50,83 ± 0,15 a
2	51,26 ± 0,29 a
3	50,35 ± 1,31 a

Letras diferentes na vertical representam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre si.

A utilização de tanase na detanificação de sucos vem sendo explorada e pode minimizar custos de produção pela indústria. Couri et al. (2002) comparou o tratamento da polpa do caju após aplicar tanase e utilizar gelatina, separadamente, visando à redução no teor de taninos totais. Os autores verificaram uma redução de 46 % no teor de taninos totais após utilizar tanase e 39 % após uso da gelatina. Lima et al. (2014) produziram e aplicaram tanase, extraída de *Penicillium montanense* URM 6486, em suco de uva. Após aplicação os autores obtiveram uma redução de 46 % de taninos após 2 horas de aplicação. Sharma et al. (2014) aplicaram tanase de *Aspergillus niger*, parcialmente purificada, em suco de goiaba sendo observado decréscimo no conteúdo de ácido tânico em 17,60, 29,04 e 44,38 % após 30 minutos de tratamento utilizando 0,5, 1,0 e 2,0 % de extrato enzimático, respectivamente.

Com base nos resultados dos pesquisadores supracitados pode-se observar que tanto as condições de aplicação, o tipo de micro-organismos e o meio em que foi aplicado, vão ter influência na diminuição do teor de taninos. A

presença de alto teor de tanino nos frutos é responsável pela turvação e formação de sedimento, cor, amargor e adstringência do suco durante o armazenamento, neste sentido é desejável a aplicação de tanase para remoção dos mesmos.

Fenólicos totais e Atividade antioxidante

Os resultados do teor de fenólicos totais e atividade antioxidante encontram-se na Tabela 3. Como pode ser observado houve diferença significativa entre os ensaios testes (estatisticamente superiores) e o controle, demonstrando a biotransformação do suco de caju. Após o tratamento enzimático houve aumento médio de 51 % no teor de fenólicos no suco de caju integral, além de ser verificado um aumento médio de 22,32 % na atividade antioxidante total. Os dados apresentados mostraram uma correlação positiva entre as análises realizadas. Isto quer dizer que, ao aumentar o conteúdo em compostos fenólicos houve um aumento na atividade antioxidante.

Tabela 3 -Resultados obtidos após a aplicação de extrato enzimático, contendo tanase de *Aspergillus tamarii* URM 7115, no teor de fenólicos totais e atividade antioxidante no suco de caju integral

Ensaio	Fenólicos totais experimentais (mg EAG/100 g)/Aumento de fenólicos (%)	Atividade antioxidante experimental – DPPH (%) / aumento da atividade antioxidante (%)
1	250,60 ± 4,21/51,48 a	46,76 ± 0,20/22,92 a
2	255,47 ± 7,29/54,40 a	46,82 ± 0,17/23,08 a
3	243,30 ± 8,42/47,07 a	46,01 ± 0,79/20,95 a
C	165,45 ± 42,07 b	38,04 ± 1,20 b

C: Controle. Letras diferentes na vertical representam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre médias.

Estudos tem demonstrado que o consumo de frutas e vegetais reduzem o risco de doenças crônicas como o câncer, doenças cardiovasculares e acidente vascular cerebral (Yeum et al., 2003). Isso pode ser devido à presença de diversos compostos fitoquímicos.

Os sucos de frutas (romã, amora, framboesa, etc.) foram recentemente aclamados por seus benefícios para a saúde, em particular, pelo seu potencial antioxidante de combate a doenças (Beniwal, 2013). Em relação ao caju, pesquisadores avaliaram o teor em fenólicos e atividade antioxidante, recomendando o consumo do pseudofruto para prevenção de doenças crônicas. Entretanto, até o momento não foi reportado por outros pesquisadores o efeito de tanase, após aplicação, na atividade antioxidante e no teor de fenólicos em suco de caju integral.

Alves et al. (2013) avaliaram o teor de fenólicos

no pseudofruto do caju e encontraram um valor médio de 279,3 ± 50,4 mg EAG/100 g no conteúdo de fenólicos totais e 22,7 ± 11,2 % de atividade antioxidante. Vieira et al. (2011) determinaram o teor de fenólicos totais e atividade antioxidante em polpa de frutos tropicais e encontraram na polpa de caju o valor médio de 201,61 ± 19,15 mg EAG/100 g em fenólicos totais e uma atividade antioxidante maior do que as polpas de goiaba, cajá e tamarindo. Silva Neto et al. (2021) após avaliar a biotransformação de suco de pitomba integral utilizando tanase de *S. cerevisiae* CCMB 520 verificaram uma redução de 19,20 % no teor de taninos, um aumento nos compostos fenólicos (10,54 para 13,059 mg EQ AG/100 g) e um aumento no poder antioxidante (78,52 para 97,78 %).

Vale ressaltar que os radicais livres podem estimular processos oxidativos e a atividade

antioxidante dos compostos fenólicos reduz o risco dessas doenças (Vetran, 2013). Neste sentido, os resultados deste estudo demonstram a importância da aplicação de tanase no suco de caju visando aumentar a ingestão de substâncias antioxidantes potencialmente protetoras contra diversas doenças crônicas, tais como obesidade, diabetes e cânceres.

CONCLUSÕES

A partir dos resultados verificou-se a importância do uso de tanase na biotransformação de compostos para melhorar a sua atividade funcional e potencial nutracêutico. Os antioxidantes naturais presentes na dieta aumentam a resistência aos danos provocados pela oxidação, apresentando assim um impacto significativo para a saúde humana. Neste sentido, os resultados sugerem que a tanase obtida de *Aspergillus tamarii* URM 7115 pode ser utilizada potencialmente para aplicação biotecnológica industrial, como produção de sucos, visando à diminuição do teor de taninos, aumento de compostos fenólicos e atividade antioxidante total. Vale destacar que após a biotransformação do suco de caju integral não houve perda na qualidade nutricional e alterações nas características físico-químicas.

AGRADECIMENTOS

Ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Pernambuco (IFPE), Campus Barreiros, pela bolsa concedida e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro (469406/2014-3).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdullah S, Pradhan RC, Aflah M, Mishra S. Efficiency of tannase enzyme for degradation of tannin from cashew apple juice: Modeling and optimization of process using artificial neural network and response surface methodology. *Journal of Food Process Engineering*, v. 43, n.10, p.1-10, 2020. <https://doi.org/10.1111/jfpe.13499>
- Aguilar C, Augur C, Viniegra-González G, Favela E. A comparison of methods to determine Tannin Acyl Hydrolase Activity. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v.42, n.3, p.355-361, 1999.
- Alves MSO, Alves AM, Naves MMV. Compostos bioativos e atividade antioxidante de pseudofrutos de caju arbóreo do Cerrado. *Revista Instituto Adolfo Lutz*, v.72, n.4, p.327-331, 2013.
- Banerjee D, Mondal KC, Pati BR. Production and characterization of extracellular and intracellular tannase from newly isolated *Aspergillus aculeatus* DBF 9. *Journal of Basic Microbiology*, v.41, n.6, p.313-318, 2001.
- Beniwal V, Kumar A, Sharma J, Chhokar V. Recent advances in industrial application of tannases: a review. *Recent Patents on Biotechnology*, v.7, n.3, p.228-233, 2013.
- Brand-Williams W, Cuvelier M-E, Berset C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft/Technologie – Food Science and Technology*, v.28, n.1, p.25-30, 1995. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)
- Brasil. Instrução Normativa nº 37, de 1 outubro de 2018. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Poder executivo, Brasília, DF, 8 out. 2018. Seção 1.
- Bruneton J. Elementos de Fitoquímica y de Farmacognosia. AS/Espanha: Ed. Acribia, 1991. 594p.
- Castellani A. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. *Journal of Tropical Medicine & Hygiene*, v.24, p.270-276, 1939.
- Couri S, Menezes LF, Pinto GAS, Souza MLM, Freitas SP. Comparação entre os tratamentos com tanase e com gelatina para clarificação do suco de caju (*Anacardium occidentale* L.). B.CEPPA, Curitiba, v.20, n.1, p.41-54. 2002.
- Costa AM, Kadowaki MK, Minozzo MC, Souza CGM, Boer CG, Bracht A, Peralta RM. Production, purification and characterization of tannase from *Aspergillus tamarii*. *African Journal of Biotechnology*, v.11, n.2, p.391-398, 2012.
- Ferreira, DF. Sisvar: a computer statistical analysis system. *Ciência e Agrotecnologia (UFPA)*, v.35, p.1039-1042, 2011.
- Haslam E. Plant polyphenols (syn. vegetable tannins) and chemical defense-A reappraisal. *Journal of Chemical Ecology*, v.14, n.10, p.1789-1805, 1988. <https://doi.org/10.1007/BF01013477>
- Helbig E, Oliveira AC, Queiroz KS, Reis SM. Effect of soaking prior to cooking on the levels of phytate and tannin of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and the protein value. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, v.49, n.2, p.81-86, 2003. <https://doi.org/10.3177/jnsv.49.81>
- INSTITUTO ADOLFO LUTZ (IAL). Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz: métodos químicos e físicos para análises de alimentos. São Paulo: 4ª edição, 2008. 1020p.
- Khanbabaee K, Ree TV. Tannins: Classification and definition. *Natural Product Reports*, v.18, n.6, p.641-649, 2001. <https://doi.org/10.1039/b101061l>
- Lekha PK, Lonsane BK. Production and application of tannin acyl hydrolase: state of the art. *Advances in Applied Biochemistry and Microbiology. Advances Applied Microbiology*, v.44, p.215-260, 1997. [https://doi.org/10.1016/s0065-2164\(08\)70463-5](https://doi.org/10.1016/s0065-2164(08)70463-5)
- Lima JS, Cruz R, Fonseca JC, Medeiros EV, Maciel MHC, Moreira KA, Motta CMS. Production, Characterization of tannase from *Penicillium montanense* URM 6286 under SSF using agroindustrial wastes, and application in the clarification of grape juice (*Vitis vinifera* L.). *Scientific World Journal*, v.2014, p. 1-9, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/182025>

- Monteiro JM, Albuquerque UP, Araújo EL. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. *Química Nova*, v.28, n.5, p.892-896, 2005. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422005000500029>
- Monteiro GCD, Araujo MIF, Barbosa PPS, Mello MRF, Leite TCC, Assis AS, Sena AR. Biotransformation of Pitanga Juice by Tannase from *Saccharomyces cerevisiae* CCMB 520. In: *Saccharomyces*. 1ed. 1-20 p. 2021.
- Nascimento KBM, Martins AGR, Takaki GMC, Silva CAA, Okada K. Utilização de resíduos agroindustriais para produção de tanase por *Aspergillus* isolado do solo da caatinga de Pernambuco, Brasil. *E-xacta*, Belo Horizonte, v.7 n.1, p. 95-103, 2014. <https://doi.org/10.18674/exacta.v7i1.1146>
- Paula PFA, Souza L, Pimentel CRM. Situação atual e perspectiva da agroindústria do caju. In: Araújo JPP, Silva VV. *Cajucultura: modernas técnicas de produção*. Fortaleza: EMBRAPA- CNPAT, p.23-42, 1995.
- Pinto GAS, Couri S, Gonçalves EB. Replacement of methanol by ethanol on gallic acid determination by rhodanine and its impacts on the tannase assay. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry*, v.5, n.5, p.1560-1568, 2006.
- Rout S, Banerjee R. Production of tannase under mSSF and its application in fruit juice debittering. *Indian Journal of Biotechnology*, v.5 p.346-350, 2006.
- Selwal MK, Yadav A, Selwal KK, Aggarwal NK, Gupta R, Gautam SK. Tannase production by *Penicillium atramentosum* KM under SSF and its applications in wine clarification and tea cream solubilization. *Brazilian Journal Microbiology*, v.42, n.1, p.374-387, 2011. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822011000100047>
- Sena AR, Oliveira BFM, Campos TCL, Nascimento TCES, Moreira KA, Assis SA. Application of aqueous biphasic systems as strategy to purify tannase from *Aspergillus tamarii* URM 7115. *Preparative Biochemistry Biotechnology*, v.47, n.9, p.945-951, 2017. <https://doi.org/10.1080/10826068.2017.1365249>
- Silva Neto GJ, Barbosa JAP, Assis AS, Leite TCC, Sena AR. Biotransformação do suco de pitomba integral por tanase de *Saccharomyces cerevisiae* CCMB 520. In: One GMC, Rocha BL (Org.). *NUTRIÇÃO: Os desafios da pesquisa na atualidade*. 1ed. João Pessoa: Instituto Medeiros de Educação Avançada, v.2, p.143-165, 2021.
- Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventos RM. Analysis of total phenol and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, v.299, p.152-178, 1999. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99017-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1)
- Sharma HP, Patel H, Sugandha. Enzymatic added extraction and clarification of fruit juices-A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v.57, n.6, p.1215-1227, 2017. <https://doi.org/10.1080/10408398.2014.977434>
- Sharma NK, Beniwal V, Kumar N, Kumar S, Pathera AK, Ray A. Production of tannase under solid-state fermentation and its application in detannification of guava juice. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, v.44, n.3, p.281-290, 2014. <https://doi.org/10.1080/10826068.2013.812566>
- Sharma S, Bhat TK, Dawra RK. A spectrophotometric method for assay of tannase using rhodanine. *Analytical Biochemistry*, v.279, n.1, p.85-89, 2000. <https://doi.org/10.1006/abio.1999.4405>
- Sharma P, Chaturvedi A, Sharma L. Parametric Optimization for Extracellular Tannase Production in Submerged Fermentation by Isolated *Aspergillus* Species. *International Journal of Current Microbiology and Applied Science*, v.4, n.4, p. 232-239, 2015.
- Srivastava A, Kar R. Characterization and application of tannase produced by *Aspergillus niger* ITCC 6514.07 on pomegranate rind. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.40, n.4, p.782-789. 2009. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822009000400008>
- Srivastava A, Kar R. Application of immobilized tannase from *Aspergillus niger* for the removal of tannin from myrobalan juice. *Indian Journal of Microbiology*, v.50, n.1, p. 46-51, 2010. <https://doi.org/10.1007/s12088-010-0029-6>
- Vetran IC, Costabile G, Di Marino L, Rivelles AA. Nutrition and oxidative stress: a systematic review of human studies. *International Journal Food Science and Nutrition*, v.64, n.3, p.312-326, 2013. <https://doi.org/10.3109/09637486.2012.738651>
- Vieira LM, Sousa MSB, Mancini-Filho J, Lima A. Fenólicos totais e capacidade antioxidante *in vitro* de polpas de frutos tropicais. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v.33, n.3, p.888-897, 2011. <https://doi.org/10.1590/S0100-29452011005000099>
- Yeum KJ, Russell RM, Krinsky NI, Aldini G. Biomarkers of antioxidant capacity in the hydrophilic and lipophilic compartments of human plasma. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v.430, n.1, p.97-103, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2004.03.006>



Avaliação fitoquímica e atividades biológicas do extrato do exocarpo do fruto de *Protium spruceanum*

Antonio Carlos Pereira de Menezes Filho^a

^a Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano, Brasil

* Autor correspondente (astronomoamadorgoias@gmail.com)

INFO

Keywords

Protium
protective activity
antifungal activity
antibacterial activity

ABSTRACT

Phytochemical evaluation and biological activities of the exocarp extract from the fruit of Protium spruceanum. Protium spruceanum known as “breu branco” is a medicinal plant species. The aim of this study was to evaluate the hydroethanolic extract of the exocarp of the mature fruit of *Protium spruceanum* regarding its phytochemical groups and biological activities. The fruits were collected and the extract produced by static maceration in a 70% hydroethanol solution. The analyzes carried out were for organoleptic, physicochemical, regarding the yield of the extract obtained, relative density, pH, refractive index and optical rotation, and for biological assays, the extract was tested for photoprotection activity in UV-Vis, antifungal activity on *Candida* and antibacterial on *Staphylococcus*, *Salmonella* and *Escherichia* by disk assay (mm). The extract was light brown and aromatic. Qualitative phytochemical screening revealed the presence of organic acids, reducing sugars, phenols, purines, catechins and double olefins. The yield was 16.99%, relative density 0.965 g mL⁻¹, pH 5.26, refractive index 1.3987 n_D and optical rotation -99.8°. In photoprotection activity, the extract exhibited activity at UVC wavelength. In the antifungal activity, potential inhibition was obtained for *C. guilliermondii* and *C. tropicalis* and for antibacterial inhibition for strains of *S. aureus*, *E. coli* and *S. serovar* Enteritidis. The exocarp extract of the ripe fruit of *Protium spruceanum* showed a potential biological effect.

RESUMO

Palavras-chaves

Protium
atividade fotoprotetora
atividade antifúngica
atividade antibacteriana

Protium spruceanum conhecido por “breu branco” é uma espécie vegetal medicinal. O estudo teve por objetivo, avaliar o extrato hidroetanólico do exocarpo do fruto maduro de *Protium spruceanum* quanto aos grupos fitoquímicos e atividades biológicas. Os frutos foram coletados e o extrato produzido por maceração estática em solução hidroetanólica 70%. As análises realizadas foram para organolépticas, físico-químicas quanto ao rendimento de extrato obtido, densidade relativa, pH, índice de refração e giro óptico, e para os ensaios biológicos, o extrato foi testado para atividade de fotoproteção em UV-Vis, atividade antifúngica sobre *Candida* e antibacteriana sobre *Staphylococcus*, *Salmonella* e *Escherichia* pelo ensaio em disco (mm). O extrato apresentou coloração castanho claro e aromático. A prospecção fitoquímica qualitativa revelou a presença de ácidos orgânicos, açúcares redutores, fenóis, purinas, catequinas e duplas olefinas. O rendimento foi de 16,99%, densidade relativa de 0,965 g mL⁻¹, pH 5,26, índice de refração 1,3987 n_D e giro óptico de -99,8°. Na atividade de fotoproteção, o extrato exibiu atividade no comprimento de ondas UVC. Na atividade antifúngica, foi obtido potencial inibição para *C. guilliermondii* e *C. tropicalis* e para antibacteriano inibição para cepas de *S. aureus*, *E. coli* e *S. sorovar* Enteritidis. O extrato do exocarpo do fruto maduro de *Protium spruceanum* demonstrou potencial efeito biológico.

Received 22 January 2021; Received in revised from 19 March 2021; Accepted 28 February 2022



INTRODUÇÃO

A família Burseraceae é composta por 19 gêneros e aproximadamente 700 espécies amplamente distribuídas nos trópicos (295 espécies em 8 gêneros) e subtropicais nas (Américas (Central e do Sul) e África), e em menor quantidade em áreas temperadas quentes, sendo Burseraceae uma das maiores do mundo (Lima et al., 2014; Sri Rama Murthy et al., 2016; Rosalem et al., 2017). No Brasil, os gêneros encontrados nos diversos biomas e domínio Cerrado são, *Protium* Burm. f., *Bursera* Jacq. ex L., *Tetragastris* Gaertn., *Crepidosperrum* Hook. F., *Dacryodes* Vahl e *Trattinnickia* Willd conforme Vieira et al. (2010) e Lima et al. (2014).

Vários táxons do gênero *Protium* são empregados na medicina popular, onde as resinas, óleos essenciais e extratos de diversas partes do vegetal, apresentam inúmeras classes de fitocompostos com potencial comprovado para uso medicinal. Estudos reportam para *P. decandrum*, *P. altsonii*, *P. strumosum*, *P. ovatum*, e *P. spruceanum* importantes atividades biológicas (Silva et al., 2013). As diversas espécies de *Protium* apresentam exsudato branco ou preto extraído principalmente das partes aéreas e das raízes superficiais. Esse exsudato é comercializado em mercados de produtos naturais e em lojas especializadas em produtos fitoterápicos. Sabe-se que, a composição desse exsudato apresenta atividades biológicas com ação antimicrobiana, antioxidante, analgésica, antiinflamatória, antitussígena, antitumoral e edematogênica (Siani et al., 1999; Bandeira et al., 2006; Rüdiger et al., 2007; Camargo et al., 2010; Rosalem et al., 2017; Amparo et al., 2019), bem como no tratamento da pneumonia, tuberculose e gonorréia (Corrêa, 1926; Costa, 1994; Amparo et al., 2018; Aranaga et al., 2020).

Popularmente o gênero *Protium* é conhecido por “almecegueira, breu branco, breu preto, pau-de-breus e resina mesca”. Uma das espécies de com maior distribuição nos ambientes naturais, é a *P. spruceanum* encontrada com abundância nas regiões Amazônica, Mata Atlântica e Cerrado

brasileiro. Em si, um indivíduo de *P. spruceanum* pode alcançar até 20 m de altura; copa densa e arredondada, formando dossel; com tronco reto cilíndrico, com casca rugosa e delgada entre 25-40 cm de diâmetro; folhas compostas, pinadas, alternas; folíolos subcoriáceos entre 3-5, descoloridos, glabros na face superior e pubescentes na face inferior; inflorescências em panículas ramosas axilares com 2-3 cm de comprimento, frutos elipsóides entre 2-3 valvas avermelhadas (Brasil et al., 2018), sendo conhecida entre a população por “breu branco, breu ou almecega-de-casca-lisa” devido a coloração natural esbranquiçada do exsudato aromático produzido nas raízes, tronco, galhos e frutos, sendo utilizado no tratamento de dores estomacais, dores de cabeça e de dente, bem como em processos gripais (Machado et al., 2003; Zoghbi et al., 2005).

Os extratos foliares são utilizados em processos inflamatórios na presença de febre, antinociceptivo e antiedematogênico, sendo estas atividades atribuídas a presença de α - e β -amirinas (Rodrigues et al., 2013; Amparo et al., 2018; Figueiredo et al., 2019), e os frutos, servem de alimento para a fauna como: tucanos, jabutis e tartarugas e ajudam também no processo de digestão desses animais (Machado et al., 2003; Rodrigues et al., 2013).

Como observado, *P. spruceanum* apresenta diversos estudos bem diversificados quanto as atividades biológicas e constituintes fitoquímicos ativos. No entanto, essa espécie ainda apresenta várias possibilidades de estudos de caracterização, bem como, ensaios *in vitro* e *ex vitro*, principalmente para uso farmacológico.

Este estudo teve por objetivo, avaliar o extrato do exocarpo do fruto maduro de *Protium spruceanum* (Figura 1), sobre os grupos fitoquímicos, características físico-químicas e atividades biológicas nos ensaios de fotoproteção, antifúngica sobre o gênero *Candida* e antibacteriana sobre *Staphylococcus aureus*, *Salmonella sorovar* Tiphymurium, *Salmonella sorovar* Enteritidis e *Escherichia coli*.



Figura 1 - Indivíduo de *Protium spruceanum* em período de frutificação e no canto inferior esquerdo o extrato hidroetanólico

MATERIAL E MÉTODOS

Identificação do vegetal e coleta dos frutos

Frutos maduros (1 kg) foram coletados em 20 indivíduos de *P. spruceanum* adultos localizados em uma propriedade rural no município de Rio Verde, Goiás, Brasil, com a seguinte localização geográfica (17°42'59.5''S e 50°53'27.7''W), apresentando altura média de 748 m, tipo de solo distroférrico, clima com duas estações bem definidas: seca (Maio a Outubro) e chuvosa (Novembro a Abril). A espécie foi identificada através de chave dicotômica para o gênero *Protium* pelo Biólogo Mscº. Wendel Cruvinel, e uma exsiccata foi herborizada e depositada no Herbário do Instituto Federal Goiano, Campus Rio Verde, localizado no laboratório de Sistemática Vegetal com o seguinte Voucher (HRV: 15954).

Produção do extrato

O exocarpo foi retirado do fruto utilizando uma faca inox. As sementes foram descartadas. Um total de 500 g de exocarpo teve sua massa determinada em balança analítica digital. E em seguida, o material foi transferido para um processador de alimentos contendo 1 L de uma solução hidroetanólica 70% (v/v) onde foi processado por 5 min. Após esse tempo, a solução foi transferida para um frasco de vidro âmbar onde ficou sob maceração estática por 8 dias, em sala livre de luz e calor. Após esse período, foi adicionado 100 mL de acetona (P.A – ACS) (Neon), permanecendo por mais 2 dias.

A solução foi então filtrada em papel de filtro qualitativo faixa azul (Unifil, C-42), e o sobrenadante coletado em balão de fundo redondo de 2 L. Em seguida, o balão foi transferido para rotaevaporador rotativo com pressão reduzida para concentração do extrato. Após redução, o extrato foi transferido para freezer a $-12\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 h e logo em seguida, transferido para liofilizador até massa constante. O extrato liofilizado foi mantido em frasco de vidro âmbar mantido em freezer a $-10\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ até análises.

Análises físico-químicas

As características organolépticas para cor, aroma, limpidez e homogeneidade foram obtidas por método qualitativo. O rendimento de extrato foi determinado conforme descrito por Rodrigues et al. (2011) através da equação $R(\%) = (Pex/Pexo) \times 100$. Onde: $R(\%)$ = rendimento de extrato em percentagem; Pex = massa do extrato seco; Pexofruto = massa exocarpo *in natura* (g). A densidade relativa foi realizada em proveta

graduada de 10 mL a $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ e o resultado expresso em g mL^{-1} .

A massa do extrato hidroetanólico bruto foi então obtida em balança analítica digital, e o resultado expresso em g mL^{-1} a $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ conforme proposto por Menezes Filho et al. (2020). O pH foi obtido em pHmetro digital de bancada (Lucadena, Mod. Luca-210), a partir de 50 mL o extrato bruto. Para determinação do índice de refração, foi necessário 1 mL do extrato bruto adicionado em refratrômetro digital (Hanna Instruments, Mod. HI96800) com faixa de refração entre 1,3330 a 1,5080, resolução de 0,0001 a $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$. O giro óptico foi determinado em polarímetro (Novainstruments, Mod. WYG-4) com faixa de aferição entre -180° e $+180^{\circ}$ na escala Vernier conforme descrito por Menezes Filho et al. (2020), a partir de solução hidroetanólica conc. 10% (m/v) do extrato e transferida para uma célula de 10 mL.

Prospecção fitoquímica qualitativa

A determinação qualitativa para as classes fitoquímicas de glicosídeos cardíacos, glicosídeos cianogênicos, alcaloides, açúcares redutores e não redutores, ácidos orgânicos, cumarinas, saponinas espumílica e hemolítica, polissacarídeos, fenóis, flavonoides, purinas, resinas, catequinas, depsídeos e depsídonas, esteroides e triterpenoides, sesquiterpenolactonas e outras lactonas, duplas olefínicas e tempo de oxidação foram realizados conforme descrito por Bessa et al. (2013).

Atividade fotoprotetora pelo método de varredura no comprimento de ondas crítico UV-Vis

Uma varredura foi realizada no comprimento de ondas crítico entre 400-240 nm, utilizando espectrofotômetro UV-Vis (Belphotonics, Mod. M-51) e cubeta de quartzo de campo único de 1 cm. O resultado foi analisado onde gerou-se uma imagem (Figura 3) da varredura através do programa UV Professional 2.

Ensaio antifúngico sobre Candida

O ensaio antifúngico avaliando o extrato hidroetanólico do exocarpo do fruto de *P. spruceanum*, foi realizado através do método de difusão em disco de papel, conforme descrito por Menezes et al. (2009) adaptado. As cepas fúngicas utilizadas foram: *Candida tropicalis* (ATCC 4563), *Candida guilliermondii* (ATCC 56822), *Candida albicans* (ATCC 10231) e *Candida krusei* (ATCC 34135) mantidas em meio sólido batata dextrose e ágar (BDA) (Kasvi). As cepas foram então

repicadas em solução caldo Brain Heart Infusion (BHI) (Sigma Aldrich), e em seguida, incubadas a $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 20 horas em estufa bacteriológica.

Inicialmente, foi preparado um inóculo com 100 μL a partir de uma suspensão fúngica em diluição a 10^6 mL^{-1} de células, padronizado conforme a escala de McFarland com turbidez de 0,5 sendo realizado em espectrofotômetro UV-Vis (Belphotonics, Mod. M-51) e densidade óptica em 530 nm, utilizando cubeta de vidro de 5 mL. A solução fúngica foi dispersa homogeneamente pela técnica de esgotamento em placa de *Petri* de 10 cm, contendo meio BDA.

Diferentes concentrações do extrato nas conc. 500; 250; 125; 62,5; 31,25 e 15,62 mg mL^{-1} (m/v) foram previamente diluídas em dimetilsulfóxido (DMSO) (P.A – ACS) (Vetec). Discos de papel de filtro qualitativo com diâmetro de 6 mm foram embebidos com 25 μL de cada concentração de extrato. Logo após, os discos foram adicionados sobre o ágar contendo a solução fúngica e o sistema foi mantido em incubadora bacteriológica a $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 48 h. O acompanhamento do ensaio fúngico foi realizado diariamente, conforme descrito por Gonzalez Hernandez et al. (2020) adaptado.

Foi considerado o halo de inibição igual ou superior à 8 mm de diâmetro. Como controle negativo foi utilizado DMSO, e como controle positivo solução aquosa esterilizada 10 mL contendo o princípio ativo Cetoconazol (Crovell, P.A – ACS, 99%) na conc. de 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (v/m).

Ensaio antibacteriano sobre Staphylococcus aureus, Salmonella sorovar Typhimurium, Salmonella sorovar Enteritidis e Escherichia coli

O ensaio antibacteriano foi realizado conforme descrito por Fernández et al. (2017) adaptado. Foram utilizadas culturas de bactérias dos gêneros *Staphylococcus aureus* (ATCC 9891), *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028), *Salmonella enteritidis* (ATCC 13076) e *Escherichia coli* (ATCC 8739). As bactérias foram doadas pelo banco genético de microorganismos da Universidade Federal de Goiás – UFG, Campus Samambaia, Goiânia, Goiás, Brasil. Inicialmente, as colônias foram suspensas em 50 mL de uma solução aquosa de caldo peptona bacteriológico (PB) (Kasvi) em frasco Erlenmeyer de 125 mL esterilizado. Em seguida, os frascos contendo o suspenso bacteriano foi mantido na temperatura de $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, por 48 h em incubadora bacteriológica (SolidSteel, Mod. SSD). Após a fase crescimento, alíquotas de 5 mL foram coletadas e distribuídas em placas de *Petri* contendo meio sólido Ágar Contagem de Placas (ACP) (Kasvi)

esterilizado. Após esse procedimento, as placas foram homogeneizadas com auxílio de uma alça de *Drigalski* e incubadas a $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 h.

Após esse tempo, foram selecionadas e transferidas cinco colônias com auxílio de uma alça de platina para Erlenmeyers de 125 mL contendo 50 mL de caldo PB. Após esse procedimento, os frascos foram incubados a $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ por ~36 horas com agitação orbital a 100 rpm, até obtenção de turbidez adequada conforme escala 0.5 de McFarland. Após determinação da turbidez ideal, entre $1\text{--}2 \times 10^8\text{ UFC mL}^{-1}$, uma alíquota de 5 mL foi coletada e transferida para placas de *Petri* contendo meio ACP. Em seguida, a solução foi homogeneizada com auxílio de uma alça de *Drigalski*.

A avaliação da atividade antimicrobiana foi realizada através do método de difusão em poços. Na placa de *Petri* foram realizados pequenos poços com 9 mm de diâmetro na superfície do meio. Em cada placa, foram realizados 4 poços onde foi aplicado 100 $\mu\text{L mL}^{-1}$ para o 1º poço: Ciprofloxacina 500 mg mL^{-1} (La Santé), como controle positivo, no 2º poço: Azitromicina 500 mg mL^{-1} (Eurofarma), como controle positivo, no 3º poço: solução hidroetanólica como controle negativo, e no 4º poço: extrato hidroetanólico do exocarpo do fruto maduro de *P. spruceanum* nas concentrações 500; 250; 125; 62,5; 31,25 e 15,62 mg mL^{-1} (m/v). Os controles positivos foram diluídos em 100 mL de água destilada estéril conc. 500 mg 100 mL^{-1} .

Após a aplicação, as placas foram mantidas por 30 minutos em câmara de fluxo laminar a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, e em seguida, incubadas a $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 36 horas. Após este período, a mensuração foi realizada utilizando paquímetro digital (Digimess, Mod. 100.174NL), com resolução de 0,01 mm/.0005" e erro de 0,001 mm. Foi considerado o halo de inibição igual ou superior à 8 mm de diâmetro.

Análise Estatística

Os experimentos foram realizados em triplicata seguido de $\pm$ desvio padrão. Para determinação da diferença estatística entre o antifúngico e os agentes antibacterianos de referências, e as concentrações do extrato hidroetanólico 70%, foi utilizado teste de Duncan com significância ($p < 5\%$). O programa estatístico utilizado foi o IBM SPSS (Statistic 26).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O extrato apresentou coloração castanho claro, aromático, límpido e homogêneo, com rendimento de $16,99\% \pm 1,54$, densidade relativa foi de 0,96569

$\pm 0,01 \text{ g mL}^{-1}$ a 20°C , $\text{pH} = 5,26 \pm 0,02$, índice de refração = $1,3987 \pm 0,04$ n_D 20°C e giro óptico de $-99,8^\circ$.

Os métodos qualitativos para fitoquímica é uma importante ferramenta preliminar onde possibilita *screening* inicial de baixo custo, especialmente quando se desconhece o perfil químico de um vegetal. O extrato hidroetanólico do exocarpo do fruto de *P. spruceanum* apresentou resultados positivos para um grande número de fitomoléculas (Tabela 1).

Estudos fitoquímicos com espécies do gênero *Protium* reportam a presença de esteróides, terpenos (mono e triterpenos), cumarinas, ligninas, fenilpropanoides e flavonoides (Magalhães et al., 2006; Adfa et al., 2013) corroborando com esse estudo. Ainda são escassos os estudos com extratos do fruto de *P. spruceanum* na literatura, embora observa-se um grande número de trabalhos com folhas, galhos e resina como relatado por Figueiredo et al. (2019) em que avaliaram os extratos etanólico e aceto-etílico foliar quanto aos fitocompostos, moléculas de glicerol, ácido hexadecanóico, galactopiranosose, inositol, ácido oléico, catequina que foram observados em ambos os extratos. Fitomoléculas não compartilhadas foram ácido piroglutâmico, ácido 2-aminoheptanodióico, ácido ribônico, talose, A- β -glucopiranosídeo para o extrato etanólico, e β -Amirina para o extrato aceto-etílico foliar. Amparo et al. (2019) também encontraram um grande número de moléculas nos grupos dos taninos (procianidina B) e seis flavonoides (catequina, isoquercetina, quercetina-3-O-glucuronídeo, rutina, quercitrina e kaempferol-3-O-ramnosídeo) nos extratos hidrometanólicos das folhas e galhos finos de *P. spruceanum*.

Alguns desses constituintes presentes no extrato de *P. spruceanum* podem responder

majoritariamente por inúmeras atividades biológicas, embora sua ação seja normalmente através de conjugações em determinada bioatividade. Por exemplo: ácidos orgânicos, apresentam ação antibacteriana principalmente para o grupo de bactérias gram-negativas e ação fungistática devido ao baixo pH (Duarte et al., 2014); açúcares redutores atuam no sistema nervoso central (SNC) e musculoesquelético suprindo de energia e agindo também como gastoprotetor (Menezes Filho e Castro, 2019).

Fenóis apresentam capacidade redutora em radicais livres que são gerados continuamente no organismo ou mesmo adquiridos na forma exógena, sendo esses, estando intimamente ligados a diversas patologias principalmente aos inúmeros tipos de cânceres, envelhecimento precoce e distúrbios genéticos (Rocha et al., 2011; Bessa et al., 2013); taninos, caracterizados como compostos fenólicos possuem atividade antioxidante, antifécciosa, antibacteriana, antifúngica, antitumoral e antiprotozoária além de auxiliar no reparo e regeneração tecidual (Robbers et al., 1997; Bessa et al., 2013); compostos purínicos apresentam atividade antialucínógena e inseticida (Vizzotto et al., 2010; Menezes Filho e Castro, 2020).

As catequinas são polifenóis, que apresentam atividade antioxidante, quimioprotetora, termogênica, antiinflamatória, antitumoral e com ação reguladora de gordura atuando diretamente no metabolismo dos lipídios (Schmitz et al., 2005; Bessa et al., 2013; Menezes Filho e Castro, 2019), duplas olefinas são capazes de formarem compostos estruturais resinosos e oleosos apresentando também aromas adocicados (Menezes Filho e Castro, 2019), como observado no próprio extrato desse estudo.

Tabela 1 – Prospecção fitoquímica do extrato hidroetanólico 70% do exocarpo do fruto de *Protium spruceanum*

Grupos	Resultados
Glicosídeos cardíacos	-
Glicosídeos cianogênicos	-
Alcaloides	+
Ácidos orgânicos	+++
Açúcares redutores	+++
Açúcares não redutores	++
Cumarinas	-
Saponinas espumídica	-
Saponinas hemolítica	+
Polissacarídeos	-
Fenóis	+++
Taninos	Verde
Flavonoides	++
Purinas	+++

(continua..)

Tabela 1 – Prospecção fitoquímica do extrato hidroetanólico 70% do exocarpo do fruto de *Protium spruceanum* (continuação)

Grupos	Resultados
Resinas	++
Catequinas	+++
Depsídeos e depsidonas	++
Esteroides e triterpenóides	-
Sesquiterpenolactonas	+
Dupla olefínicas	+++
Tempo de oxidação	2 seg.

Nota: (-) negativo. (+) fraco positivo. (++) moderado positivo. (+++) forte positivo. Taninos: Verde condensado o catéquicos. Azul (Az) hidrolisável ou gálicos

O extrato do exocarpo do fruto maduro de *P. spruceanum* apresentou uma banda entre 256-288 nm. Essa banda apresenta as características larga amplitude com média intensidade e máxima absorção energética entre 270-280 nm, nesta faixa de comprimento de ondas, prevalece fontes energéticas pertencentes a UVC, que compreende entre a faixa espectral de 100-280 nm (Figura 2).

Fontes energéticas do espectro do ultravioleta causam sérios danos nos vegetais, animais e no próprio homem. Com isso, a evolução dos vegetais proporcionou que grupos de moléculas apresentassem característica de repelir essas fontes impedindo assim, os efeitos deletérios nos tecidos superficiais. A partir disso, os pesquisadores desenvolveram emulsões capazes de agirem como meio bloqueador e filtrando essas fontes de energia. O fator de proteção solar (FPS) por estimativa em espectrofotometria, baseia-se em um número que avalia o filtro solar ou uma ou várias fitomoléculas em conjunto em estudo, de acordo com a altura, largura e localização da banda de absorção dentro do espectro do UV (Mansur et al., 1986; Violante et al., 2009).

Conforme Violante et al. (2009), extratos

vegetais também podem apresentar diferentes comportamentos de absorção de fontes energéticas no UV, como ocorre entre as soluções emulsificantes fotoprotetoras alopatícas. Isso se deve, a presença de diferentes classes fitoquímicas, que são capazes de absorver diferentes fontes UV (UVA, UVB e UVC).

Entre estas classes fitoquímicas estão os flavonoides, taninos, antraquinonas, alcalóides e polifenóis que além de agirem como fotoprotetores, agem também como antioxidantes (Henriques et al., 2000; Violante et al., 2009). Corroborando com os estudos de Bobin et al. (1994), e Violante et al. (2009) ainda observando a (Figura 2), a banda observada é característica dos flavonóides que em solução hidroetanólica absorvem com duas bandas características, a primeira entre 240-280 nm e a segunda entre 300-550 nm. Além disso, o resultado qualitativo para flavonoides (Tabela 1) corrobora com a análise espectrofotométrica em UV-Vis. No entanto, novos estudos deverão ser realizados na determinação quantitativa do flavonoide por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para o extrato do fruto de *P. spruceanum*.

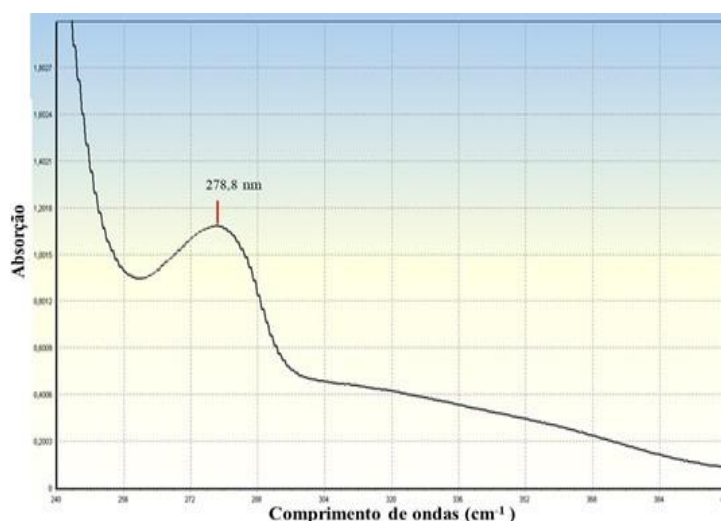


Figura 2 - Varredura em espectrofotometria UV-Vis no comprimento de ondas crítico entre 400 a 240 nm sobre o extrato hidroetanólico do exocarpo do fruto maduro de *Protium spruceanum*

O ensaio antifúngico a partir do extrato do exocarpo do fruto de *P. spruceanum* sobre cepas de *Candida*, demonstrou que a eficiência alta sensibilidade é maior em maiores conc. sobre *C. guilliermondii* (Figura 3), para *C. tropicalis* fica claro que a ação antifúngica é dose dependente. Para *C. krusei* foi observada discreta sensibilidade apenas nas maiores concentrações entre 500 e 250 mg mL⁻¹. O teste antifúngico com *C. albicans* demonstrou que essa levedura apresentou resistência em todas as concentrações não sendo possível a verificação de inibição. *Candida albicans* é a espécie de *Candida* oportunista em indivíduos humanos imunossuprimidos e em infecções hospitalares (Vieira e Santos, 2017). Todos os resultados apresentaram diferença significativa entre o antifúngico de referência e as dosagens do extrato conforme teste de Duncan $p < 5\%$. Quando comparado ao antifúngico de referência, as cepas de *Candida* ainda apresentam alta sensibilidade.

De acordo com Vieira e Santos (2017) e López-Ávila et al. (2016), as principais espécies de interesse clínico e epidemiológico são: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. krusei*. Os pesquisadores ainda complementam que, nos surtos de candidíase são observadas diferentes manifestações clínicas desde cutânea a quadros mais severos e altamente perigosos observados na forma de candidíase invasiva e sistêmica. Embora

os agentes antifúngicos apresentem boa eficácia na inibição desses fungos patológicos, o uso concomitante e contínuo de drogas antifúngicas, vem promovendo o aparecimento de cepas resistentes principalmente para Anfotericina B, Fluconazol, Caspofungina e Azóis (Quintero, 2010; López-Ávila et al., 2016; Vieira e Santos, 2017).

De acordo com Rodrigues e Wrangham (1993), os frutos de *Protium* sp., são utilizados entre os macacos para curarem infecções oportunistas causadas por fungos. Vários estudos com extratos vegetais apresentam resultados promissores na inibição de diferentes cepas de *Candida*. Além da atividade antifúngica em fungos promotores de patologias em animais e humanos, os extratos, óleos essenciais e óleos-resinas de *Protium* proporcionam atividade antifúngica em espécies fitopatológicas como descrito no estudo de Carvajal, Alvarez e Sorio (2016) a partir do óleo essencial de *P. colombianum* com potencial atividade antifúngica sobre isolados de *Fusarium* (*F. oxysporum* e *F. solani*). No estudo de Silva et al. (2013) foi observado inibição na concentração mínima inibitória (CMI) de 1,25 mg mL⁻¹ para o óleo essencial de breu preto (*Protium* spp.) sobre isolado de *C. albicans*. Bandeira et al. (2006) também observaram que o óleo essencial da resina de *Protium heptaphyllum* apresentou atividade fíngistática sobre *C. albicans*.

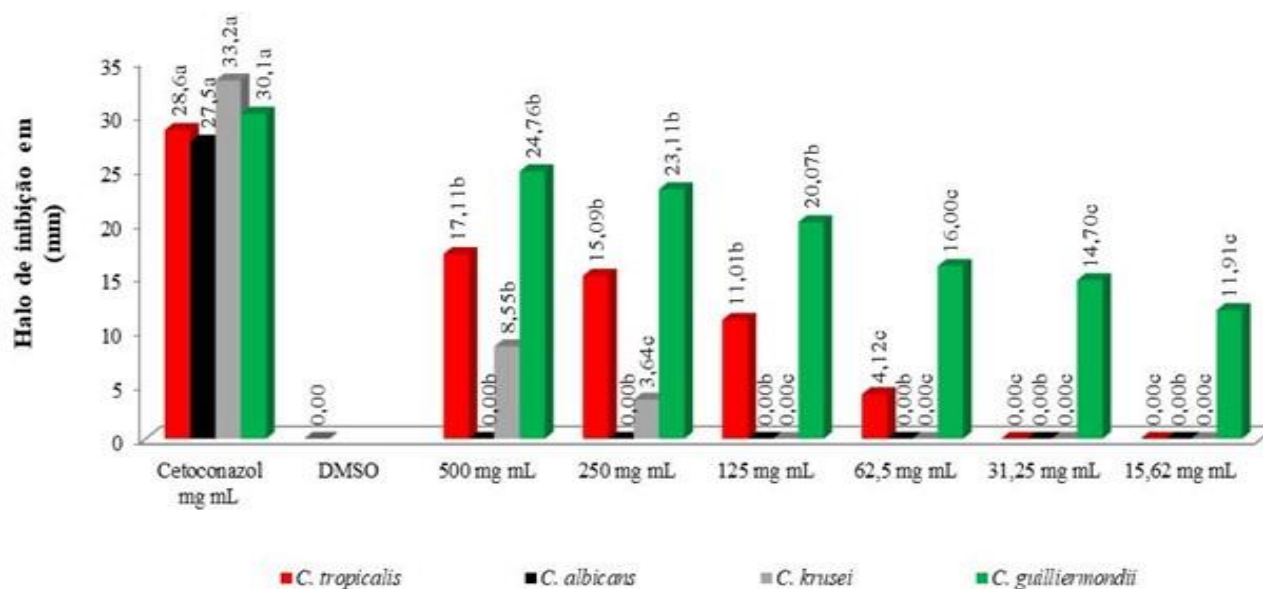


Figura 3 - Atividade antifúngica do extrato hidroetanólico do exocarpo do fruto de *Protium spruceanum* sobre *Candida*. Letras diferentes apresentam diferença estatística entre o antifúngico de referência e as dosagens do extrato pelo teste de Duncan ($p < 5\%$)

O extrato hidroetanólico apresentou alto potencial de inibição bacteriana sobre *S. aureus* entre as

concentrações 500-31,5 mg mL⁻¹ e para *E. coli* entre as concentrações 500-15,62 mg mL⁻¹ (Figura

4). Estatisticamente, ambas as cepas demonstraram ser sensíveis ao extrato bruto do exocarpo do fruto. Ainda quando comparado aos antibacterianos de referência Ciprofloxacina e Azitromicina (500 mg mL⁻¹) antibióticos de amplo espectro, o extrato nas maiores concentrações entre 500-125 mg mL⁻¹ não diferiram entre si pelo teste de Duncan.

Discreta inibição foi observada em *S. serovar* Enteritidis que diferiu entre os antibióticos de referência mesmo na maior concentração de extrato. No entanto, demonstrou eficácia podendo ser administrado em conjunto com antibióticos avaliados proporcionando o sinergismo entre as moléculas, embora seja necessário novos estudos sobre essa administração de doses *in vitro*. Para *S. serovar* Typhimurium não foi possível verificar inibição antibacteriana em nenhuma das doses, demonstrando ser ineficaz. Entretanto, ambos os antibióticos de referência, ainda apresentam alta eficácia de inibição para essa cepa.

Outros estudos demonstram o importante efeito biológico de *P. spruceanum* como no estudo de

Amparo et al. (2017) com o extrato etanólico dos galhos de *P. spruceanum* com boa eficácia sobre zonas de inibição superiores a 10 mm em 19 bactérias patogênicas sendo este, um extrato com alto potencial bacteriostático. Silva et al. (2013) observaram sensibilidade embora discreta, sobre *Mycobacterium tuberculosis* na concentração de 100 µg mL⁻¹ a partir do óleo essencial da resina do breu preto (*Protium* spp.). Os pesquisadores ainda observaram baixa atividade de inibição sobre *S. aureus* e *E. coli* avaliando tanto o óleo essencial do breu preto quanto do breu branco de *Protium*. Bandeira et al. (2006) também observaram atividade antibacteriana sobre *S. aureus* e *E. coli* utilizando o óleo essencial da resina de *P. heptaphyllum*. Algumas espécies de *Protium* sp., produtoras de óleo essencial também apresentam interessantes valores de inibição de crescimento sobre *S. aureus* Rosenbach., *Mycobacterium smegmatis* Trevisan. e para *Bacillus subtilis* Ehrenberg. (Carvajal et al., 2016).

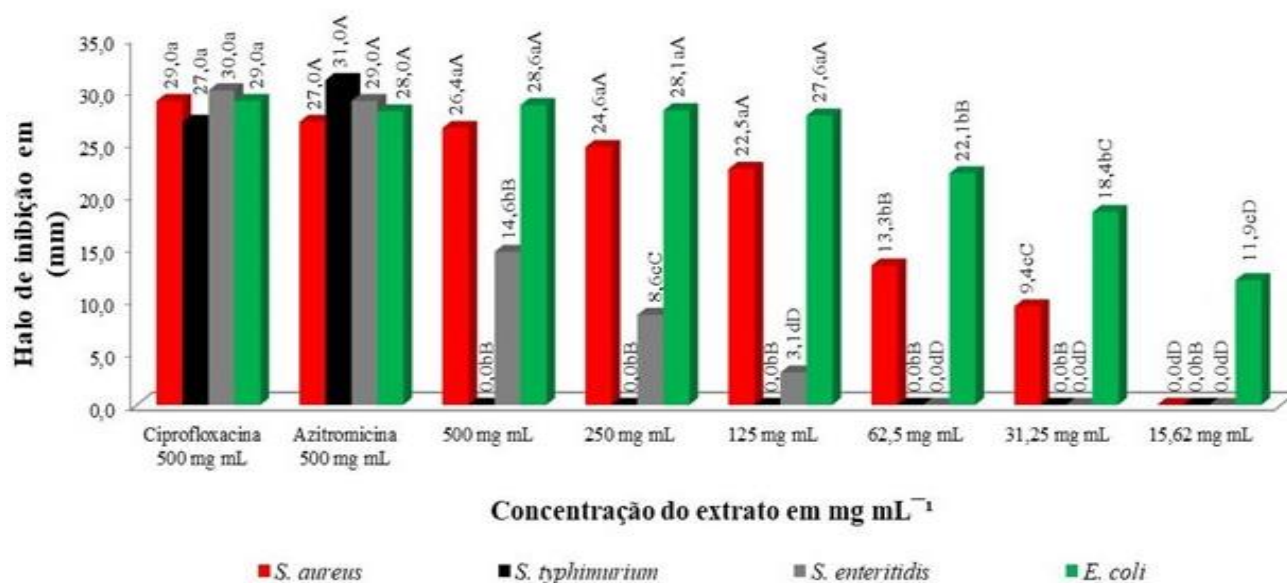


Figure 4 - Atividade antibacteriana do extrato hidroetanólico do exocarpo do fruto maduro de *Protium spruceanum* sobre *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium* e *Staphylococcus aureus*. Letras diferentes apresentam diferença estatística entre o antifúngico de referência e as dosagens do extrato pelo teste de Duncan ($p < 5\%$)

CONCLUSÃO

O extrato hidroetanólico de *Protium spruceanum* exibiu grande número de grupos de fitomoléculas no ensaio de prospecção qualitativa, além disso, importante rendimento de extrato bruto, bem como atividade fotoprotetora sobre a fonte energética UVC e excepcional atividade antifúngica

sobre *Candida guilliermondii* e antibacteriana sobre *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Estudos futuros deverão ser realizados avaliando quantitativamente os grupos de fitomoléculas no extrato do exocarpo do fruto de *P. spruceanum* por cromatografia líquida de alta eficiência, bem como, avaliar novos grupos de agentes fúngicos e bacterianos.

AGRADECIMENTOS

Ao Instituto Federal Goiano; ao Departamento de Agroquímica; aos laboratórios de Química Tecnológica, Química Orgânica, Química Geral e Inorgânica, Fitotécnica; órgãos de fomento em pesquisa CAPES, CNPq, FINEP e FAPEG.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adfa M, Hattori Y, Ninomiya M, Funahashi Y, Yoshimura T, Koketsu M. Chemical constituents of Indonesian plant *Protium javanicum* Burm. f. and their antifeedant activities against *Coptotermes formosanus* Shiraki. *Natural Product Research*, v.27, p.270-273, 2013. <https://doi.org/10.1080/14786419.2012.665917>
- Amparo TR, Seibert JB, Mathias FAZ, Vieira JFP, Soares RDOA, Freitas KM, Cabral VAR, Brandão GC, Santos ODH, Souza GHB, Vieira PMA. Anti-inflammatory activity of *Protium spruceanum* (Benth.) Engler is associated to immunomodulation and enzymes inhibition. *Journal of Ethnopharmacology*, v.241, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.112024>
- Amparo TR, Rodrigues IV, Seibert JB, Souza RHZ, Oliveira AR, Cabral VAR, Vieira PMA, Brandão GC, Okuma AA, Vieira Filho AS, Teixeira LFM, Souza GHB. Antibacterial activity of extract and fractions from branches of *Protium spruceanum* and cytotoxicity on fibroblasts. *Natural Product Research*, v.32, n.16, p.1951-1954, 2018. <https://doi.org/10.1080/14786419.2017.1354182>
- Aranaga CA, Fraile S, Torres A, Falco A, Michelangeli F, Takiff H. Antimycobacterial and PKnB inhibitory activities of Venezuelan medicinal plants. *International Journal of Microbiology*, v.2020, 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/8823764>
- Bandeira PN, Fonseca AM, Costa SMO, Lins MUDS, Pessoa ODL, Monte FJQ, Nogueira NAP, Lemos TLG. Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil of resin *Protium heptaphyllum*. *Natural Product Communication*, v.1, n.2, p.117-120, 2006. <https://doi.org/10.1177%2F1934578X0600100207>
- Bessa NGF, Borges JCM, Besarra FP, Carvalho RHA, Pereira MAB, Fagundes R, Campos SL, Ribeiro LU, Quirino MS, Chagas Junior AF, Alves A. Prospecção fitoquímica preliminar de plantas nativas do cerrado de uso popular medicinal pela comunidade rural do assentamento vale verde – Tocantins. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, v.15, n.4, p.692-707, 2013. <https://doi.org/10.1590/S1516-05722013000500010>
- Brasil COM, Lacerda GA, Arrudas SR, Veloso MDM. Essential oil content and composition of almescla resin (*Protium spruceanum* (Benth.) Engl., Burseraceae). *Journal of Agricultural Science*, v.10, n.11, p.442-450, 2018. <https://doi.org/10.5539/jas.v10n11p442>
- Camargo JER, Afonso ANT, Rojas-Rozo RA, Castro C, Murcia TR. Efeitos citotóxicos *in vitro* de extratos y fracciones de *Bursera tomentosa* (Jacq.) Triana and Planch., Burseraceae, frente a linhas celulares tumorais humanos. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.20, n.4, p.588-593, 2010. <https://doi.org/10.1590/s0102-695x2010000400019>
- Carvajal D, Alvarez R, Osorio E. Chemical variability of essential oils of *Protium colombianum* from two tropical life zones and their *in vitro* activity against isolates of *Fusarium*. *Journal Pest Science*, v.89, n.1, p.241-248, 2016. <https://doi.org/10.1007/s10340-015-0667-x>
- Corrêa MP. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Imprensa Nacional, Rio de Janeiro, 1926.
- Costa A. Fármacos resinosos. In: *Farmacognosia*. Ed., Costa A, p.773-842. Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, 1994.
- Duarte JL, Mota LJ, Almeida SSMS. Análise fitoquímica das folhas de *Tabebuia serratifolia* (Vahl.) Nicholson (Ipê Amarelo). *Revista Estação Científica*, v.4, n.1, p.33-43, 2014.
- Figueiredo JCG, Nunes YRF, Vasconcelos VO, Arruda SR, Morais-Costa F, Santos, Alvez FS, Duarte ER. Effects of leaf extracts of *Protium spruceanum* against adult and larval *Rhipicephalus microplus*. *Experimental and Applied Acarology*, v.79, p.447-458, 2019. <https://doi.org/10.1007/s10493-019-00447-4>
- Gonzalez Hernandez, RM, Martínez VR, Delgado MM, Abreu YM, Hernández LJG. Actividad antibacteriana del extracto de *Mentha arvensis* L. (menta japonesa), frente a cepas productoras de piodermis. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, v.25, n.4, p.e1164, 2020.
- Henriques AT, Kerber VA, Moreno PRH. Alcalóides: generalidades e aspectos básicos. In: *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 2.ed. UFRGS/UFSC: Porto Alegre/Florianópolis, p.641-642, 2000.
- Lima TAAC, Rocha KRA, Melo MFF, Marques MOM, Facanali R, Lima MP. Aspectos morfológicos e químicos de *Protium spruceanum*: Uma contribuição ao conhecimento de espécies aromáticas do Bosque da Ciência do INPA. *Scientia Amazonia*, v.3, n.2, p.6-10, 2014.
- López-Ávila K, Dzúl-Rosado KR, Lugo-Caballero C, Arias-León J, Zavala-Castro JE. Mecanismos de resistencia antifúngica de los azoles en *Candida albicans*. Uma revisión. *Revista Biomédica*, v.27, p.127-136, 2016.
- Machado LB, Zoghbi MGB, Helena E, Andrade EHA. Seasonal variation in the composition of the essential oils from the leaves, thin branches and resin of *Protium spruceanum* (Benth.) Engl. *Flavour and Fragrance Journal*, v.18, n.4, p.338-341, 2003. <https://doi.org/10.1002/ffj.1238>
- Magalhães A, Zoghbi MDGB, Siani AC. 5-Methoxypropacin, a novel coumarinolignoid from *Protium unifoliatum*. *Natural Product Research*, v.20, n.1 p.43-46, 2006. <https://doi.org/10.1080/14786410500055555>
- Mansur JS, Breder MVR, Mansur MCA, Azulay RD. Correlação entre a determinação do fator de proteção solar em seres humanos e por espectrofotometria. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v.61, n.4, p.167-172, 1986.
- Melo MFF, Macedo ST, Daly DC. Morfologia de frutos, sementes e plântulas de nove espécies de *Protium* Burm. f. (Burseraceae) da Amazônia Central, Brasil. *Acta Botanica Brasilica*, v.21, n.3, p.503-520, 2007. <https://doi.org/10.1590/S0102-33062007000300001>
- Menezes Filho ACP, Castro CFS. Classes fitoquímicas de metabólitos secundários em extratos etanólicos foliares de espécies do Cerrado brasileiro. *Revista Saúde & Ciência*

- Online, v.8, n.1, p.45-61, 2019.
<https://doi.org/10.35572/rsc.v8i1.60>
- Menezes Filho ACP, Castro CFS. Identificação das classes fitoquímicas de metabólitos secundários em extratos etanólicos foliares de espécies do Cerrado goiano/GO, Brasil. *Revista Eixo*, v.9, n.2, p.41-52, 2020.
<https://doi.org/10.19123/eixo.v9i2.653>
- Menezes Filho ACP, Sousa WC, Castro CFS. Caracterização química e atividades antioxidante e antifúngica do óleo essencial das flores de [*Cochlospermum regium* (Mart. ex Schrank.) Pilger] (Bixaceae). *Revista Princípios*, v.52, p.80-91, 2020. <http://dx.doi.org/10.18265/1517-0306a2020v1n52p80-91>
- Moreno J, Aparicio R, Velasco J, Rojas LB, Usubillaga A, Lue-Merú M. Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil from fruits of *Bursera tomentosa*. *Natural Product Communications*, v.5, n.2, p.311-313, 2010. <https://doi.org/10.1177%2F1934578X1000500229>
- Quintero CHG. Resistencia de levaduras del género *Candida* al fluconazol. *Infectio*, v.14, p.172-180, 2010.
[https://doi.org/10.1016/S0123-9392\(10\)70134-X](https://doi.org/10.1016/S0123-9392(10)70134-X)
- Robbers JE, Speedie MK, Tyler VE. *Farmacognosia e Farmacobiocotecnologia*, 1.ed. São Paulo: Editorial premier. 372 p. 1997.
- Rocha WS, Lopes RM, Silva DB, Vieira RF, Silva JP, Agostini-Costa TS. Compostos fenólicos totais e taninos condensados em frutas nativas do cerrado. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v.33, n.4, p.1215-1221, 2011.
<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-29452011000400021>
- Rodrigues IV, Souza JNP, Silva ACG, Chibli LA, Cabral VAR, Vieira Filho AS, Perazzo FF, Guimarães AG, Souza GHB. Antiedematogenic and antinociceptive effects of leaves extracts from *Protium spruceanum* Benth. (Engler). *Pharmacognosy Journal*, v.5, p.6-13, 2013.
<https://doi.org/10.1016/j.phcgj.2012.08.001>
- Rodrigues TS, Guimarães SF, Rodrigues-das-Dôres RG, Gabriel JV. Métodos de secagem e rendimento dos extratos de folhas de *Plectranthus barbatus* (boldo-da-terra) e *P. ornatus* (boldo-miúdo). *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, v.13, p.587-590, 2011.
<http://dx.doi.org/10.1590/S1516-05722011000500014>
- Rodriguez E, Wrangham R. Chapter 4, 1993. Zoopharmacognosy: the use of medicinal plants by animals in: Downum KR, Stafford HA. (Eds.), *Phytochemical Potential of Tropical Plants. Recent Advances in Phytochemistry* (Proceedings of the Phytochemical Society of North America), 27. Springer, Boston, MA, p.89-105.
https://doi.org/10.1007/978-1-4899-1783-6_4
- Rosalem PF, Picão TB, Rodrigues-Lisoni FC, Martins AR. Leaf anatomy of *Protium ovatum* and its antiproliferative potential in cervical cells. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, v.27, p.673-678, 2017.
<https://doi.org/10.1016/j.bjp.2017.09.001>
- Rüdiger AL, Siani AC, Veiga-Júnior VF. The chemistry and pharmacology of the South America genus *Protium* Nurm. F. (Burseraceae). *Pharmacognosy Review*, v.1, n.1, p.93-104, 2007.
- Schimitz W, Saito AY, Estevão D, Saridakis HO. O chá verde e suas ações como quimioprotetor. *Semina: Ciências Biológicas e da Saúde*, v.26, n.2, p.119-130, 2005.
<http://dx.doi.org/10.5433/1679-0367.2005v26n2p119>
- Siani AC, Ramos MFS, Menezes-de-Lima O, Ribeiro-dos-Santos R, Fernandez-Ferreira E, Soares ROA, Rosas EC, Susunaga GS, Guimarães AC, Zoghbi MGB, Henriques MGMO. Evaluation of anti-inflammatory-related activity of essential oils from the leaves and resin of species of *Protium*. *Journal of Ethnopharmacology*, v.66, n.1, p.57-69, 1999. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(98\)00148-2](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(98)00148-2)
- Silva ER, Oliveira DR, Leitão SG, Assis IM, Veiga-Júnior VF, Lourenço MC, Alviano DS, Alviano CS, Bizzo HR. Essential oils of *Protium* spp. samples from Amazonian popular markets: chemical composition, phytochemical parameters and antimicrobial activity. *Journal of Essential Oil Research*, v.25, n.3, p.171-178, 2013.
<http://dx.doi.org/10.1080/10412905.2012.751055>
- Sri Rama Murthy K, Chandrasekhara Reddy M, Sandhya Rani S, Pullaiah T. Bioactive principles and biological properties of essential oils of Burseraceae: A review. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, v.5, n.2, p.247-258, 2016.
- Vieira FA, Appolinário V, Fajardo CG, Carvalho D. Reproductive biology of *Protium spruceanum* (Burseraceae), a dominant dioecious tree in vegetation corridors in Southeastern Brazil. *Revista Brasileira de Botânica*, v.33, n.4, p.711-715, 2010. <https://doi.org/10.1590/S0100-84042010000400018>
- Vieira AJH, Santos JI. Mecanismos de resistência de *Candida albicans* aos antifúngicos anfotericina B, fluconazol e Caspofungina. *RBAC*, v.49, n.3, p.235-239, 2017.
<https://doi.org/10.21877/2448-3877.201600407>
- Violante IMP, Souza IM, Venturini CL, Ramalho AFS, Santos RAN, Ferrari M. Avaliação *in vitro* da atividade fotoprotetora de extratos vegetais do cerrado de Mato Grosso. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.19, n.2a, p.452-457, 2009. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2009000300020>
- Vizzotto M, Krolow AC, Weber GEB. Metabólitos secundários encontrados em plantas e sua importância. *Pelotas: Embrapa*, 2010. 16p. (Embrapa Clima Temperado. Documentos, 316).
- Zoghbi MGB, Andrade EHA, Lima MP, Silva TMD, Daly DC. The essential oils of five species of *Protium* growing in the North of Brazil. *Journal of Essential Oil-Bearing Plants*, v.8, n.3, p.312-317, 2005.
<https://doi.org/10.1080/0972060X.2005.10643458>
- Zoghbi MGB, Andrade EH, Maia JG. Composition of the essential oils from leaves, wood, fruits and resin of *Protium spruceanum* (Benth.) Engl. *Journal of Essential Oil Research*, v.14, n.3, p.169-171, 2002.
<https://doi.org/10.1080/10412905.2002.9699813>



Análise bioeconômica da relação custo-benefício de dois protocolos de IATF utilizados em vacas zebuínas

Jorge Luís Ferreira^{a*}, Matheus Henrique Dias Rodrigues^a, Gabriel Almeida Peres^a,
Murilo Ferreira da Silva Junior^a, Mário Antônio Vilches Júnior^a, Helcileia Dias Santos^a,
José Bento Sterman Ferraz^b

^a Universidade Federal do Tocantins, Brasil

^b Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Brasil

* Autor correspondente (jlferrreira@uft.edu.br)

INFO

Keywords

bovine
investment
economic viability

ABSTRACT

Bioeconomic analysis of the cost-effectiveness of two FTAI protocols used in Zebu cows. The objective was to evaluate the economic viability of two experiments carried out in 2019 and 2020, in which the first experiment (P1) evaluated the effect of additional dose of PGF2 α and the second (P2) the effect of the association of butaphosphan and cyanocobalamin, on Pregnancy rate of beef cows submitted to Fixed-Time Artificial Insemination (FTAI). For the calculations, the fixed and random costs of the practice were considered, in reais (R\$), practiced in the region of Araguaína-TO on 05/13/2021. Financial analyzes were performed using Microsoft Excel® considering 100 cows per treatment in each experiment. It was verified, in both experiments, that the treated groups had higher costs per FTAI (R\$: 63.98 and 67.58) compared to the control (R\$: 60.58 and 60.58) for P1 and P2 respectively, with lower cost per pregnancy (R\$: 95.97 and 110.26) compared to control (R\$: 146.58 and 133.29) resulting in better returns and economic viability. In the comparison between the protocols (P1 and P2), P1 had a net income of R\$12,853.35 and an investment in the FTAI cost of R\$360.00. However, although there is a financial difference in this simulation, the choice for one or the other experimental protocol must be made considering the needs of the herd, and both FTAI protocols had increases in zootechnical indices and financial results compared to the control.

RESUMO

O objetivo foi avaliar a viabilidade econômica de dois experimentos realizados nos anos de 2019 e 2020, em que o primeiro experimento (P1) avaliou o efeito de dose adicional de Prostaglandina (PGF2 α) e o segundo (P2) o efeito da associação de butafosfan e cianocobalamina, na taxa de prenhez de vacas de corte submetidas a inseminação artificial em tempo fixo (IATF). Para os cálculos foram considerados os custos fixos e aleatórios da prática, em reais (R\$), praticados na região de Araguaína-TO em 13/05/2021. As análises financeiras foram realizadas pelo Microsoft Excel® considerando 100 vacas por tratamento de cada experimento. Foi verificado, em ambos os experimentos, que os grupos tratados tiveram maiores custos por IATF (R\$: 63,98 e 67,58) em relação ao controle (R\$: 60,58 e 60,58) para o P1 e P2 respectivamente, com menor custo por prenhez (R\$: 95,97 e 110,26) em relação ao controle (R\$: 146,58 e 133,29) resultando em melhor retorno e viabilidade econômica. Na comparação entre os protocolos (P1 e P2), P1 teve uma receita líquida de R\$ 12. 853,35 e um investimento no custo de IATF de R\$ 360,00. Entretanto, apesar de haver diferença financeira nessa simulação, a escolha por um ou outro protocolo deve ser tomada considerando a necessidade do rebanho, sendo que ambos os protocolos de IATF experimentais tiveram incrementos nos índices zootécnicos e resultados financeiros em comparação ao controle.

Palavras-chaves

bovino
investimento
viabilidade econômica

Received 01 November 2021; Received in revised from 07 January 2021; Accepted 14 February 2022



INTRODUÇÃO

A atual situação econômica da pecuária mundial exige alta produtividade como garantia de retorno do capital investido a médios e curtos prazos. A reprodução é um dos principais alicerces da cadeia reprodutiva e sua eficiência deve ser controlada de perto para garantir uma boa taxa de desfrute com alto retorno financeiro (Morais et al., 2019).

A demanda por produto de qualidade e segurança, instiga a procura por novas estratégias produtivas e reprodutivas para que a pecuária de corte atenda essa demanda com alto retorno financeiro (Nogueira et al., 2017). Sendo assim, estudar e buscar novas estratégias reprodutivas que garantam maior retorno econômico da atividade tem se tornado cada dia mais frequentes e um grande desafio a ser alcançado.

Existe uma variedade de protocolos disponíveis no mercado, estes são adaptados à medida que surgem novos conhecimentos e necessidades na área. Atualmente, algo que muito vem se discutindo é a respeito das estratégias reprodutivas com adição de fármacos e/ou substâncias nos protocolos de Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF), uma vez que podem proporcionar um incremento significativo nos índices reprodutivos e redução do intervalo de gerações, porém aumentam os custos financeiros, sendo necessário estudar a viabilidade econômica dessas estratégias em cada sistema produtivo.

O mercado de Inseminação Artificial (IA) no Brasil vem crescendo em ritmo acelerado nos últimos anos, só em 2020 foram vendidas para o mercado interno 23.670.906 doses de sêmen em que 89,8% (21.255.375 protocolos) foram realizadas com IATF, representando um crescimento de 29,7% em relação ao ano anterior (Baruselli, 2021). Entretanto, a taxa de prenhez média ainda é de 51,8% e possui grandes variações (Zoetis Brasil, 2019).

Com isso, várias estratégias veem sendo desenvolvidas para manipular as taxas de concepção em vacas de corte e leite. Dentre elas, estão a utilização de progesterona exógena após a IA (Moreira et al., 2020; Plugliesi et al., 2016), utilização de dose adicional de prostaglandina F2 α (Ferreira et al., 2020; Rodrigues et al., 2017) ou hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH)

(Madureira et al., 2020), além de componentes vitamínicos e minerais (Lima et al., 2017; Souza et al., 2014).

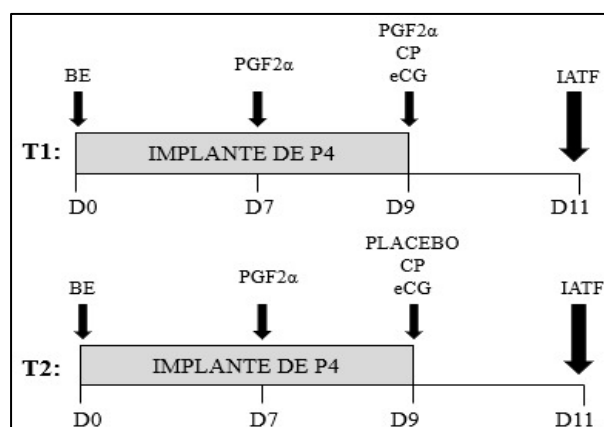
Uma propriedade rural deve ser vista como uma empresa, a qual é necessário investimentos em diversas áreas, como sanidade, reprodução, nutrição e pastagens, afim de alcançar bons resultados produtivos (Graf, 2016). Portanto, a utilização de suplementos em protocolos de IATF deve ser feita pensando-se não só no preço dos produtos, mas sim nos benefícios dos mesmos para a produção final, num raciocínio onde o custo/benefício é o ponto principal.

Diante ao exposto, o objetivo do presente trabalho é analisar a relação custo-benefício de dois protocolos de IATF, aplicados no Estado do Tocantins, em trabalhos desenvolvidos pelo Núcleo de Estudos, Pesquisa e Extensão em Genética e Melhoramento Animal (NAPGEM) da Universidade Federal do Tocantins, através da análise bioeconômica.

MATERIAL E MÉTODOS

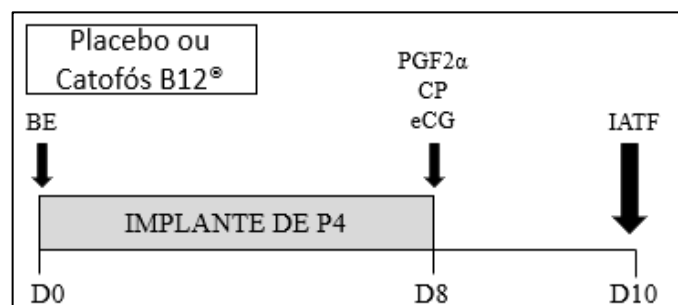
O presente trabalho é um estudo de caso sobre a relação custo-benefício de dois protocolos de IATF. As informações utilizadas na análise econômica foram simuladas com base nos resultados obtidos em dois experimentos, que no seu desenvolvimento apresentaram diferença significativa ($P>0,05$) entre os tratamentos. Esses experimentos foram realizados pelo NAPGEM do Campus de Araguaína da Universidade Federal do Tocantins, nos anos de 2019 e 2020.

O primeiro artigo (Ferreira et al., 2020), realizado no ano de 2019, teve como objetivo avaliar o efeito de dose adicional de PGF2 α no D9 (Figura 1) sobre a taxa de concepção de vacas de corte. No segundo artigo (Rodrigues et al., 2020), o objetivo foi avaliar o efeito da suplementação mineral vitamínica injetável de fósforo e vitamina B12 (Catofós B12, JA Saúde animal, SP, Brasil) (Figura 2) na taxa de concepção de fêmeas bovinas da raça Nelore. A partir dos dados desses trabalhos foi realizada uma simulação para avaliação econômica dos protocolos utilizados, considerando-se os preços dos produtos utilizados na IATF e mão de obra, com base no mercado local.



Fonte: Ferreira et al. (2020) adaptado.

Figura 1 - Protocolo de IATF utilizado no experimento: Efeito de dose adicional de pgf2α sobre a taxa de gestação de fêmeas bovinas Nelore submetidas à IATF. BE= Benzoato de estradiol; CP= Cipionato de estradiol; eCG= Gonadotrofina coriônica equina



Fonte: Rodrigues et al. (2020) adaptado.

Figura 2 - Protocolo de IATF utilizado no experimento: Combinação do butafosfan associado a cianocobalamina no incremento da fertilidade em fêmeas zebuínas

Os custos com sêmen, inseminador e de manutenção da vaca, bem como os preços utilizados no comércio dos bezerros, foram considerados como fixos, sendo considerada uma média geral comum para todos os experimentos. Assim, na análise econômica dos diferentes protocolos foram considerados os custos fixos e variáveis.

Os custos dos produtos utilizados para a IATF

foram considerados com base no mercado de Araguaína-TO, para tal foi realizada pesquisa de preços dos produtos nas lojas agropecuárias da cidade nos meses de abril e maio de 2021, posteriormente foi calculado a média de preço desses produtos (Tabela 1) e com esses valores foram realizados os cálculos financeiros para o custo da IATF, custo total para IATF e custo por prenhez.

Tabela 1 - Preço dos produtos e serviços utilizados na IATF para base da análise bioeconômica.

Produto	Unidade	Custo/dose/animal
Implante P4*	Unidade	6,67
BE*	ml	0,80
CP*	ml	0,76
PGF2α	ml	3,40
eCG*	ml	11,45
Catofós B12*	ml	7,00
Mão de obra: Inseminação	Animal	14,00
Bainha de IA	Unidade	0,50
Custo mensal da vaca	Vaca	50,00
Sêmen	Dose	23,00

*BE= Benzoato de estradiol; Catofós B12= Produto comercial a base da associação de Cianocobalamina e Butafosfan; CP= Cipionato de estradiol; eCG= Gonadotrofina coriônica equina; P4= Progesterona.

Para os cálculos financeiros foram utilizados as seguintes fórmulas e preço da venda de animais desmamados:

- a) $\text{Custo da IATF} = \text{Protocolo hormonal} + \text{Mão de obra inseminador} + \text{Sêmen} + \text{Bainha de IA} + \text{produto testado}$
 b) $\text{Custo total da IATF} = \text{Custo da IATF} \times \text{N}^\circ \text{ de fêmeas na IATF}$
 c) $\text{Custo de prenhez} = \frac{\text{Custo total da IATF}}{\text{N}^\circ \text{ de fêmeas prenhas}}$

Para o cálculo das perdas de bezerros, da gestação até o nascimento, utilizou-se como referência os valores reportados por Sá (1991) e Corrêa et al. (2001), considerando-se 4% para perdas gestacionais até os 30 dias, e 2,2% de mortes de bezerros do nascimento até a desmama. Com base nesses índices estabeleceu-se uma taxa de 6,11% para perdas (ou mortes) da concepção ao desmame. Para entendimento do cálculo (6,11%), exemplificamos, (Vacas prenhas aos 30 dias após a IATF – 4% = Número de bezerros nascidos; e Número de bezerros nascidos – 2,2% = Número de bezerros desmamados. Assim, considerando a taxa total estabeleceu-se 6,11%. Também foi considerado dimorfismo sexual entre os bezerros, com 50% de nascimento para ambos os sexos (Macho e fêmea). Quando o número vacas prenhas aos 30 dias e bezerros desmamados obtidos foi valor decimal, o resultado foi arredondado para o menor valor, desconsiderando o valor decimal e considerando apenas o valor inteiro.

Para o cálculo do retorno financeiro com a venda dos bezerros, os preços dos bezerros foram considerados com base nas tabelas de projeção estipulados pela Scot Consultoria no mês de maio

de 2021 para o mercado da região norte do Tocantins (<https://www.scotconsultoria.com.br/busca/cota%C3%A7%C3%A3o%20do%20bezerro/>).

- a) $\text{Perdas de bezerros (Morte embrionária + Aborto + Morte de bezerro do nascimento a desmama)} = \text{N}^\circ \text{ de fêmeas prenhas} \times 6,11\%$
 b) $\text{Preço do bezerro desmamado (Macho 180 kg - R\$ 15,00/Kg)} = \text{R\$ 2.700,00}$
 c) $\text{Preço da bezerra desmamada (Fêmea 165 kg - R\$ 14,33/Kg)} = \text{R\$ 2.364,45}$

Em vista do número distintos de animais por tratamento e experimento, foi considerado 100 fêmeas bovinas por tratamento de cada experimento para ser possível realizar uma simulação financeira e comparação dos experimentos. Com base nos valores levantados, foi realizado o cálculo do lucro líquido pela diferença entre as receitas e despesas envolvida nos processos, e realizada a comparação entre lucros líquidos dos tratamentos para cada experimento realizado. Os cálculos foram realizados no programa Microsoft Excel®.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em ambos os experimentos foi observado que o grupo tratado com o aditivo obteve melhores taxa de prenhez em relação ao grupo controle ($P < 0,05$) (Tabela 2). Dessa forma, a utilização de aditivos em protocolos de IATF tendem a aumentar os resultados, porém é importante que o técnico avalie as condições e necessidades de cada rebanho para optar pela estratégia adequada para o incremento da fertilidade dos animais daquele rebanho.

Tabela 2 - Taxa de Concepção em fêmeas bovinas submetidas a IATF nos experimentos realizados pelo NAPGEM/UFT

Efeito de dose adicional de PGF2* alfa sobre a taxa de concepção de vacas de corte		
	Positivo (%)	Negativo (%)
Tratamento 1	66,67 ^a	33,33
Tratamento 2 (Controle)	41,33 ^b	58,67
Combinação do butafosfan associado a cianocobalamina no incremento da fertilidade em fêmeas zebuínas		
	Positivo (%)	Negativo (%)
Tratamento 1	61,29 ^a	38,71
Tratamento 2 (Controle)	45,45 ^b	54,55

*PGF2 alfa= Prostaglandina. Fonte: Ferreira et al. (2020) e Rodrigues et al. (2020).

A variabilidade na taxa de prenhez evidenciada nos estudos foi de 25,34 pontos percentuais para o protocolo com dose adicional de PGF2 α (P1) e de 15,84 pontos percentuais para o protocolo com a associação butafosfan e cianocobalamina (P2), em relação à taxa do grupo controle de cada experimento. Se fosse possível, uma comparação entre os tratamentos com melhores resultados, uma

vez que os animais, tempo e espaço são diferentes, observa-se uma amplitude de 9,5% entre as taxas de prenhez. Devido a diversidade de protocolos existentes no mercado, a escolha de qual é o mais adequado para a propriedade deve ser baseada em inúmeros fatores, dentre eles a relação benefício/custo (Dickson et al., 2012; Gottschall e Silva, 2014).

O resumo financeiro dos protocolos aplicados neste trabalho está apresentado na tabela 3. Pelos resultados, a utilização de ambos os protocolos (P1 e P2), analisando-os isoladamente, apresentam uma vantagem econômica em relação ao grupo controle, pois a taxa de concepção foi maior, e segundo as análises o número de bezerros desmamados é superior em relação ao grupo controle, favorecendo assim um retorno econômico maior.

Entretanto, comparando-se os custos e as

receitas aplicadas a cada experimento verificou-se que o experimento P1 foi mais rentável que o P2, com uma produção a mais de cinco bezerros (02 bezerros machos e 03 fêmeas) desmamados, garantindo uma receita líquida de R\$ 12. 853,35. Outrossim, o investimento com o protocolo utilizado no experimento P1 foi de R\$ 360,00 menor que o do P2, sendo, portanto, um investimento mais barato e maior retorno econômico.

Tabela 3 - Resumo Financeiro da análise bioeconômica das simulações de IATF, segundo os protocolos utilizados, e as Receitas na produção de bezerros

Experimento: Efeito de dose adicional de PGF2α sobre a taxa de concepção de vacas de corte (P1)		
	T1	T2
Custo IATF/Animal	R\$ 63,98	R\$ 60,58
Custo total IATF	R\$ 6.398,00	R\$ 6.058,00
Quantidade de prenhez (30D)	66	41
Custo por prenhez	R\$ 95,97	R\$ 146,58
Perdas gestacionais + morte de bezerros até a desmama	4	3
Nº de bezerros desmamados	62	38
Nº de bezerros desmamados (M)	31	19
Valor do bezerro Macho	R\$ 2.700,00	R\$ 2.700,00
Receita da venda de bezerros (M)	R\$ 83.700,00	R\$ 51.300,00
Nº de bezerros desmamados (F)	31	19
Valor da bezerra Fêmea	R\$ 2.364,45	R\$ 2.364,45
Receita da venda das bezerras (F)	R\$ 73.297,95	R\$ 44.924,55
Receita Bruta	R\$ 156.997,95	R\$ 96.224,55
Receita líquida	R\$ 150.599,95	R\$ 90.166,55
Experimento: Combinação do butafosfan associado a cianocobalamina no incremento da fertilidade em fêmeas zebuínas (P2)		
	T1	T2
Custo IATF/Animal	R\$ 67,58	R\$ 60,58
Custo total IATF	R\$ 6.758,00	R\$ 6.058,00
Quantidade de prenhez (30D)	61	45
Custo por prenhez	R\$ 110,26	R\$ 133,29
Perdas gestacionais + morte de bezerros até a desmama	4	3
Nº de bezerros desmamados	57	42
Nº de bezerros desmamados (M)	29	21
Valor do bezerro Macho	R\$ 2.700,00	R\$ 2.700,00
Receita da venda de bezerros (M)	R\$ 78.300,00	R\$ 56.700,00
Nº de bezerros desmamados (F)	28	21
Valor da bezerra Fêmea	R\$ 2.364,45	R\$ 2.364,45
Receita da venda das bezerras (F)	R\$ 66.204,60	R\$ 49.653,45
Receita Bruta	R\$ 144.504,60	R\$ 106.353,45
Receita líquida	R\$ 137.746,60	R\$ 100.295,45

Além disso, outras questões devem ser levadas em consideração ao custo benefício de cada protocolo adotado, pois há ganhos indiretos que geralmente não são observados. Dentre estes, está o custo mensal do menor número de vacas não prenhas na 1º IATF, produção de maior quantidade de bezerros nascidos na primeira IATF que geralmente corresponde à melhor época de nascimento do bezerro, que interfere diretamente no peso a desmama. Ademais, em propriedades que

realizam a ressincronização das vacas vazias da 1º IATF, ainda há o ganho com o menor investimento com o custo total do protocolo de 2º IATF do lote, pois haveria menor número de vacas para ressincronizar.

Considerando que o P2 tem maior quantidade de vacas a ressincronizar e que as mesmas vão emprenhar na ressincronização, pode-se sugerir que o mesmo teve um custo adicional de R\$ 250,00 reais (5 vacas * R\$ 50,00 custo mensal) devido a

permanência de um mês a mais na propriedade como não gestante e deixaram de produzir pelo menos cinco (05) bezerros ao longo de 10 anos de vida reprodutiva em comparação ao P1, pois, segundo Baruselli (2009) cada mês que uma vaca fica vazia na propriedade resulta no aumento do intervalo de partos e diminuição da produção de um (01) bezerro ao longo de 10 anos de vida reprodutiva.

Outro benefício da antecipação da prenhez das vacas é a maior taxa de prenhez ao término da estação de monta (EM) devido ao maior período que a mesma está na estação de monta e tempo para se recuperar do parto e voltar a atividade reprodutiva (Sonohata et al., 2013). Entretanto, essa comparação pode não se enquadrar nas propriedades que não possuem estação de monta definida e que as vacas fiquem com o touro até o desmame do bezerro.

O peso a desmama dos bezerros é outro índice que pode ser beneficiado pela antecipação da prenhez, pois bezerros nascidos no início da estação de nascimento têm menor desafio sanitário e imunológico, e as vacas lactantes tem maior período de oferta de alimentos, proporcionando boa produção de leite e bezerros com desempenho satisfatório na desmama (Santos et al., 2019; Queiroz et al., 2019).

O peso a desmama dos bezerros pode variar de 0,84 a 7,42 kg na comparação de um mês para outro (Sonohata et al., 2013; Queiroz et al., 2019). Com isso, considerando que na ressincronização as 5 vacas ficariam gestantes, o número de prenhez após a 2ª IATF seria igual e a diferença entre os meses de 3 kg e a antecipação de um mês de prenhez das 5 vacas na 1ª IATF, haveria 15 kg a mais de bezerros desmamados no P1 em comparação ao P2.

Entretanto, apesar da PGF2 α ter apresentado melhores resultados não é possível afirmar que essa ferramenta é melhor que a associação da cianocobalamina com butafosfan, pois ambos experimentos tiveram condições de rebanho, propriedade e tempo distintos, mas ambas as estratégias foram mais eficientes que o grupo controle. Além disso, por ser realizada apenas algumas simulações financeiras é possível fazer tais comparações feitas anteriormente.

Outrossim, é recomendado avaliar qual a necessidade do rebanho, pois em rebanhos que as condições de manejo não estressante e suplementação mineral estiverem atendidas adequadamente é recomendado utilizar a dose adicional de PGF2 α , já em propriedades em que a suplementação mineral do rebanho não estiver atendida e que a realização de um manejo a mais dos animais no curral não ser possível, é

recomendado realizar administrar a associação da butafosfan com cianocobalamina.

Na comparação do grupo controle com o testado de cada experimento, o grupo testado sempre teve um maior investimento, porém teve melhores retornos econômicos com diminuição do custo da prenhez, maior produção de bezerros desmamado e nascido na época de melhor condição, menor intervalo de parto das vacas e número de vacas vazias que resultam em menor custo, bem como uma receita líquida maior.

CONCLUSÕES

A modificação do protocolo de IATF, seja pela dose adicional de PGF2 α e/ou suplementação com Bustafosfan + Cianocobalamina, mostraram-se eficientes na rentabilidade econômica+. A modificação do protocolo de IATF apresenta uma vantagem econômica em relação ao grupo controle, pois a taxa de concepção foi maior, bem como o número de bezerros desmamados, favorecendo assim um retorno econômico maior. O protocolo com PGF2 α mostrou-se com maior rentabilidade e lucro líquido comparado ao protocolo com Cianocobalamina + Bustafosfan.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio do Programa Nacional de Cooperação Acadêmica na Amazônia – PROCAD/Amazônia da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES/Brasil. Ao Núcleo de Pesquisa e Extensão em Genética e Melhoramento Animal (NAPGEM) da Universidade Federal do Tocantins, Campus de Araguaína.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Baruselli PS. Como as tecnologias da Reprodução conseguem produzir mais bezerros, com melhor genética e mais pesados. Departamento de Reprodução Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, p.44, 2009.
- Baruselli PS. Mercado da IATF cresce 30% em 2020 e supera 21 milhões de procedimentos. Boletim Eletrônico do Departamento de Reprodução animal/FMVZ/USP, 5.ed., 2021.
- Corrêa ES, Euclides FK, Alves RGO, Vieira A. Desempenho reprodutivo em um sistema de produção de gado de corte. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, Boletim de Pesquisa / Embrapa Gado de Corte, ISSN 1516-5809, Boletim de Pesquisa 13, 33p., 2001.
- Dickson N, Siew N, Singh-Knights D, Bourne G, Knights M. Technical and economic outcome using various timed artificial insemination protocols in dairy cattle in the tropics.

- Journal of Animal Production Advances, v.2, p.490-499, 2012.
- Ferreira JL, Rodrigues MHD, Santos SN, Oliveira RORG, Rodrigues VS, Beserra DAA, Garcia JA. S. Efeito de dose adicional de *pgf2 α* sobre a taxa de gestação de fêmeas bovinas nelore submetidas a IATF. *Semina Ciências Agrárias*, Londrina, v.41, n.6, p.2669-2676, 2020. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2020v41n6p2669>
- Gräf LV. Gestão da propriedade rural: um estudo sobre a autonomia do jovem na gestão da propriedade rural. 2016, 73p. Monografia (Bacharel em Administração) - Centro Universitário Univates, Lajeado, 2016. Acesso em 20/10/2021. Disponível em: <https://www.univates.br/bdu/bitstream/10737/1472/1/2016LucioVicente-Graf.pdf>
- Gottschall CS, Silva LR. Análise econômica de diferentes protocolos para inseminação artificial em tempo fixo (IATF) aplicados em novilhas de corte. *Veterinária em Foco*, v.11, n.2, p.119-125, 2014.
- Lima M E, Pereira RA, Maffi AS, Santos JT, Martin CE, Del Pino FA, Correa MN. Butaphosphan and cyanocobalamin: effects on the aspiration of oocytes and in vitro embryo production in Jersey cows. *Canadian Journal of Animal Science*, v.97, n.4, p.633-639, 2017. <https://doi.org/10.1139/cjas-2016-0222>
- Madureira G, Consentini CEC, Motta JCL, Drum JN, Prata AB, Monteiro J PLJ, Melo LF, Gonçalves JRS, Wiltbank MC, Sartori R. Progesterone-based timed AI protocols for Bos indicus cattle II: Reproductive outcomes of either EB or GnRH-type protocol, using or not GnRH. *Theriogenology*, v.145, p.86-93, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.01.033>
- Morais MC, Aguiar KHO, Faria LA, Monteiro BM. Análise de falhas nos índices reprodutivos de novilhas de corte no município de Paragominas-PA. In: Congresso Internacional das Ciências Agrárias – Cointer PDVAGRO, 3, 2018, João Pessoa. Anais [...]. Brasília: Associação Brasileira de Zootecnia, 2019.
- Moreira FS, Oliveira RORG, Rodrigues MHD, Fioravante FCRC, Souza ABB, Rodrigues VS, Garcia JAS, Ferreira JL. Efeito de estratégias anti luteolíticas sobre a fertilidade de novilhas de corte. *Brazilian Journal of Development*, v.6, n.10, p.75839-75851, 2020. <https://doi.org/10.34117/bjdv6n10-128>
- Nogueira, CS. Impacto da iatf (inseminação artificial em tempo Fixo) sobre características de importância econômica em bovinos nelore. 2017, 44p. Dissertação (Mestrado em Genética e melhoramento animal) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2017.
- Pugliesi G, Santos FB, Lopes E, Nogueira E, Maio JRG, Silva LA. Improved fertility in suckled beef cows ovulating large follicles or supplemented with long-acting progesterone after timed-AI. *Theriogenology*, v.85, n.7, p.1239-1248, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.12.006>
- Queiroz GR, Goulart GR, Baldi, F, Castro LM, Lôbo RB, Venturini GC. Relação entre mês de nascimento e peso à desmama em bovinos da raça Nelore. In: Congresso brasileiro de zootecnia, 29, 2019, Uberaba. Anais [...]. Brasília: Associação Brasileira de Zootecnia, 2019.
- Rodrigues WB, Jara JP, Borges JC, Oliveira LOF, Abreu UPH, Silva KC, Nogueira E. Ação da prostaglandina F2 α como indutor de ovulação em vacas de corte submetidas a protocolos de IATF. In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 22., 2017, Santos, SP. Anais [...] Belo Horizonte: Revista Brasileira de Reprodução Animal, 2017.
- Rodrigues VS, Vilches JMA, Souza ABB, Rodrigues MHD, Oliveira RORG, Fioravante FCRC, Bussiman FO, Nepomuceno LL, Garcia JAS, Ferreira JL. Combinação do butafosfan associado a cianocobalamina no incremento da fertilidade em fêmeas zebuínas. *Research, Society and development*, v.9, n.12, e14291210935, 2020. <https://doi.org/10.33448/rsd-v9i12.10935>
- Sá WP. Abortamento em bovinos. Coronel Pacheco: EM-BRAPA Gado de Leite, 20p. 1991.
- Santos LR, Gaspar EB, Benavides MV, Trentin G. Tristeza Parasitária Bovina – Medidas de controle atuais. Brasília: Embrapa Gado de Corte, 2019.
- Sonohata MM, Oliveira DP, Abreu UGP, Santi FM. Efeito do mês do parto na taxa de prenhez e no peso ao desmame de bovinos de corte criados extensivamente na sub – região Aquidauana. In: Simpósio sobre recursos naturais e socioeconômicos do pantanal, 6., 2013, Corumbá, MS. Anais [...]. Corumbá: Embrapa Pantanal, 2013.
- Souza, JVL, Frade MC, Frade CS. Incremento da fertilidade em novilhas zebuínas com uso do catosal® e robrante®. UNISALESIANO, v.1, n.1, p.1-6, 2014.
- Zoetis Brasil (2019). Gerar: Benchmarking Iatf 2019. São Paulo: Zoetis. (Informativo Técnico). Recuperado de https://www.grupogerar.agr.br/wp-content/themes/gerar_theme/file/benchmarking-gerar-corte-2019.pdf



Germinação de sementes de *Handroanthus serratifolius* (Vahl) S. O. Grose em substrato contendo resíduos agroindustriais

Carolina Rafaela Barroco Soares^{a*}, Karen Janones da Rocha^a, Kenia Michele de Quadros Tronco^a

^a Universidade Federal de Rondônia, Brasil

* Autor correspondente (carolinabarroco@gmail.com)

INFO

Keywords

alternative use
social impact
environmental
farming

ABSTRACT

Germination of seeds of Handroanthus serratifolius (Vahl) S. O. Grose in substrate containing agro-industrial residues. Agriculture has a great influence on the economy of Rondônia, but the sector generates residues that can have different destinations. And a promising alternative for the final destination of these residues is their use as substrates, thus minimizing social, economic and environmental impacts. The objective of this work was to evaluate the substrates obtained from different concentrations of agro-industrial residues, in the germination of *Handroanthus serratifolius* (Vahl) S. O. Grose. The design used was a randomized blocks, five treatments and four replications. The treatments resulted in different combinations of sand and agroindustrial residue: T1 – 0%:100% (control); T2 – 75%:25%; T3 – 50%:50%; T4 – 25%: 75%; and T5 – 0%:100%. The germination percentage (G%) was evaluated daily and, after germination stabilization at 27 days, the germination speed index (IVG), mean germination time (TMG) and mean germination speed (VMG) were calculated of seeds and germination means were submitted to normality tests, homogeneity at 5% significance and analysis of variance to Tukey test ($P \geq 0.95$). The germination percentage ranged from 9% to 71%, and 100% seed health and absence of abnormal seedlings were verified. It was found that treatment 2 showed a significant difference between the other treatments, the substrate with the best results was T2 (G% = 71%; IVG = 11; TMG = 17 days; VMG = 0.0606 seeds.day⁻¹). The substrate with 25% residues + 75% sand stood out from the other treatments, resulting in the best ones, resulting in better germination.

RESUMO

Palavras-chaves

uso alternativo
impacto social
ambiental
agropecuária

A agricultura tem grande influência na economia rondoniense, mas o setor gera resíduos que podem ter diferentes destinações. E uma alternativa promissora para o destino final desses resíduos é o seu uso como substratos, minimizando assim impactos social, econômico e ambiental. O objetivo do trabalho foi avaliar os substratos obtidos a partir de diferentes concentrações resíduos agroindustriais, na germinação de *Handroanthus serratifolius* (Vahl) S. O. Grose. O delineamento utilizado foi o de blocos casualizados, cinco tratamentos e quatro repetições. Os tratamentos resultaram em diferentes combinações de areia e resíduo agroindustrial: T1 – 0%:100% (testemunha); T2 – 75%:25%; T3 – 50%:50 %; T4 – 25%:75%; e T5 – 0%:100%. Diariamente, foi avaliada a porcentagem de germinação (G%) e, após a estabilização da germinação aos 27 dias, foram calculados o índice de velocidade de germinação (IVG), tempo médio de germinação (TMG) e velocidade média de germinação (VMG) das sementes e as médias de germinação foram submetidas aos testes normalidade, homogeneidade a 5% de significância e análise de variância ao teste de Tukey ($P \geq 0,95$). A porcentagem de germinação variou de 9% a 71%, e foi verificado 100% de sanidade das sementes e ausência de plântulas anormais. Verificou-se que o tratamento 2 apresentou diferença significativa entre os demais tratamentos, o substrato com os melhores resultados foi o T2 (G% = 71%; IVG = 11; TMG = 17 dias; VMG = 0,0606 sementes.dia⁻¹). O substrato com 25% resíduos + 75% areia destacou-se dos demais tratamentos, resultando nos melhores resultando na melhor germinação.

Received 08 August 2021; Received in revised from 26 December 2021; Accepted 21 January 2022



INTRODUÇÃO

A espécie *Handroanthus serratifolius* (Vahl) S. O. Grose, popularmente conhecido como Ipê-amarelo, pertence à família Bignoniaceae e ao clado aliança Tabebuia, encontra-se inserida na ordem Lamiales. Estende-se nos domínios fitogeográficos da Amazônia, Caatinga, Cerrado, Pantanal, e Mata atlântica. É uma espécie arbórea decídua, heliófila normalmente encontradas em áreas de borda ou isoladas em áreas abertas como pastagens, podendo alcançar alturas entre 5 e 30 metros, e usualmente alcançam posição de dossel superior ou emergente em floresta primárias ou secundárias (Lorenzi, 1992; APG IV, 2016).

Apresenta-se como uma das espécies com o maior valor de mercado entre as espécies legalmente comercializadas na região e apresenta potencial para fitorremediação de solos moderadamente contaminados (Paiva et al., 2003; Dutra et al., 2017). Nos últimos anos têm-se verificado uma grande falta destas espécies em áreas de sua ocorrência natural, devido a extração predatória de sua madeira, em conjunto com o desmatamento e incêndios. Tais práticas envolvem um impacto ambiental muito grande, devido à descaracterização dos fragmentos originais (Monteiro et al., 2005; Pacheco et al., 2006).

Por conseguinte, estudos a respeito de sua propagação, aspectos comportamentais e geração de protocolos para uso em trabalhos de recuperação de ecossistemas florestais e de paisagismo são vitais para a conservação da espécie. (Schulze et al., 2008; Lima et al. 2014). E visto que seu principal método de propagação é via seminal, é essencial um bom manejo silvicultural, evitando assim a ocorrência de perdas e proporcionando uma alta qualidade das mudas.

Na produção de mudas em quantidade e qualidade, o êxito não está ligado unicamente à espécie utilizada, e sim de um conjunto de fatores, sendo a composição dos substratos um fator de grande importância, pois a germinação de sementes, a iniciação radicular e o enraizamento estão diretamente ligados às características químicas, físicas e biológicas do substrato (Caldeira et al., 1998; Caldeira et al., 2012). Algumas características desejáveis para um substrato ideal são disponibilidade de aquisição na região, facilidade no transporte, baixo custo, ausência de patógenos, riqueza de nutrientes e condições adequadas ao crescimento da planta (Silva e Pedroso et al., 2001).

Na produção de mudas florestais é comumente utilizado substratos constituídos de materiais orgânicos que geralmente não são encontrados abundantemente nas proximidades dos viveiros. Evidenciando a importância da reutilização de

substratos alternativos e economicamente viáveis, e o uso de materiais alternativos para a produção de substratos tais como os resíduos urbano e agroindustrial. Proporcionando indiretamente, benefícios ambientais pelo reaproveitamento e destinação de resíduos (Gonçalves et al. 2000; Baratta Junior, 2007).

O agronegócio em Rondônia tem avançado a cada ano e possui vital importância econômica no estado, representando 21% no Produto Interno Bruto (PIB) nacional em 2020, a agroindústria tem participação de aproximadamente 5,9% no PIB brasileiro, no beneficiamento, na transformação dos produtos e no processamento de matérias-primas provenientes da agropecuária, promovendo dessa forma maior integração do meio rural com a economia de mercado (CNM, 2018; SEAGRI, 2020). Nos processos de obtenção de seus produtos, as indústrias do setor normalmente geram resíduos dos quais podem ter diferentes tipos de destino, e a sua utilização na formação de substratos destinados à produção de mudas, essa tem sido frequentemente citada na literatura nacional e internacional (Galbiatti et al., 2007; Santos et al., 2013; Ribeiro et al., 2007).

O seu reaproveitamento como componente de substratos ou adubo orgânicos através da compostagem, por conseguinte minimiza impactos social, econômico e ambiental. E desta forma, diminui a utilização de recursos naturais, reduzindo seu acúmulo, agregando valores e, contribuindo com o desenvolvimento sustentável (Rosa et al., 2001; Rosa et al., 2002). Porém, notou-se escassez de estudos que contemplam misturas desses diversos resíduos na composição de substratos para produção de mudas.

Nesse contexto, estudos sobre a reutilização desses resíduos na produção de substratos para mudas de espécies florestais contribuirão para a redução dos impactos ambientais, gerando uma alternativa de renda para viveiristas e agricultores, impulsionando assim projetos de reflorestamento e recuperação de áreas degradadas. Desta forma, realizou-se este trabalho com o objetivo de avaliar os substratos obtidos a partir de diferentes concentrações de compostos orgânicos, oriundo de resíduos do agroindustriais, na germinação de *Handroanthus serratifolius* (Vahl) S. O. Grose.

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido na Universidade Federal de Rondônia, Campus de Rolim de Moura, realizado em casa de vegetação sob tela de sombreamento de polietileno com 50% de permeabilidade aos raios solares, anexo do Laboratório de Recuperação de Ecossistemas e

Produção Florestal – REProFlor. O clima da região, de acordo com adaptação da classificação de Köppen, é do tipo Am (monção), com temperaturas médias em torno de 26°C, precipitação anual média de 2.300 mm e umidade relativa entre 80 e 90% (Alvares et al., 2013).

Para instalação do experimento foi utilizado resíduos gerados de agroindústrias, composto principalmente de resíduo gerado em frigoríficos de bovinos (rúmen) e curtume, restos vegetais, cinzas de caldeira e serragem, palha de café, casca de arroz, restos de madeira, casca de ovo, entre outros compostos orgânicos compostados. E para compor os substratos foi utilizado areia do tipo grossa e lavada, a qual foi peneirada (em peneira de aço com malha de 3 mm) para retirada de impurezas e espalhada sobre lona para solarização por sete dias, sendo diariamente revolvida.

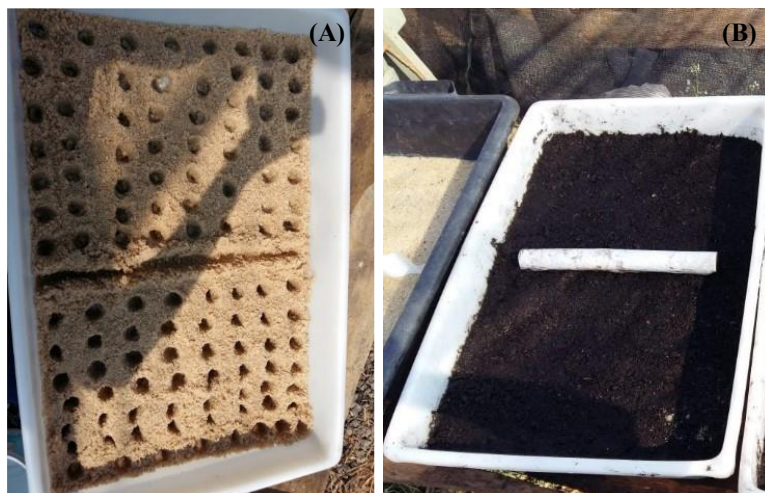
O composto de resíduos foi submetido a análise qualitativa e quantitativa dos compostos, conforme preconiza a Resolução CONAMA nº 375, de 29 de agosto de 2006 (CONAMA, 2006), para isso anterior ao experimento foram coletadas amostras do resíduo e enviados para laboratório particular em Cuiabá-MT para a realização dos testes.

Os frutos de *H. serratifolius* (Ipê amarelo) utilizados foram coletadas 8 plantas matrizes no Município de Rolim de Moura (RO), foram coletados fechados e maduros e colocados em

ambiente arejado para secagem natural e para extração das sementes, posteriormente foram armazenadas em sacos de papel devidamente identificadas e colocadas sob refrigeração de 8 °C nas dependências do REProFlor.

Os tratamentos testados resultaram nas seguintes proporções volumétricas de substrato: T1 – (Testemunha), 100% areia; T2 – 75% areia + 25% resíduo agroindustrial; T3 – 50% areia + 50% resíduo agroindustrial; T4 – 25% areia + 75% resíduo agroindustrial; T5 – 100% resíduo agroindustrial. O delineamento utilizado foi o de blocos casualizados, com quatro repetições e 56 sementes em cada repetição, totalizando 224 sementes por tratamento e 1.120 semente no total do experimento. Cada bandeja foi dividida em dois blocos, resultando em duas bandejas por tratamento (Figura 1, A e B).

Para a realização dos testes de germinação, foi utilizado bandejas de polietileno, drenadas e de dimensões 60,8 cm x 40,7 cm x 9,4 cm, a semeadura foi realizada manualmente, e a irrigação ocorreu duas vezes ao dia com o auxílio de regador comum de jardim, sem uma quantidade pré-determinada. Também durante todo o experimento foi realizado a limpeza manual das plantas daninhas nas bandejas. Não foi utilizado nenhum tipo de adubação durante o experimento.

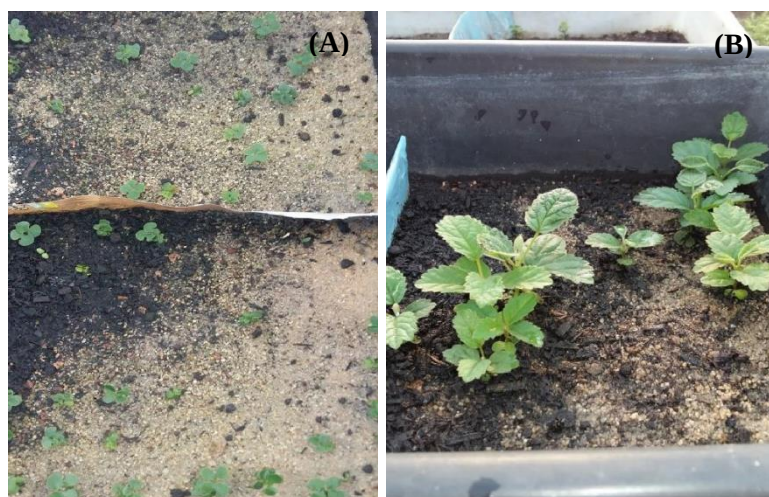


Fonte: Rolim de Moura (2018)

Figura 1 - Divisão dos tratamentos, com dois blocos por bandejas com 56 sementes de *Handroanthus serratifolius* (Vahl) S. O. Grose por bloco, totalizando duas bandejas por tratamentos. (A) - tratamento 1 (100% areia); (B) - tratamento 5 (100% REAGRO).

Previamente à instalação do experimento, foi determinado o teor de água das sementes através do método da estufa a 105±3 °C/24 h (Brasil, 2009), utilizando-se seis sub amostras de 2 gramas cada. A

contagem de sementes germinadas foi realizada diariamente até a estabilização das germinações. Foram consideradas como germinadas as plântulas que emitiram um dos cotilédones (Figura 2, A e B).



Fonte: Rolim de Moura (2018)

Figura 2 - Plântulas de *Handroanthus serratifolius* (Vahl) S. O. Grose germinadas com 12 (A) e 25 (B) dias após o plantio, tratamento 2 - 75% areia + 25% REAGRO.

Foram avaliadas a porcentagem de germinação (G%) e a presença de plântulas normais e anormais (BRASIL, 2009). Após a estabilização da germinação, foi calculado o índice de velocidade de germinação (IVG), tempo médio de germinação (TMG) e velocidade média de germinação (VMG) das sementes, conforme fórmulas a seguir.

$$G\% = \frac{(\sum n_i)}{100} * 100$$

$$IVG = \sum \frac{n_i}{t_i}$$

$$TMG = \frac{\sum n_i * t_i}{\sum n_i}$$

$$VMG = \frac{1}{TMG}$$

em que:

G% - germinação em porcentagem;
IVG - índice de velocidade de germinação, adimensional;
TMG - tempo médio de germinação, em dia;
VMG - velocidade média de germinação, em sementes.dia⁻¹;
 n_i - número de sementes que germinaram no tempo i ;
 t_i - tempo após instalação do experimento;
 $i = 2$ em 2 dias até a estabilização da germinação das sementes.

Após a tabulação dos dados, foram construídas curvas descritivas da germinação acumulada em porcentagem. Os dados foram inicialmente submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk a 5% de significância e à modificação do teste de Levene proposta por O'Neil e Mathews (2000)

a 5% de significância. Posteriormente, foram submetidos ao modelo de análise de variância de um delineamento de blocos casualizados ($P \geq 0,95$) e, no caso de constatadas diferenças significativas, ao teste de Tukey ($P \geq 0,95$). Para as análises estatísticas foi utilizado o *software R* (R Core Team, 2018), através do pacote ExpDes.pt (Ferreira et al., 2014).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O resultado da análise química das amostras do resíduo agroindustrial gerou 22 parâmetros (Tabela 1). Desses, seis encontravam-se em níveis não quantificáveis (LQ), enquanto os demais atenderam os Requisitos Mínimos de Qualidade do Lodo de Esgoto ou Produto Derivado Destinado a Agricultura, conforme art. 11 da Resolução CONAMA nº 375, de 29 de agosto de 2006. Com intuito de facilitar a comparação das concentrações obtidas com os parâmetros da literatura, as concentrações encontradas foram convertidas para mg.L⁻¹, considerando o volume de 1 kg da amostra de 1,640 L.

Quanto à presença de metais potencialmente tóxicos, não se encontram acima dos níveis aceitáveis conforme a Resolução do CONAMA nº 375/2006, não oferecendo risco ao meio ambiente. E os resultados analíticos garantem a aptidão do uso do adubo em substratos na produção florestal. Substratos oriundos do processo de compostagem dentre as características desejáveis dos substratos, pode destaca-se o custo, disponibilidade, teor de nutrientes, capacidade de troca de cátions, esterilidade biológica, aeração, retenção de umidade, boa agregação às raízes e uniformidade de estabelecimento (Nascimento, 2005).

Tabela 1 - Parâmetros físico-químicos analisados em amostras do resíduo agroindustrial utilizado para caracterizar o substrato

Parâmetro Analisado	Resultados analíticos	Concentração máxima permitida pela Resolução nº375/2006 CONAMA	Resultados analíticos Convertidos
		mg.kg ⁻¹	mg.L ⁻¹
Nitrogênio	4800	-	7,88
Fósforo ¹	30000	-	49,20
Potássio ²	1300	-	2,13
Zinco	100	-	0,16
Cobre	0	1500	0,00
Manganês	600	-	0,98
Boro	1000	-	1,64
Cálcio	43500	-	71,34
Enxofre ³	2500	-	4,10
Magnésio	3000	-	4,92
Ferro	31900	-	52,32
Silício	206300	-	338,33
Cádmio	LQ*	39	LQ
Chumbo	LQ	300	LQ
Níquel	6,5	420	10,66
Mercurio	LQ	-	LQ
Nióbio	LQ	-	LQ
Molibdênio	LQ	-	LQ
Cobalto	LQ	-	LQ
Cromo	64,4	1000	105,62
Arsênio	1,87	41	3,07
Tântalo	3,32	-	5,44

*Elementos abaixo do limite de quantificação do método utilizado; LQ – Limite de quantificação do método analítico: 0,05 mg.kg⁻¹; ^{1/} P₂O₅ CNA+Água - Pentóxido de difósforo solúvel em água, extrator citrato neutro de amônio e água; ^{2/} K₂O - Óxido de potássio; ^{3/} S - SO₄ - fornecido na forma do íon sulfato

Os resultados também mostram que os substratos compostos por resíduo agroindustrial possuem grande quantidade dos macros nutrientes, que são os elementos básicos necessários em maior volume às plantas, como: nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio, magnésio e enxofre. O nitrogênio e fósforo são nutrientes altamente requeridos nos estádios iniciais das mudas, esses elementos apresentaram concentrações de 4.800 mg.kg⁻¹ e 30000 mg.kg⁻¹, respectivamente. O nitrogênio é requerido para a síntese de clorofila e, como parte da molécula da clorofila, está altamente envolvido no processo fotossintético; é um componente do sistema enzimático, sendo essencial para a formação de aminoácidos e proteínas das mudas (Taiz e Zeiger, 2013). Já o fósforo possui importante papel na fotossíntese, respiração, armazenamento e transferência de energia como parte do trifosfato de adenosina (ATP) (Dechen e Nachtigall, 2007).

Os micronutrientes apresentaram-se em consideráveis concentrações. Esses são requeridos em quantidades pequenas e possuem grande importância para o crescimento, desenvolvimento e reprodução das plantas (Brown et al., 1987). O

níquel possui função direta na germinação das sementes e é essencial para as plantas, mas é requerido em quantidades muito pequenas, pois em altas concentrações pode causar fitotoxidez (Neves et al., 2007). A concentração de 0,05 mg.L⁻¹ níquel é adequada nos tecidos vegetais (Epstein e Bloom, 2006). Visto que, os substratos formulados com 100% Resíduo agroindustrial (Tratamento 5) possui a concentração de níquel de 10,66 mg.L⁻¹, e a germinação desse tratamento foi inferior quando comparando aos demais tratamentos com menores concentrações de resíduos (Figura 4), a concentrações de níquel pode ter causado toxidez nas plântulas de *H. serratifolius*.

Tanto os macros quanto os micronutrientes são essenciais para o bom crescimento e desenvolvimento das plantas, porém, estes devem apresentar-se em equilíbrio, uma vez que, em excesso ou em falta podem prejudicar o desenvolvimento ideal dos vegetais. Dois elementos foram encontrados em concentrações relativamente altas: Silício (338,33 mg.L⁻¹) e Cromo (105,62 mg.L⁻¹).

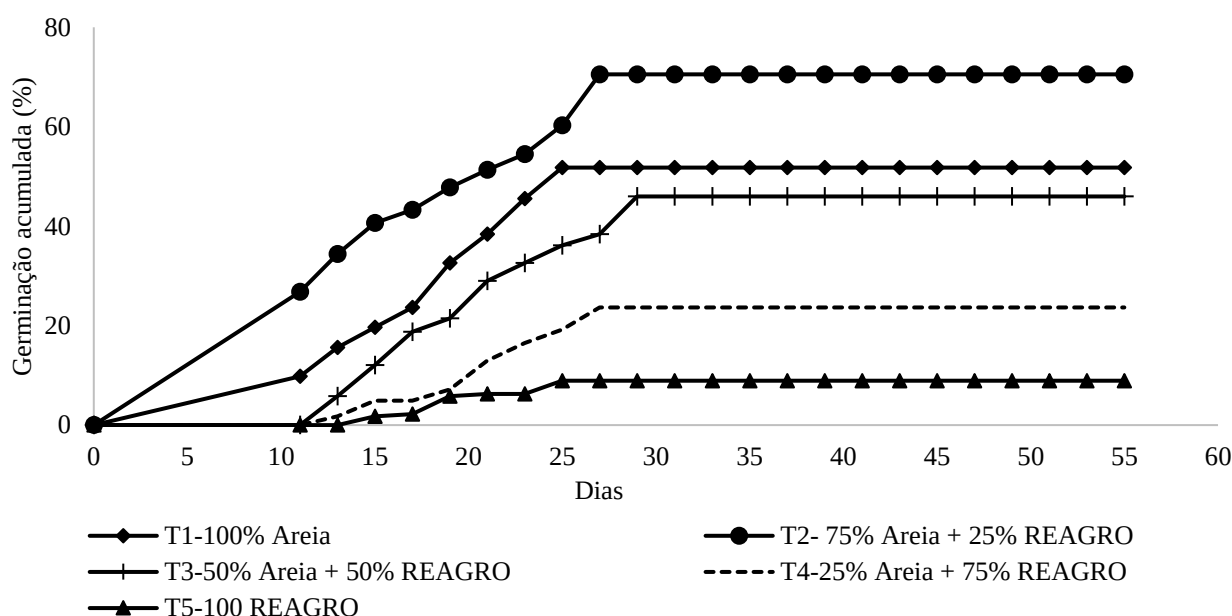
O silício possui efeito benéfico nas plantas, aumentando a tolerância delas à toxidez de

manganês e ferro, aumentando o poder oxidantes das raízes, além de contribuir no crescimento e na produtividade das plantas (Dechen e Nachtigall, 2007). Plantas crescendo em ambiente rico em silício são mais resilientes ao ataque de organismos patogênicos (Lima Filho et al., 1999; Epstein, 2001; Neves, 2013).

Altas concentrações de Cromo podem causar distúrbios à ultraestrutura dos cloroplastos e, consequentemente, afetar o processo fotossintético (Panda e Choudhury, 2005). Os sintomas de toxicidade por Cromo são manifestados como inibição do crescimento, clorose nas folhas jovens, folhas pequenas de coloração vermelho-amarronzada ou púrpura, lesões necróticas e injúrias nas raízes (Kabata-Pendias e Pendias, 2001). Entretanto, no presente estudo foi encontrado em concentração abaixo do limite

considerado tóxica.

O valor do teor de água das sementes de *H. serratifolius* foi de 9,44%, e o processo de germinação das sementes de *H. serratifolius* teve início a partir do décimo primeiro dia após a semeadura (Figura 3), com porcentagem de germinação mínima de 9% e máxima de 71%. O tratamento que proporcionou maior porcentagem de germinação foi o com o tratamento 2, e se manteve assim ao longo dos 63 dias de avaliação. Em todos os tratamentos ocorreram germinação e foi verificado total sanidades das sementes de *H. serratifolius*, também não houve presença de plântulas anormais. A estabilização da germinação ocorreu aos 27 dias, mesmo resultado relatado por Machado et al. (2002) em estudo com *H. serratifolius*, utilizando areia e papel como substratos.



Fonte: Rolim de Moura (2019)

Figura 3 - Germinação de sementes de *Handroanthus serratifolius* (Vahl) S.O.Grose, semeadas em diferentes composições de resíduo agroindustrial, em casa de vegetação

A porcentagem de germinação das sementes variou entre os tratamentos, observa-se um decréscimo nas porcentagens conforme aumenta – se as concentrações do resíduo agroindustrial tratamento 1 com 52%, tratamento 2 com 71%, tratamento 3 46%, tratamento 4 24% e tratamento 5 com 9%. As baixas porcentagem de germinação dos tratamentos com maiores concentrações de resíduo, pode estar atrelado aos altos valores de macro e micronutrientes, como já dito anteriormente que o desequilíbrio de suas concentrações pode afetar a germinação das plantas.

Os resultados do Índice de Velocidade de

Germinação (IVG), Tempo Médio de Germinação (TMG) e Velocidade Média de Germinação (VMG) (Tabela 2) foram influenciado pelo substrato utilizado, o substrato formulado com 25% de resíduo (tratamento 2) destacou-se dos demais tratamentos e obteve os maiores resultados para IVG, TMG e VMG evidenciando que esse substrato proporcionou as melhores condições para a germinação das sementes, seguido pelos substratos com 100% areia (testemunha) e com 50% de resíduo (Tratamento 3). Os tratamentos com maiores concentrações de resíduo foram os quais resultaram em IVG, TMG e VMG mais baixo, ou seja, promoveram uma germinação mais lenta.

A areia é considerada um substrato indicado para a germinação de muitas espécies florestais, como *Handroanthus serratifolius* (Vahl) S.O.Grose (Machado et al., 2002), *Inga ingoides* (RICH.) Willd. (Nascimento et al., 2011), *Acacia longifolia* (Andrews) Willd. (Medeiros e Zanon, 1999), *Hymenaea courbaril* L. var. *Stilbocarpa* (Pagliarini et al., 2016), *Myracrodruon urundeuva* Allemão LC (Guedes et al., 2011), *Astronium concinnum* Schott (Souza et al., 2012) e *Caesalpinia*

pyramidalis Tul. (LIMA et al., 2011).

Os substratos compostos com areia e resíduo agroindustrial em concentrações menores que 50% apresentarem-se promissores para a germinação do *H. serratifolius*. Os resíduos orgânicos, quando utilizados na composição de substratos, promovem o crescimento dos organismos, melhoram o nível de fertilidade e aumentam a capacidade de troca de cátions, afetando diretamente a qualidade das mudas (Knapik et al., 2005).

Tabela 2 - Índice de Velocidade de Germinação (IVG), Tempo Médio (TMG) e Velocidade Média (VMG) de germinação de sementes *Handroanthus serratifolius* (Vahl) S.O.Grose semeadas em diferentes composições de resíduos agroindustriais em casa de vegetação

Tratamentos	Descrição	IVG	TMG (Dias)	VMG (Sementes dias ⁻¹)
1	100% Areia	7	18	0,0560
2	75% Areia + 25% REAGRO	11	17	0,0606
3	50% Areia + 50% REAGRO	6	17	0,0578
4	25% Areia + 75% REAGRO	3	19	0,0526
5	100% REAGRO	1	20	0,0500

Fonte: Rolim de Moura (2019)

De acordo com a modificação do teste de Levene, p-valor 0,8267466 a 5% de significância, as variâncias do número de germinação podem ser consideradas homogêneas. E de acordo com o teste de Shapiro-Wilk, p-valor 0,6240166 a 5% de significância, os resíduos podem ser considerados

normais. Na avaliação entre as diferentes composições de substratos para germinação de sementes de *H. serratifolius*, verifica-se que houve diferença significativa a 5% de probabilidade entre os tratamentos e os blocos (Tabela 3).

Tabela 3 - Análise de variância em relação média de germinação de sementes de *Handroanthus serratifolius* (Vahl) S.O.Grose coletadas em julho de 2018 na Zona da Mata Rondoniense e semeadas em diferentes composições de substratos em casa de vegetação

Variável	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Tratamento	4	2934,5	4	50,858	0,00000000
Bloco	3	93,4	3	2,158	0,14606
Resíduo	12	173,1	2		
Total	19	3201,0			
Coefficiente de variação		16,88%			

GL é graus de liberdade; SQ é soma de quadrados; QM é quadrado médio; Fc é a estatística do teste de Fisher-Snedecor.

As médias de germinação das sementes variaram de 5,00 a 39,50, verifica-se que o tratamento 2 com 25% de resíduo apresentou a maior média não apresentaram diferença significativa entre os demais tratamentos. Além da presença de metais potencialmente tóxicos presentes nos substratos, foi observado ao longo do experimento que os substratos que continham maiores concentrações do resíduo agroindustrial apresentavam menor absorção de água, o que pode ter influenciando nas baixas taxas de germinação. Os resíduos são compostos predominantemente por resíduos de frigoríficos (rúmem), e esse resíduo apresentam elevado teor de umidade. Consequentemente, quando utilizado o em concentrações maiores que

50%, a absorção de água é relativamente lenta.

Durante os testes de germinação o substrato deve-se manter suficientemente umedecido, mas nunca envolvendo as sementes com uma película de água, que consequentemente pode restringir a respiração das mesmas. O excesso de água provoca decréscimo na germinação ao impedir a penetração do oxigênio e, desta forma, reduz todos os processos metabólicos resultantes. O *H. serratifolius* prefere solos secos e bem drenados para germinar (Amaral, 1986; Lorenzi, 1992), solos com características contrárias desfavorecem sua germinação e desenvolvimento o que podem resultar em elevadas taxas de mortalidade.

Tabela 4 - Germinação média de sementes *Handroanthus serratifolius* (Vahl) S.O.Grose semeadas em diferentes composições do adubo orgânico Vitalys® em casa de vegetação

Tratamento	Descrição	Germinação média*
1	100% Areia	39,50 ^a
2	75% Areia + 25% REAGRO	29,00 ^b
3	50% Areia + 50% REAGRO	25,75 ^b
4	25% Areia + 75% REAGRO	13,25 ^c
5	100% REAGRO	5,00 ^c

*Médias seguidas de mesma letra na linha não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade.

Fonte: Rolim de Moura (2019).

A formulação de substratos para produção de mudas com misturas de componentes facilita a retenção de água pelo substrato, facilitando a embebição da semente, o que torna a combinação de componentes em geral substrato mais eficientes do que os isolados (Cogo et al., 2013). Porém, no caso dos substratos testados com concentrações superiores a 50% de resíduos agroindustrial, a combinação de componentes não promoveu ganhos nas características avaliadas.

Além dos fatores inerentes às sementes dormência, inibidores e promotores da germinação, a germinação também é influenciada pelos fatores externos como luz, temperatura, disponibilidade de água e oxigênio. A disponibilidade de oxigênio e água pelo substrato está relacionada com sua textura. Como os resíduos agroindustrial, apresenta uma textura mais grossa que pode ocasionar menor retenção de água, já o substrato formulado com as contrações 25% resíduos agroindustrial + 75% areia apresentou melhores condições para a germinação das sementes de *H. serratifolius*, promovendo a melhor disponibilidade de oxigênio necessário para germinação.

A área de contato das sementes com o substrato umedecido é fundamental para o desenvolvimento de plântulas mais vigorosas (Carvalho e Nakagawa, 2012). E por isso, a escolha do substrato ideal é de grande importância nos resultados do teste, tornando imprescindível a utilização de um material inerte que não influencie no desenvolvimento das plântulas e favoreça a sustentabilidade da raiz e a baixa contaminação por patógenos (Sena et al., 2010). O substrato ideal deve proporcionar condições ideais para uma maior taxa de germinação, favorecendo o crescimento das raízes apresentando um equilíbrio entre os seus constituintes de forma a promover uma adequação em relação a macro e microporosidade, proporcionando uma melhor disponibilidade de água e oxigênio (Gonçalves e Benedetti, 2000; Ferreira et al., 2008).

Analisando-se a influência das diversas proporções propostas para composição de substrato, o tratamento 2 (75% Areia + 25% REAGRO) apresentou-se promissor. O substrato

originado dessa combinação demonstrou ser rico em matéria orgânica, nutrientes e fornecedor de água e oxigênio de modo adequado para o bom desempenho das sementes e caracterizando como um promissor substrato para a germinação das sementes de *H. serratifolius*. A partir dos resultados é possível inferir a viabilidade da utilização de resíduos agroindustriais decompostos como componente principal de substratos para a produção de mudas de *H. serratifolius*, e sua utilização no setor florestal.

CONCLUSÃO

Os substratos formulados à base resíduos agroindustriais são promissores na germinação *H. serratifolius*, sendo que o substrato com 25% de resíduo agroindústria destacou-se dos demais tratamentos, resultando nos maior Índice de velocidade de germinação, melhor Tempo Médio de germinação e maiores média de germinação. Dessa forma pode-se destacar o potencial do uso dos resíduos agroindustriais para produção de mudas florestais para projetos de reflorestamento e recuperação de áreas degradadas, permitindo um adequado destino a esses resíduos, reduzindo impactos ambientais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alvares CA, Stape JL, Sentelhas PC, Gonçalves JL, Sparovek G. (Dezembro de 2013). Köppen's climate classification map for Brazil. Meteorologische Zeitschrift, v.22, p.711-728, dez. 2013. <https://doi.org/10.1127/0941-2948/2013/0507>
- Amaral DMI. Padronização de testes em laboratório com sementes florestais. In: Simpósio Brasileiro Sobre Tecnologia de Sementes Florestais, v.1, 1984, Belo Horizonte. Anais... Brasília: ABRATES, 1986. p.267-283.
- Angiosperm Phylogeny Group (APG). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. Botanical Journal of the Linnean Society, v.118, n.1, p.1-20, mai, 2016. <https://doi.org/10.1111/boj.12385>
- Baratta Júnior AP. Utilização do composto de resíduos da poda da arborização urbana em substratos para produção de mudas. 2007. 53f. Dissertação (Mestrado em Ciências

- Ambientais e Florestais) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Florestas, Rio de Janeiro.
- Brasil. (2009). Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regras para análise de sementes. (1ª ed.). Brasília, DF: MAPA/ACS, 2009.
- Brown PH, Welch RM, Cary EE, Nickel: a micronutrient essential for higher plants. *Plant Biologists*, v.85, p.801-803, 1987. <https://doi.org/10.1104/pp.85.3.801>
- Caldeira MVW, Delarmelina WM, Lube SG, Gomes DR, Gonçalves EO, Alves AF. Biossólido na composição de substrato para a produção de mudas de *Tectona grandis*. *Floresta*, v.42, n.1, p.77-84, jan/mar, 2012. <http://dx.doi.org/10.5380/rf.v42i1.26302>
- Caldeira MV, Schumacher MV, Barichello LR, Vogel HL, Oliveira L. Crescimento de mudas de *Eucalyptus saligna* Smith em função de diferentes doses de vermicomposto. *Floresta*, v.28, n.1/2, p.19-30, 1998. <http://dx.doi.org/10.5380/rf.v28i12.2305>
- Carvalho NM, Nakagawa J. Sementes: ciência, tecnologia e produção. V.5. ed. Jaboticabal: FUNEP, 2012. 590p.
- Cogo MR, Barbosa FM, Souza LB, Coelho APD, Frescura VD. Produção de mudas de *Solanum betaceum* Cav. e *Physalis angulata* L. em diferentes substratos. *Revista Enciclopédia Biosfera*. Goiânia, v.9, n.16, p.1806-1813, 2013.
- Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA). Resolução n. 375, de 29 de agosto de 2006: Define critérios e procedimentos, para o uso agrícola de lodos de esgoto gerados em estações de tratamento de esgoto sanitário e seus produtos derivados, e dá outras providências. DOU, Brasília, 30 ago. 2006.
- CNM, Confederação Nacional de Municípios. Responsável por 23,5% do PIB, agropecuária puxa geração de empregos formais. Jun.2018.
- Dechen AR, Nachtigall GOR. Elementos requeridos à nutrição de plantas. Em N. R. F., A. V. H., B. N.F., F. R. F., C. R. B., & N. J. (eds), *Fertilidade do Solo* (pp. 91-132). Viçosa, MG SBCS/UFV: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo SBCS/UFV, 2007.
- Dutra TR, Massad MD, Otoni BA, Santos AR, Menezes ES, Sarmento MF. Potencial fitorremediador de *Tecoma stans* em solo contaminado com herbicida diuron + hexazinone, em Salinas-MG. *Agropecuária Científica no Semiárido - ACSA*, v.13, n.2, p.106-112, abr/jun, 2017.
- Epstein E. Silicon in plants: Facts vs. concepts L E Datnoff G H Snyder G H Korndörfer (Eds) *Silicon. Agriculture Elsevier*. Amsterdam. 15p. 2001.
- Epstein E, Bloom AJ. Nutrição mineral de plantas: princípios e perspectivas. 2. ed. Londrina: Editora Planta, 2006. 403p.
- Ferreira EB, Cavalcanti PP, Nogueira DA. ExpDes: An R Package for ANOVA and experimental designs. *Applied Mathematics*, v.5, n.19, p.2952-2958, 2014. <http://dx.doi.org/10.4236/am.2014.519280>
- Ferreira EGBS, Matos VP, Sena LHM, Sales AGFA. Germinação de sementes e desenvolvimento inicial de plântulas de crista-degalo em diferentes substratos. *Scientia Agraria*, Curitiba, v.9, n.2, p.241-244, 2008.
- Galbiatti JA, Lui JJ, Sabonaro DZ, Bueno LF, Silva VL. Formação de mudas de eucalipto com utilização de lixo orgânico e níveis de irrigação calculados por dois métodos. *Engenharia Agrícola*, v.27, n.2, p.445-455, ago.2007. <https://doi.org/10.1590/S0100-69162007000300013>
- Gonçalves JL, Benedetti V. Nutrição e fertilização florestal. Piracicaba, SP: IPEF, 2000.
- Gonçalves JL, Santareli EG, Moraes Neto SP, Manara MP. Produção de mudas de espécies nativas: substrato, nutrição, sombreamento e fertilização. Em JL. Gonçalves, V Benedetti, Nutrição e fertilização florestal (pp.309-350). Piracicaba: IPEF, 2000.
- Guedes RS, Alves EU, Gonçalves EP, Colares PN, Medeiros MS, Viana JS. (2011). Germinação e vigor de sementes de *Myracrodruon urundeuva* Allemão em diferentes substratos e temperaturas. *Revista Árvore*, v.35, n.5, 975-982, 2011. <https://doi.org/10.1590/S0100-67622011000600003>
- Kabata-Pendias A, Pendias H. Trace elements in soils and plants (3ª ed.). Boca Raton: CRC Press, 2001.
- Knapik JG et al. Crescimento inicial de *Mimosa scabrella* Benth., *Schinus terebinthifolius* Raddi e *Allophylus edulis* (St. Hil.) Radl. sob diferentes regimes de adubação. *Boletim de Pesquisa Florestal*, Colombo, PR, v.51, p.33-44, 2005.
- Lima Filho OF de; Lima MTG de; Tsai SM. O silício na agricultura. *Informações Agronômicas*, n.87, p.1-7, 1999.
- Lima CR, Pacheco MV, Ferrari CD, Braga-Júnior JM, Bezerra AK. Temperaturas e substratos na germinação de sementes de *Caesalpinia pyramidalis* Tul. *Revista Brasileira de Sementes*, v.33, n.2, p.216-222, 2011. <https://doi.org/10.1590/S0101-31222011000200003>
- Lorenzi H. Árvores Brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil (Vol.2). Nova Odessa, SP: Plantarum, 1992.
- Machado CF, Oliveira JA, Davide AC, Guimarães RM. Metodologia para a condução do teste de germinação em sementes de Ipê-Amarelo (*Tabebuia serratifolia* (Vahl) Nicholson). *Cerne*, v.8, n.2, p.17-25, 2002.
- Medeiros AC, Zanon A. Germinação de sementes de sapuva (*Machaerium stiptatum* (DC.) Vog) e de *Acacia longifolia* (Andr.) Willdenow). *Boletim de Pesquisa Florestal*, p.31-38, jan/jun 1999.
- Monteiro JM, Lins Neto EM, Amorim EL, Strattmann RR, Araújo EL, Albuquerque UP. Teor de taninos em três espécies medicinais arbóreas simpátricas da caatinga. *Revista Árvore*, v.29, n.6, p.999-1005, 2005. <https://doi.org/10.1590/S0100-67622005000600020>
- Nascimento IL, Leal CC, Nogueira NW, Medeiros AK, Câmara FM. Influência de diferentes tipos de substrato e temperatura na germinação de sementes de *Inga ingoides*, Rich., Willd. *Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável*, v.6, n.4, p.7-10, out/dez 2011.
- Nascimento JS. Compostagem.2005. Disponível em: <<http://eb.ufpel.edu.br/compostagem.pdf>> Acesso em: 19 jun 2011.
- Neves OS, Ferreira EV, Carvalho JG, Soares CR. Adição de níquel na solução nutritiva para o cultivo de mudas de umbuzeiro. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v.31, n.3, 485-490 jun, 2017. <https://doi.org/10.1590/S0100-06832007000300008>

- Pacheco MV, Matos V, Ferreira RL, Lícia A, Feliciano P, Silva KM. Efeito de temperaturas e substratos na germinação de sementes de *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. (Anacardiaceae). Revista Árvore, v.30, n.3, p.359-367, jun,2006. <https://doi.org/doi:10.1590/S0100-67622006000300006>
- Pagliarini MK, Castilho RM, Nasser FA, Alves MC. Tratamentos pré-germinativos e substratos na germinação de sementes e biometria de plântulas de *Hymenaea courbaril* L. var. Stilbocarpa. Cultura Agronômica, v.25, n.1, p.39-54, 2016. <https://doi.org/doi:10.32929/2446-8355.2016v25n1p39-54>
- Paiva HN, Carvalho JG, Siqueira JO, Fernandes AR, Miranda JR. Efeito da aplicação de doses crescentes de níquel sobre o teor e o conteúdo de nutrientes em mudas de ipê-roxo (*Tabebuia impetiginosa* (Mart.) Standley). Scientia Forestalis, n.63, p.158-166, jun, 2003.
- Panda SK, Choudhury S. Chromium stress in plants. Brazilian Journal of Plant Physiology, v.17, p.95-102, 2005. <https://doi.org/doi:10.1590/S1677-04202005000100008>
- Rosa MF, Abreu FAP, Furtado AAL, Brígido AKL, Norões ERV. Processo agroindustrial: obtenção de pó de casca de coco verde. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical. 4p. (Comunicado técnico 61), 2001.
- Rosa MF, Santos FJS, Montenegro AAT, Abreu FAP, Correia C, Araújo FBS, Norões ERV. Caracterização do pó de casca de coco verde usado como substrato agrícola. Comunicado técnico. Embrapa Agroindústria Tropical. n.54, maio/2002, p.1-6.
- Ribeiro HM, Romero AM, Pereira H, Borges P, Cabral F, Vasconcelos E. Evaluation of a compost obtained from forestry wastes and solid phase of pig slurry as a substrate for seedlings production. Bioresource Technology. Biore-source Technology, v.98, n.17, p.3294-3297, dez, 2007. <https://doi.org/doi:10.1016/j.biortech.2006.07.002>
- Santos FE, Araújo JM, Andrade WC, Costa CC, Silva AG. Formação de mudas de *Eucalyptus urophylla* S.T. Blake com utilização de resíduo sólido orgânico urbano. Enciclopédia Biosfera, v.9, n.16, p.1203-1214, 2013.
- SEAGRI, Secretaria de Estado da Agricultura. Agronegócio de Rondônia avança e bate recordes de exportação e produção agrícola em 2020. Mar. 2021.
- Sena LHM et al. Qualidade fisiológica de sementes de pitangueira submetidas a diferentes procedimentos de secagem e substratos. Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental, Campina Grande-PB, v.14, n.4, p.412-417, 2010.
- Schulze M, Grogan J, Uhl C, Lentinia M, Vidal E. Evaluating ipê (*Tabebuia*, Bignoniaceae) logging in Amazonia: Sustainable management or catalyst for forest degradation? Biological Conservation, v.141, n.8, p.2071-2085, ago, 2008. <https://doi.org/doi:10.1016/j.biocon.2008.06.003>
- Silva CS, Pedrosa MF. Ecotoxicologia do cromo e seus compostos. Caderno de Referência Ambiental, v.5, 2001.
- Souza FB, Mengarda LH, Spadeto C, Lopes JC. Substratos e temperaturas na germinação de sementes de gonçalo-alves (*Astronium concinnum* Schott). Revista Tópica: ciências agrárias e biológicas Maranhão, v.6, n.3, p.76- 86, 2012. <https://doi.org/doi:10.0000/rtcab.v6i3.905>
- Taiz L, Zeiger E. Fisiologia vegetal (Vol. 5 ed.). Porto Alegre: Artmed, 2013.



Rendimento do filé de tucunaré (*Cichla cf. monoculus*) Osteichthyes, Cichlidae em diferentes cortes da cabeça

Shirley Silva Cosme^a, Alex Guimarães Sanches^{b*}, Maryelle Barros da Silva^b, Elaine Gleice Silva Moreira^c, Carlos Alberto Martins Cordeiro^a

^a Universidade Federal do Pará, Brasil

^b Universidade Estadual Paulista, Brasil

^c Universidade Estadual de Goiás, Brasil

* Autor correspondente (alexsanches.eng@gmail.com)

INFO

Keywords

processing
filleting
morphometry

ABSTRACT

Peacock bass fillet yield (Cichla cf. monoculus) Osteichthyes, Cichlidae in different head cuts.

Peacock bass (*Cichla cf. monoculus*), is a very popular fish for consumption, but there are few studies related to its processing and yield. Thus, the objective of this work was to evaluate the effect of cutting the head on the morphometric parameters related to fillet yield. For this, 60 peacock bass were divided and submitted to oblique and straight cut of the head. Morphometric characteristics and proximate composition were investigated. The oblique cut of the head resulted in greater weight and yield of the clean trunk and fillet with and without skin compared to the straight cut. As for residues, head yield was more associated with straight cut, while weight and skin yield with the oblique cut. Regarding the morphometric analysis, the height of the fish positively influences the fillet yield, while the proximate composition is affected by the cultivation condition. Under the conditions of this study and aiming at the best use and yield of the peacock bass fillet, the oblique cut of the head is recommended.

RESUMO

Palavras-chaves

processamento
filetagem
morfometria

O tucunaré (*Cichla cf. monoculus*), é um peixe muito apreciado para o consumo, porém são poucos os estudos relacionados ao seu processamento e rendimento. Deste modo, objetivou-se neste trabalho avaliar o efeito do corte da cabeça sobre os parâmetros morfométricos relacionados ao rendimento do filé. Para isso, 60 exemplares de tucunaré foram divididos e submetidos ao corte oblíquo e reto da cabeça. As características morfométricas e a composição centesimal foram investigadas. O corte oblíquo da cabeça resultou em maior peso e rendimento do tronco limpo e do filé com e sem pele em relação ao corte reto. Quanto aos resíduos, o rendimento da cabeça foi mais associado ao corte reto, enquanto o peso e o rendimento da pele com o corte oblíquo. Com relação às análises morfométricas, a altura do peixe influencia positivamente no rendimento do filé, enquanto a composição centesimal é afetada pela condição de cultivo. Nas condições deste estudo e visando o melhor aproveitamento e rendimento do filé do tucunaré, recomenda-se o corte oblíquo da cabeça.

Received 20 October 2021; Received in revised from 26 October 2021; Accepted 21 February 2022



INTRODUÇÃO

O tucunaré (*Cichla cf. monoculus*) é uma espécie originária das bacias dos rios Amazonas e Orinoco, no entanto, encontra-se dispersa em quase todas as demais bacias hidrográficas do Brasil, com a finalidade de controle de espécies com alta prolificidade como a tilápia (Campos et al., 2015; Costa et al., 2020). Com grande importância para a pesca artesanal, figura entre as 10 espécies mais desembarcadas nos mercados do Amazonas e Pará (Anuário Brasileiro da Piscicultura, 2019).

Por apresentar tamanho, alto valor comercial e características organolépticas excelentes em sua carne a espécie tem grande chance de inclusão no plantel de peixes cultiváveis, especialmente para a prática de pesca esportiva (Inomata et al., 2016; Ferraz et al., 2019) e, sua entrada em regiões não naturais promove novas perspectivas de mercado haja vista que a espécie apresenta hábitos sedentários adaptados a ambientes lênticos (lagos, lagoas, marginais e reservatórios) (Pereira, 2020), de modo que o aprimoramento do conhecimento de suas exigências poderá tornar esta espécie promissora para a aquicultura nacional.

A morfometria é a análise quantitativa da variação morfológica dos organismos e costuma ser definida como o estudo da forma e do tamanho, e como estas variáveis se relacionam entre si (Kaouèche et al., 2017), sendo indispensável para a caracterização das espécies e avaliação do seu potencial produtivo (Maghelly et al., 2014). Para o pescado, as características morfométricas são

parâmetros fundamentais, pois indica indiretamente o rendimento de filé e o percentual de subprodutos para diferentes aproveitamentos (Macedo-Viegas et al., 2004; Vasconcelos et al., 2018), além de fornecer subsídios às indústrias de processamento e aos piscicultores para estimar sua produção econômica.

Todavia, são poucos os estudos relacionados às características morfométricas, rendimento e composição de filé de peixes de água doce no Brasil que permitam comparar as espécies como potencial de industrialização. Nesse sentido, o presente trabalho tem por objetivo avaliar as características morfométricas relacionadas ao rendimento do filé de tucunaré sob dois tipos de corte da cabeça (oblíquo e reto) visando o melhor aproveitamento de comercialização e consumo.

MATERIAL E MÉTODOS

Matéria-prima

A pesquisa foi conduzida utilizando 60 exemplares de tucunaré adquiridos em feira comercial localizada no município de Altamira – PA, Brasil, com massa média variando ~750 a ~800 g. Estes, foram transportados em caixas térmicas até o Laboratório de Tecnologia de Produtos da Universidade Federal do Pará, Campus Altamira-PA onde foram divididos aleatoriamente em dois grupos sendo 30 peixes submetidos ao corte reto da cabeça e 30 submetidos ao corte oblíquo da cabeça, conforme representado na (Figura 1A e B), respectivamente.

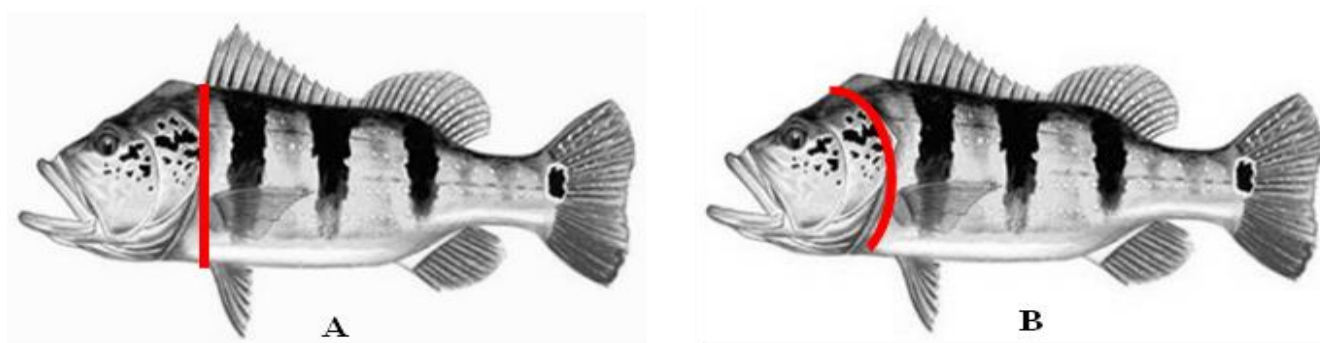


Figura 1 - Tucunaré (*Cichla cf. monoculus*) com o corte reto (A) e oblíquo (B) da cabeça

Processamento

O processo de filetagem foi efetuado por uma única pessoa, após a remoção total da pele. Nesse procedimento, retirou-se a musculatura dorso-lateral (músculos epaxiais e hipaxiais) do peixe no sentido longitudinal, ao longo de toda a extensão da coluna vertebral até o final das costelas. Todos os

processos foram realizados manualmente, desde a determinação da massa amostral, evisceração, filetagem e a retirada da pele.

Análises morfométricas

Anteriormente a filetagem dos peixes, aferiu-se as seguintes massas: peixe eviscerado (sem vísceras e brânquias), tronco limpo (sem cabeça,

nadadeiras), resíduos (cabeça, carcaça, nadadeiras, sobras em “V” e pele), massa do filé com (pele e filé sem pele) utilizando balança analítica digital (Toledo Pnix III, I3-5101, Brasil). Para o presente estudo, a massa inteira (massa total), não foi considerado devido à dificuldade de encontrar animais com o trato digestivo nos locais de venda, assim, considerou-se a partir da massa eviscerado. Os resultados foram expressos em gramas (g).

As características (comprimento, largura e altura dos exemplares) basearam-se nos seguintes

parâmetros: largura do tronco (LTR), comprimento total (CT), comprimento padrão (CP), comprimento do tronco (CTR), comprimento da cabeça (CC), altura do tronco (ATR) e altura da cabeça (AC) (Figura 2) foram determinados com o auxílio de paquímetro (Insize, 1102-150, Brasil) com graduação de 0,05mm e ictiômetro (Cienlab, Brasil) com precisão de 0,1 cm. Os dados de rendimento do filé foram calculados em porcentagem, em relação a massa total eviscerada do indivíduo.

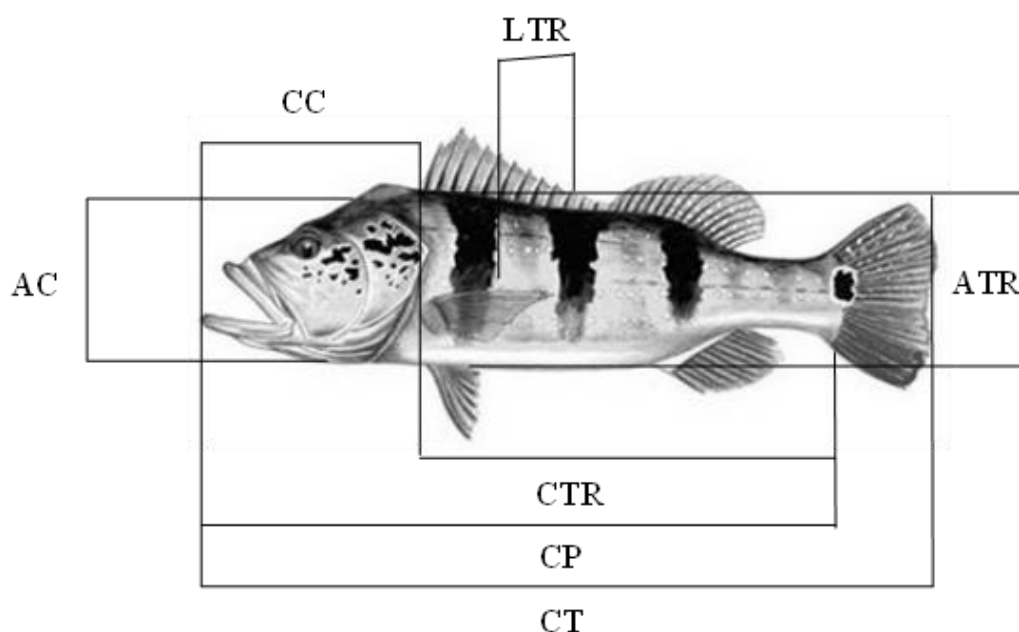


Figura 2 - Medidas morfométricas: CT (comprimento total), CP (comprimento padrão), CTR (comprimento do tronco), CC (comprimento da cabeça), AC (altura da cabeça), ATR (altura do tronco) e LTR (largura do tronco)

A partir desses parâmetros foram realizadas as seguintes relações: comprimento da cabeça/comprimento padrão (CC/CP), comprimento da cabeça/altura da cabeça (CC/AC), comprimento padrão/comprimento total (CP/CT), largura do tronco/ comprimento do tronco (LTR/CTR), largura do tronco/altura do tronco (LTR/ATR) e altura do tronco/comprimento do tronco (ATR/CTR).

Composição centesimal

Teor de umidade (método 950.46): foi obtido em amostras contendo ± 4 g em balança analítica digital, onde foram acondicionadas em placa de Petri, com massa previamente obtida. Em seguida, as placas foram transferidas para estufa (QUIMIS, Q316M) a temperatura de 105 °C e a massa foi obtida conforme descrito pela AOAC (2016).

Cinzas (método 920.153): foi obtido por porcentagem conforme o descrito pela AOAC (2016) adaptado, por meio de incineração em forno tipo mufla na temperatura de 550 °C por 4 h.

Proteína total (método 981.10): proteína foi obtido pelo método semi-micro Kjeldahl, utilizando-se o fator de conversão de 6,25 expresso em nitrogênio total para proteínas totais conforme descrito por AOAC (2016).

Lipídeos totais: determinado através do método de extração a frio utilizando solução bifásica de metanol e clorofórmio conforme descrito por Bligh e Dyer (1959). Todas as análises foram realizadas em triplicata e os resultados foram expressos em porcentagem (%).

Análise estatística e Delineamento experimental

O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado com dois tratamentos (corte reto e oblíquo) com 30 repetições sendo cada

indivíduo uma unidade experimental. Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA), e quando houve diferença, foi adotado o teste de *Tukey* com nível de significância de 95% ($p < 0,05$) utilizando a interface do programa Statistic (versão 7.0).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para as variáveis relacionadas ao rendimento do Tucunaré, houve aumento significativo ($p < 0,05$) quando o corte da cabeça foi realizado de forma oblíqua em relação ao corte reto (Tabela 1).

Tabela 1 - Rendimento do tucunaré (*Cichla cf. monoculus*) submetido a diferentes cortes da cabeça

Variáveis	Tipos de corte	
	Oblíquo	Reto
Massa eviscerada (g)	725,75 ± 93,04 a	714,63 ± 103,7 a
Massa tronco limpo (g)	470,54 ± 62,21 a	415,99 ± 64,59 b
Rendimento tronco limpo (%)	63,13 ± 3,23 a	58,47 ± 6,73 b
Massa filé com pele (g)	391,47 ± 61,60 a	338,42 ± 47,98 b
Rendimento filé com pele (%)	52,47 ± 4,69 a	47,64 ± 5,44 b
Massa filé sem pele (g)	347,23 ± 54,89 a	306,49 ± 66,79 b
Rendimento filé sem pele (%)	46,52 ± 4,08 a	42,96 ± 7,03 b

Letras diferentes na mesma linha diferem entre si pelo teste de *Tukey* ($p < 0,05$)

A massa de peixe eviscerado não diferiu ($p > 0,05$) entre os tipos de cortes utilizados. Todavia, a massa e o rendimento do tronco limpo foram de 11,59 e 7,38% maiores quando os peixes foram submetidos ao corte oblíquo da cabeça em relação ao corte reto, respectivamente. Em estudo com Tambaqui (*Colossoma macropomum*), Pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e Matrinxã (*Brycon cephalus*) Souza e Inhamus (2011) verificaram rendimento de tronco limpo = 61,54, 77,07, 68,05 %, respectivamente. Em Piranhas vermelhas (*Pygocentrus nattereri*) foi observado rendimento de 65,46 % por Mafra et al. (2016). De modo geral, esses resultados são similares aos verificados neste estudo com (média de 62,53 %) para ambos os cortes da cabeça.

De acordo com Adames et al. (2018), o rendimento do tronco limpo permite avaliar os fatores críticos e visualizar o potencial para industrialização. Contudo, dependendo da espécie de peixe, o mais importante é conhecer o rendimento do filé em função do corte em que são submetidos, já que é um produto pronto para a industrialização (fresco ou congelado). Neste caso, a massa e o rendimento do filé com pele e sem pele, foram de 13,55 %, 9,20 %, 11,73 % e 7,65 % respectivamente, maior ($p < 0,05$) no corte oblíquo da cabeça em relação ao corte reto. Gomiero et al. (2003) e Souza et al. (2008) também relataram maior rendimento dos filés de Matrinxã (*Brycon cephalus*) e Tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*) quando foram submetidos ao corte oblíquo da cabeça, respectivamente. Este resultado está relacionado com o melhor aproveitamento da linha de corte para a remoção do filé, pois

representa em torno de 4,19 % da massa corporal do peixe eviscerado, quantidade esta que, por menor que seja, representa acréscimo econômico para o piscicultor ou mesmo para a indústria de processamento do pescado.

A análise do rendimento de resíduo produzido durante o processamento, está apresentado na (Tabela 2). De modo geral, houve efeito significativo com $p < 0,05$ somente para as variáveis massa e rendimento da pele e rendimento da cabeça.

Como resíduos do processamento de pescados, consideram-se a cabeça, nadadeiras e vísceras onde dependem da espécie em estudo, podendo ser superior a 60% sobre a massa total (Henriques et al., 2020). Na comercialização do filé, a pele também pode ser considerada como resíduo, e pode compor entre 5 a 10% variando entre as espécies e a forma de filetagem empregada (Souza e Inhamuns, 2011; Garcia e Maciel, 2021).

Neste estudo, o corte oblíquo da cabeça favoreceu maior massa e rendimento de pele (15,26 e 11,50 %) respectivamente. Enquanto o rendimento da cabeça foi = 13,20 % maior no corte reto. O corte oblíquo favorece o melhor aproveitamento da linha de corte do pescado e, portanto, justifica a maior massa e rendimento de pele. Por outro lado, a quantidade de carne e nadadeiras peitorais e ventrais que permaneceram na cabeça com o corte reto, resultou em maior rendimento. Esses resultados em função do tipo de corte, sugerem que a maior massa e rendimento da pele associado com o menor rendimento da cabeça estão diretamente ligados no maior rendimento do filé.

Tabela 2 - Rendimento dos resíduos produzidos durante o processamento do tucunaré (*Cichla cf. monoculus*) submetido a diferentes cortes da cabeça

Variável	Tipos de corte	
	Oblíquo	Reto
Massa de sobras em “V” (g)	9,47 ± 2,24 a	9,13 ± 2,36 a
Rendimento de sobras em “V” (%)	1,27 ± 0,27 a	1,28 ± 0,30 a
Massa da pele (g)	42,00 ± 5,03 a	35,59 ± 5,90 b
Rendimento da pele (%)	5,65 ± 0,47 a	5,00 ± 0,56 b
Massa da carcaça (g)	76,43 ± 10,68 a	69,41 ± 15,34 a
Rendimento da carcaça (%)	10,26 ± 0,71 a	9,69 ± 1,48 a
Massa da cabeça (g)	221,36 ± 30,64 a	241,44 ± 62,29 a
Rendimento da cabeça (%)	29,72 ± 2,21 b	34,24 ± 7,59 a
Massa de resíduos (g)	37,23 ± 9,43 a	35,66 ± 7,61 a
Rendimento de resíduos (%)	4,96 ± 0,95 a	4,98 ± 0,72 a

Letras diferentes na mesma linha diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

De modo geral, o valor médio da percentagem de pele em peixes teleósteos a exemplo do Tucunaré, é de 7,5 %. Todavia, variações em função do tamanho, massa, método de filetagem, retirada da pele e à destreza do filetador, influenciam diretamente o rendimento do filé (Contreras-Gusmán, 1994). Em outras espécies de peixes da família Teleostei como Jaraqui (*Semaprochilodus* spp.), Beijupirá (*Rachycentron canadum*), Jundiá (*Rhamdia voulezi*), Tambacu (*Colossoma*

macropomum x *Piaractus mesopotamicus*) foram observados percentuais de rendimento de pele na ordem de 4,21, 5,72, 6,49 e 8,13 % respectivamente (Costa et al., 2014; Goes et al., 2015; Castro et al., 2017; Barros et al., 2019), corroborando com o valor médio obtido neste estudo = 5,32 %.

Para as análises morfométricas, os tipos de cortes apresentaram diferença em $p < 0,05$ para as variáveis altura, largura e comprimento do tronco, além do comprimento padrão (Tabela 3).

Tabela 3 - Parâmetros e relações morfométricas do tucunaré (*Cichla cf. monoculus*) submetido a diferentes cortes da cabeça

Variáveis (cm)	Tipos de corte	
	Oblíquo	Reto
Altura da cabeça (ACAB)	7,55 ± 0,91 a	7,30 ± 1,07 a
Altura do tronco (ATRO)	9,65 ± 0,49 a	9,22 ± 0,52 b
Largura do tronco (LTRO)	4,55 ± 0,21 a	4,41 ± 0,26 b
Comprimento total (CTOT)	36,32 ± 2,24 a	35,27 ± 1,55 a
Comprimento do tronco (CTRO)	21,30 ± 2,51 a	19,52 ± 1,10 b
Comprimento padrão (CPAD)	31,75 ± 2,04 a	30,20 ± 1,40 b
Comprimento da cabeça (CCAB)	10,45 ± 1,39 a	10,68 ± 0,51 a
CCAB/CPAD	0,33 ± 0,04 a	0,35 ± 0,01 a
CCAB/ACAB	1,40 ± 0,23 a	1,52 ± 0,39 a
LTRO/ATRO	0,47 ± 0,03 a	0,48 ± 0,02 a
CPAD/CTOT	0,87 ± 0,01 a	0,86 ± 0,02 a
LTRO/CTRO	0,22 ± 0,02 a	0,23 ± 0,01 a
ATRO/CTRO	0,46 ± 0,04 a	0,47 ± 0,03 a
Índice de cabeça (CPAD/CCAB)	3,15 ± 0,95 a	2,83 ± 0,10 a
Índice de perfil (CPAD/ATRO)	3,29 ± 0,16 a	3,28 ± 0,15 a

Letras diferentes na mesma linha diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

A relação morfométrica são estimativas numéricas que analisam a forma corporal do indivíduo em relação ao seu tamanho e, ponto de vista econômico, e o crescimento é o componente mais importante (Maciel et al., 2014).

Neste estudo, a altura do tronco é maior com $p < 0,05$ comparado a largura do tronco, sendo que, a mesma forma sobre o comprimento padrão, foi superior ao comprimento do tronco, mesmo sem diferença com $p > 0,05$ para o comprimento total do peixe. Deste modo, o Tucunaré desenvolve-se mais em altura do que em comprimento, logo, tanto a indústria quanto os piscicultores devem considerar a altura em relação ao comprimento para obter melhor largura e rendimento do filé. De forma similar, o peixe Barbado (*Pinirampus pirinampu*) também apresentou maior correlação entre altura e rendimento do filé em comparação ao comprimento, classificando-o com padrão de crescimento do tipo alométrico (Adames et al., 2014). Além disso, o corte oblíquo foi = 4,45 % (altura do tronco), 3,07 % (largura do tronco), 8,35 % (comprimento do tronco) e 4,88% (comprimento padrão) maior que o corte reto da cabeça com $p < 0,05$ sugerindo que o melhor aproveitamento da musculatura em função da linha de corte contornada, contribui para o melhor aproveitamento e rendimento do filé.

A análise centesimal tem como principal objetivo, à obtenção da composição química e nutricional dos alimentos (Botelho et al., 2017; Menezes Filho et al., 2019). Segundo Ogawa e Maia (1999) os valores médios expressos em 100 g^{-1} determinados para o teor de água no pescado, pode variar entre 60-80 %, fração lipídica entre 0,6-36 %, proteínas 10-25 %, minerais expressos em cinzas entre 1-5 % e matéria seca de 22-28 %. De modo geral, os valores obtidos neste estudo estão dentro dessas faixas, isto é: umidade = 74,97 %, lipídios = 7,39 %, proteínas = 22,05 %, minerais = 3,70 %, cinzas = 25,03 %. A composição centesimal em filés de Tucunaré da bacia Amazônica, correspondeu a 78,91 % umidade, 1,61 % fração lipídica, 16,25 % proteínas, 0,76 % minerais e 23,45 % de cinzas (Santos et al., 2018). Essa variação na composição físico-química do pescado, é dependente de vários fatores como, tipo de alimentação, temperatura da água, sazonalidade, idade, sexo, parte do corpo avaliada e forma de cultivo. Nesta pesquisa, utilizaram-se peixes provenientes de cativeiro onde a alimentação é rica em gorduras e proteínas para estimular o crescimento rápido desses animais, tal fato justifica, por exemplo, a maior concentração da fração lipídica e proteínas.

Costa et al. (2014) em estudo, obtiveram concentrações sobre a fração lipídica com valores

entre 12,39 e 16,27 % em espécies de Jaraqui (*Semaprochilodus* spp). A fração lipídica de pescados é rica em ácidos graxos poli-insaturados, sendo considerada benéfica ao consumo na alimentação humana e influenciam no tempo de vida útil dos produtos e na aceitação pelo consumidores (Li et al., 2011; Jabeen e Chaudhry, 2011).

CONCLUSÕES

Com base nas características morfométricas do tucunaré, recomenda-se o corte oblíquo da cabeça e a escolha de peixes com maior altura para obtenção de maior rendimento do filé.

A composição centesimal é influenciada pela condição de criação em cativeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adames MS, Krause RA, Damasceno DZ, Piana PA, de Oliveira JDS, Bombardelli RA. Características morfométricas, rendimentos no processamento e composição centesimal da carne do barbado. Boletim do Instituto de Pesca, v.40, n.2, p.251-260, 2018.
- ANUÁRIO BRASILEIRO DA PISCICULTURA. 2020. Piscicultura brasileira, uma atividade em constante expansão. Disponível em <https://www.peixebr.com.br/anuario-2020/>. Acesso em 01/10/21.
- AOAC - Association of Official Analytical Chemistry. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemistry. Washington: USA, 2200 p. 2016.
- Barros FAL, Silveira Brito MA, Silveira DS, Brabo MF, Cordeiro CAM. Características morfométricas, rendimentos de cortes e composição centesimal do híbrido tambacu. Agrarian, v.12, n.43, p.89-96, 2019.
<https://doi.org/10.30612/agrarian.v12i43.8132>
- Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. Canadian Journal of Biochemistry and Physiology, v.37, n.8, p.911-917, 1959.
<https://doi.org/10.1139/o59-099>
- Botelho HA, Costa AC, Fernandes EM, Café MB, Freitas RTF. Bromatological analysis of filet pacu (*Piaractus mesopotamicus*), pirapitinga (*Piaractus brachypomum*) and tambaqui (*Colossoma macropomum*). Journal of Veterinary Science and Public Health, v.4, n.2, p.158-165, 2017.
<https://doi.org/10.4025/revcivet.v4i2.37022>
- Campos CP, Freitas CEC, Amadio S. Growth of the *Cichla temensis* Humboldt, 1821 (Perciformes: Cichlidae) from the middle rio Negro, Amazonas, Brazil. Neotropical Ichthyology, v.13, n.2, p.1-8, 2015.
<https://doi.org/10.1590/1982-0224-20140090>
- Castro LAA, Paulo EA, Masih Neto T, Furtado Neto MAA. Avaliação do rendimento dos filés e resíduos da filetagem do beijupirá cultivado e selvagem. Arquivos de Ciência Marinha, v.50, n.1, p.15-24, 2017.
<https://doi.org/10.32360/acmar.v50i1.18819>

- Contreras-Gusmán ES. Bioquímica de pescados e derivados. Jaboticabal: FUNEP, 409p. 1994.
- Costa TV, Machado, NJB, Brasil RJM, Fragata NP. Caracterização físico-química e rendimento do filé e resíduos de diferentes espécies de jaraqui (*Semaprochilodus* spp). Boletim do Instituto de Pesca, v.40, n.1, p.35-47, 2014.
- Ferraz JD, Casimiro ACR, Pereira AD, Garcia DAZ, Ribeiro L. Incentivo à pesca esportiva de Tucunaré *Cichla Bloch* & Schneider, 1801 no Lago Igapó, Londrina, Paraná: ameaça a comunidade aquática nativa e aos habitantes da cidade?. Boletim Sociedade Brasileira de Ictiologia, v.128, p.19-25, 2019.
- Garcia AML, Maciel HM. Tambaqui yield in different filleting methods. Research, Society and Development, v.10, n.4, p.1-8, 2021. <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i4.13849>
- Goes ESR, Feiden A, Neu DH, Goes MD, Boscolo WR, Signor A. Processing yield and proximate composition of *Rhamdia voulezi* filets. Ciência Animal Brasileira, v.16, n.4, p.481-490, 2015. <https://doi.org/10.1590/1089-6891v16i421100>
- Gomiero JSG, Ribeiro PAP, Ferreira MW, Logato PVR. Rendimento de carcaça de peixe matrinxã (*Brycon cephalus*) nos diferentes cortes de cabeça. Ciência e Agrotecnologia, v.27, n.1, p.211-216, 2003. <https://doi.org/10.1590/S1413-70542003000100027>
- Henriques JJS, Pires BS, Rodrigues RB. Utilização de subprodutos da indústria pesqueira na nutrição de peixes. NutriTime, v.17, n.5, p.8788-8799, 2020.
- Inomata SO, Inomata DO, Freitas CEC. Análise bibliométrica acerca da pesca de tucunaré *Cichla* spp. em reservatórios brasileiros: um estudo exploratório nas bases de dados Scopus e Web of Science. Scientia Amazonia, v.5, n.2, p.40-53, 2016.
- Jabeen F, Chaudhry AS. Chemical compositions and fatty acid profiles of three freshwater fish species. Food Chemistry, v.125, n.3, 991-996, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.09.103>
- Kaouèche M, Bahri-Sfar L, Hammami I, Hassine OKB. Morphometric variations in white seabream *Diplodus sargus* (Linneus, 1758) populations along the Tunisian coast. Oceanologia, v.59, n.2, p.129-138, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.oceano.2016.10.003>
- Li G, Sinclair AJ, Li D. Comparison of lipid content and fatty acid composition in the edible meat of wild and cultured freshwater and marine fish and shrimps from China. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v.59, n.5, p.1871-1881, 2011. <https://doi.org/10.1021/jf104154q>
- Macedo-Viegas EM, Souza MLR, Kronka SN. Estudo da carcaça de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), em quatro categorias de peso. Revista Unimar, v.19, n.3, p.863-870, 2004.
- Maciel LG, Santos JS, Araújo JA. Relação das características morfológicas externas do mandi (*Pimelodus blochii*) em relação ao seu potencial de produção de filé. Revista Agropecuária Técnica, v.35, n.1, p.113-120, 2014. <https://doi.org/10.25066/agrotec.v35i1.19356>
- Mafra DP, Dresch RT, Costa LHC, Costa CS, Diemer O. Morphometric characteristics, body yield and chemistry composition of the red piranha. Revista Agrarian, v.9, n.34, p.383-389, 2016.
- Maghelly OR, Huergo GM, Zaniboni Filho E, Enke DBS. Características morfológicas e rendimento corporal do surubi *Steindachneridion scriptum* agrupados por sexo. Boletim do Instituto de Pesca, v.40, n.3, p.419 - 430, 2014.
- Menezes Filho ACP, Silva MA, Pereira AV, Oilveira-Filho JG, Castro CFS. Parâmetros físico-químicos, tecnológicos, atividade antioxidante, conteúdo fenólicos totais e carotenóides das farinhas dos frutos do jatobá-do-cerrado (*Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne). Multi-Science Journal, v.2, n.1, p.93-100, 2019. <https://doi.org/10.33837/msj.v2i1.900>
- Ogawa M, Maia EL. Manual de Pesca. Varela. São Paulo, 430p. 1999.
- Pereira RGA. Produção da piscicultura de espécies nativas da Amazônia em Rondônia. Caderno De Ciências Agrárias, v.12, p.1-4, 2020. <https://doi.org/10.35699/2447-6218.2020.15940>
- Santos PR, Vasconcelos ELQ, Souza AFL, Silva Júnior JL, Inhamuns AJ. Qualidade físico-química e microbiológica de pescado congelado consumido na merenda escolar do estado do Amazonas. Pubvet, v.12, n.5, p.1-6, 2018.
- Souza MLR, Marengoni NG, Pinto AA, Caçador, WC. Rendimento do processamento da tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*): tipos de corte da cabeça em duas categorias de peso. Acta Scientiarum. Animal Sciences, v.22, p.701-706, 2000. <https://doi.org/10.4025/actascianimsci.v22i0.2926>
- Souza AFL, Inhamuns AJ. Análise de rendimento cárneo das principais espécies de peixes comercializados no Estado do Amazonas, Brasil. Acta Amazonica, v.41, n.2, p.289-296, 2011.
- Vasconcelos J, Vieira AR, Sequeira V, Gonzalez JA, Kaufmann M, Gordo LS. Identifying populations of the blue jack mackerel (*Trachurus picturatus*) in the Northeast Atlantic by using geometric morphometrics and otolith shape analysis. Fishery Bulletin, v.116, n.1, p.81-92, 2018. <https://doi.org/10.7755/FB.116.1.9>



Alternativas ao paraquat para o controle químico de azevém, aveia e buva

Alfredo Junior Paiola Albrecht^a, Leandro Paiola Albrecht^a, Mauricio Paulo Batistella Pasini^b
 André Felipe Moreira Silva^{c*}, Willian Felipe Larini^a, Debora Cristine Neuberger^a

^a Universidade Federal do Paraná, Brasil

^b Universidade de Cruz Alta, Brasil

^c Crop Science Pesquisa e Consultoria Agrônômica Ltda, Brasil

* Autor correspondente (afmoreirasilva@alumni.usp.br)

INFO

Keywords

Lolium perenne ssp.
multiflorum
Avena fatua
Conyza sumatrensis
 glufosinate
 weeds

ABSTRACT

Alternatives to paraquat for the chemical control of Italian ryegrass, wild oat and Sumatran fleabane.

With the banning of paraquat, it is necessary to plan for the use of alternative herbicides in the desiccation of weeds. In this sense, herbicides such as glufosinate, saflufenacil, diquat, glyphosate, clethodim are highlighted in different mixtures. Glufosinate, especially in mixtures, is believed to be effective in controlling *Lolium perenne* ssp. *multiflorum* (Italian ryegrass), *Avena fatua* (wild oat) and/or *Conyza sumatrensis* (Sumatran fleabane). The aim was to evaluate the efficacy of glufosinate alone, or in mixtures, in the control of Italian ryegrass, wild oat and Sumatran fleabane, as an alternative to paraquat. The experiment was carried out in November 2020, in an experimental area located in the city of Cruz Alta, state of Rio Grande do Sul (RS), Brazil. A randomized block design was used, with four replications. The treatments consisted of the application of glufosinate, saflufenacil, diquat, glyphosate and clethodim, alone or in combinations. The control of Italian ryegrass, wild oat and Sumatran fleabane was evaluated at 7, 14, and 28 days after application. Glufosinate at mixtures was effective in controlling weeds, being almost always superior to that observed for diquat alone or in mixtures. To achieve the same efficacy of the mixtures, the rate of glufosinate must be at least 700 g a.i. ha⁻¹. The application of glufosinate (400 g a.i. ha⁻¹) in mixtures with saflufenacil, glyphosate and clethodim was effective in controlling Italian ryegrass, wild oat and Sumatran fleabane. The alone application of glufosinate was effective in controlling all weeds at the maximum dose (700 g a.i. ha⁻¹). Glufosinate, alone or in mixtures, is thus characterized as an alternative to paraquat in the control of weeds.

RESUMO

Palavras-chaves

Lolium perenne ssp.
multiflorum
Avena fatua
Conyza sumatrensis
 glufosinate
 plantas daninhas

Com o banimento do paraquat, é necessário planejar o uso de herbicidas alternativos na dessecação de plantas daninhas. Neste sentido desatacam-se herbicidas como glufosinate, saflufenacil, diquat, glyphosate, clethodim, em diferentes associações. Acredita-se que o glufosinate, sobretudo em associações, seja eficaz no controle de *Lolium perenne* ssp. *multiflorum* (azevém), *Avena fatua* (aveia) e/ou *Conyza sumatrensis* (buva). Objetivou-se avaliar a eficácia de glufosinate isolado, ou em associações, no controle de azevém, aveia e buva, como alternativa ao paraquat. O experimento foi conduzido em novembro de 2020, em área experimental localizada no município de Cruz Alta, estado do Rio Grande do Sul (RS), Brasil. Foi utilizado delineamento em blocos casualizado, com quatro repetições. Os tratamentos foram compostos pela aplicação de glufosinate, saflufenacil, diquat, glyphosate e clethodim, isolados ou em associações. Foi avaliado o controle de azevém, aveia e buva, aos 7, 14 e 28 dias após aplicação. O glufosinate em associações foi eficaz no controle das plantas daninhas, sendo quase sempre superior ao observado para diquat isolado ou em misturas. Para se atingir a mesma eficácia das associações, a dose de glufosinate deve ser de no mínimo 700 g i.a. ha⁻¹. A aplicação de glufosinate (400 g i.a. ha⁻¹) em associações com saflufenacil, glyphosate e clethodim foi eficaz no controle de azevém, aveia e buva. A aplicação isolada de glufosinate foi eficaz no controle de todas as plantas daninhas na dose máxima (700 g i.a. ha⁻¹). O glufosinate, isolado ou em associações, caracteriza-se como alternativa ao paraquat no controle de plantas daninhas.

Received 26 October 2021; Received in revised from 18 January 2022; Accepted 07 March 2022



INTRODUÇÃO

O paraquat é um herbicida inibidor do fotossistema I, não seletivo, de amplo espectro e com ação de contato, utilizado em aplicações pré-semeadura de cultivos como a soja (Kalsing et al., 2020). Também pode ser utilizado na dessecação pré-colheita de alguns cultivos de grãos (Bellaloui et al., 2020), pode ser aplicado em jato dirigido (Costa et al., 2013), ou ainda no controle de plantas daninhas em ferrovias, margens de rodovias e sob linhas de alta tensão. Apesar de sua elevada eficácia no controle de plantas daninhas, apresenta 72 casos de resistência no mundo (Heap, 2021). Bem como é proibido em vários países (Camargo et al., 2020; Kim e Kim, 2020). No Brasil, o paraquat passou por processo de reavaliação de 2008 a 2017, devido a estudos que mostraram sua alta toxicidade ao ser humano, após a conclusão da revisão, o paraquat foi banido (Anvisa, 2020).

O paraquat era importante no controle de gramíneas, sobretudo *Lolium perenne* ssp. *multiflorum* (azevém) (Pereira et al., 2017). Contudo, com a sua proibição e com os casos de gramíneas resistentes a outros herbicidas, a importância da associação de herbicidas e o manejo integrado é uma exigência. O paraquat era muito utilizado para o controle de espécies como a *Conyza* spp. (buva), durante a entressafra em pré-semeadura, principalmente em aplicação sequencial após a utilização de glyphosate e associações (Cesco et al., 2019; Soltani et al., 2020). Contudo nos últimos anos tem-se observado redução na eficácia de paraquat no controle de buva, com relatos de biótipos resistentes de *Conyza sumatrensis* ao paraquat (Pinho et al., 2019; Zobiole et al., 2019; Albrecht et al., 2020a; Albrecht et al., 2020b).

Deste modo, mesmo sem o banimento do paraquat, já seria necessário planejar o uso de herbicidas alternativos na dessecação pré-semeadura da soja. O banimento do paraquat apenas reforça a necessidade da caracterização e configuração de novos manejos. Neste sentido, desatacam-se herbicidas como glufosinate, saflufenacil, diquat, glyphosate, clethodim, em diferentes associações.

Estudos indicam até mesmo efeito sinérgico para associações de glufosinate com saflufenacil no controle de *Amaranthus palmeri* (caruru-palmeri) (Takano et al., 2020). Assim, acredita-se que o glufosinate, sobretudo em associações, seja eficaz no controle de azevém, *Avena fatua* (aveia) e/ou buva. Diante do exposto, objetivou-se avaliar a eficácia de glufosinate isolado, ou em associações, no controle de azevém, aveia e buva, como alternativa ao paraquat.

MATERIAL E MÉTODOS

Delineamento experimental

O experimento foi conduzido em área experimental localizada no município de Cruz Alta, estado do Rio Grande do Sul (RS), Brasil (24°17'36,7"S 53°50'27"O), em novembro de 2020. Foi utilizado delineamento em blocos casualizados, com quatro repetições. As unidades experimentais foram compostas por parcelas de 5 x 3, a área estava em pousio desde a colheita da soja no início de abril. No momento da aplicação a área estava infestada com azevém, sob densidade de 8,9 plantas m⁻², 25,9 cm de altura, com plantas perfilhadas e próximas ao final do ciclo. Também estava infestada com 1,8 plantas m⁻² de aveia, com altura média 29,7 cm, perfilhadas e próximas ao final do ciclo. Além destas, também observou-se a presença de plantas de buva, com 16,2 plantas m⁻² e altura média de 16,4 cm.

Os tratamentos foram compostos pela aplicação de herbicidas, isolados ou em associações (Quadro 1). A aplicação foi realizada em pós-emergência das plantas daninhas, no dia 03/11/2020. Foi utilizado pulverizador costal pressurizado a CO₂ equipado com seis pontas XR 110.015, com espaçamento entre as pontas de 0,5 m, a uma pressão de 2,5 kgf cm⁻², uma velocidade de 3,6 km h⁻¹ e distância do alvo de 0,5 m, fornecendo um volume de aplicação de 150 L ha⁻¹. A aplicação ocorreu sob temperatura de 26,9 °C, umidade relativa do ar de 69,8 % e vento de 3 km h⁻¹.

Avaliações

Foi realizada avaliação de controle, individualmente para cada espécie de planta daninha, aos 7, 14 e 28 dias após aplicação (DAA). Para todas estas avaliações, foram atribuídas notas através de análises visuais a cada unidade experimental (0 para ausência de injúrias, até 100% para morte das plantas), considerando-se, neste caso, sintomas significativamente visíveis nas plantas, como necrose, queima, amarelecimento, ou quaisquer outras injúrias decorrentes da aplicação dos herbicidas, de acordo com seu desenvolvimento (Velini et al., 1995).

Análise estatística

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (p < 0,05) e as médias dos tratamentos foram agrupadas pelo teste de Scott & Knott (1974) ao nível de 5% (Pimentel-Gomes & Garcia, 2002). Para a análise foi utilizado o programa Sisvar 5.6 (Ferreira, 2011).

Quadro 1 - Tratamentos compostos pela aplicação de herbicidas para o controle de plantas daninhas

Herbicida	Dose ⁴ (g i.a. ha ⁻¹)
testemunha	-
glufosinate ¹	400
glufosinate ¹	500
glufosinate ¹	600
glufosinate ¹	700
diquat ²	400
diquat + clethodim ³	400 + 120
glufosinate + glyphosate ¹	400 + 1.250
glufosinate + clethodim ³	400 + 120
glyphosate + clethodim ³	1.250 + 120
glufosinate + saflufenacil ¹	400 + 35
glufosinate + saflufenacil + glyphosate ¹	400 + 35 + 1.250
glufosinate + glyphosate + clethodim ³	400 + 1.250 + 120
glufosinate + saflufenacil + clethodim ³	400 + 35 + 120
glufosinate + saflufenacil + clethodim + glyphosate ³	400 + 35 + 120 + 1.250

Adição do adjuvante: ¹ MeesTM (0,5 L ha⁻¹), ² Agral[®] (0,2 L ha⁻¹) ou ³ Dash[®] HC (0,5 L ha⁻¹). Produtos comerciais: Finale[®] (glufosinate), Reglone[®] (diquat), Select[®] 240 EC (clethodim), Zapp[®] QI 620 (glyphosate), Heat[®] (saflufenacil). ⁴ i.a. (ingrediente ativo) para todos os herbicidas, exceto para glyphosate em e.a. (equivalente ácido).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para o controle de azevém, as aplicações de glufosinate (400 g i.a. ha⁻¹) ou glyphosate (1.250 g e.a. ha⁻¹) em associações com clethodim (120 g i.a. ha⁻¹), bem como glufosinate + saflufenacil + clethodim (400 + 35 + 120 g i.a. ha⁻¹) e glufosinate + saflufenacil + clethodim (400 + 35 + 120 g i.a. ha⁻¹) + glyphosate (1.250 g e.a. ha⁻¹), estiveram entre os melhores tratamentos, nas três avaliações, com

eficácia de 95,7 a 99%. Aos 28 DAA a aplicação de glufosinate, isolado e na maior dose (700 g i.a. ha⁻¹), foi a única a se equipar aos mais eficazes com 97,3% de controle. Estes resultados indicam que glufosinate em associações é eficaz no controle de azevém, sendo superior ao observado para diquat isolado ou em misturas. Para se atingir a mesma eficácia das associações, a dose de glufosinate deve ser de no mínimo 700 g i.a. ha⁻¹ (Figura 1).

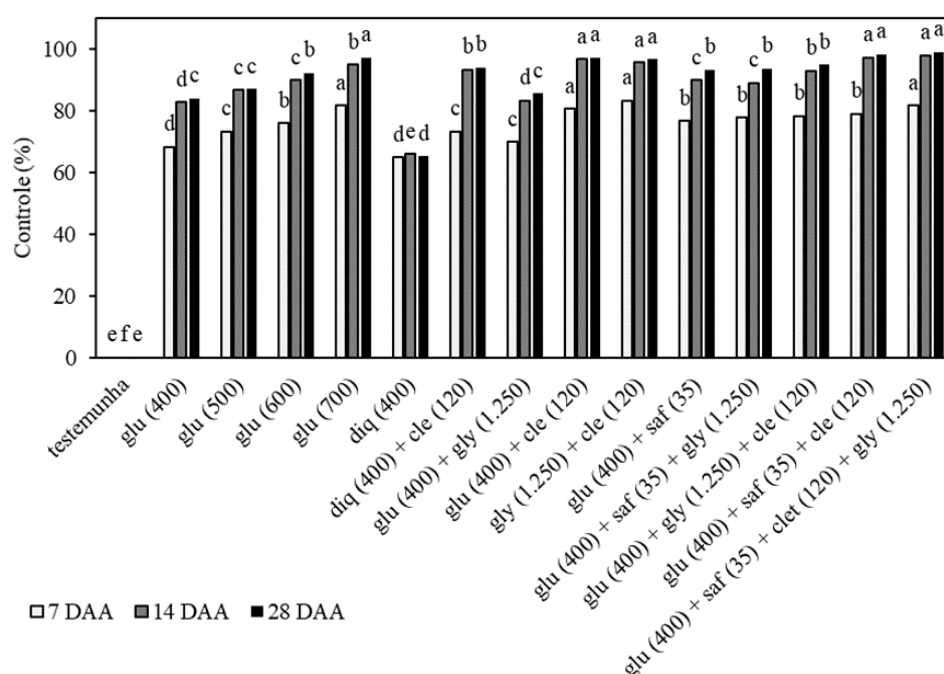


Figura 1 - Controle de azevém aos 14 e 28 dias após a aplicação (DAA) de glufosinate (glu), diquat (diq), clethodim (cle), glyphosate (gly) e saflufenacil (saf), isolados ou em associações

Doses entre parênteses, em g e.a. ha⁻¹ para glyphosate, ou em g i.a. ha⁻¹ para demais herbicidas. Barras de mesma cor, com mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Scott & Knott (1974), ao nível de 5%.

No controle da aveia, maior eficácia (94,3 a 99,3%), aos 14 e 28 DAA, foi observada para a aplicação isolada de glufosinate na maior dose (700 g i.a. ha⁻¹) ou quando em associações, exceto com saflufenacil, na dose de 400 g i.a. ha⁻¹. Assim como para o controle azevém, o glufosinate e associações, apresenta-se como eficaz e alternativa

ao paraquat. Enquanto o diquat isolado não atingiu o mesmo patamar de eficácia, contudo quando em associação com clethodim esteve entre os tratamentos mais eficazes. Destaca-se ainda, que aos 7 DAA os melhores tratamentos foram compostos por associações de herbicidas, com superioridade aos herbicidas isolados (Figura 2).

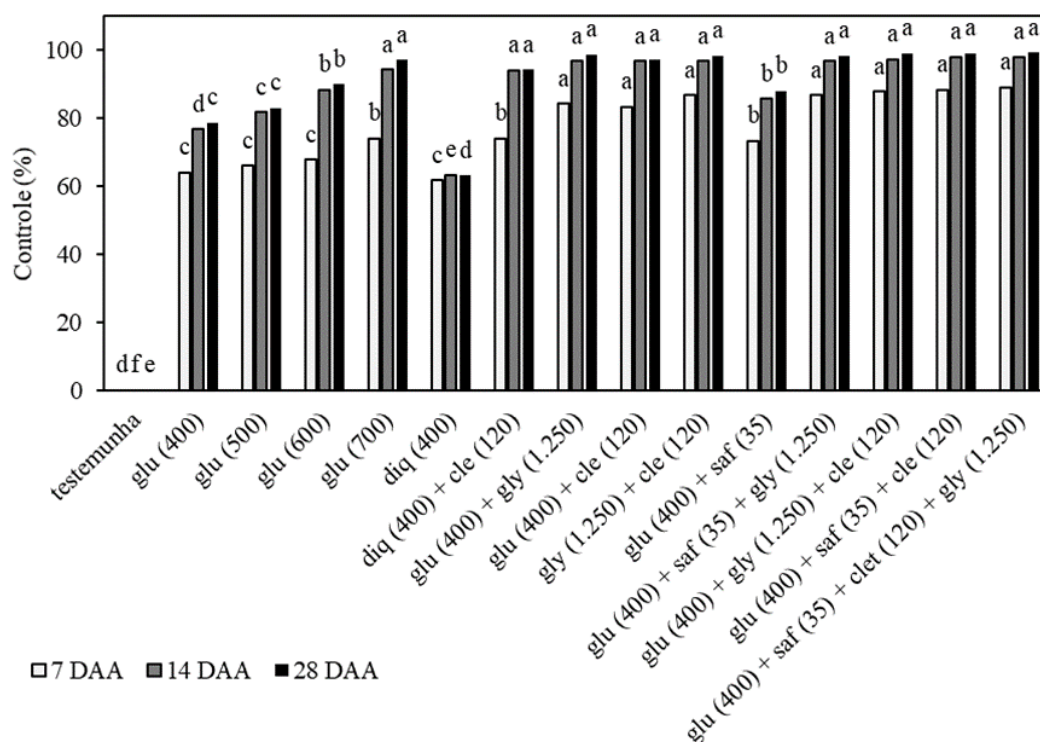


Figura 2 – Controle de aveia aos 14 e 28 dias após a aplicação (DAA) de glufosinate (glu), diquat (diq), clethodim (cle), glyphosate (gly) e saflufenacil (saf), isolados ou em associações

Doses entre parênteses, em g e.a. ha⁻¹ para glyphosate, ou em g i.a. ha⁻¹ para demais herbicidas.

Barras de mesma cor, com mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Scott & Knott (1974), ao nível de 5%.

A aplicação isolada de glufosinate (a partir de 600 g i.a. ha⁻¹) também foi eficaz no controle de buva (≥92,3%). Já em associações com saflufenacil ou saflufenacil + glyphosate, glufosinate mostrou-se eficaz apenas na dose de 400 g i.a. ha⁻¹. Os resultados do glufosinate foram superiores ao observado para diquat, sobretudo para as associações com saflufenacil. O clethodim é um herbicida que não tem ação sob plantas daninhas eudicotiledôneas, como a buva, mas o mesmo não

reduziu a eficácia do glufosinate no controle da buva (Figura 3). Este herbicida é utilizado no controle de gramíneas e são comuns situações de infestações com gramíneas e buva. Assim, esta associações de glufosinate + clethodim podem ser utilizadas para o controle de gramíneas, como observado para azevém e aveia, ou ainda em infestações mistas de gramíneas com buva, uma vez que não foram observados indícios de antagonismo desta associação no controle da buva.

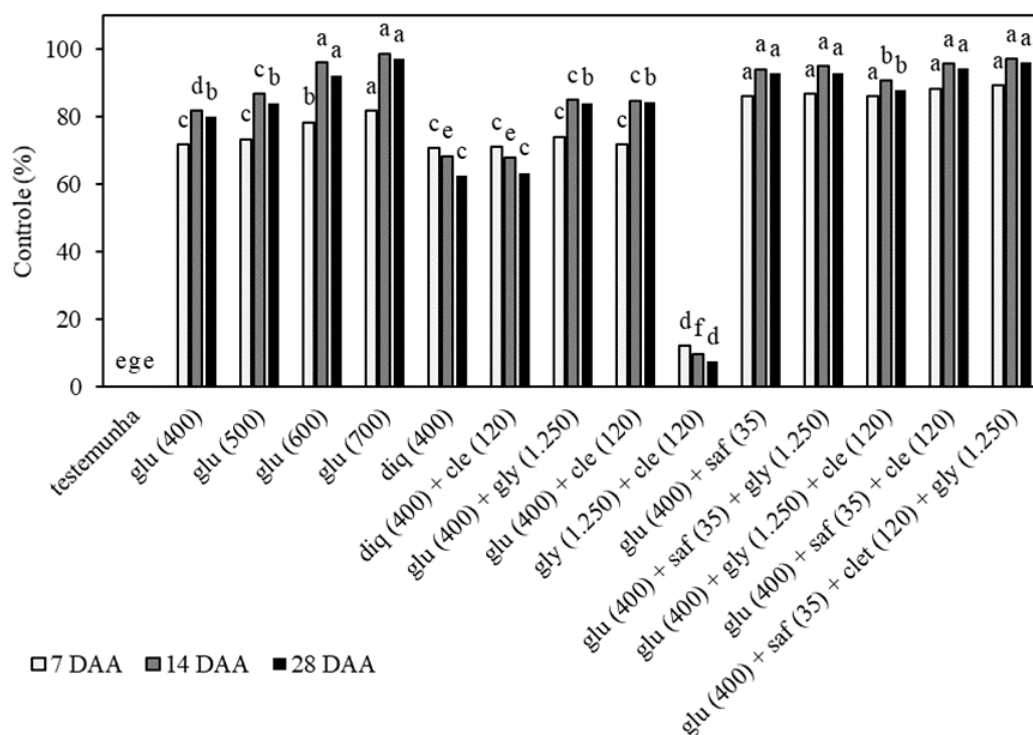


Figura 3 - Controle de buva aos 14 e 28 dias após a aplicação (DAA) de glufosinate (glu), diquat (diq), clethodim (cle), glyphosate (gly) e saflufenacil (saf), isolados ou em associações

Doses entre parênteses, em g e.a ha⁻¹ para glyphosate, ou em g i.a. ha⁻¹ para demais herbicidas.

Barras de mesma cor, com mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Scott & Knott (1974), ao nível de 5%.

Um potencial substituto do paraquat na dessecação pré-semeadura para o controle de plantas daninhas é o diquat, principalmente para o manejo de plantas daninhas eudicotiledôneas (Gitsopoulos et al., 2018). Mas no controle de plantas com alto fator de resistência ao paraquat, uma vez que estes herbicidas são do mesmo mecanismo de ação e mesmo grupo químico (bipiridíliuns), o desempenho no controle está aquém do desejado. Para o controle de gramíneas o diquat não se apresenta como grande alternativa, em geral com baixa eficácia, com incremento quando associado com adjuvantes, mas ainda assim com níveis de controle não satisfatórios (Gitsopoulos et al., 2014).

A associação de diquat com graminicidas inibidores da enzima ACCase e outros herbicidas, ainda precisa ser melhor elucidada para aplicação consistente a campo. Neste sentido o presente estudo apresenta resultados relevantes, uma vez que, embora para azevém o diquat tenha ficado abaixo do glufosinate, a adição de clethodim incrementou a eficácia do diquat no controle das gramíneas.

O glufosinate mostrou-se eficaz no controle de azevém e aveia, assim como observado por

Schneider et al. (2015) e Ulguim et al. (2019) no controle de azevém. Ressalta-se que os herbicidas inibidores da enzima ACCase são destaque no manejo destas plantas daninhas (Correia et al., 2015; Vilela et al., 2019). O paraquat era importante no controle de gramíneas, principalmente azevém (Pereira et al., 2017), devido à menor eficácia do diquat (Gitsopoulos et al., 2014). Logo, a importância da associação de herbicidas e do manejo integrado destas gramíneas em pré-semeadura é uma exigência. Reitera-se que a aplicação de glufosinate com clethodim, foi eficaz no controle de gramíneas no presente estudo, estas associações podem ser muito úteis no manejo de plantas daninhas não apenas na pré-semeadura, assim como em pós-emergência de soja e milho tolerantes ao glufosinate.

Para o manejo de buva, mesmo sem o banimento do paraquat, já seria necessário considerar o uso de herbicida alternativos. A proibição do uso do paraquat apenas reforça a necessidade da caracterização e delineamento de novos manejos. Neste sentido, pode ser ressaltado o glufosinate (Tahmasebi et al., 2018; Albrecht et al., 2020c; Cantu et al., 2021; Albrecht et al., 2021), o que foi observado neste estudo, principalmente, por

exemplo, nas associações com saflufenacil. A aplicação de glufosinate + saflufenacil também é destacada em outros trabalhos como eficaz no controle da buva (Waggoner et al., 2011; Zobiole et al., 2018). Sendo observado efeito sinérgico para esta associação em estudo de Takano et al. (2020). Logo, glufosinate e saflufenacil são importantes alternativas ao paraquat na dessecação pré-semeadura, no manejo de buva.

Outro ponto a salientar é que não se observou indício de antagonismo da associação de glufosinate com clethodim. O herbicida clethodim não tem ação sob plantas daninhas eudicotiledôneas, como a buva, mas o mesmo não reduziu a eficácia do glufosinate no controle da buva no presente estudo. Logo a associação de glufosinate + clethodim pode ser utilizada para o controle de gramíneas, como azevém e aveia, ou ainda em infestações mistas de gramíneas com buva.

CONCLUSÕES

A aplicação de glufosinate (400 g i.a. ha⁻¹) em associações com saflufenacil, glyphosate e clethodim foi eficaz no controle de azevém, aveia e buva. A aplicação isolada de glufosinate se mostrou eficaz no controle de todas as plantas daninhas na dose máxima aplicada (700 g i.a. ha⁻¹). O glufosinate, isolado ou em associações, foi superior ao diquat no controle das plantas daninhas, caracteriza-se assim alternativa ao paraquat no controle de plantas daninhas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Albrecht AJP, Albrecht LP, Alves SNR, Silva AFM, Silva WO, Lorenzetti JB, Danilussi MTY, Barroso AAM. Pre-sowing application of combinations of burndown and preemergent herbicides for *Conyza* spp. control in soybean. *Agronomía Colombiana*, v.39, n.1, p.121-128, 2021. <https://doi.org/10.15446/agron.colomb.v39n1.89545>
- Albrecht AJP, Albrecht LP, Silva AFM, Ramos RA, Corrêa NB, Carvalho MG, Lorenzetti JB, Danilussi MTY. Control of *Conyza* spp. with sequential application of glufosinate in soybean pre-sowing. *Ciência Rural*, v.50, n.9, p.1-9, 2020c. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20190868>
- Albrecht AJP, Pereira VGC, Souza CNZ, Zobiole LHS, Albrecht LP, Adegas FS. Multiple resistance of *Conyza sumatrensis* to three mechanisms of action of herbicides. *Acta Scientiarum. Agronomy*, v.42, p.1-9, 2020a. <https://doi.org/10.4025/actasciagron.v42i1.42485>
- Albrecht AJP, Thomazini G, Albrecht LP, Pires A, Lorenzetti JB, Danilussi MTY, Silva AFM, Adegas FS. *Conyza sumatrensis* resistant to paraquat, glyphosate and chlormuron: confirmation and monitoring the first case of multiple resistance in Paraguay. *Agriculture*, v.10, n.12, p.1-11, 2020b. <https://doi.org/10.3390/agriculture10120582>
- Anvisa - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 428. Brasília: Diretoria colegiada - Anvisa, 2020.
- Bellaloui N, Bruns HA, Abbas HK, Fisher DK, Mengistu A. Effects of harvest-aids on seed nutrition in soybean under midsouth USA conditions. *Plants*, v.9, n.8, p.1-16, 2020. <https://doi.org/10.3390/plants9081007>
- Camargo ER, Zapiola ML, Avila LA, Garcia MA, Plaza G, Gazziero DLP, Hoyos V. Current situation regarding herbicide regulation and public perception in South America. *Weed Science*, v.68, n.3, p.232-239, 2020. <https://doi.org/10.1017/wsc.2020.14>
- Cantu RM, Albrecht LP, Albrecht AJP, Silva AFM, Danilussi MTY, Lorenzetti JB. Herbicide alternative for *Conyza sumatrensis* control in pre-planting in no-till soybeans. *Advances in Weed Science*, v.39, e2021000025, 2021. <https://doi.org/10.51694/AdvWeedSci/2021;39:000012>
- Cesco VJS, Nardi R, Krenchinski FH, Albrecht AJP, Rodrigues DM, Albrecht LP. Management of resistant *Conyza* spp. during soybean pre-sowing. *Planta Daninha*, v.37, p.1-9, 2019. <https://doi.org/10.1590/S0100-83582019370100039>
- Correia NM, Acra LT, Balieiro G. Chemical control of different *Digitaria insularis* populations and management of a glyphosate-resistant population. *Planta Daninha*, v.33, n.1, p.93-101, 2015. <https://doi.org/10.1590/S0100-83582015000100011>
- Costa NV, Neunfeld TH, Ohland T, Piano JT, Klein J. Directed-spray application of paraquat and diuron in physic nut plants. *Planta Daninha*, v.31, n.4, p.987-996, 2013. <https://doi.org/10.1590/S0100-83582013000400025>
- Ferreira DF. Sisvar: a computer statistical analysis system. *Ciência e Agrotecnologia*, v.35, n.6, p.1039-1042, 2011. <https://doi.org/10.1590/S1413-70542011000600001>
- Gitsopoulos TK, Damalas CA, Georgoulas I. Improving diquat efficacy on grasses by adding adjuvants to the spray solution before use. *Planta Daninha*, v.32, n.2, p.355-60, 2014. <https://doi.org/10.1590/S0100-83582014000200013>
- Gitsopoulos TK, Damalas CA, Georgoulas I. Optimizing diquat efficacy with the use of adjuvants. *Phytoparasitica*, v.46, n.5, p.715-722, 2018. <https://doi.org/10.1007/s12600-018-0698-y>
- Heap I. 2021. The international herbicide-resistant weed database. Disponível em: <http://www.weedscience.org/>. Acesso em 17 out 2021.
- Kalsing A, Rossi CVS, Lucio FR, Minozzi GB, Goncalves FP, Valeriano R. Efficacy of control of glyphosate-tolerant species of the Rubiaceae family through double-knock-down applications. *Planta Daninha*, v.38, p.1-9, 2020. <https://doi.org/10.1590/S0100-83582020380100023>
- Kim JW, Kim DS. Paraquat: toxicology and impacts of its ban on human health and agriculture. *Weed Science*, v.68, n.3, p.208-213, 2020. <https://doi.org/10.1017/wsc.2019.70>
- Pereira LV, Carvalho LB, Dal Magro T. Controle químico de *Lolium multiflorum*: efeito do biótipo e da época de aplicação. *Revista de Ciências Agroveterinárias*, v.16, n.3, p.338-341, 2017. <https://doi.org/10.5965/223811711632017338>
- Pimentel-Gomes F, Garcia CH. Estatística aplicada a experimentos agrônômicos e florestais: exposição com exemplos

e orientações para uso de aplicativos. Piracicaba: FEALQ, 2002.

Pinho CF, Leal JFL, Souza AS, Oliveira GFPB, Oliveira C, Langaro AC, Machado AFL, Christoffoleti PJ, Zobiolo LHS. First evidence of multiple resistance of Sumatran fleabane (*Conyza sumatrensis* (Retz.) E.Walker) to five-mode-of-action herbicides. Australian Journal of Crop Science, v.13, n.10, p.1688-1697, 2019.

<https://doi.org/10.21475/ajcs.19.13.10.p1981>

Schneider T, Vargas L, Agostinetto D. Controle alternativo de biótipos de azevém resistentes ao clethodim. Revista Brasileira de Herbicidas, v.14, n.3, p.243-247, 2015.

<https://doi.org/10.7824/rbh.v14i3.424>

Scott AJ, Knott M. A cluster-analysis method for grouping means in analysis of variance. Biometrics, v.30, n.3, p.507-512, 1974. <https://doi.org/10.2307/2529204>

Soltani N, Shropshire C, Sikkema PH. Glyphosate-resistant Canada fleabane control with three-way herbicide tank-mixes in soybean. American Journal of Plant Sciences, v.11, n.9, p.1478-1486, 2020.

<https://doi.org/10.4236/ajps.2020.119107>

Tahmasebi BK, Alebrahim MT, Roldán-Gómez RA, Silveira HM, Carvalho LB, Alcántara-de la Cruz R, De Prado R. Effectiveness of alternative herbicides on three *Conyza* species from Europe with and without glyphosate resistance. Crop Protection, v.112, p.350-355, 2018.

<https://doi.org/10.1016/j.cropro.2018.06.021>

Takano HK, Beffa R, Preston C, Westra P, Dayan FE. Glufosinate enhances the activity of protoporphyrinogen oxidase inhibitors. Weed Science, v.68, n.4, p.324-332, 2020. <https://doi.org/10.1017/wsc.2020.39>

Ulgum AR, Agostinetto D, Vargas L, Silva JDG, Schneider T, Silva BMD. Mixture of glufosinate and atrazine for ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.) control and its effect on seeds' quality. Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín, v.72, n.1, p.8655-8661, 2019.

<https://doi.org/10.15446/rfnam.v72n1.69093>

Velini DE, Osipe R, Gazziero DLP. Procedimentos para instalação, avaliação e análise de experimentos com herbicidas. Londrina: SBCPD, 1995.

Vilela XS, Medeiros FCL, Gonçalves AH, Silva LC. Quizalofop-p-ethyl controlling sourgrass (*Digitaria insularis*) and goosegrass (*Eleusine indica*) in infested coffee areas. Coffee Science, v.14, n.4, p.530-537, 2019.

<http://dx.doi.org/10.25186/cs.v14i4>

Waggoner BS, Mueller TC, Bond JA, Steckel LE. Control of glyphosate-resistant horseweed (*Conyza canadensis*) with saflufenacil tank mixtures in no-till cotton. Weed Technology, v.25, n.3, p.310-315, 2011.

<https://doi.org/10.1614/WT-D-10-00161.1>

Zobiolo LHS, Krenchinski FH, Pereira GR, Rampazzo PE, Rubin RS, Lucio FR. Management programs to control *Conyza* spp. in pre-soybean sowing applications. Planta Daninha, v.36, p.1-8, 2018. <https://doi.org/10.1590/S0100-83582018360100076>

Zobiolo LHS, Pereira VGC, Albrecht AJP, Rubin RS, Adegas FS, Albrecht LP. Paraquat resistance of Sumatran fleabane (*Conyza sumatrensis*). Planta Daninha, v.37, p.1-8, 2019. <https://doi.org/10.1590/S0100-83582019370100018>



Doses de nitrogênio em cultivares de feijão-comum em sistema plantio direto recém-instalado

Almir Salvador Neto^a , Anderson Prates Coelho^{a*} , Orlando Ferreira Morello^a ,
Leandro Borges Lemos^a , Fabio Luiz Checchio Mingotte^a

^a Universidade Estadual Paulista (Unesp), Brasil

* Autor correspondente (anderson_100ssp@hotmail.com)

INFO

Keywords

Phaseolus vulgaris L.
Pérola
produtividade
rendimento de peneiras

ABSTRACT

Nitrogen rates in common bean cultivars in short-term no-tillage system.

The first years of the no-tillage system can promote changes in soil balance that directly impact on managements such as nitrogen fertilization. The aim was to evaluate the agronomic and qualitative performance of common bean cultivars under nitrogen rates in top-dressing in the first year of no-tillage system. The experiment was carried out in the winter season in a randomized block design in a split-plot scheme, with four replications. The plots consisted of three common bean cultivars (IAC Alvorada, IAC Milênio and Pérola) and the subplots by four N rates (urea) applied in top-dressing (0, 70, 140 and 210 kg ha⁻¹). The common bean were sown under no-tillage system after maize crop, which showed a straw production of 7.0 Mg ha⁻¹ of dry matter. The cultivars IAC Alvorada and IAC Milênio were more efficient and responsive than Pérola cultivar. The cultivars IAC Alvorada and IAC Milênio presented, on average, grain yield and sieve yield 12.5 and 15.2% higher than Pérola cultivar, respectively. Nitrogen rates in top-dressing and common bean cultivars promote differences in agronomic performance and quality independently. The grain yield of common bean cultivars showed linear increments with the nitrogen rates in top-dressing in the first year of no-tillage system, indicating a higher N requirement than the rate of 90 kg ha⁻¹ of N recommended for the crop.

RESUMO

Palavras-chaves

Phaseolus vulgaris L.;
Pérola
grain yield
sieve yield

Os primeiros anos da adoção do sistema plantio direto pode promover alterações no equilíbrio do solo que impactam diretamente em manejos, como a adubação nitrogenada. Objetivou-se avaliar o desempenho agrônomo e qualitativo de cultivares de feijão-comum sob doses de nitrogênio em cobertura no primeiro ano de adoção do sistema plantio direto. O experimento foi conduzido na safra de inverno em delineamento de blocos casualizados em esquema de parcelas subdivididas, com quatro repetições. As parcelas foram constituídas de três cultivares de feijão (IAC Alvorada, IAC Milênio e Pérola) e as subparcelas por quatro doses de N (ureia) aplicadas em cobertura (0, 70, 140 e 210 kg ha⁻¹). O feijão foi semeado em sistema plantio direto após a cultura do milho, que apresentou produção de palhada de 7,0 Mg ha⁻¹ de massa seca. As cultivares IAC Alvorada e IAC Milênio foram mais eficientes e responsivas comparado à cultivar Pérola. As cultivares IAC Alvorada e IAC Milênio apresentaram, na média, produtividade e rendimento de peneiras 12,5 e 15,2% superior à cultivar Pérola, respectivamente. As doses de nitrogênio em cobertura e as cultivares de feijão-comum promovem diferenças no desempenho agrônomo e qualidade de maneira independente. A produtividade das cultivares de feijão apresentam incrementos lineares com as doses de nitrogênio em cobertura no primeiro ano de adoção do sistema plantio direto, indicando maior exigência de N do que a dose ideal de 90 kg ha⁻¹ de N recomendada para a cultura.

Received 26 October 2021; Received in revised from 10 November 2021; Accepted 28 February 2022



INTRODUÇÃO

O feijão-comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é uma das fontes de proteínas mais importantes e de menor custo para a população de diversos países (Bettiol et al., 2020). No Brasil, o seu cultivo abrange 1,6 milhões de ha, com produtividade média de 1,5 Mg ha⁻¹ (Conab, 2020), valor considerado baixo, visto que produtividades próximas de 3.000 kg ha⁻¹ são observadas (Carbonell et al., 2014; Soratto et al., 2017). Dentre os fatores que contribuem para a baixa produtividade do feijão no Brasil podem ser destacados o manejo inadequado da adubação nitrogenada em função do sistema de produção adotado, a safra de cultivo e a cultivar utilizada.

Embora seja uma leguminosa, a fixação biológica de N no feijão (FBN) não supre totalmente a necessidade da cultura, necessitando de complementação mineral para a obtenção de elevadas produtividades (Soares et al., 2016). Para a obtenção de produtividades entre 3,5 e 4,5 Mg ha⁻¹, recomenda-se a aplicação de 90 kg ha⁻¹ de N na cultura do feijão em áreas com alta classe de resposta esperada, como lavouras irrigadas e/ou cultivo após gramíneas (Ambrosano et al., 1997).

O cultivo de feijão-comum no Brasil é realizado em três safras durante o ano: a safra “das águas”, a safra “da seca” e a safra “de inverno” (Conab, 2020). Por necessidade de irrigação em algumas regiões, como o Cerrado brasileiro, é incontestável que a safra de inverno é a que apresenta o maior nível tecnológico, gerando as maiores produtividades médias. Nessas áreas, geralmente ocorre o cultivo de até três culturas durante o ano, sendo a sucessão soja/milho/feijão uma das mais comuns. Nesse sistema, por questões operacionais, o solo é preparado apenas uma vez durante o ano, antes da semeadura da soja, enquanto as culturas de milho e feijão são semeadas em plantio direto. Nesse manejo, o feijão sempre é semeado em plantio direto após gramíneas, podendo alterar a necessidade de adubações na cultura, especialmente a nitrogenada.

Verifica-se na literatura que a idade do plantio direto pode alterar a dinâmica dos nutrientes no sistema solo/planta, especialmente o N (Soratto et al., 2014; Pittelkow et al., 2015). Os primeiros anos de plantio direto podem promover redução da produtividade das culturas, causando maior imobilização de N e necessidade de maior adubação nitrogenada (Pittelkow et al., 2015). Entretanto, em áreas de sistema plantio direto consolidados pode ocorrer redução da adubação

nitrogenada nas culturas sem afetar a sua produtividade (Deiss et al., 2020). Nesse sentido, recomendações mais específicas, como para o feijão cultivado na safra de inverno no primeiro ano de plantio direto, são necessárias para otimizar a adubação nitrogenada na cultura e garantir elevadas produtividades.

Outro fator que pode afetar a eficiência da adubação nitrogenada em cobertura é a cultivar utilizada. Para o feijão, existe elevada variabilidade quanto à eficiência e resposta das cultivares à adubação nitrogenada (Leal et al., 2019). A eficiência se refere à capacidade do genótipo em produzir satisfatoriamente bem em baixas doses de N, enquanto a resposta é a capacidade do genótipo em aumentar a sua produtividade com o aumento da dose de N (Nunes et al., 2021). Assim, as cultivares de feijão podem ser classificadas pela combinação desses dois fatores, devendo-se buscar genótipos eficientes e responsivos. Essa característica da cultivar pode afetar diretamente a necessidade da adubação nitrogenada do feijão cultivado no início do plantio direto após gramíneas, necessitando de mais estudos.

Partindo-se da hipótese de que o feijão apresenta maior exigência de N no primeiro ano de instalação do sistema plantio direto em relação à recomendação padrão para a cultura e que esse efeito depende do genótipo, objetivou-se avaliar o desempenho agrônômico e a qualidade de cultivares de feijão sob doses de nitrogênio em cobertura no primeiro ano de adoção do plantio direto.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado na Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, São Paulo, Brasil. A área experimental é localizada próxima às coordenadas de latitude 21°15'22" S, longitude 48°18'58" W, com altitude média de 565 metros, no bioma Cerrado. O clima, de acordo com a classificação de Koppen, é do tipo Aw, tropical úmido com verões quentes e úmidos e invernos frios e secos. O solo da área experimental é classificado como Latossolo Vermelho eutrófico de textura argilosa (Santos et al., 2018), sendo que os resultados da análise química do solo, obtidos antes da instalação do experimento, na camada 0,00-0,20 m, encontram-se na Tabela 1. O solo apresentou 540 g kg⁻¹ de argila, 230 g kg⁻¹ de silte e 230 g kg⁻¹ de areia na camada 0,00-0,20 m.

Tabela 1 - Análise química do solo na área experimental antes da semeadura do feijão

pH (CaCl ₂)	MO (g kg ⁻¹)	P _{resina} (mg dm ⁻³)	H + Al -----	K (mmol _c dm ⁻³)	Ca	Mg	SB	CTC	V (%)
5,6	20	49	22	4,2	46	27	77,2	99,2	78

MO: matéria orgânica; SB: soma de bases; CTC: capacidade de troca catiônica; V: saturação por bases.

O experimento foi implantado no primeiro ano de adoção do sistema plantio direto, com a cultura antecessora sendo o milho. Antes da semeadura do milho, realizou-se o preparo de solo convencional, constituído por escarificação, aração e gradagem, para a instalação do sistema plantio direto. A semeadura do feijão ocorreu sobre a palhada do milho. O híbrido de milho utilizado foi Impacto Viptera 3, no espaçamento de 0,90 m, população de 67.000 plantas por ha, com adubação de semeadura de 250 kg ha⁻¹ do adubo formulado 04-20-20 e a adubação de cobertura com 140 kg ha⁻¹ de N (ureia). Antes da semeadura do feijão, foram amostrados 8 pontos aleatórios na área experimental para o cálculo de palhada proveniente da colheita do milho, obtendo-se valor médio de 7,0 Mg ha⁻¹ de massa seca.

O delineamento experimental utilizado foi o de blocos casualizados em esquema de parcelas subdivididas, com quatro repetições. As parcelas foram compostas por três cultivares de feijão, sendo a Pérola, IAC Alvorada e IAC Milênio. Cada subparcela foi formada por 10 linhas de feijão com cinco metros de comprimento, sendo consideradas úteis as 08 linhas centrais, desprezando-se 0,50 m de cada extremidade. As cultivares apresentam grãos do tipo comercial carioca, hábito de crescimento indeterminado e ciclo normal. As subparcelas foram constituídas por quatro doses de nitrogênio (0, 70, 140 e 210 kg ha⁻¹ de N), aplicadas em cobertura, no início do estágio fenológico V4, caracterizado pela presença da terceira folha trifoliada completamente expandida em 50% das plantas (Fernández et al., 1985), utilizando a ureia como fonte. A adubação de cobertura ocorreu no dia 30 de julho de 2015, 27 dias após a emergência (DAE), sendo aplicada uma única vez durante todo o ciclo do feijão para todas os tratamentos. A adubação de cobertura foi realizada em filete contínuo, a 10 cm da linha da cultura.

As sementes das cultivares de feijão foram tratadas com fungicida (carboxin + thiram), nas doses comerciais de 250 ml para cada 100 kg de sementes. A semeadura das cultivares foi realizada no dia 23 de junho de 2015, utilizando uma semeadora-adubadora regulada com espaçamento de 0,45 m entre linhas e com 12 sementes por metro. A emergência das plântulas ocorreu no dia 03 de julho de 2015. A semeadura do feijoeiro foi realizada na 3ª safra ou safra de inverno, com fornecimento de água por um sistema de irrigação

convencional por aspersão, aplicando-se lâminas de irrigação em turno de rega a cada 5 dias, utilizando-se 12 sementes por metro, no espaçamento de 0,45 m. A adubação mineral de semeadura foi de 6 kg ha⁻¹ de N, 30 kg ha⁻¹ de P₂O₅ e 30 kg ha⁻¹ de K₂O, utilizando-se 150 kg ha⁻¹ de formulado 4-20-20, de acordo com a análise de solo e seguindo as recomendações de Ambrosano et al. (1997) para produtividade de grãos esperada entre 3,5 a 4,5 Mg ha⁻¹ para feijão de inverno irrigado.

As temperaturas máxima e mínima média do período experimental foram de 28,7 e 15,3 °C, respectivamente, com umidade relativa média de 61,7% e precipitação acumulada de 170 mm. A lâmina total de água aplicada pelo sistema de irrigação por aspersão convencional foi de 350 mm.

No estágio fenológico R6 (48 DAE), foram coletadas 10 folhas do terço médio das plantas de feijão para a determinação do teor de N foliar da folha diagnóstica, conforme recomendações de Ambrosano et al. (1997). As folhas foram levadas para laboratório, lavadas em água corrente, água deionizada com detergente neutro (0,1%) e água deionizada. Após isso, as folhas foram secas e levadas para estufa com circulação de ar forçada por 72 horas e as amostras foram moídas em moinha tipo Willey. O teor de N foliar foi determinado segundo metodologia proposta por Malavolta et al. (1997). Ainda no estágio R6, 10 plantas consecutivas de uma linha útil de cada subparcela foram coletadas para a determinação da massa seca total da parte aérea, com os resultados expressos em kg ha⁻¹. As plantas foram secas em estufa com circulação de ar forçada até massa constante após serem lavadas em água corrente.

Por ocasião da colheita (89 DAE), foram determinados os componentes de produção população final de plantas, número de vagens por planta, número de grãos por vagem e massa de 100 grãos. A população final de plantas de cada subparcela foi determinada após a contagem do número de plantas de quatro linhas centrais, com 5 metros de comprimento. Para a determinação do número de vagens por planta e número de grãos por vagem, foram coletadas 10 plantas consecutivas em uma das linhas da área útil de cada subparcela. A massa de 100 grãos foi determinada por meio de 3 subamostras de 100 grãos de cada subparcela, padronizando-se a umidade em 0,13 g g⁻¹. Para a estimativa da produtividade de grãos, expressa em kg ha⁻¹, foram colhidas 4 linhas centrais de cada

subparcela, padronizando a umidade em 0,13 g g⁻¹.

O teor de proteína bruta dos grãos foi determinado através da equação (AOAC, 1995) TPB = N total x 6,25 onde: TPB = teor de proteína bruta nos grãos (%) e N total = teor de nitrogênio nos grãos, obtido de acordo com a metodologia proposta por Malavolta et al. (1997). Para o cálculo do rendimento de peneiras maior ou igual a 12 (RP_{≥12}), a massa total de grãos provenientes de cada subparcela foram classificados em peneira de crivos oblongos 12/64" x 3/4 (4,76 x 19,05 mm). Para a determinação do tempo de cozimento, tempo para a máxima hidratação dos grãos e relação de hidratação foram utilizados os grãos retidos na peneira 12.

O tempo de cozimento foi determinado com o auxílio do cozedor de Mattson modificado, que consta de 25 estiletes verticais terminados em ponta de 1/16", com peso de 90 g na outra extremidade do estilete, conforme descrito em Alves et al. (2020). O nível de resistência dos grãos ao cozimento foi determinado pela escala de Proctor e Watts (1987), em que: <16 min (muito suscetível); 16-20 min (suscetibilidade média); 21-28 min (resistência normal); 29-32 min (resistência média); 33-36 min (resistente) e >37 min (muito resistente). A capacidade de hidratação dos grãos foi determinada por 16 horas, conforme Alves et al. (2020). A

relação de hidratação foi determinada pela razão entre a massa após a hidratação e a massa inicial dos grãos. Realizou o estudo de regressão polinomial entre o tempo (horas) e o volume de água absorvido pelos grãos (mL), visando determinar o tempo para a máxima hidratação dos grãos de feijão.

Os dados foram submetidos à análise de variância (Teste F) a 5% de probabilidade e, quando necessário, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Os dados provenientes do fator doses de N e da interação cultivares de feijão versus doses de N foram comparados por meio de regressão polinomial. Realizou-se desdobramento da interação entre cultivares e doses de N para a produtividade de grãos, independentemente da significância dos fatores na análise de variância.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O teor de nitrogênio foliar (TNF) e a massa seca (MS) do feijão foram afetados somente pelas doses de N estudadas (Tabela 2). A população final de plantas não apresentou diferenças para os fatores estudados, apresentando média geral de 226,6 mil plantas ha⁻¹, demonstrando o elevado controle na semeadura do experimento.

Tabela 2 - Teor de nitrogênio foliar (TNF), massa seca de plantas (MS), população final (PF), número de vagens por planta (NVP), número de grãos por vagem (NGV), massa de 100 grãos (M100) e produtividade de grãos (PG) de cultivares de feijão sob doses de nitrogênio em cobertura

Tratamentos	TNF	MS	PF	NVP	NGV	M100	PG
	g kg ⁻¹	kg ha ⁻¹	mil plantas ha ⁻¹	-	-	g	kg ha ⁻¹
Cultivar (C)							
IAC Alvorada	33,5	1.977	223,3	14,4 a	4,2 ab	31,9	2.575
IAC Milênio	32	1.569	226,2	13,4 a	4,0 b	32,3	2.568
Pérola	32,2	1.619	230,2	11,0 b	4,4 a	31,9	2.285
DMS(5%)	2,42	569,4	21,1	1,39	0,25	1,73	691,5
CV(%)	6,8	30,4	8,5	9,9	5,4	4,9	25,7
Teste F							
C	2,125 ^{ns}	2,871 ^{ns}	0,513 ^{ns}	29,551 ^{**}	8,016 [*]	3,091 ^{ns}	1,079 ^{ns}
Doses de N (D)	38,056 ^{**}	2,965 [*]	0,511 ^{ns}	12,820 ^{**}	0,598 ^{ns}	7,039 ^{**}	8,245 ^{**}
Interação C x D	1,633 ^{ns}	1,416 ^{ns}	0,773 ^{ns}	1,774 ^{ns}	0,730 ^{ns}	0,427 ^{ns}	0,398 ^{ns}
Média Geral	32,6	1.722	226,6	12,96	4,27	32,5	2.476

Médias seguidas pelas mesmas letras, na coluna, não diferem entre si pelo teste Tukey (p<0,05). ^{ns}não significativo; ^{*}Significativo a 5% de probabilidade; ^{**}Significativo a 1% de probabilidade.

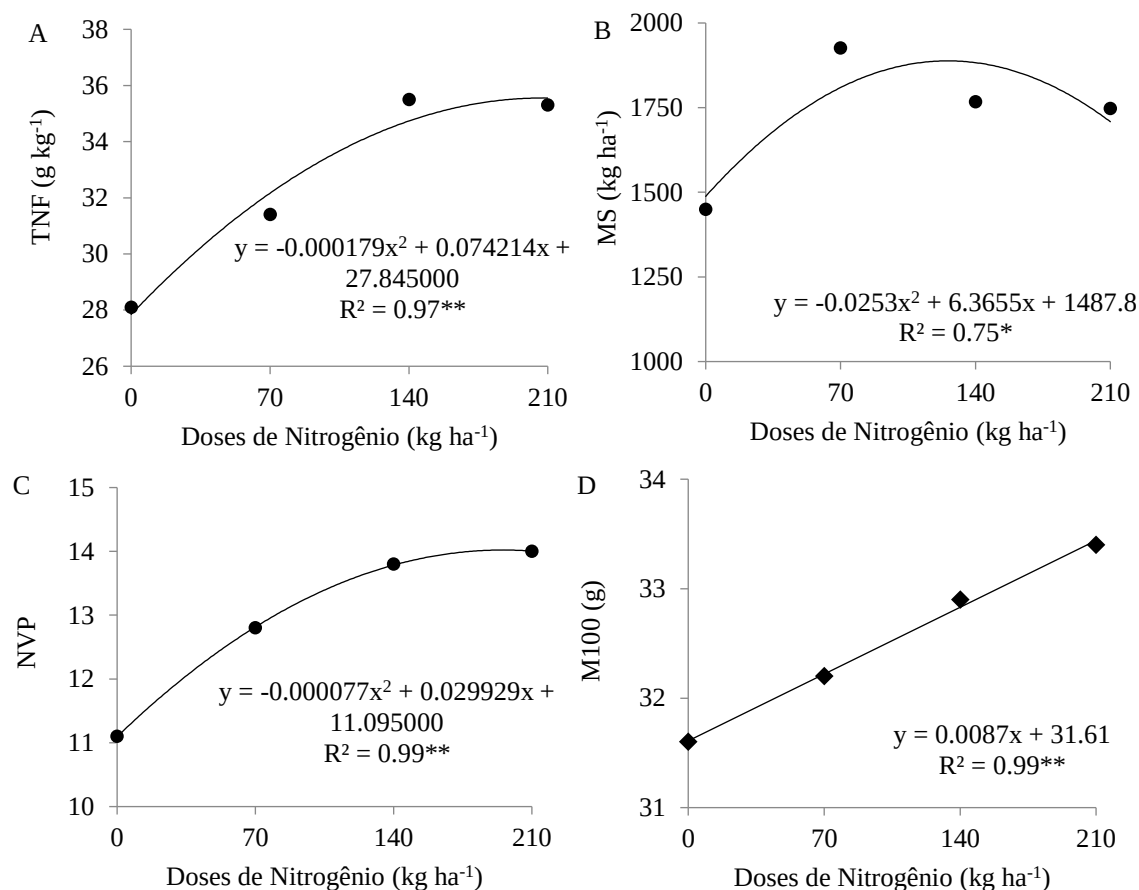
O número de vagens por planta (NVP) apresentou diferenças entre cultivares e doses de N em cobertura, com as cultivares IAC Alvorada e IAC Milênio apresentando valores 31% e 22%

superiores à cultivar Pérola, respectivamente. O número de grãos por vagem (NGV) foi afetado somente pelas cultivares, com maior valor médio para a cultivar Pérola, apresentando superioridade

de 5% e 10% em relação às cultivares IAC Alvorada e IAC Milênio, respectivamente. A massa de 100 grãos (M100) e a produtividade de grãos (PG) apresentaram diferenças somente para as doses de N em cobertura. Vale destacar que para

nenhuma variável a interação cultivar versus doses de N foi significativa.

O TNF, MS e NVP apresentaram incrementos quadráticos com o aumento das doses de N em cobertura (Figura 1).



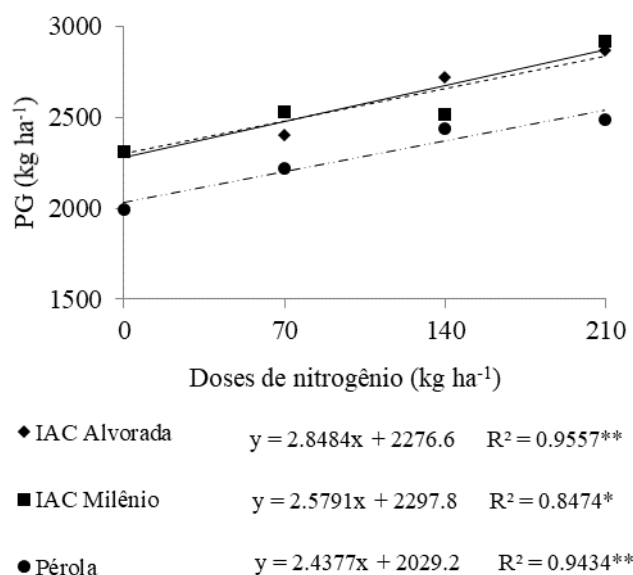
*Significativo a 5%; **Significativo a 1%.

Figura 1 - Teor de nitrogênio foliar (TNF - A), massa seca de plantas (MS - B), número de vagens por planta (NVP - C) e massa de 100 grãos (M100 - D) de cultivares de feijão sob doses de nitrogênio em cobertura

Os máximos valores para o TNF (35,5 g kg⁻¹), MS (1.888 kg ha⁻¹) e NVP (14,0) foram obtidos com as doses de N em cobertura de 207, 126 e 194 kg ha⁻¹, respectivamente. A M100 apresentou incremento linear com o aumento da dose de N em cobertura, com aumentos de 0,087 g na M100 para cada 10 kg ha⁻¹ de N adicionado.

Todas as cultivares estudadas incrementaram linearmente a PG com o aumento das doses de N em cobertura (Figura 2). Para todas as doses de N estudadas, as cultivares IAC Alvorada e IAC Milênio apresentaram PG superior à Pérola. As cultivares IAC apresentaram maior eficiência do que a

cultivar Pérola, visto que na dose 0 apresentaram PG, na média, 12,7% superior à cultivar Pérola. Além disso, as cultivares IAC apresentaram maior resposta às doses de N do que a cultivar Pérola, visto que incrementaram proporcionalmente mais a PG com o aumento das doses de N. Para cada 10 kg ha⁻¹ de N adicionado, a PG das cultivares IAC Alvorada, IAC Milênio e Pérola aumentaram 28,4, 25,8 e 24,4 kg ha⁻¹, respectivamente. Dessa maneira, as cultivares IAC Alvorada e IAC Milênio apresentaram 16,4% e 5,7% maior resposta na PG com o incremento das doses de N do que a cultivar Pérola.



*Significativo a 5%; **Significativo a 1%.

Figura 2 - Produtividade de grãos (PG) de cultivares de feijão sob doses de nitrogênio em cobertura

Quanto aos atributos tecnológicos do feijão, não foram observadas diferenças entre doses de N em cobertura e para a interação cultivar versus doses de N em nenhuma das variáveis avaliadas (Tabela 3). Observou-se somente diferenças entre cultivares para as variáveis rendimento de peneiras maior ou

igual a 12 ($RP \geq 12$) e relação de hidratação (RH). As cultivares IAC Alvorada e IAC Milênio apresentaram, na média, 15,2% maior $RP \geq 12$ do que a cultivar Pérola. A menor RH foi observada para a cultivar IAC Milênio, seguida pela cultivar IAC Alvorada e, por último, para a cultivar Pérola.

Tabela 3 - Rendimento de peneiras maior ou igual a 12 ($RP \geq 12$), teor de proteína bruta dos grãos (TPB), tempo de cozimento (TC), tempo para a máxima hidratação (TMH) e relação de hidratação (RH) de cultivares de feijão sob doses de nitrogênio em cobertura

Tratamentos	TPB	$RP \geq 12$	TC	TMH	RH
	%	%	min	h:m	-
Cultivar (C)					
IAC Alvorada	16,7	86,6a	34,12	11:52	2,00b
IAC Milênio	17,2	86,2a	36,28	12:18	1,93c
Pérola	17,7	75,0b	35,80	11:32	2,05a
DMS (5%)	2,21	7,83	4,43	01:58	7,83
CV(%)	11,8	8,7	11,5	15,2	8,7
Teste F					
C	0,944 ^{ns}	13,327 ^{**}	1,232 ^{ns}	0,716 ^{ns}	148,14 ^{**}
Doses de N (D)	2,285 ^{ns}	0,266 ^{ns}	1,078 ^{ns}	0,827 ^{ns}	2,548 ^{ns}
Interação C x D	0,462 ^{ns}	0,280 ^{ns}	0,339 ^{ns}	0,626 ^{ns}	1,639 ^{ns}
Média Geral	17,2	82,6	35,4	11:54	1,99

Médias seguidas pelas mesmas letras, na coluna, não diferem entre si pelo teste Tukey ($p < 0,05$). ^{ns}não significativo; *Significativo a 5% de probabilidade; **Significativo a 1% de probabilidade.

Observou-se correlação direta e significativa do TNF com as variáveis NVP, M100 e PG e da PG com as variáveis NVP e M100 (Tabela 4). Além disso, observou-se correlações diretas entre as

variáveis $RP \geq 12$ e NVP e RH com NGV. As correlações inversas foram observadas entre a variável $RP \geq 12$ com NGV e RH.

Tabela 4 - Matriz de correlação das variáveis de desempenho agrônômico e qualidade das cultivares de feijão sob doses de nitrogênio em cobertura

	TNF	MS	NVP	NGV	M100	PG	RP $\geq$ 12	TPB	TC	RH
TNF	1,00									
MS	0,53	1,00								
NVP	0,74*	0,66	1,00							
NGV	0,18	0,10	-0,39	1,00						
M100	0,81*	0,23	0,61	-0,05	1,00					
PG	0,83**	0,43	0,90**	-0,34	0,81*	1,00				
RP $\geq$ 12	0,14	0,23	0,73*	-0,79*	0,17	0,56	1,00			
TPB	0,63	-0,28	0,08	0,36	0,66	0,41	-0,30	1,00		
TC	-0,15	-0,42	-0,22	-0,31	0,27	0,13	-0,15	0,22	1,00	
RH	0,17	0,11	-0,37	0,98**	-0,11	-0,32	-0,74*	0,35	-0,30	1,00

*Significativo a 5% de probabilidade; **Significativo a 1% de probabilidade.

Independentemente da cultivar, o desempenho agrônômico do feijão foi afetado pelas doses de N em cobertura, em que, para as três cultivares avaliadas, ocorreram incrementos lineares na PG com o aumento das doses de N em cobertura (Figura 2). O incremento da PG em função das doses de N em cobertura pode ser atribuído, principalmente, às variáveis TNF, NVP e M100, em que foi observado aumento dessas variáveis com o incremento das doses de N em cobertura. Além disso, essas variáveis foram as que apresentaram correlação direta e significativa com a PG (Tabela 4).

Observou-se que a testemunha sem aplicação de N em cobertura apresentou TNF inferior ao mínimo estabelecido para a faixa ideal do feijão (30 a 50 g kg⁻¹) que não representa deficiência de N (Ambrosano et al., 1997). Somente a partir da dose de N em cobertura de 32 kg ha⁻¹ o feijão apresentou TNF acima do mínimo estabelecido para a cultura (Figura 1A). O incremento do TNF em função das doses de N aumentou os componentes de produção NVP e M100 e, consequentemente, a PG. Isso ocorre, pois, a deficiência de N pode levar a produção de menor quantidade de estruturas reprodutivas, além de interferir na produção de fotoassimilados pela fotossíntese, reduzindo o processo de enchimento de grãos das cultivares (Soares et al., 2016; Cetner et al., 2017). Soares et al. (2016) observaram redução de até 36% no número de vagens por planta pela ausência de N em cobertura na cultura do feijão.

Em estudos conduzidos próximo da área experimental, não se verificou deficiência de N quando o feijoeiro foi cultivado sem adubação nitrogenada de cobertura (Bettiol et al., 2020; Filla et al., 2020). A deficiência de N em doses abaixo de 32 kg ha⁻¹ de N pode ter ocorrido, pois o presente

estudo estava no primeiro ano de adoção do plantio direto, sendo cultivado sobre palhada de milho (7 Mg ha⁻¹ de massa seca). Em função da elevada relação C/N da palhada de milho, aproximadamente 50/1, isso pode ter causado imobilização do N aplicado e disponível na solução pelos microrganismos do solo para a degradação da palhada do milho. Além disso, observou-se que a PG das cultivares de feijão apresentaram incrementos lineares até a dose de N de 210 kg ha⁻¹, demonstrando a elevada resposta do feijão à adubação nitrogenada em áreas de primeiro ano da adoção do sistema plantio direto. Soratto et al. (2017) avaliando a nutrição de cultivares de feijão sob doses de N em área sob sistema plantio direto consolidado (10 anos), observaram que sem adubação nitrogenada em cobertura, as duas cultivares avaliadas apresentaram TNF superior à 30 g kg⁻¹, não se verificando deficiência de N nesse caso. Em sistemas de plantio direto consolidados, verifica-se que o solo apresenta maior disponibilidade natural de N na solução do solo, devido ao maior teor de matéria orgânica do que áreas sob sistema de preparo convencional (Deiss et al., 2020), não se observando diferenças elevadas entre a aplicação de doses elevadas de N. Após longo período de adoção do plantio direto (5 anos), Pittelkow et al. (2015) verificaram que leguminosas tendem a apresentar maior produtividade em relação às áreas com preparo de solo convencional. Antes desse período, a produtividade de leguminosas cultivadas em plantio direto pode reduzir em até 10% em relação ao preparo de solo convencional, especialmente devido às mudanças na dinâmica do N no solo.

O feijão irrigado de inverno, referente à terceira safra da cultura, geralmente é cultivado após gramíneas, especialmente o milho. Nesse sentido,

em áreas no primeiro ano de adoção do sistema de plantio direto a adubação nitrogenada na cultura tende a ser maior do que os 90 kg ha⁻¹ de N recomendados para a obtenção de elevadas produtividades na cultura (Ambrosano et al., 1997), conforme observado no presente estudo.

A PG média obtida pelas cultivares IAC Alvorada e IAC Milênio no presente estudo foi 9,0% superior à PG média (2.361 kg ha⁻¹) para a safra de inverno de 2015 no estado de São Paulo, enquanto para a cultivar Pérola a PG foi 3,3% inferior à média estadual (Conab, 2020). De forma geral, observou-se que os genótipos IAC Alvorada e IAC Milênio apresentaram maior desempenho agrônomo do que o genótipo Pérola (Tabela 2; Figura 2). Além de maior desempenho agrônomo, as cultivares IAC apresentaram maior eficiência, visto que na dose 0 a PG dessas cultivares foi maior do que a cultivar Pérola, e maior responsividade à aplicação de N, pois incrementaram significativamente mais a PG com o aumento das doses de N em cobertura. Esses resultados demonstram a importância dos programas de melhoramento e do lançamento frequente de novas cultivares para o aumento da produtividade do feijão. Isso ocorre, pois dentre as três cultivares avaliadas, a cultivar Pérola é a mais antiga, com lançamento em 1996 (Yokoyama et al., 1999), enquanto as cultivares IAC Alvorada e IAC Milênio apresentam lançamentos mais recentes, sendo nos anos de 2007 e 2013, respectivamente (Carbonell et al., 2008; Carbonell et al., 2014).

Em relação aos atributos de qualidade dos grãos, também se observou que as cultivares IAC foram superiores, com RP_{≥12} maior do que a cultivar Pérola. O RP_{≥12} é um dos principais atributos que definem o preço pago pelo feijão. De acordo com Carbonell et al. (2010), valores de RP_{≥12} acima de 70% indica grãos graúdos e com boa aceitação pelo mercado e empacadoras. Segundo os autores, quanto maior for o RP_{≥12}, maior será o preço pago pelo produto. Assim, as cultivares IAC Alvorada e IAC Milênio se destacam em relação à cultivar Pérola, podendo gerar um produto final com maior preço e renda aos produtores.

O TPB variou de 16,7 a 17,7%, não ocorrendo diferenças entre os fatores estudados. Os valores para o TPB foram adequados para o feijão cultivado no inverno, observando-se valores semelhantes aos encontrados em outros estudos com cultivares de feijão (Carbonell et al., 2008; Carbonell et al., 2014). A relação de hidratação ficou próxima de 2,0, ou seja, os grãos de feijão dobraram a sua massa após a hidratação, sendo esse valor semelhante ao encontrado em Terra et al. (2019) e Alves et al. (2020). Além disso, o TMH ficou próximo de 12 horas para todos os tratamentos,

sendo um tempo adequado para o feijão, pois cotidianamente o feijão é um alimento colocado em maceração na noite anterior ao seu preparo, facilitando a cocção e diminuindo a quantidade de substâncias antinutricionais do produto (Proctor e Watts, 1987; Ertop et al., 2018).

O tempo de cozimento variou de 34 a 36 minutos, não ocorrendo diferenças entre os tratamentos (Tabela 3). De acordo com a escala de Proctor e Watts (1987), grãos de feijão com tempos de cozimento entre 33 e 36 minutos são considerados como “resistentes” ao cozimento. Carbonell et al. (2008) observaram tempos de cozimento de 33 min e 36 minutos para as cultivares IAC Alvorada e Pérola na safra de inverno, respectivamente. Para a cultivar IAC Milênio, Carbonell et al. (2014) observaram tempo de cozimento de 36 minutos para a safra de inverno. Esses valores são semelhantes aos observados no presente estudo, indicando a semelhança do TC das cultivares avaliadas em diferentes ambientes de produção.

CONCLUSÕES

As doses de nitrogênio em cobertura e as cultivares de feijão promovem diferenças no desempenho agrônomo e na qualidade do feijão de maneira independente. A produtividade das cultivares de feijão apresentam incrementos lineares com as doses de nitrogênio em cobertura no primeiro ano de plantio direto, indicando maior exigência de N nessas condições comparado à dose ideal de 90 kg ha⁻¹ de N recomendada para a cultura. As cultivares IAC Alvorada e IAC Milênio, lançadas recentemente, apresentam desempenho agrônomo e qualidade superior à cultivar Pérola, com produtividade e rendimento de peneira 12,5 e 15,2% superior, respectivamente.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo nº 2014/26236-3, pela concessão da bolsa de iniciação científica ao primeiro autor.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alves MV, Filla VA, Coelho AP, Leal FT, Bettiol JVT, Lemos LB. Desempenho agrônomo e qualitativo de cultivares de feijoeiro dos grupos comerciais carioca e especial na época de inverno. *Revista de la Facultad de Agronomía*, v.119, n.1, p.1-8, 2020.
<https://doi.org/10.24215/16699513e046>
- Ambrosano EJ, Wutke EB, Bulisani EA, Cantarella H. Feijão. In: Raj BV, Cantarella H, Quaggio JA, Furlani AMC

- (Eds.). Recomendação de adubação e calagem para o Estado de São Paulo. 2. ed. Campinas: Instituto Agrônomo, 1997. p.194-195. (Boletim técnico, 100).
- AOAC - International (Gaithersburg, Estados Unidos). Official methods of analysis of AOAC International. 16.ed. Washington, 1995, 200p.
- Bettiol JVT, Filla VA, Leal FT, Coelho AP, Meirelles FC, Lemos LB, Bossolani JW. Sustainable production of common beans: inoculation, co-inoculation and mineral fertilization in early-cycle cultivars. *Journal of Plant Nutrition*, v.44, n.1, p.16-28, 2020. <https://doi.org/10.1080/01904167.2020.1822403>
- Carbonell SAM, Chiorato AF, Ito MF, Perina EF, Gonçalves JGR, Souza PS, Gallo PB, Ticelli M, Colombo CA, Azevedo Filho JA. IAC-Alvorada and IAC-Diplomata: new common bean cultivars. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, v.8, n.2, p.163-166, 2008.
- Carbonell SAM, Chiorato AF, Bolonhezi D, Barros VLN, Borges WLB, Ticelli M, Gallo PB, Finoto EL, Santos NCBD. 'IAC Milênio'-Common bean cultivar with high grain quality. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, v.14, n.4, p.273-276, 2014. <https://doi.org/10.1590/1984-70332014v14n4c44>
- Cetner MD, Kalaji HM, Goltsev V, Aleksandrov V, Kowalczyk K, Borucki W, Jajoo A. Effects of nitrogen-deficiency on efficiency of light-harvesting apparatus in radish. *Plant Physiology and Biochemistry*, v.119, p.81-92, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2017.08.016>
- Companhia nacional de abastecimento (Conab). Acompanhamento da safra Brasileira de grãos. Safra 2020/21. Brasília, DF, Brazil 2020. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/info-agro/safras>> Acessado em 10 de outubro de 2020.
- Deiss L, Kleina GB, Moraes A, Franzluebbers AJ, Motta AC, Dieckow J, Sandini IE, Anghinoni I, Carvalho PC. Soil chemical properties under no-tillage as affected by agricultural trophic complexity. *European Journal of Soil Science*, v.71, n.6, p.1090-1105, 2020. <https://doi.org/10.1111/ejss.12869>
- Ertop MH, Bektaş M. Enhancement of bioavailable micronutrients and reduction of antinutrients in foods with some processes. *Food and Health*, v.4, n.3, p.159-165, 2018. <https://doi.org/10.3153/FH18016>
- Fernández F, Gepts P, López M. Etapas de desarrollo en la planta del frijol. In: López M, Fernández F, Schoonhoven AV. *Frijol: investigación y producción*. Cali: CIAT, 1985. p.61-78.
- Filla VA, Coelho AP, Leal FT, Bettiol VT, Lemos LB. Portable chlorophyll meter in monitoring and management of nitrogen in common bean cultivars. *Revista de La Facultad de Ciencias Agrarias*, v.52, n.2, p.64-77, 2020.
- Leal FT, Filla VA, Bettiol JVT, Sandrini FOT, Mingotte FLC, Lemos LB. Use efficiency and responsivity to nitrogen of common bean cultivars. *Ciência e Agrotecnologia*, v.43, p.1-13, 2019. <https://doi.org/10.1590/1413-7054201943004919>
- Malavolta E, Vitti GC, Oliveira SA. Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações. Piracicaba: POTAFOS, 1997. 201p.
- Nunes HD, Leal FT, Mingotte FLC, Damião VD, Junior PAC, Lemos LB. Agronomic performance, quality and nitrogen use efficiency by common bean cultivars. *Journal of Plant Nutrition*, v.44, n.7, p.995-1009, 2021. <https://doi.org/10.1080/01904167.2020.1849292>
- Pittelkow CM, Linquist BA, Lundy ME, Liang X, Van Groenigen KJ, Lee J, Gestel NV, Six J, Venterea RT, Van Kessel C. When does no-till yield more? A global meta-analysis. *Field Crops Research*, v.183, p.156-168, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2015.07.020>
- Proctor JR, Watts BM. Development of a modified Mattson Bean Cooker procedure based on sensory panel cookability evaluation. *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal*, v.20, n.1, p.9-14, 1987. [https://doi.org/10.1016/S0315-5463\(87\)70662-2](https://doi.org/10.1016/S0315-5463(87)70662-2)
- Santos HG, Jacomine PKT, Anjos LHC, Oliveira VA, Lumbrales JF, Coelho MR, Cunha TJF. Sistema brasileiro de classificação de solo. 3 ed. Brasília, Embrapa, 390p. 2018.
- Soares BL, Ferreira PAA, Rufini M, Martins FAD, Oliveira DP, Reis RP, Andrade MJB, Moreira FMD. Agronomic and economic efficiency of common-bean inoculation with rhizobia and mineral nitrogen fertilization. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v.40, p.1-13, 2016. <https://doi.org/10.1590/18069657rbc20150235>
- Soratto RP, Perez AA, Fernandes AM. Age of No-Till system and nitrogen management on common bean nutrition and yield. *Agronomy Journal*, v.106, n.3, p.809-820, 2014. <https://doi.org/10.2134/agronj13.0439>
- Soratto RP, Catuchi TA, Souza EDFCD, Garcia JLN. Plant density and nitrogen fertilization on common bean nutrition and yield. *Revista Caatinga*, v.30, n.3, p.670-678, 2017. <https://doi.org/10.1590/1983-21252017v30n315rc>
- Terra FSA, Coelho AP, Bettiol JVT, Farinelli R, Lemos LB. Produtividade e qualidade dos grãos de cultivares de feijoeiro cultivado na safra das águas e de inverno. *Revista de la Facultad de Agronomía*, v.118, n.2, p.1-7, 2019. <https://doi.org/10.24215/16699513e026>
- Yokoyama LP, Del Peloso MJ, Di Stefano JG, Yokoyama M. Nível de aceitabilidade da cultivar de feijão "Pérola": avaliação preliminar. Embrapa Arroz e Feijão, 20p. 1999.



Biocontrole de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* por *Pseudomonas* spp. em banana “Prata anã”

Lara Cristine da Silva Vieira^a, Cristine Vanz Borges^{a*}, Shirley Nascimento Costa^b,
Zalmar Santana Gonçalves^c, Bruno Laecio da Silva Pereira^d, Fernando Haddad^c

^a Faculdade Maria Milza, Brasil

^b Faculdade Santo Antônio, Brasil

^c Embrapa Mandioca e Fruticultura, Brasil

^d Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Brasil

* Autor correspondente (cristine.vanzb@gmail.com)

INFO

Keywords

biological control
banana
Panama disease

ABSTRACT

Fusarium oxysporum f. sp. *cubense* biocontrol mediated by *Pseudomonas* spp. in Prata-Anã banana.

The banana tree is cultivated in the main countries of the world, including Brazil. This crop presents several phytosanitary problems, especially the *Fusarium* wilt caused by the fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc). The use of microorganisms such as *Pseudomonas* has been an alternative for the biocontrol of phytopathogens. In order to investigate the control capacity of rhizobacteria of the genus *Pseudomonas* in relation to the activity of the fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc), two experiments were carried out under greenhouse conditions. The design was completely randomized (DIC) with three treatments, three controls and 10 replications. The treatments of the first experiment consisted of applying *Pseudomonas* spp. on the substrate, with the addition of Foc with and without a time interval. After inoculation period in the substrate infested by Foc and *Pseudomonas*, banana seedlings were planted in tubes. In the second experiment, the application interval was the same as in the pre-inoculation experiment, but *Fusarium* was inoculated first and then the bacteria and then transferred to the substrate. The use of *Pseudomonas* in different treatments, with time intervals, was not efficient to control Foc. It was observed that the disease index was less severe in the treatment without time interval for inoculation of *Fusarium* and *Pseudomonas*, being the best treatment for the biocontrol of *Fusarium* in banana plants of the cultivar Prata Anã. The use of bacteria of the genus *Pseudomonas* spp. is an economically viable alternative to control *Fusarium* Wilt.

RESUMO

Palavras-chaves

controle biológico
banana
Mal-do-Panamá

A bananeira apresenta diversos problemas fitossanitários, tendo destaque a murcha de *Fusarium* causada pelo fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc). O uso de microrganismos como o *Pseudomonas*, tem sido uma alternativa para o biocontrole dos fitopatógenos. Com o objetivo de investigar a capacidade de controle da rizobactéria do gênero *Pseudomonas* em relação à atividade do fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc), foi realizado dois experimentos em condições de casa de vegetação. O delineamento foi inteiramente casualizados (DIC) com três tratamentos, três controles e 10 repetições. Os tratamentos do primeiro experimento consistiram em aplicar *Pseudomonas* spp. no substrato, com adição de Foc com e sem intervalo de tempo. Após período de inoculação no substrato infestado por Foc e *Pseudomonas*, realizou-se o plantio das mudas de bananeira nos tubetes. No segundo experimento, o intervalo de aplicações foi o mesmo do experimento de pré-inoculação, porém o *Fusarium* foi inoculado primeiro, posteriormente a bactéria e em seguida foram transferidos para o substrato. A utilização de *Pseudomonas* em tratamentos diferentes, com intervalo de tempo não foi eficiente para o controle do Foc. Observou-se que o índice de doença foi menos severo no tratamento sem intervalo de tempo para inoculação de *Fusarium* e *Pseudomonas*, sendo o melhor tratamento para o biocontrole do *Fusarium* em plantas de banana da cultivar Prata Anã. A utilização de bactérias do gênero *Pseudomonas* spp. é uma alternativa economicamente viável para controle da Murcha de *Fusarium*.

Received 03 November 2021; Received in revised form 10 January 2022; Accepted 17 February 2022



INTRODUÇÃO

Bananas e plátanos representam o quarto alimento mais produzido no mundo, com uma produção anual de 114 milhões de toneladas, são produzidos em larga escala pela Índia, China, Indonésia e Brasil, os quais são os maiores produtores atualmente (FAO, 2021). O Brasil produziu aproximadamente, 6,67 milhões de toneladas em 465 mil hectares de área cultivada no último censo realizado pela FAO, destacando-se entre os maiores produtos da cultura (FAOSTAT, 2019). Desta produção, 99% são destinadas ao mercado interno, destaque para as regiões Nordeste e Sudeste, que são as responsáveis por dois terços da produção do país. Nestas regiões, a cultura apresenta relevante papel social, fixando o homem no campo, gerando empregos e rendas, principalmente para a agricultura familiar (Borges et al., 2009).

Apesar dos avanços nos últimos anos das tecnologias desenvolvidas para a produção de banana, a bananicultura tem sua produção cada vez mais limitada por várias pragas e doenças, tendo destaque a Murcha do *Fusarium* ou Mal-do-panamá. Esta doença é causada pelo fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc), o qual apresenta ação devastadora em milhares de plantações pelo mundo (Ploetz, 2015).

O Foc pode sobreviver no solo por décadas e se disseminar por diversas maneiras (isto é, infectar solo, águas superficiais, plantas e outras). O patógeno é capaz de penetrar diretamente pelas células da epiderme das regiões apicais e zonas de alongamento das raízes, bem como, por meio de ferimentos naturais causados pela emissão de raízes secundárias. Após a penetração, o Foc movimentase pelos vasos do xilema e coloniza o rizoma da bananeira, causando uma coloração pardo avermelhada no sistema vascular (LIU et al., 2019).

Essa patologia é de caráter endêmico em todas as regiões bananicultoras do mundo, e seu controle é complexo, pois não há efetividade por meio de fungicidas. Com opções limitadas para gerenciar as doenças causadas pelo *Fusarium*, as cultivares resistentes (Gonçalves et al., 2019) e o uso de produtos químicos (Nel et al., 2007) são as únicas ferramentas para controlar a doença em solos infestados pelo patógeno. No entanto, variedades resistentes abre precedentes para o surgimento de novas raças do patógeno (Borges et al., 2009) e o uso de produtos químicos causa uma série de danos ambientais, sendo necessária a busca por novas alternativas de controle (Arya et al., 2018).

O uso de organismos antagonistas, incluindo rizobactérias não patogênicas é um método seguro de controle contra os fitopatógenos, desempenhando um papel importante contra as

principais doenças de plantas (Pandey et al., 2019). Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas, como as cepas *Bacillus*, *Pseudomonas* e *Actinomicetes*, são os principais colonizadores de raízes e podem induzir a resistência sistêmica nas plantas contra o *Fusarium* (Alzandi e Naguib, 2019; Mohamed et al., 2019; Pandey et al., 2019).

As bactérias do gênero *Pseudomonas* têm a capacidade de promover o crescimento de plantas e também contribuir para o biocontrole de fitopatógenos (Gamez et al., 2019; Islam et al., 2016). Estas bactérias possuem mecanismos que atuam dificultando o desenvolvimento de outros microrganismos, como a síntese de sideróforos (Arya et al., 2018), de antibióticos (Huang et al., 2018) e a indução da atividade de enzimas de defesa da planta contra os patógenos (Alazandi e Naguib, 2019). Estas bactérias foram testadas em bananas das cultivares Great Dwarf e Calcutá (Rivera-Cruz et al., 2008) e Williams (Gamez et al., 2019). No entanto, até o momento, não existem relatos de seus efeitos em bananas do subgrupo Prata, que é de grande interesse econômico, principalmente para a bananicultura brasileira (IBGE, 2017). Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade de controle de rizobactérias, do gênero *Pseudomonas* em relação à atividade do fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, causador da Murcha do *Fusarium* em bananeiras da cv. Prata-Anã.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido em condições de casa de vegetação, na Embrapa Mandioca e Fruticultura, no Município de Cruz das Almas – BA (12°40'19"S e 39°06'22"W', altitude de 220 m acima do nível do mar).

Foi avaliado o efeito de *Pseudomonas* no controle do fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc) em mudas de bananeira da variedade Prata-anã entre os meses de janeiro a maio de 2016. Foi escolhida a cultivar Prata Anã devido sua importância para a bananicultura brasileira, sendo esta cultivar a mais plantada na região Nordeste, segundo maior produtor de banana do Brasil (IBGE, 2017). Além disso, essa cultivar se comporta como um material moderadamente suscetível em relação ao *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc), então encontrar soluções para inibir a ação do patógeno é de suma importância para a bananicultura.

Foi utilizado para a produção do inoculo de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raça 1 o isolado CNPMF-0801 que é o padrão utilizado pela Embrapa para a seleção de genótipos resistentes

tanto em casa de vegetação quanto em campo, onde a empresa possui em sua coleção este material em estudo. Isolado do gênero *Pseudomonas spp.* pré-selecionados para ensaios de controle biológico foram obtidos da coleção do Laboratório de Microbiologia da mesma instituição. A cultura monospórica obtida foi cultivada em meio BDA (Batata, Dextrose e Ágar) e mantida em Demanda Bioquímica de Oxigênio (B.O.D.) a 25 °C com fotoperíodo de 12 horas.

A obtenção das mudas da cultivar Prata Anã foram através de cultura *in vitro* do laboratório da própria Embrapa Mandioca e Fruticultura e aclimatizadas por 60 dias e posteriormente transferidas para casa de vegetação da unidade, e transplantadas para sacos de polietileno com dimensão de 20 x 30 cm, permanecendo até o início das avaliações.

Preparo do inóculo de Foc1

Para o preparo do inóculo de Foc, foram misturados 1330 g de areia lavada, 250 g de fubá de milho umedecido e 150 mL de água destilada. Esse substrato foi colocado em sacos de polipropileno de 500 cm³ e esterilizado em autoclave a 120 °C por uma hora e armazenados em locais livres de contaminações até o início do bioensaio. Discos do meio de cultura contendo micélios e conídios de Foc foram adicionados à mistura, a qual foi armazenada em B.O.D. a 25 °C, durante 20 dias para a multiplicação do inóculo. Após esse período, as unidades formadoras de colônias (UFC) de Foc foram quantificados em câmara de Neubauer utilizando-se da técnica de diluição seriada.

Foi utilizado 1,0 g da mistura e colocada em um tubo de ensaio contendo 9,0 mL de água destilada e, posteriormente, foram realizadas diluições de 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴ e 10⁻⁵. As duas últimas diluições (10⁻⁴ e 10⁻⁵) foram submetidas à multiplicação em placas de Petri com meio BDA. As placas foram mantidas em B.O.D. a 25 °C por 48 horas para posterior contagem do número de unidades formadoras de colônias.

Preparo do inóculo de *Pseudomonas*

Os isolados de *Pseudomonas spp.* foram removidos das placas de Petri com auxílio da alça de Drigalsky e transferidos para um Becker com água destilada. Após este procedimento, 1,0 mL da suspensão formada foi transferida para tubos de ensaio para a realização de diluições seriadas (10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴ e 10⁻⁵).

Uma alíquota de 0,1 mL das duas últimas diluições foi transferida para placas de Petri contendo Agar nutriente e mantidas em B.O.D a 37

°C por 24 horas para posterior quantificação das unidades formadoras de colônias (UFC). Posteriormente, as colônias foram observadas sob luz ultravioleta (UV), sendo realizada a determinação da concentração inicial de cada solução de bactérias, estas foram diluídas com água destilada até atingirem à concentração de 10⁷ UFC mL⁻¹. Para conferir a concentração desta diluição, a absorbância da solução foi analisada por densidade óptica no espectrofotômetro, utilizando o comprimento de onda de 490 nm.

Montagem dos experimentos

Para a avaliação do efeito de *Pseudomonas* no controle de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc) em plantas de bananeira da cultivar Prata Anã previamente isoladas em ambiente livres de ataques de pragas e doenças, o delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado em casa de vegetação, possuindo três tratamentos com três controles e 10 repetições (uma planta por unidade experimental). O trabalho experimental foi montado de duas formas distintas (dois experimentos).

Vale ressaltar que o protocolo utilizado neste experimento teve como base o trabalho de Vieira et al, 2020, com modificações, pois os autores citados trabalharam com controle de *Fusarium* utilizando *Bacillus* na cultivar Prata Anã. Fornecendo desta forma, informações relevantes para o êxito desse artigo.

Os tratamentos do primeiro experimento consistiram em: T1- uma aplicação de *Pseudomonas* no substrato, com adição de Foc sete dias após; T2- duas aplicações de *Pseudomonas* em intervalo de sete dias no substrato e aplicação de Foc sete dias após a última aplicação de *Pseudomonas*; T3- *Pseudomonas* aplicado no substrato no mesmo momento que Foc. Os controles consistiram de infestação do substrato apenas com *Pseudomonas* (C1), apenas com Foc (C2) e sem infestação do substrato (C3) protocolo ajustado de Vieira et al. (2020).

No segundo experimento, o intervalo de aplicações foi o mesmo do experimento de pré-inoculação, porém o *Fusarium* foi aplicado primeiro e posteriormente a bactéria foi transferida para o substrato. Os tratamentos foram: T1- uma aplicação de Foc no substrato, com adição de *Pseudomonas* sete dias depois; T2- duas aplicações de Foc em intervalo de sete dias no substrato e aplicação de *Pseudomonas* sete dias após a última aplicação de Foc; T3- Foc aplicado no substrato no mesmo momento que *Pseudomonas*. Os controles consistiram de infestação do substrato apenas com Foc (C1), apenas com *Pseudomonas* (C2) e sem

infestação do substrato (C3). Na tabela 1, constam os tratamentos realizados nos diferentes experimentos.

Tabela 1 - Distribuição das diferentes amostras aplicadas em substrato com a cultivar Prata Anã.

EXPERIMENTO 1 MÉTODOS	
T1*	Uma aplicação de <i>Pseudomonas</i> no substrato, com adição de Foc sete dias após a aplicação de <i>Pseudomonas</i>
T2	Duas aplicações de <i>Pseudomonas</i> no substrato e aplicação de Foc sete dias após a segunda aplicação de <i>Pseudomonas</i>
T3	<i>Pseudomonas</i> e Foc aplicados simultaneamente no substrato
C1	Infestação do substrato apenas com <i>Pseudomonas</i>
C2	Apenas com Foc
C3	Sem inoculação no substrato
EXPERIMENTO 2 MÉTODOS	
T1**	Uma aplicação de Foc no substrato, com adição de <i>Pseudomonas</i> sete dias após a aplicação de Foc
T2	Duas aplicações de Foc no substrato e aplicação de <i>Pseudomonas</i> sete dias após a segunda aplicação de Foc
T3	Foc aplicado no substrato no mesmo momento que <i>Pseudomonas</i>
C1	Infestação do substrato apenas com <i>Pseudomonas</i>
C2	Apenas com Foc
C3	Sem inoculação no substrato

*Tratamento 1 (com utilização de *Pseudomonas* antes da aplicação de Foc);

**Tratamento 2 (aplicação de Foc antes da aplicação de *Pseudomonas*). O controle (C1, C2 e C3) foram iguais para ambos os tratamentos. Fonte: Embrapa (2016).

Foram realizadas seis avaliações em intervalos de 15 dias. A primeira avaliação externa foi feita aos 15 dias após o plantio, utilizando-se da escala de notas proposta por Cordeiro et al. (1993), perfazendo um total de 90 dias de avaliação.

As plantas foram mantidas em casa de vegetação com temperatura de aproximadamente 26 °C. As variáveis avaliadas foram: o número de folhas; altura da planta (cm) medida entre a base do pseudocaule até a última folha totalmente aberta e o diâmetro do pseudocaule (cm), com o auxílio de um paquímetro e por fim, foi calculado o índice de severidade da doença (ID %) proposto por Mckinney (1923).

Para facilitar a visualização dos sintomas internos, as raízes foram lavadas em água corrente para a retirada do substrato e em seguida separou-se as raízes das plantas de sua parte aérea. Essas medidas associadas com os sintomas internos foram realizadas ao final dos 90 dias ou no momento da morte das plantas (escala 5), a partir do corte transversal do rizoma para a análise da descoloração vascular causada pela presença de Foc. Com base na escala proposta por Cordeiro et al. (1993) e citada por Gonçalves et al. (2019), as plantas receberam as seguintes notas: (1) ausência de descoloração vascular, planta sadia; (2) pontos

isolados de descoloração no câmbio vascular; (3) descoloração em 1/3 do câmbio vascular; (4) descoloração entre 1/3 e 2/3 do câmbio vascular; (5) descoloração acima de 2/3 do câmbio vascular; e (6) completa descoloração do câmbio vascular. Posteriormente, foi realizada a transformação para o índice de severidade da doença (ID %) pela expressão de Mckinney (1923):

$$ID (\%) = \sum \frac{(\text{grau da escala} \times \text{frequência}) \times 100}{(\text{n}^\circ \text{ total de unidades} \times \text{grau máximo da escala})}$$

Para a análise estatística, foi estimado o índice de severidade da doença (ID) a partir da escala de sintomas externos e internos, respectivamente, para isso foi obtido através de três repetições (duas compostas por dados de três plantas e outra composta por quatro plantas), de forma aleatória. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANAVA) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, a nível de 5% de probabilidade, utilizando o programa estatístico SISVAR (Ferreira, 2011). Os dados do índice de severidade de doença foram transformados em $\sqrt{x + 0,5}$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Houve variações significativas nos atributos físicos entre os tratamentos, independente do experimento analisado (Tabelas 2 e 3). No primeiro experimento, os valores médios de altura da planta, diâmetro do pseudocaule e número de folhas das plantas, somente diferiram entre si no Tratamento T1 (inoculação com *Pseudomonas* e após com *Fusarium* com intervalo), o qual apresentou uma redução significativa nos valores destas variáveis. Em campo, plantas que apresentam porte reduzido facilitam na colheita e manuseio do cacho, porém em casa de vegetação plantas mais baixas podem apresentar tamanho reduzido, devido ao constante ataque de patógenos (Roque et al., 2014).

Não houve diferenças significativas entre os controles para as variáveis altura do pseudocaule, número de folhas e diâmetro do pseudocaule, nem mesmo o controle C2, onde ocorreu a aplicação apenas de Foc. Cabe ressaltar, que plantas com incidência ou severidade de murcha de *Fusarium* tendem a apresentar menores números de folhas e

pseudocaule mais frágil e de tamanho reduzido, como pode ser verificado no tratamento T1 das tabelas 2 e 3, onde todas as variáveis apresentaram redução significativa.

O estudo de poucas variáveis são justificáveis, pois alguns trabalhos relatam que não há a necessidade de avaliar um grande número de caracteres devido a sua pouca importância ou pouco peso nas análises do trabalho, como pode ser visto nos trabalhos de Pereira et al. (2012), que utilizaram o método para selecionar variáveis capazes de discriminar diploides melhorados; Brandão et al. (2013) eliminaram 20 dos 27 descritores quantitativos utilizados na caracterização de acessos de bananeira, Roque et al. (2014) descartaram aproximadamente 70% das características agronômicas utilizadas para a fenotipagem de cultivares de bananeira e Gonçalves et al. (2019), eliminaram 22 das 31 variáveis agronômicas em seu estudo com bananeiras do tipos diploides, triploides e tetraploides.

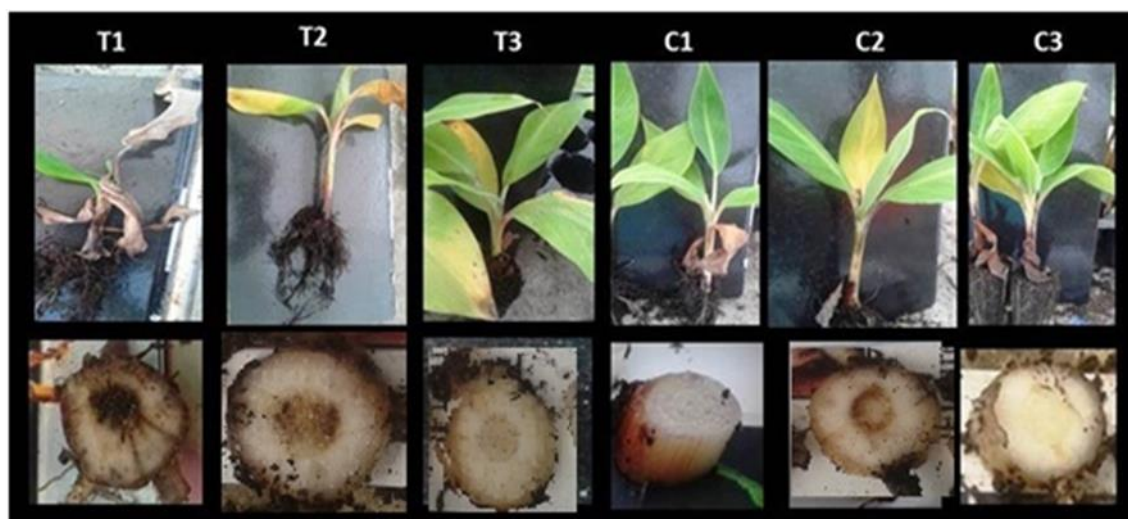
Tabela 2 - Teste de médias entre três características agronômicas e índice de severidade da doença (ID) na cultivar Prata Anã infestada por *Pseudomonas* e depois por *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc) sob condições de ambiente controlado.

Tratamentos	Altura (cm)	Número de folhas	Diâmetro (cm)	ID ¹ (%)
T1	10,80b*	1,40b	0,53b	33,33a
T2	30,80a	4,70a	1,10a	35,56a
T3	27,50a	3,80a	1,05a	28,89a
C1	30,80a	3,90a	0,99a	0,00b
C2	34,70a	3,90a	0,97a	27,78a
C3	28,80a	4,00a	1,09a	0,00b

T1 - *Pseudomonas* + Foc com intervalo; T2 - *Pseudomonas* + *Pseudomonas* + Foc com intervalo; T3 - *Pseudomonas* + Foc sem intervalo; C1 - Apenas *Pseudomonas*; C2 - Apenas Foc; C3 - Sem infestação. *Médias seguidas com diferentes letras minúsculas na coluna diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste Tukey. ¹Dados de ID originais não transformados.

Em relação às avaliações do índice de severidade da doença, não houve diferenças significativas entre os tratamentos T1, T2 e T3 e não diferindo do controle C2, onde foi aplicado somente o Foc. Com este resultado, pode-se inferir que os tratamentos com *Pseudomonas*, mesmo quando aplicado duas vezes, não apresentou controle sobre o Foc. Cabe ressaltar, que os controles C1 (somente *Pseudomonas*) e C3 (sem infestação) não apresentaram sintomas da doença, mostrando que não houve contaminação com o fungo nestes tratamentos.

As plantas dos tratamentos T1, T2 e T3, mesmo apresentando índices de doença semelhantes, apresentaram diferentes respostas externas. O decréscimo das variáveis morfológicas no Tratamento T1, comparado aos outros tratamentos, pode estar associado ao maior desenvolvimento do *Fusarium* no substrato ou a produção ineficiente de compostos químicos inibidores de *Pseudomonas* para controlar o Foc. Neste tratamento, foi observado um intenso amarelecimento nas folhas, típicos dos sintomas da Murcha do *Fusarium* (Figura 1).



T1- uma aplicação de *Pseudomonas* no substrato, com adição de Foc sete dias após; T2- duas aplicações de *Pseudomonas* no substrato (a primeira no dia um e a segunda com sete dias após a primeira) e aplicação de Foc sete dias após a segunda aplicação de *Pseudomonas*; T3- *Pseudomonas* e Foc aplicados simultaneamente no substrato. Os controles consistiram de infestação do substrato apenas com *Bacillus* (C1), apenas com *Foc* (C2) e sem inoculação no substrato (C3). Após período de 14 dias de incubação do substrato inoculado por Foc e *Bacillus*.

Figura 1 - Sintomas externos e interno da murcha de *Fusarium*, do primeiro experimento, após avaliação da interação *Pseudomonas* e *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, na cultivar Prata-anã

Após a infecção do Foc, o patógeno se move pelos vasos do xilema e coloniza o rizoma da bananeira, o que resulta na descoloração interna do sistema vascular. Posteriormente, a colonização do patógeno ocasiona marchas vasculares, que tem início com o surgimento de manchas verde-claras e listras marrom-avermelhadas nos tecidos vasculares da base do pecíolo (Ploetz, 2015; Li et al., 2017). O sintoma mais comum é o amarelecimento da borda de folhas mais velhas para as mais novas e quando a doença se encontra em estágios mais avançados, ocorre a colonização do tecido parenquimatoso adjacente, com produção elevada de conídios e clamidósporos (Ploetz, 2015; Li et al., 2017).

No presente trabalho, os tratamentos T1, T2, T3 e o controle C2 apresentaram danos externos na planta característicos da infecção causada pelo Foc (Figura 1). A ineficiência do tratamento com *Pseudomonas* uma semana antes da aplicação do Foc sugere que a produção de compostos químicos por parte da bactéria, capazes de inibir o patógeno, pode ter sido baixa e seu tempo de resposta foi ineficiente, sugerindo assim um tempo maior de avaliação. Além disso, esses compostos podem ter diminuído ou apresentado baixa vida útil antes da inserção do Foc no meio, ocasionando resultados mascarados. Quando se leva em consideração os aspectos epidemiológicos de murcha de *Fusarium*

e a ecologia da maioria das plantações de banana, fica evidente que o manejo para a murcha de *Fusarium* é bastante complexo (Gonçalves et al., 2019).

Na segunda parte do experimento, (Foc é aplicado antes da *Pseudomonas*) a variável “altura da planta” apresentou comportamento semelhante entre os tratamentos, ou seja, não houve diferenças estatísticas entre eles (Tabela 3). Sua variação foi entre 23,20 cm (T1) a 25,40 cm (T2), respectivamente. Quando se analisa o comportamento dos controles do experimento 2 nota-se que houve destaque do C1 e C3 para altura da planta. Para o C2 (apenas com Foc) o valor foi inferior aos demais, como já era esperado. Corrêa et al. (2010) trabalhando com *Fusarium* em alface hidropônica apresentaram resultados de crescimento das plantas semelhantes aos encontrados no presente trabalho, apresentando ainda murcha das folhas, clorose e podridão radicular. Vieira et al., (2020) avaliando a eficiência de dosagens de aplicações de *Bacillus* spp. para controle do Foc em banana demonstraram que é viável economicamente utilizar biocontrole como agente antagonista a Murcha de *Fusarium*, além disso, eles demonstraram que o uso desse tipo de biocontrole é capaz de inibir o crescimento e ataque do Foc, quando usado em dosagens aplicadas sete dias antes do inóculo.

Tabela 3 - Teste de médias entre três características agrônômicas e índice de severidade da doença (ID) na cultivar Prata Anã infestada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc) e depois por *Pseudomonas* sob condições de ambiente controlado

Tratamentos	Altura (cm)	Número de folhas	Diâmetro (cm)	ID ¹ (%)
T1	23,20b*	4,50a	1,02a	55,00a
T2	25,40ab	3,40b	0,99a	55,56a
T3	24,60ab	4,40ab	0,95a	14,44c
C1	29,40 ^a	4,70a	1,05a	0,00d
C2	23,60b	4,50a	0,91a	32,22b
C3	29,70 ^a	3,80ab	1,04a	0,00d

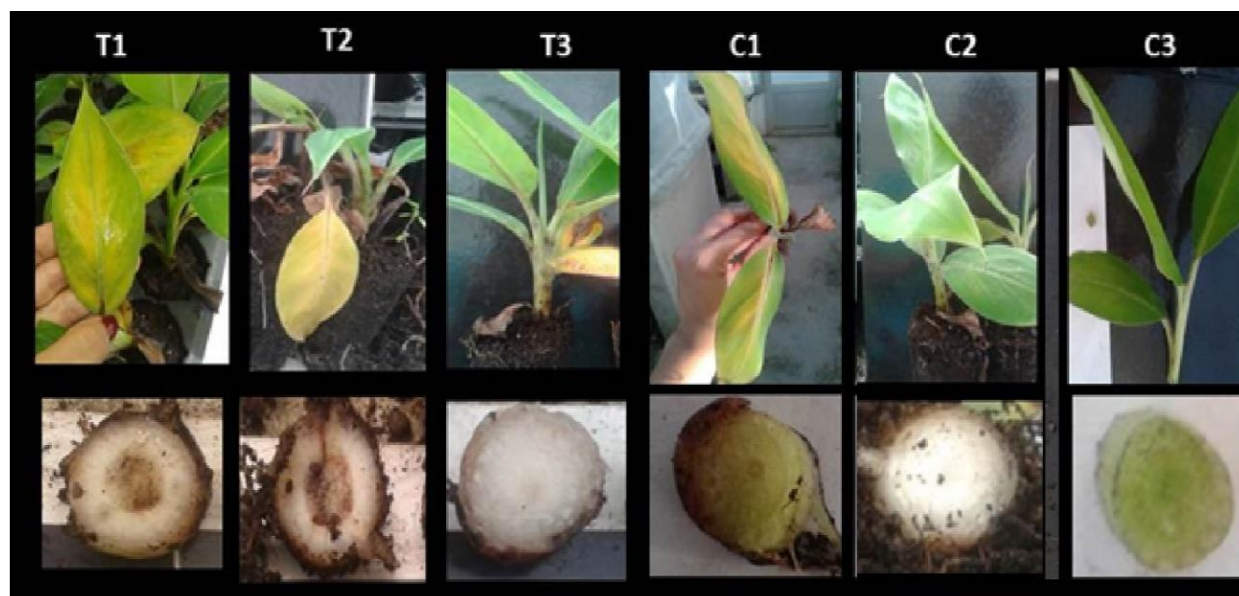
T1- Foc + *Pseudomonas* com intervalo; T2 – Foc + Foc + *Pseudomonas* com intervalo; T3 – Foc + *Pseudomonas* sem intervalo; C1 – Apenas *Pseudomonas*; C2 – Apenas Foc; C3 – Sem infestação. *Médias seguidas com diferentes letras minúsculas na coluna diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste Tukey. ¹Dados de ID originais não transformados.

Para o número de folhas o tratamento T1 se destacou, sendo superior aos demais, assim como o controle C1, tendo como indicativo que a aplicação de Foc de alguma forma acelera a produção de folhas nas plantas, podendo ainda ser considerado como um meio de sobrevivência e perpetuação da espécie. Não houve variação no diâmetro do pseudocaule entre os tratamentos e os controles, formando apenas um grupo.

Com relação ao ID, houve a formação de quatro grupos, onde todos os tratamentos que foram infectados por Foc demonstraram o desenvolvimento da doença com alterações significativas resultantes dos sintomas internos da doença. No entanto, o tratamento T3 (sem intervalo de tempo entre a aplicação dos dois inóculos) resultou em melhor controle da doença e, consequentemente, em menor ID (Tabela 3). Embora a doença tenha se manifestado e sua

intensidade tenha sido significativamente reduzida, esse controle não demonstra ser uma alternativa viável a campo. Considerando que o Foc já esteja no solo, à hipótese de inoculação da *Pseudomonas* logo após a detecção do Foc no substrato e/ou no solo no campo é remota. No entanto, em condições de casa de vegetação, este tratamento mostrou-se o mais efetivo.

Nos tratamentos T1 e T2 as plantas apresentaram amarelecimento progressivo das folhas, característico da doença, bem como o enegrecimento do pseudocaule (Figura 2). Os sintomas da doença apresentados nestes tratamentos sugerem que o tempo de inoculação e/ou a quantidade de bactérias presente no substrato não foi suficiente à inibição do Foc, independentemente da quantidade do fungo inoculada.



T1- uma aplicação de Foc no substrato, com adição de *Pseudomonas* sete dias após; T2- duas aplicações de Foc no substrato (a primeira no dia um e a segunda com sete dias após a primeira) e aplicação de *Pseudomonas* sete dias após a segunda aplicação de Foc; T3- Foc e *Pseudomonas* aplicados simultaneamente no substrato. Os controles consistiram de infestação do substrato apenas com *Bacillus* (C1), apenas com Foc (C2) e sem inoculação no substrato (C3).

Figura 2 - Sintomas externos e internos da murcha de Fusarium, do segundo experimento após avaliação da interação *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* e *Pseudomonas* na cultivar Prata-anã.

No presente estudo percebe-se que, mesmo quando Foc é aplicado antes de *Pseudomonas*, como verificado no experimento 2, as plantas apresentaram sintomas característicos da doença causada pelo fungo, não sendo verificada eficiência para a redução do índice de doença (ID) (Tabela 3). A ineficiência do controle do desenvolvimento do fungo pela bactéria pode ser explicada pela colonização ineficiente da *Pseudomonas* nas raízes das plantas de bananeira. A colonização das rizobactérias é muito importante para o controle efetivo de patógenos do solo, incluindo o Foc (Ploetz, 2015). Estudos indicam que a colonização por *P. fluorescens* Ps006, por exemplo, é escassa, sem colônias visíveis, especialmente quando observadas por microscopia confocal após coloração com FISH (Gamez et al., 2019). Isso pode indicar que essa linhagem requer um tempo maior para se aderir firmemente às raízes da bananeira comparadas com outras rizobactérias, e.g., *B. amyloliquefaciens* Bs006. No entanto, observando os valores e comportamentos do tratamento T3 de ambos os experimentos, acredita-se que fatores como a viabilidade do inóculo pode ter interferido nas diferenças encontradas, considerando-se que houve uma redução quando a *Pseudomonas* foi empregada logo à adição do Foc.

Embora apenas o tratamento T3, do segundo experimento tenha sido eficiente, outros trabalhos utilizando *Pseudomonas fluorescentes*, tiveram resultados significativos no controle da murcha do *Fusarium* na cultura da bananeira (Gamez et al., 2019). Estes trabalhos relatam que o controle do Foc pela bactéria *Pseudomonas* pode estar associado, principalmente à produção de sideróforos pela bactéria, que tem a capacidade de limitar a quantidade de ferro disponível ao crescimento do patógeno (Arya et al., 2018; Lecomte et al., 2016), ou também por meio da produção de enzimas líticas capazes de degradar a parede das células fúngicas (Durairaj et al., 2018).

Diferenças encontradas nos inúmeros estudos podem estar relacionadas com a composição e condição do meio utilizado, a redução na sobrevivência do controle, condições climáticas, tempo de inoculação, entre outros, que necessitam ser investigados. Diante disso, este trabalho evidenciou que o controle de Foc com a bactéria do gênero *Pseudomonas* não foi eficiente, nem como controle preventivo, nem no controle curativo da doença, exceto quando esta intervenção foi direta.

Corrêa et al. (2010), ao dobrar a dose de *Pseudomonas* em seu experimento, foi detectado um nível significativo de controle da murcha de *Fusarium*, aumentando a massa da planta e diâmetro do pseudocaule em até 6,0 %, tendo como mecanismos de ação a produção de antibióticos e a

competição por espaço e nutrientes com os patógenos.

Outros trabalhos demonstram a importância da pré-seleção das cepas de *Pseudomonas*, quanto a capacidade de produção de sideróforos, antes do uso da bactéria como biocontrole do Foc. Estes estudos indicam que cepas de *Pseudomonas* suprimem a Murcha do *Fusarium*, principalmente pela competição pelo ferro na rizosfera, sendo a produção de sideróforos essencial, conferindo vantagens competitivas às bactérias. Além disso, a produção de sideróforos pela bactéria depende do teor de ferro, pH e temperatura do meio (Arya et al., 2018), sendo essencial o controle eficiente das condições do experimento e/ou do cultivo da bananeira. Concomitantemente, o ajuste da acidez do solo, por meio de fertilizantes alcalinos, é uma característica correlacionada positivamente com a supressão da doença da Murcha do *Fusarium* em bananas (Huang et al., 2019), podendo ser um manejo adequado para melhorar a eficácia do biocontrole utilizado.

Novos estudos devem ser realizados para melhor entendimento do comportamento da *Pseudomonas* e seu poder antagonista junto ao fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* na cultura da bananeira “Prata Anã”, devendo ainda ser testadas com outras cultivares mais resistentes e mais suscetíveis ao ataque da murcha de *Fusarium*.

CONCLUSÕES

A utilização de bactérias do gênero *Pseudomonas* spp., para controle biológico é uma alternativa economicamente viável. A aplicação da bactéria sem intervalo de tempo depois de aplicado o *Fusarium*, demonstrou melhor biocontrole do fungo em planta de bananeira da cv. Prata Anã. Entretanto, estudos quanto a seleção eficiente das cepas das bactérias utilizadas no biocontrole, o período de aplicação, quantidade a ser aplicada, viabilidade dessas bactérias após transferência para o solo, bem como as condições do meio de cultivo da bananeira, precisam ser mais estudados, tendo em vista que, apenas um dos tratamentos teve ação eficaz.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alzandi AA, Naguib DA. Metabólitos de *Pseudomonas fluorescens* como agente de biopriming para indução de resistência sistêmica em tomateiro contra *Fusarium* murchar. *Rhizosphere*, v.11, p.124-128, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2019.100168>
- Anjum S, Sundaram S, Rai GK. Nutraceutical application and value addition of banana peel: A review. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, v.6, n.10, p.81-85, 2014.

- Arya A, Gupta K, Chundawat TS, Vaya D. Biogenic Synthesis of Copper and Silver Nanoparticles Using Green Alga *Botryococcus braunii* and Its Antimicrobial Activity. *Bioinorganic Chemistry and Applications*, v.2018, p.1-9, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/7879403>
- Bholay AD, Jadhav UP, Borkhataria BV. Fluorescent pseudomonads as plant growth promoting rhizobacteria and their siderophoregenesis. *Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, v.3, p.27-32, 2012. <https://doi.org/10.9790/3008-0312732>
- Borges AL, Souza LS, Oliveira AMG. Banana in: Crisóstomo, L. A.; Naumov, A.(org.). *Adubando para alta produtividade e qualidade: fruteiras tropicais do Brasil*. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 238p., 2009. (IIP. Boletim 18).
- Brandão LP, Souza CPF, Pereira VM, SILVA SO, Santos-Serejo JA, Ledo CAS, Amorim EP. Descriptor selection for banana accessions based on univariate and multivariate analysis. *Genetics and Molecular Research*, v.12, n.2, p.1603-1620, 2013. <http://dx.doi.org/10.4238/2013.May.14.1>
- Cordeiro ZJM, Shepherd K, Soares Filho WS, Dantas JLL. Avaliação de resistência ao mal-do-Panamá em híbridos tetraploides de bananeira. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.18, n.4, p.478-483, 1993.
- Cordeiro ZJM; Doenças fúngicas e bacterianas In: Ferreira CF (org.) *O agronegócio da banana*. 1 ed. Brasília-DF, Embrapa/ Cruz das Almas, p.547-575, 2016.
- Corrêa EB, Bettiol W, Sutton JC. Controle biológico da podridão radicular (*Pythium aphanidermatum*) e promoção de crescimento por *Pseudomonas chlororaphis* 63-28 e *Bacillus subtilis* GB03 em alface hidropônica. *Summa Phytopathologica*, v.36, n.4, p.275-281, 2010. <https://doi.org/10.1590/S0100-54052010000400001>
- Durairaj K, Velmurugan P, Park JH, Chang WS, Park YJ, Senthilkumar P, Oh BT. An investigation of biocontrol activity *Pseudomonas* and *Bacillus* strains against *Panax* ginseng root rot fungal phytopathogens. *Biological control*, 9 ed., v.125, p.138-146, 2018.
- FAOSTAT (2021). Banco de dados online FAOSTAT. Disponível em <http://faostat.fao.org/> (acessado em janeiro de 2021).
- Ferreira DF. Sisvar: a computer statistical analysis system. *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, v.35, n.6, p.1039-1042, 2011.
- Freitas SS. Rizobactérias promotoras do crescimento de plantas. In: SILVEIRA, A. P. D.; FREITAS, S. S. *Microbiologia do solo e qualidade ambiental*. Campinas: Instituto Agrônomo, 2007.
- Gamez RM, Rodríguez F, Vidal NM, Ramirez S, Alvarez RV, Landsman D, Mariño-Ramirez L. Perfil do transcriptoma de banana (*Musa acuminata*) em resposta a rizobactérias: *Bacillus amyloliquefaciens* Bs006 e *Pseudomonas fluorescens* Ps006. *BMC Genomics*, v.20, n.378, p.121-133, 2019. <https://doi.org/10.1186/s12864-019-5763-5>
- Gonçalves zs, Haddad f, Amorim vbo, Ferreira cf, de Oliveira sa, s, Amorim ep. Agronomic characterization and identification of banana genotypes resistant to *Fusarium* wilt race 1. *European Journal of Plant Pathology*, v.155, p.1093-1103, 2019. <https://doi.org/10.1007/s10658-019-01837-5>
- Huang Y, Hickman JE, Wu S. 2018: Impactos de aplicações aprimoradas de fertilizantes no ozônio troposférico e danos às colheitas na África Subsaariana. *Atmospheric Environment*, v.180, p.117-125, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2018.02.040>
- IBGE. Banco de Dados Agregados. Sistema IBGE de Recuperação Automática –SIDRA.2015. Disponível em: <<http://www2.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/listabl.asp?c=1613&z=t&o=11>>. Acesso em: 27 nov. 2016.
- Islam MT, Kim KH, Choi J. Wheat Blast in Bangladesh: The Current Situation and Future Impacts. *The Plant Pathology Journal*, v.35, n.1, p.1-10, 2019. <https://doi.org/10.5423/PPJ.RW.08.2018.0168>
- Lecomte C, Alabouvette C, Edel-Hermann V, Robert F, Steinberg, C. Biological control of ornamental plant diseases caused by *Fusarium oxysporum*: A review. *Biological Control*, v.101, p.17-30, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2016.06.004>
- Li C, Yang J, Li W, Sun J, Peng M. Direct root penetration and rhizome vascular colonization by *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense are the key steps in the successful infection of Brazil Cavendish. *Plant Disease*, v.101, n.12, p.2073-2078, 2017. <https://doi.org/10.1094/PDIS-04-17-0467-RE>
- Mckinney HH. Influence of soil, temperature and moisture on infection of wheat seedlings by *Helminthosporium sativum*. *Journal of Agricultural Research*, Washington, v.26, p.195-217, 1923.
- Pandey PK, Samanta R, Yadav, RNS. Inside the plant: addressing bacterial endophytes in biotic stress alleviation. *Archives Microbiology*, v.201, n.4, p. 415-429, 2019. <https://doi.org/10.1007/s00203-019-01642-y>
- Pereira VM, Borges CV, Brandão LP, Oliveira LS, Souza CPF, Gonçalves ZS, Silva SO, Santos-Serejo JA, Ferreira CF, Amorim EP, Ledo CAS. Genetic diversity between improved banana diploids using canonical variables and the Ward-MLM Methods. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.47, n.10, p.1480-1488, 2012. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2012001000010>
- Ploetz RC. *Fusarium* wilt of Banana. Review *Phytopathology*, v.105, p.1512-1521, 2015. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-04-15-0101-RVW>
- Rivera-Cruz MC, Narcia AT, Ballana GC, Kohler J, Coravaca F, Roldán A. Poultry manure and banana waste are effective biofertilizer carriers for promoting plant growth and soil sustainability in banana crops. *Soil Biology and Biochemistry*, v.40, n.12, p.3092-3095, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2008.09.003>
- Roque RL, Amorim TB, Ferreira CF, Ledo CAS, Amorim EP. Desempenho agrônomo de genótipos de bananeira no recôncavo da Bahia. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v.36 n.3, p.598-609, 2014. <https://doi.org/10.1590/0100-2945-361/13>
- Silva ER. Exsudação radicular e sua utilização por rizobactérias. 2011. 23 p. Dissertação (mestrado em Gestão de recursos agroambientais). Faculdade de agricultura tropical e subtropical, Instituto Agrônomo, Campinas.

Srivastava S, Sharma PK, Guru K. Nutraceuticals: a review.
Journal of Chronotherapy and Drug Delivery, v.6, n.1, p.1-10, 2015.

Vieira LCS, Costa SN, Borges CV, Gonçalves ZS, Haddad F.
Fusarium oxysporum f. sp. *ubense* biocontrol mediated by
Bacillus spp. in Prata-Anã banana. Revista Brasileira de
Ciências Agrárias, v.15, n.3, p.1-7, 2020.

<https://doi.org/10.5039/agraria.v15i3a8030>



Effect of mineralized nitrogen through decomposition of plant residues on the uptake of maize (*Zea mays* L.) in sudan savannah ecological zone of Nigeria

Noah Alabi Oyebamiji^{a*}, Oluwatoyin Abimbola Babalola^b, David Olusegun Adelani^c

^a Federal University Dutsin-Ma, Nigeria

^b Federal University of Agriculture, Abeokuta, Nigeria

^c Federal College of Forestry, Mechanization, Nigeria

* Author's correspondent (noahoye06@gmail.com)

INFO

Keywords

plant residues
decomposition
mineralization
uptake

ABSTRACT

A field experiment was designed to determine the effect of mineralized nitrogen (N) through the decomposition of leafy biomass of agroforestry tree species as residues to underscore its uptake by maize under Sudan savannah conditions. The experiment was laid out as 3 x 4 x 2 factorial in a split-split plot design with three replicates for two cropping seasons. The factors considered include: control, biomass species (*Albizia lebbbeck* and *Parkia biglobosa*) as main plots, four levels of nitrogen fertilizer (0, 40, 80, 120 kg N ha⁻¹) as sub-plots, and two maize varieties (DMR-ESR-7 and 2009 EVAT) as sub-sub plots. Data were analysed using Analysis of Variance (ANOVA). Chemical composition of *A. lebbbeck* biomass had higher average contents of N (32.4 g kg⁻¹) and C (186.4 g kg⁻¹) and lower average C: N ratio (57.5) than *P. biglobosa* and this affected their decomposition rates, hence, *A. lebbbeck* decomposed faster than *P. biglobosa*. 56 % of N in the litter bags were released within the first 2 weeks of biomass incorporation and progressively increased up to 10 weeks after planting (WAP). Total N uptake by maize was lowest (2.8 kg N ha⁻¹) in *P. biglobosa* and was highest (8.6 kg N ha⁻¹) in *A. lebbbeck* amended plots. It is then concluded that total N uptake by maize crop increased rapidly between 4-6 WAP, and the impact was obvious in plots amended with *A. lebbbeck* biomass than in *P. biglobosa* plots during the two cropping seasons.

RESUMO

Efeito do nitrogênio mineralizado através da decomposição de resíduos vegetais na absorção de milho (Zea mays L.) na zona ecológica da savana sudanesa da Nigéria. Um experimento de campo foi projetado para determinar o efeito do nitrogênio mineralizado (N) através da decomposição da biomassa foliar de espécies de árvores agroflorestais como resíduos para destacar sua absorção pelo milho em condições de savana do Sudão. O experimento foi estabelecido como fatorial 3 x 4 x 2 em um delineamento de parcelas subdivididas com três repetições para duas safras. Os fatores considerados incluem: controle, espécies de biomassa (*Albizia lebbbeck* e *Parkia biglobosa*) como parcelas principais, quatro níveis de fertilizante nitrogenado (0, 40, 80, 120 kg N ha⁻¹) como subparcelas e duas variedades de milho (DMR -ESR-7 e EVAT 2009) como sub-subparcelas. Os dados foram analisados por meio de Análise de Variância (ANOVA). A composição química da biomassa de *A. lebbbeck* apresentou maiores teores médios de N (32,4 g kg⁻¹) e C (186,4 g kg⁻¹) e menor relação C:N média (57,5) do que *P. biglobosa* e isso afetou suas taxas de decomposição, portanto, *A. lebbbeck* se decompôs mais rápido que *P. biglobosa*. 56% do N nos sacos de lixo foram liberados nas primeiras 2 semanas de incorporação da biomassa e aumentaram progressivamente até 10 semanas após o plantio (WAP). A absorção total de N pelo milho foi menor (2,8 kg N ha⁻¹) em *P. biglobosa* e maior (8,6 kg N ha⁻¹) em parcelas corrigidas de *A. lebbbeck*. Conclui-se então que a absorção total de N pela cultura do milho aumentou rapidamente entre 4-6 WAP, e o impacto foi óbvio em parcelas alteradas com biomassa de *A. lebbbeck* do que em parcelas de *P. biglobosa* durante as duas safras.

Palavras-chaves

resíduos vegetais
decomposição
mineralização
absorção

Received 10 July 2021; Received in revised from 15 February 2022; Accepted 26 February 2022

INTRODUCTION

Maize (*Zea mays* L.) has been relatively a major staple food and is useful in human diet and animal feeds across Africa. It has been the most widely adapted and accepted cereal in the world with production of 872.8 million metric tonnes in 2012, followed by rice and wheat (FAO, 2014). Nigeria happens to be second in Africa after South Africa to produce maize of about 9.4 metric tonnes which represent 1.1 % of the world's total maize production in 2012. Considering world total cereal in 2012, it was discovered that, maize was the first most vital cereal in Nigeria followed by sorghum and millet (FAO, 2014).

Maize is a multi-purpose crop that can be utilized as food, livestock feed and fuel, and for manufacturing starch, flakes, alcohol, salad oil, soap, varnish paint, and painting and similar products (Biswas et al., 2009). The demand for maize is rapidly increasing day by day worldwide. It is expected to be increased further with the establishment of maize-based food industries, poultry, dairy and fish farms. But, its production is still low due to declining in soil fertility, especially nitrogen (N) couple with some other environmental factors (Oyebamiji et al., 2020).

Soil infertility has been the major challenge for small holder farmers in terms of maize production in any semi-arid zones (Osuji et al., 2010), and this has invariably increased poverty and food insecurity too. Meanwhile, legume tree based agroforestry trees has the capacity to improve soil quality (Osuji et al., 2010; Oyebamiji et al., 2017c), improve nutrient cycling, support microbial N₂ fixation, increase soil N availability, improve soil fertility, crop yields, and also support long-term nutrient balance in semi-arid lands (Jama and Zeila, 2005; Rosenstock et al., 2014).

Fertilizer agroforestry trees improve soil for better productivity of maize yield and its components due to N₂ fixation and recovery of leached nutrients (Akinnifesi et al., 2008). Plant residues equally have other beneficial effects on crop yield as they can improve availability and uptake of nutrients such as phosphorus. Application of plant biomass or residues from fertiliser trees as green manure also contribute to P availability, either directly by releasing tissue P during decomposition and mineralisation or indirectly by acting on chemical processes that regulate P adsorption-desorption reactions (Mweta et al., 2007).

Chemical fertilizers have been reported to increase cereal rooting depth and root proliferation. However, few small holder farmers cannot afford chemical or mineral fertilizers, and those who can afford hardly use the recommended

rates (Mugwe et al., 2009). Moreover, the little fertilizer available when added to the soil is often utilised with poor efficiency (Vanlauwe et al., 2010) due to environmental or soil-related factors (e.g. P fixation by sesquioxides, leaching and volatilization of N etc.) as well as management factors (e.g., poor timing or placement of fertilizer). In the opposite, the use of locally available manure is also limited by its low quality and quantity (Bationo and Waswa, 2011).

The uptake of nutrients and their distribution to various parts of maize plants have been noted to be influenced by factors like fertility of the native soil, application of chemical fertilizers, the growth stage of the plant and the environmental conditions Hussaini et al. (2008). Decomposition of plant material is key process in the control of nutrient cycling and formation of soil organic matter (Oyebamiji et al., 2018). Nutrient release during decomposition of litters or residues increases plant available nutrients (Koorem et al., 2011). Plant litter input also constitutes the main resource of energy and matter for the community of soil organisms (Hattenschwiler et al., 2005) that improve nutrient cycling process.

MATERIALS AND METHODS

Study area

The study area is Makera, a village in Dutsinma Local Government Area of Katsina State, having an area of 527 km², altitude of 605 m and a population of 169, 671 and is found within Latitude 12°27'18" N and Longitude 07°29'29" E. It is also found in the basement complex derived soils of Katsina State (Oyebamiji et al., 2018). The area receive an annual rainfall of 700 mm, which is spread from May to September. The mean annual temperatures range from 29-31° C. the high temperature normally occurs in April/May and the lowest in December through February (Tukur et al., 2013).

Experimental design

The experiment was laid in split-split plot design in 3 x 4 x 2 factorials with three replicates. The plot dimension was 4 m x 3 m. Leafy biomass of *Albizia lebbbeck* and *Parkia biglobosa* were pruned and incorporated fresh into the soil at the rate of 6 kg for each of each species biomass plots (B₁ and B₂ for *A. lebbbeck* and *P. biglobosa* respectively). There are plots without incorporation of leafy biomass (B₀), referred to as control. The leafy biomass was incorporated into the soil for two planting seasons (2014 and 2015).

Four levels of N fertilizers were split applied as: N₀, 0 kg N ha⁻¹ (control); N₁, 40 kg N ha⁻¹; N₂, 80 kg N ha⁻¹; N₃, 120 kg N ha⁻¹ and half were applied at 2 weeks after planting (WAP). The remaining quantity was applied 5 WAP. The two varieties of maize used (DMR- ESR- 7 (Yellow Maize) and 2009 EVAT (White Maize) were obtained from Katsina State Agricultural and Rural Development Authority (KTARDA). The two maize varieties were planted; two maize seeds were planted per hole, at equal depth and it was later thinned to one 2 WAP by conventional spacing of 75 cm x 25 cm two weeks after the incorporation of leafy biomass of *A. lebbeck* and *P. biglobosa* into the soil, to make the total plant population of 64 stands per plot.

Plant tissue analysis of the agroforestry tree species

Samples of pruned leaves of *A. lebbeck* and *P. biglobosa* were air dried at a room temperature and ground to be analysed for their initial contents of N, C, lignin and polyphenols. Total N was analysed by Macro-Kjeldahl digestion, followed by distillation and titration (Brandstreet, 1965; Anderson and Ingram, 1993). Lignin was determined by the Acid Detergent Fibre (ADF) method as outlined in (Anderson and Ingram, 1993). The polyphenol was extracted in hot (80⁰ C) 50 % aqueous methanol and determined calorimetrically with tannic acid as a standard measurement (Hagerman, 1988; Anderson and Ingram, 1993).

Leaf biomass decomposition

Fifty grammes of the tree-leafy biomass from all the treatments that received biomass application was placed in 1-mm mesh size litter bags and buried into the soil at a depth of about 15 cm at the time of maize planting (beginning of the season). One bag per replicate containing residues from each species was randomly removed from the soil in each plot at 2, 4, 6, 8 and 10 weeks after planting (WAP). The contents in the bags were cleaned with water, oven dried at 65⁰ C to constant weight, and dry weights were recorded.

Estimation of leaf biomass decomposition and N mineralization rate were carried out as follows:

$$Y = e^{-kt},$$

where

Y is the percent remaining of initial weight of

material at time

t in weeks

k is the rate of decomposition/N release per week (rate constant).

The k values were estimated using ANOVA in SAS (2003). Nitrogen released (RLS) over time were calculated following the formula by Giashuddin et al. (1993):

% N RLS = 100 – % of original N content remaining (No) where,

$$No = \frac{(\% N \text{ at time } t) \times \% \text{ of original weight remaining}}{(\% N \text{ at time } 0)}$$

Maize crop N uptake

Destructive random maize sampling was done at 4, 6, 8, and 10 weeks after planting (WAP) maize to determine N concentration in the plant tissue. Sampling was done outside of the net plots. The total dry matter weight per plant of the harvested plants was used to determine N uptake by maize crop growth.

The cob was not included in the plant materials that were used for the analysis. The samples were cleaned with water (where necessary) and oven dried at 65⁰ C to constant weight after which they were ground to first pass through a 2-mm and finally through a 0.5 mm sieve. The resulting powder was then kept in plastic air tight bottle and stored in a cool dry place awaiting chemical analysis. Nitrogen concentration in the samples was analyzed following the methods outlined by Parkinson and Allan (1975). Nitrogen uptake was there after calculated by this equation:

$$Y = A \times B$$

Where Y = percentage nitrogen uptake by maize

A = dry matter yield of maize

B = N concentration

Data collection method

Five maize plants were randomly selected within each of the net plots of 4 m x 1.5 m (6 m²) with a tag for periodic observations at 4, 6, 8 and 10 WAP during the crop growth cycle for both pre and post- harvest data collection.

Soil sample collections

Soil sample collections from the depth of 0-30 cm which were randomly taken in each plot in 2014, were analyzed as described below. Soil pH was determined in 0.01M CaCl₂ by using a soil

solution ratio of 1: 2.5 by means of a Philip analogue pH meter. The soil was determined using the pH meter (Black, 1965). The organic carbon content of soil was determined by the wet oxidation method of Walkley-Black as described by Allison (1965). The total nitrogen content of the soil was determined by Micro Kjeldahl procedure Bremner (1965). C: N was computed as ratio of N to C. Available phosphorus (P) was extracted by the Bray 1 method. The P concentration in the extract was determined colorimetrically by using the Spectronic 20 and absorption was read-off as described by Bray and Kurtz (1945) and modified by Murphy and Riley (1962). Exchangeable K, Ca and Mg were extracted using ammonium acetate. K was determined on flame photometer and Ca and Mg by Atomic Absorption Spectrophotometer (AAS).

Statistical analysis

Data were analysed using Analysis of Variance using Statistical Analysis System (SAS, 2003) computer package at 5 % level of significance to determine differences in the treatment and

interaction effects. The Duncan's Multiple Range Test (Duncan, 1955) was used to separate means of significant differences among the treatments.

RESULTS

Selected soil physical and chemical properties before planting

The physical and chemical analysis of the top soil (0-30 cm depth) of the experimental site before planting in 2014 and 2015 as determined by standard procedures showed that, the soil was sandy loam with the following properties: pH (0.01M CaCl₂), 4.1, 4.2; organic carbon, 5.3 g kg⁻¹, 5.46 g kg⁻¹; total nitrogen, 0.4 g kg⁻¹, 0.45 g kg⁻¹; ammonia-nitrogen, 23.99 mg kg⁻¹, 24.68 mg kg⁻¹; nitrate-nitrogen, 26.38 mg kg⁻¹, 27.79 mg kg⁻¹; available phosphorus, 7.94 mg kg⁻¹, 7.96 mg kg⁻¹; and exchangeable cations (c mol kg⁻¹) of Ca²⁺, 6.25, 6.36; Mg²⁺, 1.01, 1.11; K⁺, 0.2, 0.32; Na⁺, 0.35, 0.41; and CEC, 7.96, 8.34 c mol kg⁻¹ (Table 1).

Table 1 - Soil physical and chemical properties before establishment of the experiment at the study site

Soil properties	2014	2015
Particle size (g kg⁻¹)		
Sand	88.60	85.75
Silt	4.00	3.89
Clay	7.40	7.33
Textural class	Sandy loam	Sandy loam
Chemical properties		
pH (0.01M CaCl ₂)	4.10	4.20
Organic carbon (g kg ⁻¹)	5.30	5.46
Total nitrogen (g kg ⁻¹)	0.40	0.45
NH ₄ ⁺ N (mg kg ⁻¹)	23.99	24.68
NO ₃ ⁻ N (mg kg ⁻¹)	26.38	27.79
Available phosphorus (mg kg ⁻¹)	7.94	7.96
Exchangeable cations (c mol kg⁻¹)		
Ca	6.25	6.36
Mg	1.01	1.11
K	0.20	0.32
Na	0.35	0.41
CEC	7.96	8.34

NH₄⁺N: Ammonia-nitrogen, NO₃⁻N: Nitrate-nitrogen. Ca: Calcium, Mg: Magnesium, K: Potassium, Na: Sodium, CEC: Cation Exchange Capacity.

Chemical composition of leafy biomass of the two agroforestry species

The leaves of *A. lebbeck* contained more N (leading to lower C: N ratio) than *P. biglobosa*. *A.*

lebbeck had the highest concentration of lignin with mean value of 110.6 g kg⁻¹, while, *P. biglobosa* had highest concentration of C: N ratios with mean value of 63.0. The result showed that *P. biglobosa* had low N and C contents (Table 2).

Table 2 - Initial chemical composition of the biomass of *A. lebbeck* and *P. biglobosa* plant species

Component	N(g kg ⁻¹)	C (g kg ⁻¹)	Lignin (g kg ⁻¹)	Polyphenol (g kg ⁻¹)	C: N
<i>Albizia lebbeck</i>					
2014	33.2a	186.2a	113.7a	6.5b	56.0b
2015	31.6a	186.5a	107.4a	4.8b	59.0b
Means	32.4a	186.4a	110.6a	5.7b	57.5b
<i>Parkia biglobosa</i>					
2014	28.5b	178.1b	83.5b	8.7a	62.0a
2015	24.4b	155.2b	81.3b	6.3a	64.0a
Means	26.5b	166.7b	82.4b	7.5a	63.0a

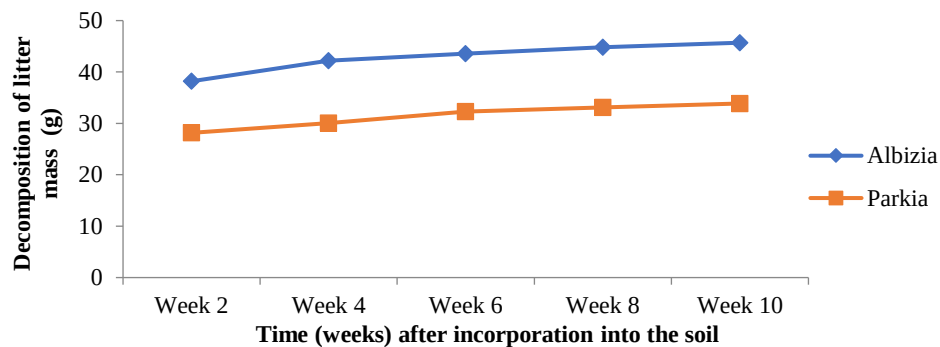
N= Nitrogen; C= Carbon; C: N= Carbon/N ratio

Means followed by the same letter(s) within the same column and treatment are not significantly different ($p > 0.05$).

Decomposition patterns of plant residues

Generally, there was a rapid loss of mass from the litter bags during the first two weeks after planting (2 WAP) for the two species (Figure 1) in this order *A. lebbeck* (38.2 g) < *P. biglobosa* (28.16 g) compared to initial weight of 50 g. At four weeks after planting (4 WAP), *A. lebbeck* had

lost 42.19 g of its initial weight, while, 30.04 g of *P. biglobosa* had been decomposed. At 6 WAP, the rate of mass loss due to decomposition declined in both species. Though, *A. lebbeck* continued to decompose faster than *P. biglobosa*. The rate of decomposition increased with increase in the number of weeks after planting.

Figure 1 - Loss weight of *A. lebbeck* and *P. biglobosa* leafy biomass over a period of 10 weeks

Decomposition factors of plant residues

The plant materials investigated showed variations in their rate and pattern of decomposition during 2014 and 2015 cropping seasons. The leaves of *A. lebbeck* contained significantly ($p < 0.05$) higher N (leading to lower C: N ratio) than *P. biglobosa*. *P. biglobosa* leaves had significantly ($p < 0.05$) lower concentration of lignin (LG) and lignin plus polyphenol (PP): nitrogen (N) (LG+PP: N) ratio in 2014 compared with *A. lebbeck*, but *A. lebbeck* and *P. biglobosa*

had similar values in 2015. Also, *P. biglobosa* had higher concentration of PP: N ratio than *A. lebbeck*. On the other hand, *A. lebbeck* had the significantly ($p < 0.05$) higher concentration of LG, while, *P. biglobosa* had higher concentration of C: N ratios. *A. lebbeck* had higher rates of (LG+PP): N in 2014 and was constant in 2015. However, *A. lebbeck* and *P. biglobosa* had similar concentrations of LG: N in 2014, but the value for *A. lebbeck* was significantly ($p < 0.05$) higher than that of *P. biglobosa* in 2015 (Table 3).

Table 3 - Decomposition rate patterns of *A. lebbeck* and *P. biglobosa* leafy biomass during the maize growing seasons of 2014 and 2015

Season	Residue	N	C	LG	PP	C:N	LG:N	PP:N	(LG+PP):N
					g kg ⁻¹				
2014	<i>Albizia</i>	33.20a	186.20a	113.70a	6.54b	56.00b	30.00a	2.00b	40.00a
	<i>Parkia</i>	28.50b	178.10b	83.50b	8.67 ^a	62.00a	30.00a	3.00a	30.00b
2015	<i>Albizia</i>	31.60a	186.50a	107.40a	4.84b	59.00b	34.00a	2.00b	36.00a
	<i>Parkia</i>	24.40b	155.20b	81.30b	6.38 ^a	64.00a	33.00b	3.00a	36.00a

Abbreviation: LG = lignin; PP = polyphenol; N = nitrogen; C = organic carbon

Means followed by the same letter within a column in a particular season are not significantly different at 5 % level of probability.

Effect of nitrogen uptake on maize

The combined mean of 2014 and 2015 cropping seasons revealed that, N uptake was comparable among the treatments across the periods of experiments. At 4-8 WAP, there was progressive and significant increase of N uptake by maize and declined at 10 WAP in some treatments. At 4 WAP, treatment 12 (*A. lebbeck* plots and 120 kg N ha⁻¹ with DMR-ESR-7 maize variety (B1N3V1) had significantly higher value (0.5 kg N ha⁻¹) than *P. biglobosa* (0.4 kg N ha⁻¹) and control (0.2 kg N ha⁻¹). At 6 WAP, treatment 16 (*A. lebbeck* plots and 120 kg N ha⁻¹ with 2009 EVAT maize variety (B1N3V2) had significantly higher value (2.5 kg N ha⁻¹) uptake of maize than control and *Parkia*. At 8 WAP treatments 8 and 11 (plots without biomass and 120 kg N ha⁻¹ with 2009 EVAT maize variety (B0N3V2 and *A. lebbeck* plots and

80 kg N ha⁻¹ with DMR-ESR-7 maize variety (B1N2V1) had significantly higher value (3.4 kg N ha⁻¹) of N uptake in maize than *P. biglobosa* (1.1 kg N ha⁻¹). At 10 WAP, treatment 8 (plots without biomass and 80 kg N ha⁻¹ with DMR-ESR-7 (B0N2V1) produced significantly ($p < 0.05$) higher value (3.1 kg N ha⁻¹) than *A. lebbeck* (2.6 kg N ha⁻¹) and *P. biglobosa* (1.8 kg N ha⁻¹). Total N uptake was comparable in many treatments, however, treatment 8 (plots without biomass and 120 kg N ha⁻¹ with 2009 EVAT maize variety (B0N3V2) had significantly ($p < 0.05$) higher value (9.2 kg N ha⁻¹) of N uptake in maize than *A. lebbeck* (8.6 kg N ha⁻¹) and *P. biglobosa* (2.8 kg N ha⁻¹). However, the values of N uptake ranged from 2.8 kg N ha⁻¹ to 8.6 kg N ha⁻¹ that is, in *P. biglobosa* and *A. lebbeck* respectively (Table 4).

Table 4 - Nitrogen taken up by maize at different sampling periods during 2014/2015 growing seasons at Makera in combined means

Treatment		Uptake (kg N ha ⁻¹) at different sampling period (WAP)				Total
		4	6	8	10	
1	B0 N0 V1	0.1ef	0.9fg	1.4efg	1.4ab	3.9fgh
2	B0 N1 V1	0.1def	0.8g	1.1fg	1.5ab	3.6fgh
3	B0 N2 V1	0.3a-f	1.7b-f	2.2b-g	2.8ab	7.0a-e
4	B0 N3 V1	0.2a-f	1.4c-g	2.2b-g	2.2ab	6.0b-g
5	B0 N0 V2	0.2b-f	1.2efg	2.0b-g	2.0ab	5.4c-g
6	B0 N1 V2	0.3a-f	1.4c-g	2.2b-e	2.3ab	6.2a-f
7	B0 N2 V2	0.3a-f	1.3d-g	1.7d-g	2.6ab	5.9b-h
8	B0 N3 V2	0.3a-f	2.4ab	3.4 ^a	3.1a	9.2a
9	B1 N0 V1	0.2c-f	0.9f-g	1.1g	1.3ab	3.5fgh
10	B1 N1 V1	0.2b-f	1.4c-g	1.8d-g	1.4ab	4.7d-h
11	B1 N2 V1	0.4abc	2.3ab	3.4 ^a	2.4ab	8.5abc
12	B1 N3 V1	0.5a	2.4ab	2.6a-e	2.4ab	7.8a-d
13	B1 N0 V2	0.3a-e	2.1abc	2.5a-e	2.4ab	7.4a-e
14	B1 N1 V2	0.3a-f	2.0a-e	2.7a-d	2.4ab	7.4a-e
15	B1 N2 V2	0.4a-d	2.1a-d	2.9abc	2.5ab	7.8a-d
16	B1 N3 V2	0.3a-d	2.5a	3.1ab	2.6ab	8.6ab
17	B2 N0 V1	0.2b-f	0.8g	1.1g	0.9b	3.0gh
18	B2 N1 V1	0.2b-f	1.4c-g	1.9c-g	1.4ab	4.9d-h
19	B2 N2 V1	0.2b-f	0.8g	1.1g	1.2ab	3.3fgh
20	B2 N3 V1	0.4ab	2.1a-d	2.5a-e	2.0ab	7.0a-e
21	B2 N0 V2	0.3a-f	1.4c-g	1.9c-g	2.1ab	5.7b-h
22	B2 N1 V2	0.2a-f	1.0fg	1.1g	1.2ab	3.6fgh
23	B2 N2 V2	0.1f	0.6g	1.1g	1.0b	2.8h
24	B2 N3 V2	0.2b-f	0.9f-g	1.5efg	1.8ab	4.4e-h

4, 6, 8 and 10 WAP = Weeks after planting, B0= without biomass incorporation, B1= *Albizia lebbeck* biomass incorporation, B2= *Parkia biglobosa* biomass incorporation, N0= 0 Kg N ha⁻¹, N1= 40 Kg N ha⁻¹, N2= 80 Kg N ha⁻¹, N3= 120 Kg N ha⁻¹ and V1= DMR-ESR-7, V2 = 2009 EVAT.

Means followed by the same letter within a column are not significantly different at $p > 0.05$.

DISCUSSION

The soil of the study area is basically sandy loam and acidic with pH of 4.1, 4.2 before the experiment commenced as observed by Oyebamiji

et al. (2017b). Plots amended with *A. lebbeck* biomass performed better as it contain higher average N and C contents and lower average C: N which aided its decomposition than *P. biglobosa* as confirmed by Oyebamiji et al. (2017a). Over 56

% of N in the litter bags were decomposed during the first two weeks of incubation for the two biomass species. Thereafter, the N release in the remaining undecomposed litter generally increased with time for the two biomass.

The differences in decomposition and N release between biomass of *A. lebbeck* and *P. biglobosa* tree species could be interpreted to be caused by the amount of initial N concentration and C: N ratios contained in the tissue of these plant materials. Meanwhile, *A. lebbeck* leafy biomass that had significantly higher N concentration and lower C: N ratio than *P. biglobosa* decomposed and released N faster than *P. biglobosa* over the entire 10 weeks of research investigation and aligned with the results of other researchers that N content and C: N ratio serve as relevant bases for decomposition and N release study (Santonja et al., 2015).

It was noted that *P. biglobosa* contained higher level of polyphenol which have been confirmed and reported by other researchers to inhibit microbial activities, thereby slowing down the rate of decomposition and N release (Mafongoya et al., 1998). Therefore, it is important to note that decomposition and nutrient release are governed by the chemical composition of the plant materials. The total N uptake in maize had better performance in *A. lebbeck* amended plots than in *P. biglobosa* plots, this was possible as result of its ability to decompose and mineralize faster based on mineral contents inherent in the leafy biomass (Bisht et al., 2014; Oyebamiji et al., 2017a).

CONCLUSIONS

This study revealed the appreciable N released from decomposed biomass of both *A. lebbeck* and *P. biglobosa* tree species. The differences in decomposition and nitrogen release patterns between *A. lebbeck* and *P. biglobosa* biomass was determined by the amount of initial N concentration and C: N ratios which are contained in the leaves of these plant materials. *A. lebbeck* leafy biomass decomposed and released nitrogen faster and was significantly higher in N and lower C: N ratio than *P. biglobosa*. It was also noted that *P. biglobosa* contained high level of polyphenol compared with *A. lebbeck*, hence, slower rate of decomposition and N release. The total N uptake by maize crop increased rapidly between 4-6 WAP, and the impact was obvious in plots amended with *A. lebbeck* biomass compare to *P. biglobosa* amended plots.

REFERENCES

- Akinnifesi FK, Chirwa PW, Ajayi OC, Sileshi G, Matakala P, Kwesiga FR, Harawa H. and Makumba W. Contributions of agroforestry research to livelihood of smallholder farmers in Southern Africa: 1. Taking stock of the adaptation, adoption and impact of fertilizer tree options, Journal of Agriculture, v. 3, p.58–75, 2008.
- Allison LE. Organic carbon. In: Black CA. (ed.) Methods of Soil Analysis Part 2. Chemical and Microbiological Properties. American Society Agronomy, Madison, Wisconsin. p. 1376-1378, 1965.
- Anderson JM. Ingram JS. Tropical Soil Biology and Fertility, A Handbook of methods. CAB International, Wallingford. p. 45-49, 1993.
- Bationo A, Waswa BS. New challenges and opportunities for integrated soil fertility management in Africa. In Innovation as Key to the Green Revolution in Africa. Exploring the Scientific Facts, Vol 1 (Eds Bationo A, Waswa B, Okeyo JM, Maina, F, Kihara J). New York, NY: Springer, Science +Business Media p. 1, 2011.
- Bisht VK, Nautiyal BP, Kuniyal CP, Prasad P, Sundriyal RC. Litter Production, Decomposition, and Nutrient Release in Subalpine Forest Communities of the Northwest Himalaya. Journal of Ecosystems, v. 2014, p. 1-13, 2014.
- Biswas M, Islam N, Islam S, Ahmed M. Seedling raising methods for Production of Transplanted Maize. International Journal of Sustainable Crop Production, v. 4, n. 2, p. 6-13, 2009.
- Black CA. Methods of Soil Analysis II. Chemical and Microbiological Properties. Madison Wisconsin. American Society of Agronomy, p. 152, 1965.
- Brandstreet RD. Kjeldahl method for organic N. Academic Press. London. p. 85, 1965.
- Bray RH, Kurtz LT Determination of total organic and available form of P in soil. Soil Science, v. 59, p. 39-45, 1945.
- Bremner JM. Total nitrogen. In Black CA. (ed.) Methods of Soil Analysis part 2: Chemical and Microbiological Properties. American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin. p. 1149-1178, 1965.
- Dorich RA, Nelson DW. Evaluation of manual cadmium reduction methods for determination of nitrate in potassium chloride extracts of soil. Soil Science Society of America Journal, v. 48, p. 72-75, 1984.
- Duncan DB. Multiple Range and Multiple F- test. Biometrics. v. 11, p. 1-42, 1955.
- FAO 2014. Faostat. Retrieved September 23, 2014 from <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>
- Giashuddin MM, Garrity DP, Aragon ML. Weight loss, nitrogen content changes, and nitrogen release during decomposition of legume tree leaves on and in the soil. Nitrogen Fixing Tree Research Reports, v. 2, p. 43–50, 1993.
- Hagerman A. Extraction of tannin from fresh and preserved leaves. Journal of Chemical Ecology, v. 2, n. 2, p. 95-121, 1988.
- Hattenschwiler S, Tiunov A, Scheu S. Biodiversity and litter decomposition in terrestrial ecosystems. Annual Review of

- Ecology and Evolution, v. 36, p.191-218, 2005.
<http://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.36.112904.151932>
- Hussaini MA, Ogunlela VB, Ramalan AA, Falaki AM. Mineral composition of dry season maize (*Zea mays* L.) in response to varying levels of nitrogen phosphorus and irrigation at Kadawa, Nigeria. World Journal of Agriculture Sciences, v. 4, n. 6, p. 775-780, 2008.
- Jama B, Zeila A. Agroforestry in the drylands of eastern Africa: A call for action. ICRAF Working Paper – v. 1, 2005.
- Koorem K, Price JN, Moora M. Species-specific effects of woody litter on seedling emergence and growth of herbaceous plants. PLoS ONE, v. 6, n.10, 2011.
<http://doi.org/10.1371/journal.pone.0026505>
- Mugwe J, Mugendi D, Mucheru-Muna M, Merckx R, Chianu J, Vanlauwe B. Determinants of the decision to adopt integrated soil fertility management practices by smallholder farmers in the Central highlands of Kenya. Experimental Agriculture, v. 45, p. 61-75, 2009.
- Murphy J, Riley JR. A modified single solution method for the determination of P in natural waters. Annals of Chemistry Acta, v. 27, p. 31-36, 1962.
- Mweta DE, Akinnifesi FK, Saka JDK, Makumba W, Chokotho N. Green manure from prunings and mineral fertilizer affect phosphorus adsorption and uptake by maize crop in a gliricidia maize intercropping, Journal of Science Resources Essays, v. 2, p. 446-453, 2007.
- Osuji GE, Okon MA, Chukwuma MC, Nwarie II. Infiltration characteristics of soils under selected land use practices in Owerri, Southeastern Nigeria. World Journal of Agricultural Sciences, v. 6, n. 3, p. 322-326, 2010.
- Oyebamiji NA, Aduradola AM. Effect of fertilization on maize (*Zea mays* L.) shelling percentage. Journal of Forestry Research and Management, v. 15, n. 1, p.1-12, 2018. ISSN 0189-8418.
- Oyebamiji NA, Babalola OA, Aduradola AM. Decomposition and Nitrogen Release Patterns of *Parkia biglobosa* and *Albizia lebbek* Leaves with Nitrogen Fertilizer for Maize Production in Sudan Savanna Alfisol of Nigeria. Journal of Tropical Forestry and Environment, v. 7, n. 1, p. 54-64, 2017a.
- Oyebamiji NA, Adesoji AG, Aduradola AM. Influence of Leguminous Trees Biomass and Nitrogen Fertilizer on Growth and Yield of Maize. Journal of Agriculture and Environment, v. 12, n. 2, p. 119-127, 2016.
- Oyebamiji NA, Jamala GY, Adesoji AG. Soil Chemical properties as influenced by incorporated leafy biomass and nitrogen fertilizer in soil with maize (*Zea mays* L.) in a semi-arid environment, Fudma-Journal of Agriculture and Agricultural Technology, v. 3, n. 1, p. 93-103, 2017b.
- Oyebamiji NA, Ojekunle OO, Aduradola AM. Utilization of tree leafy biomass as a complement to nitrogen fertilizers for increased dry matter production of maize. Proceedings of the 42nd Annual Conference of the Forestry Association of Nigeria (FAN) held in Ibadan between 23rd – 28th November, 2020. p. 449-507, 2020.
- Oyebamiji NA, Oladaye AO, Ogundijo DS. Influence of Leafy Biomass Transfer of Agroforestry Trees with Nitrogen Fertilizer on Maize Stover Yield in Makera, Nigeria. Journal of Research in Forestry, Wildlife and Environment, v. 9, 4, p. 66-75, 2017c.
- Parkinson JA, Allen SE. A wet oxidation procedure suitable for the determination of nitrogen and mineral nutrients in biological materials. Communication Soil Science Plant Analysis, v. 6, p. 1-11, 1975.
- Rosenstock TS, Tully KL, Neufeldt H, Verchot LV. Agroforestry with N₂-fixing trees: sustainable development's friend or foe? Current Opinion in Environmental Sustainability, v. 6, p. 15-21, 2014.
<http://doi.org/10.1016/j.cosust.2013.09.001>
- Santonja M, Baldy V, Fernandez C, Balesdent J, Gauquelin T. Potential shift in plant communities with climate change: Outcome on litter decomposition and nutrient release in a Mediterranean Oak forest. Ecosystems, v. 18, p. 1253-1268, 2015. <http://doi.org/10.1007/s10021-015-9896-3>
- SAS. Statistical Analysis Systems. SAS release 9.1 for windows, SAS Institute. Cary, N.C USA. p. 949, 2003.
- Tukur R, Adamu GK, Abdulrahid I, Rabi'u M. Indigenous trees inventory and their multipurpose uses in Dutsin-Ma area, Katsina State. European Scientific Journal, v. 9, n. 11, p. 288-300, 2013.
- Vanlauwe B, Bationo A, Chianu J, Giller KE, Merckx R, Mokwunye U, Ohiokpehai, O, Pypers P, Tabo R, Shepherd KD, Smaling EMA, Woomer PL, Sanginga N. Integrated soil fertility management. Operational definition and consequences for implementation and dissemination. Outlook on Agriculture, v. 39, p. 17-24, 2010.