

Workshop de **Ciências** da **APG/ESALQ:**



“O despertar profissional”

Marcia Eugenia Amaral Carvalho

Naiara Célida dos Santos de Souza

Natalia Naranjo-Guevara

Yuri Caires Ramos

Layanne Batista Souza

Raquel Alves de Oliveira

Mônica Regina Franco



**Piracicaba
2015**

ANAIS DO I WORKSHOP DE CIÊNCIAS DA APG/ESALQ: “O
DESPERTAR PROFISSIONAL”

Editores

Marcia Eugenia Amaral Carvalho

Mestre em Ciências (Fisiologia e Bioquímica de Plantas)

Doutoranda em Ciências (Genética e Melhoramento de Plantas)

Naiara Célida dos Santos de Souza

Mestre em Agronomia (Solos e Nutrição de Plantas)

Doutoranda em Ciências (Fisiologia e Bioquímica de Plantas)

Natalia Naranjo-Guevara

Mestre em Agronomia (Entomologia Agrícola)

Doutoranda em Ciências (Entomologia)

Yuri Caires Ramos

Mestre em Agronomia (Produção Vegetal)

Doutorando em Ciências (Fitotecnia)

Layanne Batista Souza

Mestre em Ciências (Biologia na Agricultura)

Doutorando em Ciências (Genética e Melhoramento de Plantas)

Raquel Alves de Oliveira

Mestranda em Ciências (Ecologia Aplicada)

Mônica Regina Franco

Mestre em Ciências (Genética e Melhoramento de Plantas)

Doutoranda em Ciências (Genética e Melhoramento de Plantas)

Piracicaba

2015

FICHA CATALOGRÁFICA

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação DIVISÃO DE BIBLIOTECA - DIBD/ESALQ/USP

Workshop de Ciências da APG/ESALQ: O Despertar Profissional (1 : 2014 : Piracicaba, SP)
Anais do I Workshop de Ciências da APG/ESALQ: O Despertar Profissional ... [recurso eletrônico] / edição de Marcia Eugenia Amaral Carvalho ... [et al.]. - - Piracicaba: ESALQ/USP, 2015.

141 p. : il

Modo de acesso: World Wide Web

ISBN: 978-85-86481-35-2

1. Ciências agrárias 2. Congressos 3. ESALQ 4. Pós-Graduação I. Carvalho, M.E.A., ed. II. Souza, N. C. dos S. de., ed. III. Naranjo-Guevara, N., ed. IV. Ramos, Y.C., ed. V. Souza, L.B., ed. VI. Oliveira, R.A. de., ed. VII. Franco, M.R., ed. VIII. Título

CDD 630.711
W926a

SUMÁRIO

CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS	5
Capítulo 1. Atividade antioxidante e aplicação de extratos vegetais em alimentos	6
Capítulo 2. Biofilmes bacterianos na indústria de alimentos	18
Capítulo 3. Projeto Hortiescolha – Apoio à tomada de decisão na escolha, aquisição, controle de qualidade e utilização de frutas e hortaliças <i>in natura</i>	32
ENGENHARIA DE BIOSISTEMAS	39
Capítulo 4. Tecnologias aplicadas à Engenharia de Biosistemas	40
ESTATÍSTICA E EXPERIMENTAÇÃO AGRONÔMICA	51
Capítulo 5. Análise de experimentos utilizando a interface Rstudio do software R	52
FISIOLOGIA E BIOQUÍMICA DE PLANTAS	63
Capítulo 6. Biotecnologia Vegetal.....	64
Capítulo 7. Uso de mutantes e transgênicos de tomateiro no estudo de fisiologia vegetal.....	77
FITOTECNIA	90
Capítulo 8. Fruticultura: biotecnologia, propagação e pós-colheita.....	91
Capítulo 9. Sementes: os avanços da tecnologia	102
GENÉTICA E MELHORAMENTO DE PLANTAS	105
Capítulo 10. Genética de populações	106
Capítulo 11. Genética e microbiologia aplicadas ao estudo de doenças em plantas: o carvão da cana-de-açúcar e o fungo <i>Sporisorium scitamineum</i>	116
MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA	124
Capítulo 12. Microbiologia agrícola: das bases biológicas à biotecnologia.....	125
SOBRE OS AUTORES DOS CAPÍTULOS	137

PREFÁCIO

Em homenagem aos 50 anos da Pós-Graduação da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” da Universidade de São Paulo (ESALQ/USP), a Associação dos Pós-Graduandos (APG-ESALQ) realizou o I Workshop de Ciências da APG/ESALQ: “O despertar profissional”.

O objetivo deste workshop foi promover o intercâmbio científico e acadêmico entre os alunos de graduação e pós-graduação das diferentes universidades, por meio de palestras e minicursos ministrados pelos pós-graduandos dos diversos Programas de Pós-Graduação (PPG) do *campus*, tais como: Ciência Animal e Pastagens, Ecologia Aplicada, Engenharia de Sistemas Agrícolas, Entomologia, Estatística e Experimentação Agronômica, Fisiologia e Bioquímica de Plantas, Fitopatologia, Fitotecnia, Genética e Melhoramento de Plantas, Microbiologia Agrícola, Recursos Florestais e Solos e Nutrição de Plantas.

Para que um evento como este se concretizasse e tal objetivo fosse alcançado, foi necessário o auxílio de muitas pessoas; por isso, expressamos nossos agradecimentos a todos os pós-graduandos participantes, ao Serviço de Pós-Graduação (SVPG) e à diretoria do *campus* “Luiz de Queiroz”. A seguir serão descritas as palestras proferidas e os minicursos ministrados durante os três dias (28 a 30 de julho de 2014) do I Workshop de Ciências da APG/ESALQ: “O despertar profissional”.

APG-ESALQ
Gestão 2013-2014

Piracicaba
2015

Ciência e Tecnologia de Alimentos

Atividade antioxidante e aplicação de extratos vegetais em alimentos

Thalita Riquelme Augusto

José Guilherme Prado Martin

Manoel Divino da Matta Junior

Thais Maria Ferreira de Souza Vieira

1. Introdução

Na deterioração oxidativa, que pode ocorrer durante o processamento e armazenamento de alimentos, há a formação de compostos com odor e sabor indesejáveis, sendo os responsáveis pela perda da qualidade sensorial e nutricional, além de serem potencialmente tóxicos à saúde de quem os consome (Zainol et al., 2003).

Com o objetivo de controlar a oxidação lipídica, visando à qualidade e aumento do tempo de vida de prateleira dos alimentos, várias medidas podem ser tomadas, como controlar as condições durante o processamento e armazenamento, reduzir o contato do alimento com metais, oxigênio, luz e incorporar compostos com ação antioxidante. De acordo com Gutteridge (1994), um antioxidante é definido como “qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações em relação à de um substrato oxidável, retarda significativamente ou impede a oxidação do referido substrato”, e pode ser uma molécula presente em alimentos ou em materiais biológicos, incluindo hidratos de carbono, DNA, lipídios e proteínas (Wanasundara; Sahidi, 2005).

Os antioxidantes têm origem sintética ou natural. Diversos estudos elucidam que em elevadas concentrações os compostos sintéticos podem provocar danos à saúde; por esta razão, ao longo dos anos vem aumentando o interesse no estudo e aplicação de antioxidantes oriundos de fontes naturais (Pokorny, 1991; Roesler et al., 2007; Melo et al., 2008; Oliveira et al., 2009; Gülçin, 2010; Brewer, 2011; Williams et al., 2011; Martinez-Saez et al., 2014). Dentre os mais conhecidos, encontram-se os compostos fenólicos, carotenoides e vitamina C; suas potenciais fontes são grãos e sementes oleaginosas, sementes de frutas cítricas, frutas, especiarias, dentre outras (NAGEM et al., 1992; Pereira, 1996; Kulisic et al., 2004; Suwalsky et al., 2007).

No entanto, não apenas a identificação das fontes destes compostos é importante; a escolha correta da metodologia empregada para sua obtenção – que envolvem a extração, purificação e identificação de sua atividade – é imprescindível para que seja possível o emprego dessas substâncias como aditivos em alimentos, fármacos e cosméticos (Ramirez, 2008).

2. Antioxidantes

O termo “antioxidante” refere-se a um composto com capacidade de retardar a oxidação de lípideos ou de moléculas por meio da inibição da etapa de iniciação ou propagação da reação oxidativa em cadeia (Velioglu et al., 1998). Segundo Campbell (2000), o antioxidante é um composto redutor, facilmente oxidado, que evita que outras substâncias se oxidem. Podem atuar de diferentes maneiras, impedindo a formação de radicais livres, inibindo as reações em cadeia com o ferro e o cobre, ou evitando danos oxidativos por meio da interceptação de radicais livres, impedindo assim que os mesmos reajam com lipídios, aminoácidos, duplas ligações de ácidos graxos poliinsaturados e com as bases de DNA (Melo, 2010). Por apresentarem diversos mecanismos de ação, são largamente utilizados na indústria alimentícia (Scherer; Godoy, 2009).

Seu uso e atividade são muito estudados, uma vez que para serem adicionados aos alimentos devem ser atóxicos, ativos em baixas concentrações (0,001 a 0,01%) (BAILEY, 1996), se concentrarem na porção lipídica do alimento, resistirem às condições de processamento e ainda contribuírem com a estabilidade do produto final (Hras et al., 2000).

Estes compostos podem ser de origem sintética ou natural, sendo os sintéticos os mais empregados nos alimentos por fatores ligados a sua eficácia, energia de ativação, constantes de velocidade, potencial de óxido-redução, custo e solubilidade já conhecida (Coneglian et al., 2011). Os compostos sintéticos mais utilizados pela indústria de alimentos são o butil hidroxianisol (BHA), o butil hidroxitolueno (BHT) e o terc-butil-hidroquinona (TBHQ). Todos estes compostos apresentam atividade comprovada e alta estabilidade; entretanto, o uso de alguns deles é restrito em muitos países devido sua potencial toxicidade e/ou mutagênese em altas concentrações (Nakatani, 1996; Mattea et al., 2004).

Como resultado dessas restrições, o interesse por antioxidantes de fontes naturais aumentou, surgindo assim diversos estudos acerca da capacidade antioxidante de legumes, frutas, sementes, madeiras, cascas, raízes, folhas, temperos e ervas (Velioglu et al., 1998; Rubilar et al., 2006; Hossain; Rahman, 2011; Mussatto et al., 2011; Ahmed et al., 2014).

Em geral, os antioxidantes naturais podem ser representados por compostos fenólicos (tocoferóis, flavonoides, antocianinas, taninos, lignanas, cumarinas e ácidos fenólicos), compostos de azoto (alcaloides e derivados de clorofila, aminoácidos e aminas), ou carotenoides, bem como ácido ascórbico (Larson, 1988; Hudson, 1990; Hall; Cuppett, 1997). Em particular, os flavonoides, além de atuarem como agentes redutores, inibidores de radicais livres, quelantes ou sequestrantes de oxigênio e desativadores de metais pró-oxidantes (Rice-Evans et al., 1995; Kähkönen et al., 1999), exibem efeitos biológicos, como antibacteriano, antiviral, anti-inflamatório, antialérgico, antitrombótico e vasodilatador (Cook; Sammon, 1996; Martin et al., 2012).

Entretanto não basta apenas conhecer quais as fontes de antioxidantes naturais, é necessária a realização de estudos de estabilidade, solubilidade, custo, além de testes toxicológicos com o objetivo de verificar se este composto pode ser adicionado no alimento, se ele irá realmente atuar como protetor contra as reações de oxidação e se ele não irá provocar danos à saúde do consumidor.

2.1. Métodos de extração e avaliação da atividade antioxidante

De acordo com Becker et al. (2004), o procedimento para aplicação de um composto com ação antioxidante de origem natural em alimentos pode seguir os passos indicados na Figura 1.

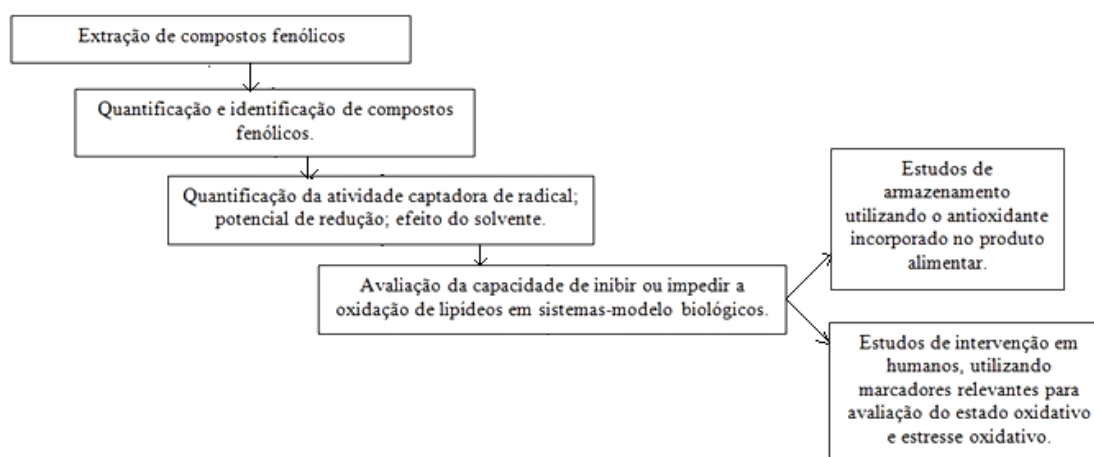


Figura 1. Procedimento para aplicação de compostos antioxidantes em alimentos. Fonte: Adaptado de Becker et al. (2004).

Atualmente, podem ser encontradas diversas metodologias que visam à extração de compostos fenólicos de fontes vegetais. Pesquisas têm se direcionado para diferentes tipos de extração com o objetivo de comparar os resultados obtidos e assim desenvolver a melhor alternativa para sua aplicação em alimentos (Andreo; Jorge, 2006).

É necessário ressaltar que diversos fatores podem influenciar na eficiência da extração sólido-líquido, como a composição da solução extratora, a polaridade do solvente, o tempo de extração, a temperatura, o pH, a relação sólido/líquido e o tamanho das partículas (Cacace; Mazza, 2002; Castañeda-Ovando et al., 2009; Pompeu et al., 2009); sendo que todas estas variáveis deverão ser consideradas no momento da seleção do método de extração dos compostos fenólicos. Dentre as metodologias mais tradicionais, estão os métodos que utilizam solventes orgânicos como água, etanol, metanol, acetona, éter e hexano (Rehman et al., 2004).

Sob o ponto de vista químico, não é possível selecionar somente uma metodologia que seja a mais eficiente para a extração desses compostos, pelo fato de que o sucesso da extração é influenciado por uma vasta gama de fatores, como a natureza do vegetal, o solvente empregado na extração, o tamanho das partículas, o tempo e a temperatura de extração (Shahidi; Naczk, 2003).

A escolha correta do solvente é fundamental, uma vez que o mesmo deverá ser capaz de extrair a maior quantidade possível dos compostos de interesse presentes na amostra. Segundo Franco et al. (2008), é importante observar que o rendimento da extração e a atividade antioxidante dos extratos estão intimamente relacionados à

polaridade do solvente empregado, determinando os compostos extraídos, em termos qualitativos e quantitativos. Os maiores rendimentos geralmente são obtidos com etanol, metanol, acetona e suas respectivas soluções. O emprego da combinação etanol:água é preferido por apresentar baixa toxicidade e elevado rendimento de extração, além da possibilidade de modular a polaridade do solvente utilizando etanol:água em diferentes proporções.

Segundo Andreo e Jorge (2006), a temperatura também é considerada um fator crucial a ser controlado; isso porque a estabilidade de compostos fenólicos durante a produção dos extratos pode ser afetada. Assim, temperaturas muito elevadas são consideradas as maiores causadoras da redução do conteúdo de polifenóis. Tal fato ocorre porque os fenóis podem se degradar sob altas temperaturas, e, em alguns casos, reagir com outros componentes, impedindo assim sua extração (Moure et al., 2001).

Outro fator importante a ser considerado é o tempo de extração, que pode variar de 1 minuto a 24 horas, sendo que longos períodos aumentam a probabilidade da oxidação dos compostos fenólicos (Shaidi; Nacz, 1995). Lapornik et al. (2005) analisaram o efeito da temperatura em extratos de resíduos de frutas vermelhas preparados com etanol, metanol e água. Os autores constataram que quanto maior o tempo de extração menor o rendimento de compostos fenólicos nos extratos aquosos, enquanto que nos extratos metanólicos e etanólicos houve um aumento no conteúdo dos mesmos com o avanço do tempo de extração.

Após o processo de extração se faz necessário a verificação da atividade antioxidante dos compostos extraídos. Esta verificação pode se dar pelo uso de metodologias para quantificação e avaliação da capacidade antioxidante dos compostos obtidos. Cabe ressaltar que a atividade antioxidante dos extratos produzidos não depende somente da presença e concentração de compostos fenólicos, mas também da metodologia de extração aplicada (Hernández-Hernández et al., 2009).

2.2. Quantificação de compostos fenólicos totais

Para quantificação dos compostos fenólicos, costuma-se empregar o reagente de *Folin-ciocalteu*. Esta metodologia foi inicialmente desenvolvida por Singleton e Rossi (1965) e posteriormente modificada por vários pesquisadores. Esse reagente consiste em uma solução de íons poliméricos formados a partir de ácidos fosfomolibdicos e

fosfotungsticos que oxidam os fenolatos, reduzindo-os a ácidos, formando um complexo de cor azul Mo-W que pode ser lido em espectrofotômetro a um comprimento de onda de 740 nm.

Apesar do conteúdo de fenólicos totais ser utilizado para estimar a atividade antioxidante, muitas vezes é improvável que ele a represente fielmente (Heinonem et al., 1998; Kähkönen et al., 1999), uma vez que pode sofrer a interferência de vários compostos como mono/dissacarídeos, ácido ascórbico, íons metálicos, ácidos orgânicos, superestimando os resultados obtidos (Stratil et al., 2007). Desta forma, torna-se necessária uma identificação mais detalhada dos compostos fenólicos presentes nos alimentos e que determine de forma fiel sua real atividade.

Os antioxidantes podem ser avaliados por sua habilidade no sequestro de espécies reativas no meio ou quanto à sua eficiência na inibição da peroxidação lipídica (Oliveira et al., 2009). Contudo, apesar da determinação da capacidade antioxidante em alimentos ser de extrema importância, há uma grande variedade de métodos que são utilizados para esta finalidade, mas que não são validados ou padronizados (Giada; Mancini-Filho, 2004), dificultando assim a comparação entre resultados de diferentes estudos.

Dentre os métodos *in vitro* de sequestro de espécie reativa gerada em meio reacional, os mais conhecidos e utilizados são o ABTS (2,2-azino-bis-(3-etil-benzotiazolina-6-ácido sulfônico)) e o DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazil).

2.2.1. DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila)

O método DPPH foi concebido há quase 50 anos por Marsden Blois na Universidade de Stanford (Blois, 1958), utilizando como modelo antioxidante o aminoácido cisteína. Posteriormente, foi modificado por Brand-Williams et al. (1995) e atualmente é um dos mais utilizados para a determinação da capacidade de um composto em capturar radicais livres.

Trata-se de uma metodologia adotada em diferentes laboratórios, por ser rápida, prática e estável (Espin et al., 2000), além de ser altamente reproduzível e recomendada para análise de extrato de frutas (Moon; Shibamoto, 2009), grãos e farelos, vegetais, ervas e óleos de sementes comestíveis, utilizando diferentes solventes como etanol, acetona, metanol e benzeno (Cheng et al., 2006).

O DPPH é um radical de nitrogênio orgânico estável, de coloração violeta, que apresenta absorção máxima na faixa de 515 a 529 nm. A redução do radical DPPH à DPPH₂ é monitorada pelo decréscimo da absorbância durante a reação (Brand-Willians et al., 1995). Na presença de um doador de hidrogênio ou elétron, a intensidade da absorção diminui e a solução com o radical perde sua coloração violeta, tornando-se amarela, de acordo com o número de elétrons capturados (Molyneux, 2004).

A maior desvantagem deste método consiste no uso de diversos solventes como água, metanol, etanol, acetona, éter de petróleo, hexano e diclorometano para o preparo de extratos. Além disso, os resultados do DPPH podem ser apresentados em diferentes unidades, como percentual de atividade antioxidante (Cervato et al., 2000; Prado, 2009), percentual de atividade em relação ao controle (Capecka et al., 2005), percentual de inibição (Erkan et al., 2008; El-Ghorab et al., 2010), micromol de Trolox por grama de amostra (Wojdylo et al., 2007) e pela quantidade necessária de um antioxidante para reduzir a 50% a concentração do DPPH^{*} inicial (E₅₀) (Kosar et al., 2005; Hinneburg et al., 2006), dificultando a comparação dos resultados da atividade antioxidante com os relatados em outras pesquisas.

2.2.2. ABTS (2,2-azino-bis-(3-etil-benzotiazolina-6-ácido sulfônico)

Segundo Re et al. (1999), o método ABTS baseia-se na formação do ABTS⁺, por meio da redução do ABTS pelo persulfato de potássio. É um composto solúvel tanto em água quanto em solventes orgânicos, permitindo que a análise seja feita em amostras hidrofílicas e lipofílicas (Arnao, 2000).

Com a formação do radical ABTS, a solução apresenta uma coloração azul esverdeada com absorção máxima nos comprimentos de onda de 415, 645, 734 e 815 nm. A atividade antioxidante é determinada pelo descoloramento do ABTS, que ocorre à medida que o radical é reduzido, sendo os resultados obtidos expressos em capacidade antioxidante em equivalentes de Trolox (TEAC), que é um padrão submetido às mesmas condições de análise do antioxidante (Re et al., 1999; Dorman; Hiltunen, 2004; Murcia et al., 2004; Pellegrini et al., 2006; Mariutti et al., 2008; Shibamoto, 2009).

Esta metodologia é aplicável ao estudo de antioxidantes hidrossolúveis e lipossolúveis, compostos puros e extratos vegetais (Tachakittirungrod et al., 2007; Sun et al., 2007; Melo et al., 2008; Duarte-Almeida et al., 2006; Rufino et al., 2007).

3. Considerações finais

A oxidação lipídica é considerada uma das principais causas da perda de qualidade nos alimentos. Com o intuito de retardá-la, faz-se necessário o uso de substâncias com poder antioxidante. Devido à crescente preocupação com a saúde, há uma forte tendência de uso de compostos oriundos de fontes naturais em substituição dos antioxidantes sintéticos, amplamente utilizados.

Frutas, legumes, verduras, especiarias, grãos, entre outros materiais, possuem compostos com atividade antioxidante, oferecendo ação protetora efetiva contra os processos oxidativos que ocorrem nos alimentos. É preciso deixar claro que apesar da existência de inúmeros métodos de extração e avaliação da atividade antioxidante destes compostos, todos apresentam vantagens e desvantagens, por isso é imprescindível analisar criteriosamente e considerar todos os fatores importantes no momento da seleção da técnica analítica para que os resultados obtidos sejam confiáveis.

Apesar das inúmeras pesquisas nessa área, ainda são necessários estudos complementares que esclareçam qual a melhor metodologia para a obtenção destes compostos e como adicioná-los nos alimentos sem modificar drasticamente as características do produto, para que assim a demanda por alimentos livres de conservantes sintéticos seja atendida pela indústria de alimentos.

Referências

- ANDREO, D.; JORGE, N. Antioxidantes naturais: técnicas de extração. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, 24: 319-336, 2006.
- AHMED, F.; FANNING, K.; NETZEL, M.; TURNER, W.; LI, Y.; SCHENK. Profiling of carotenoids and antioxidant capacity of microalgae from subtropical coastal and brackish waters. **Food Chemistry**, 165: 300-306, 2014.
- ARNAO, M.B. Some methodological problems in determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. **Trends in Food and Technology**, 11: 419-421, 2000.
- BAILEY, A.E. **Bailey's industrial oil and fat products**. 5. ed. New York: John Wiley, 1996. 560 p.
- BECKER, E.M.; NISSEN, L.R.; SKIBSTED, L.H. Antioxidant evaluation protocols: food quality or health effects. **European Food Research and Technology**, 219: 561-571, 2004.
- BLOIS, M.S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. **Nature**, 181: 1119-1200, 1958.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, 28: 25-30, 1995.
- BREWER, M.S. Natural antioxidants: sources, compounds, mechanisms of action, and potential applications. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, 10: 221-247, 2011.
- CACACE, J.E.; MAZZA, G. Extraction of anthocyanins and other phenolics from black currants with sulfured water. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 50: 5939-5946, 2002.

- CAMPBELL, M.K. **Bioquímica**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed Editora, 2000. 752 p.
- CAPECKA, E.; MARECZEK, A.; LEJA, M. Antioxidant activity of fresh and dry herbs of some *Lamiaceae* species. **Food Chemistry**, 93: 223-226, 2005.
- CASTAÑEDA-OVANDO, A.; PACHECO-HERNÁNDEZ, M.L.; PÁEZ-HERNÁNDEZ, M.E.; RODRÍGUEZ, J.A.; GALÁN-VIDAL, C.A. Chemical studies of anthocyanins: a review. **Food Chemistry**, 113: 859-871, 2009.
- CERVATO, G.; CARABELLI, M.; GERVASIO, S.; CITTERA, A.; CAZZOLA, R.; CESTARO, B. Antioxidant properties of orégano (*Origanum vulgare*) leaf extracts. **Journal of Food Biochemistry**, 24: 453-465, 2000.
- CHENG, Z.; MOORE, J.; YU, L. High-throughput relative DPPH radical scavenging capacity assay. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 54: 7429-7436, 2006.
- CONEGLIAN, S.M.; LIMA, B.S.; SILVA, L.G.; LAZZARI, C.M.; CASTAÑEDA-SERRANO, R.D.; TONELLO, C.L. Utilização de antioxidantes nas rações. **Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia**, 5: 1-33, 2011.
- COOK, N.C.; SAMMAN, S. Flavonoids: chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. **The Journal of Nutrition and Biochemistry**, 7: 66-76, 1996.
- DORMAN, H.J.D.; HILTUNEN, R. Fe(III) reductive and free radical-scavenging properties of summer savory (*Satureja hortensis* L.) extract and subfractions. **Food Chemistry**, 88: 193-199, 2004.
- DUARTE-ALMEIDA, J.M.; SANTOS, R.J.; GENOVESE, M.I.; LAJOLO, F.M. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β -caroteno/ácido linoleico e método de sequestro de radicais DPPH. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 26: 446-452, 2006.
- EL-GHORAB, A.H.; NAUMAN, M.; ANJUM, F.M.; HUSSAIN, S.; NADEEM, M. A comparative study on chemical composition and antioxidant activity of ginger (*Zingiber officinale*) and cumin (*Cuminum cyminum*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 58: 8231-8237, 2010.
- ERKAN, N.; AYRANCI, G.; AYRANCI, E. Antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.), extract, blackseed (*Nigella sativa* L.) essential oil, carnosic acid, rosmarinic acid and sesamol. **Food Chemistry**, 110: 76-82, 2008.
- ESPIN, J.C.; SOLER-RIVAS, C.; WICHERS, H.J.; GARCÍA-VIGUERA, C. Anthocyanin-based natural colorants: a new source of antiradical activity for foodstuff. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 48: 1588-1592, 2000.
- FRANCO, C.O.; FABRI, E.G.; BARREIRO NETO, M.; MANFIOLLI, M.H.; HARDER, M.N.C.; RUCKER, N.C.A. **Urucum**: sistema de produção para o Brasil. João Pessoa: EMEPA-PB, 2008. 112 p.
- FRANKEL, E.; HUANG, S.-W.; PRIOR, E.; AESCHBACH, R. Evaluation of antioxidant activity of rosemary extracts, carnosol and carnosic acid in bulk vegetable oils and fish oil and their emulsions. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 72: 201-208, 1996.
- GIADA, M.L.R.; MANCINI-FILHO, J. Avaliação da atividade antioxidante *in vitro* de compostos fenólicos de alimentos. **Nutrire**, 28: 91-107, 2004.
- GÜLÇİN, I. Antioxidant properties of resveratrol: A structure-activity insight. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, 11: 210-218, 2010.
- GUTTERIDGE, J.M.C. Biological origin of free radicals and mechanisms of antioxidant protection. **Chemico-Biological Interactions**, 9: 133-140, 1994.
- HALL, C.A.; CUPPET, S.L. Structure-activities of natural antioxidants. In: ARUOMA, O.I.; CUPPET, S.L. (Ed.). **Antioxidant methodology in vivo and in vitro concepts**. Champaign: III, AOCS Press, 1997. p. 2-29.
- HEINONEN, M.; LEHTONEN, P.J.; HOPIA, A. Antioxidative activity of berry and fruit wines and liquor. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 48: 25-31, 1998.
- HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ, E.; PONCE-ALQUICIRA, E.; JARAMILLO-FLORES, M.E.; LEGARRETA, G.I. Antioxidant effect rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) and oregano (*Origanum vulgare* L.) extracts on TBARS and colour of model raw pork batters. **Meat Science**, 81: 410-417, 2009.

- HINNEBURG, I.; DORMAN, H.J.D.; HILTUNEN, R. Antioxidant activities of extracts from selected culinary herbs and spices. **Food Chemistry**, 97: 122–129, 2006.
- HOSSAIN, M.A.; RAHMAN, S.M.M. Total phenolics, flavonoids and antioxidant activity of tropical fruit pineapple. **Food Research International**, 44: 672-676, 2011.
- HRAS, A.R.; HADOLIN, M.; KNEZ, Z.; BAUMAN, D. Comparison of antioxidative and synergistic effects of Rosemary extract with α -tocopherol, ascorbyl palmitate and citric acid in sunflower oil. **Food Chemistry**, 71: 229-233, 2000.
- HUDSON, B.J.F. **Food antioxidants**. London: Elsevier Applied Science, 1990. 317 p.
- KÄHKÖNEN, M.P.; HOPIA, A.I.; VUORELA, H.J.; JUSSI-PEKKA RAUHA, J.P.; PIHLAJA, K.; KUJALA, T.S.; HEINONEN, M. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 47: 3954–3962, 1999.
- KOSAR, M.; DORMAN, H.J.D.; HILTUNEN, R. Effect of an acid treatment on the phytochemical and antioxidant characteristics of extracts from selected *Lamiaceae* species. **Food Chemistry**, 91: 525–533, 2005.
- KULISIC, T.; RADONIC, A.; KATALINIC, V.; MILOS, M. Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. **Food Chemistry**, 85: 633-640, 2004.
- LAPORNIK, B.; PROSEK, M.; WONDRA, A.G. Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. **Journal of Food Engineering**, 71: 214–222, 2005.
- LARSON, R.A. The antioxidants of higher plants. **Phytochemistry**, 27: 969-978, 1988.
- MARIUTTI, L.R.B.; BARRETO, G.P.M.; BRAGAGNOLO, N.; MERCADANTE, A.Z. Free radical scavenging activity of ethanolic extracts from herbs and spices commercialized in Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, 51: 1225-1232, 2008.
- MARTIN, J.G.P.; PORTO, E.; CORRÊIA, C.B.; ALENCAR, S.M.; GLORIA, E.M.; CABRAL, I.S.R.; AQUINO, L.M. Antimicrobial potential and chemical composition of agro-industrial wastes. **Journal of Natural Products**, 5: 27-36, 2012.
- MARTINEZ-SAEZ, N.; ULLATE, M.; MARTIN-CABREJAS, M.A.; MASTORELL, P.; GENOVÉS, S.; RAMON, D.; CASTILLO, M.D. A novel antioxidant beverage for body weight control based on coffee silverskin. **Food Chemistry**, 150: 227-234, 2014.
- MATTEA, F.; CARDARELLI, D.A.; DAGHERO, J.D.; MATTEA, M.A. Natural antioxidants obtained with supercritical CO₂. In: ENCONTRO BRASILEIRO DE FLUIDOS SUPERCRÍTICOS, 1., 2004, Florianópolis. **Caderno de resumos...** Florianópolis: EQA/CTC, UFSC, 2004. p. 70.
- MELO, P. **Composição química e atividade biológica de resíduos agroindustriais**. 2010. 100 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.
- MELO, E.A.; MACIEL, M.I.S.; LIMA, V.L.A.G.; NASCIMENTO, R.J. Capacidade antioxidante de frutas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, 44: 193-201, 2008.
- MOLYNEUX, P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant. **Songklanakarin Journal of Science and Technology**, 26: 211-219, 2004.
- MOON, J.K.; SHIBAMOTO, T. Antioxidant assays for plant and food components. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 57: 1655-1666, 2009.
- MOURE, A.; CRUZ, J.M.; FRANCO, D.; DOMINGUEZ, J.M.; SINEIRO, J.; DOMINGUEZ, H.; NUÑEZ, M.J.; PARAJÓ, J.C. Natural antioxidants from residual sources. **Food Chemistry**, 72: 145-171, 2001.
- MURCIA, M.; EGEA, I.; ROMOJARO, F.; PARRAS, P.; JIMENEZ, A.; MARTINEZ-TOME, M. Antioxidant evaluation in dessert spices compared with common food additives. Influence of irradiation procedure. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 52: 1872–1881, 2004.
- MUSSATTO, S.I.; BALLESTEROS, L.F.; MARTINS, S.; TEIXEIRA, J.A. Extraction of antioxidant phenolic compounds from spent coffee grounds. **Separation and Purification Technology**, 83: 173-179, 2011.

- NAGEM, T.J.; ALBUQUERQUE, T.T.O.; MIRANDA, L.C.G. Ácidos fenólicos em cultivares de soja: ação antioxidante. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, 35: 129-138, 1992.
- NAKATANI, N. Antioxidant from spices and herbs. In: SHAIDI, F. (Ed.). **Natural antioxidants: chemistry, health effects and applications**. Newfoundland: AOCS Press, 1996. cap. 4, p. 64-75.
- OLIVEIRA, A.O.; VALENTIM, I. B.; GOULART, M.O.F.; SILVA, C.A.; BECHARA, E.J.H.; TRAVISAN, M.T. S. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Química Nova**, 32: 689-702, 2009.
- PELLEGRINI, N.; SERAFINI, M.; SALVATORE, S.; DELIO, D.; BIANCHI, M.; BRIGHENTI, F. Total antioxidant capacity of spices, dried fruits, nuts, pulses, cereals and sweets consumed in Italy assessed by three different *in vitro* assays. **Molecular Nutrition and Food Research**, 50: 1030-1038, 2006.
- PEREIRA, R.B. **Avaliação da atividade antioxidante de sementes de frutas cítricas**. 1996. 90 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1996.
- POKORNY, J. Natural antioxidants for food use. **Trends in Food & Technology**, 2: 223-227, 1991.
- POMPEU, D.R.; SILVA, E.M.; ROGEZ, H. Optimisation of the solvent extraction of phenolic antioxidants from fruits of *Euterpe oleracea* using response surface methodology. **Bioresource Technology**, 100: 6076-6082, 2009.
- PRADO, A. **Composição fenólica e atividade antioxidante de frutas tropicais**. 2009. 107 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.
- RAMIREZ, M.R. **Análise química e avaliação das atividades biológicas e comportamentais de extratos de frutas ricas em compostos fenólicos** (Mirtilo e Amora-Preta). 2008. 243 p. Tese (Doutor em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.
- RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, 26: 1231-1237, 1999.
- REHMAN, Z.; HABIB, F.; SHAH, W.H. Utilization of potato peels extract as a natural antioxidant in soy bean oil. **Food Chemistry**, 85: 215-220, 2004.
- RICE-EVANS, C.A.; MILLER, N.J.; BOLWELL, P.G.; BRAMLEY, P.M.; PRIDHAM, J.B. The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. **Free Radical Research**, 22: 375-383, 1995.
- ROESLER, R.; MALTA, L.G.; CARRASCO, L.C.; HOLANDA, R.B.; SOUSA, C.A S.; PASTORE, G. M. Atividade antioxidante de frutas do cerrado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27: 53-60, 2007.
- RUBILAR, M.; PINELO, M.; IHL, M.; SCHEUERMANN, E.; SINEIRO, J.; NUÑO EZ, M.J. Murta leaves (*Ugni molinae* Turcz) as a source of antioxidant polyphenols. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, 54: 59–64, 2006.
- RUFINO, M.S.M.; ALVES, R.E.; BRITO, E.S.; MORAIS, S.M.; SAMPAIO, C.G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURACALIXTO, F.D. **Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2007. 4 p. (Comunicado Técnico,128).
- SCHERER, R.; GODOY, H.T. Antioxidant activity index (AAi) by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. **Food Chemistry**, 112: 654-658, 2009.
- SHAI DI, F.; NACZK, M. **Food phenolics: sources, chemistry, effects and applications**. Lancaster: Technomic Publisher, 1995. 331 p.
- SHAI DI, F.; NACZK, M. **Food phenolics: sources, chemistry, effects and applications**. 2. ed. Lancaster: CRC Press, 2003. 405 p.
- SINGLETON, V.L.; ROSSI, J.A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, 16: 144-158, 1965.
- STRATIL, P.; KLEJDUS, B.; KUBÁŇ, V. Determination of phenolic compounds and their antioxidant activity in fruits and cereals. **Talanta**, 71: 1741–1751, 2007.

SUN, T.; POWERS, J.R.; TAND, J. Evaluation of the antioxidant activity of asparagus, broccoli and their juices. **Food Chemistry**, 105: 101-106, 2007.

SUWALSKY, M.; ORELLANA, P.; AVELLO, M.; VILLENA, F. Protective effect of *Ugni molinae* Turcz against oxidative damage of human erythrocytes. **Food and Chemical Toxicology**, 45: 130-135, 2007.

TACHAKITTIRUNGROD, S.; OKONOGLI, S.; CHOWWANAPOONPOHN, S. Study on antioxidant activity of certain plants in Thailand: mechanism of antioxidant action of guava leaf extract. **Food Chemistry**, 103: 381-388, 2007.

VELIOGLU, Y.S.; MAZZA, G.; GAO, L.; OOMAH, B.D. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 46: 4113-4117, 1998.

ZAINOL, M.K.; ABDUL-HAMID, A.; YUSOF, S.; MUSE, R. Antioxidative activity and total phenolic compounds of leaf, root and petiole of four accessions of *Centella asiatica* (L.) urban. **Food Chemistry**, 49: 5165-5170, 2003.

WANASUNDARA, U.N.; SHAHIDI, F. Antioxidants: science, technology, and applications. In: SHAHIDI, F (Ed.). **Bailey's industrial oil and fat products: chemistry, properties and health effects**. 6. ed. Hoboken: Wiley Interscience, 2005. p. 431-489.

WILLIAMS, P.; SORRIBAS, A.; HOWES, M.R. Natural products as a source of Alzheimer's drug leads. **Natural Product Reports**, 28: 48-77, 2011.

WOJDYLO, A.; OSZMIANSKI, J.; CZEMERYYS, R. Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. **Food Chemistry**, 105: 940-949, 2007.

Biofilmes bacterianos na indústria de alimentos

José Guilherme Prado Martin

Melina Luz Mary Cruzado Bravo

Manoel Divino da Matta Junior

Ernani Porto

1. Introdução

Uma das maiores preocupações da indústria de alimentos, no que diz respeito à qualidade microbiológica de seus produtos, consiste na redução de perdas decorrentes da deterioração bacteriana, bem como dos riscos à saúde dos consumidores; trata-se de atender à crescente demanda oferecendo produtos inócuos e economicamente viáveis.

No entanto, a produção de alimentos em um ritmo cada vez mais intenso, bem como a automação de grande parte dos processos, têm levado a um maior risco de desenvolvimento de biofilmes na planta de processamento. Estes causam corrosão de superfícies, perdas de rendimento de processos térmicos, além de aumento da resistência bacteriana a sanificantes, demandando uma constante avaliação dos métodos de higienização empregados e seus respectivos protocolos.

Desse modo, estudos acerca da problemática da formação de biofilmes em indústrias de alimentos aumentaram consideravelmente nos últimos anos. Biofilmes bacterianos podem ser constituídos tanto por espécies deteriorantes quanto patogênicas. Em termos de saúde pública, as últimas demandam maiores cuidados, a fim de se evitar o estabelecimento do biofilme, ou, quando for o caso, adotar medidas para sua eliminação. Dentre as espécies comumente implicadas em casos e surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA), potencialmente produtoras de biofilmes, encontram-se *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* e *Salmonella enteritidis*.

O problema da contaminação de alimentos por patógenos é ainda agravado pelo aumento da resistência bacteriana a sanificantes, cujo crescimento tem sido observado nas últimas décadas. Nesse contexto, torna-se imprescindível o desenvolvimento de novas pesquisas acerca da eficiência de agentes sanificantes utilizados em processos de higienização em indústrias de alimentos.

2. Biofilmes bacterianos

Existem várias definições de biofilmes, mas, de maneira geral, podem ser caracterizados como uma comunidade bacteriana aderida a superfícies inertes, protegida por uma matriz de polissacarídeos extracelulares, comumente denominados por exopolissacarídeos (EPS) (Costerton et al., 1995).

Cada biofilme apresenta características e composições específicas, caracterizado pela cooperação das atividades celulares metabólicas. A matriz de polissacarídeos confere proteção e permite o desenvolvimento da comunidade, uma vez que promove a circulação de água e nutrientes, bem como a eliminação de metabólitos e resíduos (Sauer, 2007).

Dessa maneira, os três componentes básicos de um biofilme compreendem células bacterianas, matriz de EPS e superfície de fixação (Dunne, 2002). Os biofilmes comumente encontrados na natureza são multi-espécie, porém, na indústria podem ser encontrados tanto biofilmes heterogêneos quanto biofilmes homogêneos, ou seja, constituídos de apenas uma espécie bacteriana (Sauer, 2007).

A regulação metabólica dentro de um biofilme parece estar relacionada com um complexo mecanismo de “comunicação” bacteriana, no qual moléculas sinalizadoras são produzidas pela população, a partir do momento em que se atinge uma determinada densidade populacional – fenômeno denominado “*quorum sensing*”. Uma vez estimuladas por tais moléculas indutoras, bactérias podem alterar funções metabólicas e até mesmo sincronizá-las dentro de uma comunidade (Hamer, 2003; Waters, 2005).

A composição dos EPS de um biofilme varia de acordo com a espécie. Diferentes tipos são estudados com potencial de aplicação pela indústria de alimentos, como espessantes e geleificantes. Os alginatos produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* – similares aos produzidos por algas pardas e amplamente utilizado na gastronomia – bem como a xantana, produzida por *Xanthomonas campestris*, são exemplos clássicos de EPS que compõem a estrutura do biofilme dessas espécies (Sutherland, 1997).

Outros polissacarídeos menos conhecidos são produzidos por espécies relacionadas à DTA, como *S. aureus* e *E. coli*. O primeiro produz um EPS conhecido como PIA, e o segundo, o polissacarídeo PGA, denominações para um mesmo polissacarídeo conhecido por poli-N-acetil-glicosamina (Kaplan, 2004).

Além dos EPS, a matriz de um biofilme é composta por água, material celular – como metabólitos e produtos de lise celular – e macromoléculas, como proteínas, DNA e RNA, os quais se encontram em meio a peptidoglicanos, lipídeos e fosfolipídeos (Frolund, 1996; Sutherland, 2001). A grande variedade de componentes demonstra claramente a complexidade estrutural de um biofilme maduro.

Em relação à sua formação, várias etapas estão envolvidas, desde a fixação da bactéria à superfície até a maturação do biofilme, culminando com a disseminação de células e camadas de EPS para o meio circundante. Existem várias teorias para explicar o processo de formação, e divergências podem ocorrer de acordo com a literatura científica. A seguir, apresentam-se as três fases da formação de um biofilme – adesão, consolidação e colonização (Nortermans et al., 1991).

O primeiro estágio compreende a adesão bacteriana, no qual forças físicas permitem a adesão das células a vários tipos de superfícies, sejam inertes ou biológicas, que pode ser influenciada por fatores externos, como tipo de substrato, temperatura, ocorrência de estruturas de fixação (como *pilli* e flagelos), bem como a fase de desenvolvimento da população bacteriana (Houry et al., 2010; Pagedar; Singh, 2012; Visvalingam; Holley, 2013).

Em um primeiro momento, interações não-específicas, como hidrofobicidade e forças eletrostáticas influenciam a adesão, caracterizada como reversível até esse momento, ou seja, forças mecânicas relativamente fracas, como a velocidade do fluxo do substrato circundante, são capazes de remover células aderidas superficialmente. Posteriormente, ocorre a fixação propriamente dita, envolvendo estruturas de ligação/fixação. Com a produção de EPS, as bactérias encontram-se ligadas à superfície de maneira relativamente forte, tornando a adesão, nesse ponto, irreversível (Dunne, 2002).

Posteriormente ao estágio de adesão, ocorre a etapa de consolidação do biofilme. Nesse momento, ocorrem alterações nas propriedades metabólicas das células, com diferenças significativas quando comparadas às células planctônicas. Tais alterações compreendem expressão diferenciada de fenótipos, como aumento da resistência a condições adversas, principalmente no que tange à carência de nutrientes, condições do meio e suscetibilidade a antimicrobianos. Nessa etapa também se intensifica a produção

de EPS, tornando-se uma estrutura altamente complexa (Costerton et al., 1995; Mclandsborough et al., 2006).

No último estágio, o de biofilme maduro, a comunidade bacteriana associada à matriz de EPS – incorporada também de partículas e detritos externos – é capaz de se desprender, eliminando para o meio circundante células bacterianas viáveis. Além disso, metabólitos produzidos, como toxinas, também podem ser eliminados, contaminando o meio externo (Mittleman, 1998).

Biofilmes proporcionam um nicho ideal para transferência de DNA extra-cromossômico (plasmidial). Essa característica permite que determinados clones contribuam para um alto índice de manutenção de genes; nesse sentido, a parceria metabólica entre as bactérias pode influenciar a expressão fenotípica decorrente de alterações genéticas (Frolund, 1996; Costerton, 2007).

Nesse contexto, atenta-se para o preocupante quadro de resistência a sanificantes, fator potencializado pela transferência diferenciada de genes dentro da comunidade do biofilme. Ademais, sanificantes também apresentam eficácia reduzida devido à proteção mecânica conferida pela matriz de EPS que envolve o biofilme maduro (Flemming, 2005; Monroe, 2007).

3. Biofilmes na indústria de alimentos

Biofilmes são um foco de contaminação dentro da indústria de alimentos, contribuindo para perdas econômicas e oferecendo riscos à saúde dos consumidores. A relevância do tema torna-se ainda mais evidente quando se observa o crescimento do número de trabalhos publicados na área. Em uma simples busca no portal de trabalhos indexados à base de dados Science Direct, nos últimos dez anos foram publicados cerca de 3500 trabalhos referentes a biofilmes na indústria de alimentos, compreendendo artigos de pesquisa, revisões e informes. Na década anterior, foram publicados cerca de 660 trabalhos, um crescimento superior a cinco vezes.

Atualmente, sabe-se que o processo de formação de um biofilme no ambiente da indústria é um processo complexo. Moléculas orgânicas provenientes de resíduos alimentares se depositam nas superfícies de equipamentos. Microrganismos

contaminantes são atraídos para as superfícies, já pré-condicionadas¹. Bactérias sobreviventes aos processos de limpeza colonizam e se multiplicam sobre a superfície, etapa potencializada pela expressão conjunta de determinados genes, o que, por sua vez, é mediado via *quorum sensing*. Tanto as propriedades dos substratos, quanto as características intrínsecas à superfície de contato, bem como fatores ambientais que regulam a expressão gênica em bactérias, desempenham um importante papel no estabelecimento de um biofilme nesse tipo de ambiente (Shi, 2009).

Dependendo do tipo de alimento que a indústria processa, é comum a ocorrência de determinadas espécies bacterianas no biofilme. Plantas processadoras de carnes e pescados, por exemplo, apresentam biofilmes de espécies distintas às encontradas em laticínios ou em ambientes onde se processam alimentos de origem vegetal. Na Tabela 1 estão listadas as espécies bacterianas mais comuns em alguns tipos de planta de processamentos de alimentos.

Tabela 1. Biofilmes bacterianos em diferentes ambientes processadores de alimentos.

Tipo de Indústria	Espécie bacteriana
Laticínios	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Bacillus cereus</i>
Linhas de pasteurização de leite	<i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Escherichia coli</i>
Indústria de sorvetes	<i>L. monocytogenes</i> , <i>Shigella</i>
Planta processadora de caviar	<i>Pseudomonas</i> , <i>Vibrio</i> , <i>Listeria</i> <i>Serratia liquefaciens</i>
Planta processadora de camarão	<i>Pseudomonas</i> , <i>P. fluorescens</i> , <i>P. putida</i>
Indústria de carnes	<i>Salmonella</i> , <i>Listeria</i> , <i>E. coli</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Brochothrix thermosphacta</i>
Planta processadoras de sucos e produtos de origem vegetal	<i>Salmonella</i> , <i>Listeria</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Erwinia</i> spp.

Adaptado de Shi *et al.* (2009).

Vários fatores favorecem a adesão bacteriana e formação de biofilmes na indústria, como *design* inadequado de equipamentos, baixa qualidade da matéria-prima, desrespeito às práticas adequadas de higienização de equipamentos, dentre outros. Problemas em qualquer um desses pontos podem contribuir para o estabelecimento de

¹ Nas indústrias de alimentos, moléculas orgânicas e inorgânicas presentes no meio circundante, tais como proteínas, gorduras e minerais, são adsorvidas na superfície de equipamentos, formando o que se denomina por “filme de condicionamento”.

um biofilme, com conseqüente perda da qualidade microbiológica dos produtos (Joseph et al., 2001).

Contribui ainda mais para o estabelecimento dos biofilmes a ocorrência de resíduos orgânicos gerados durante o processamento de alimentos (Chmielewski; Frank, 2003). A grande quantidade de incrustações minerais (“pedra do leite”) em laticínios, por exemplo, assim como depósitos de gorduras em plantas de processamento de produtos de origem animal favorecem a adesão bacteriana. Açúcares, fibras e outros resíduos do processamento de frutas também propiciam o estabelecimento de biofilmes, fenômeno que tem aumentado consideravelmente na indústria de processamento de frutas e vegetais (Tarver, 2009).

Nesse contexto, o tipo de superfície empregado na indústria reflete diretamente no potencial de formação de biofilmes. Assim, o material que compõe a superfície de contato (aço inoxidável, alumínio, madeira, plástico), bem como seu estado de conservação, podem favorecer o processo. Uma análise mais apurada de superfícies demonstra uma grande quantidade de ranhuras e imperfeições, pontos críticos para o início do estabelecimento de biofilmes na indústria.

Um dos materiais mais utilizados em plantas de processamento de alimentos consiste no aço inoxidável, liga composta de carbono, cromo e níquel, em quantidades que podem variar de acordo com a classe da liga. Ligas da classe 300 são comumente encontradas na indústria, devido à sua maior resistência (Andrade et al., 2008). Tubulações, tanques, misturadores, mesas, dentre outros equipamentos, são constituídos principalmente por aço inoxidável dessa classe, com polimento sanitário.

Perdas decorrentes de danos a equipamentos e utensílios são comuns, devido, principalmente, a processos corrosivos desencadeados por biofilmes. Enzimas bacterianas, ácidos orgânicos e outros metabólitos produzidos podem afetar reações de oxidação em metais, causando danos ao material constituinte, processo conhecido por biocorrosão microbiologicamente influenciada (Beech; Gaylard, 1999).

4. Controle de biofilmes na indústria de alimentos

Para que se tenha sucesso na higienização de superfícies na indústria de alimentos, devem-se seguir rigorosamente as práticas adequadas de limpeza e sanificação, empregando-se corretamente as soluções de limpeza e sanificantes mais

indicados para cada tipo de superfície, tipo de alimento processado e espectro de ação. Em laticínios, por exemplo, convém a utilização conjunta de agentes ácidos para remoção completa de resíduos minerais, muito comuns nesse tipo de indústria (Chmielewski, 2003).

Em sistemas de tubulação, emprega-se comumente um processo conhecido por *Cleaning In Place* (CIP), no qual uma série de soluções de limpeza e enxágue circulam pela tubulação, em temperaturas, tempos de contato e velocidade de fluxo controlados, visando à remoção de resíduos orgânicos e inorgânicos e micro-organismos contaminantes. Geralmente, faz-se a limpeza com detergentes alcalino e ácido, com enxágues entre as operações, aplicando-se, ao final, um agente sanificante (Andrade et al., 2008).

Em relação à resistência bacteriana de biofilmes, vários fatores estão relacionados, como a reduzida penetração dos agentes de limpeza, cujo acesso às células mais internas é dificultado e o fato que o crescimento celular é relativamente lento nessas camadas. O anterior pode diminuir o poder dos antimicrobianos, os quais possuem mecanismos de ação que envolvem a interrupção de processos de divisão celular (Trentin et al., 2013).

Alguns estudos têm avaliado a influência de diferentes variáveis na eliminação de biofilmes em superfícies comumente encontradas em plantas de processamento de alimentos. Furukawa et al. (2010) avaliaram a ação de detergentes e sanificantes utilizados em processos CIP. Detergentes ácidos e alcalinos fortes foram capazes de remover significativamente os biofilmes formados, com maior resistência de biofilmes de *S. aureus* em relação aos de *E. coli*.

A eficiência do sistema CIP na remoção de biofilmes de leite foi avaliado por Travagin (2010), através de uma simulação *in vitro*, com detergentes à base de quaternário de amônio. O estudo comprovou a eficácia do protocolo avaliado na eliminação de biofilmes de *L. monocytogenes*, com aplicação de detergentes alcalino e ácido e sanificante à base de quaternário de amônio. Tang et al. (2010) analisaram a eficiência de diferentes sanificantes na remoção de biofilmes de *Klebsiella oxytoca* em laticínios, dos quais todos os agentes estudados foram capazes de eliminar os biofilmes.

A remoção de biofilmes de *S. aureus* em aço inoxidável e polipropileno foi avaliada por Meira et al. (2012), utilizando ácido peracético (30 mg L⁻¹) e hipoclorito de

sódio (250 mg L⁻¹). Houve uma considerável redução da população aderida às superfícies, no entanto não foram capazes de reduzir as contagens a níveis seguros.

Alternativas aos agentes bactericidas empregados atualmente pela indústria têm sido avaliadas em estudos recentes. No contexto da formação de biofilmes, tem-se avaliado a utilização de óleos essenciais com comprovada atividade antimicrobiana em formulações para higienização de superfícies. Valeriano et al. (2012) avaliaram a atividade de óleos essenciais de menta (*Mentha piperita*) e capim-limão (*Cymbopogon citratus*) na remoção de biofilmes de *Salmonella* Enteritidis em aço inoxidável. Houve redução significativa dos biofilmes após 10 minutos de contato. Após 20-40 minutos, não foi identificada contagem de células de *S. Enteritidis* para ambos os óleos estudados.

Oliveira et al. (2010) avaliaram a atividade de óleos essenciais de capim-limão (*Cymbopogon citratus*) e citronela (*Cymbopogon nardus*) sobre biofilmes de *L. monocytogenes* em aço inoxidável. Os óleos essenciais foram capazes de reduzir significativamente as populações bacterianas aderidas à superfície. Assim mesmo, Jadhav et al. (2013) analisaram a atividade de óleos essenciais de mil-folhas (*Achillea millefolium*) sobre biofilmes de *L. monocytogenes* e *L. innocua*, relatando uma significativa redução das células aderidas a superfícies de aço inoxidável, isopor e polietileno de alta densidade. Tais estudos confirmam o potencial de utilização de óleos essenciais em novas formulações de desinfetantes e sanificantes usados na indústria de alimentos.

5. Métodos para estudo laboratorial do potencial bacteriano para formação de biofilmes

Diferentes metodologias são utilizadas para o estudo de biofilmes (Flint et al., 2001; Vasudevan et al., 2003; Meira et al., 2012). Juntas, fornecem um diagnóstico preciso do potencial de formação de biofilmes. Consistem, basicamente, em métodos moleculares (como a Reação em Cadeia da Polimerase – PCR) para detecção de genes que expressam a produção de adesinas e EPS, testes fenotípicos qualitativos para detecção de cepas produtoras de EPS (como Ágar Vermelho Congo), ferramentas de quantificação da produção de *slime* (geralmente por meio de ensaios *in vitro* utilizando-se microplacas), e, por fim, análise de microfotografias obtidas por Microscopia

Eletrônica de Varredura, que permite a visualização de colônias aderidas a superfícies, bem como a produção de EPS que compõe o biofilme (Donlan, 2002).

A PCR pode ser utilizada na detecção de genes relacionados à expressão de moléculas de adesão, como polissacarídeos de adesão capsular ou intercelular e EPS. Consiste em uma ferramenta rápida e bastante sensível; no entanto, a expressão dos genes deve ser avaliada por outras metodologias, uma vez que a presença dos genes não implica necessariamente em sua expressão fenotípica (Vasudevan, 2003).

É uma técnica vantajosa para uso em estudos epidemiológicos, pois permite o estudo concomitante de um grande número de isolados e a detecção conjunta de diferentes genes ligados à produção de biofilmes em um mesmo ensaio. É, portanto, considerada uma ferramenta bastante rápida e relativamente simples, demandando, para sua execução, reagentes e equipamentos específicos e pessoal treinado.

Dependendo da espécie de estudo, pesquisam-se diferentes genes que expressam a produção de EPS. Para *S. aureus*, por exemplo, os genes-alvo estão presentes no *locus ica*, principalmente *icaA* e *icaD*, ambos envolvidos na produção de adesinas intercelulares e EPS (Vasudevan, 2003). Para *Salmonella*, o gene *fimA* relaciona-se diretamente à produção do polissacarídeo extracelular (Nandre, 2012). Para *L. monocytogenes*, podem-se pesquisar genes relacionados à produção de auto-indutores moleculares envolvidos em mecanismos de *quorum sensing*, como o gene *luxS*, bem como o gene *inlA*, cujo papel parece estar relacionado a processos de adesão celular a superfícies (Bonsaglia, 2014). Em *E. coli*, o *locus pgaABCD* é necessário para a produção de PGA, molécula necessária à formação de biofilme da espécie (Goller, 2006).

O método do Ágar Vermelho Congo (AVC) nasceu como uma alternativa para identificação de cepas produtoras de biofilme por estafilococos coagulase negativa (Freeman et al, 1989). Atualmente, pode-se utilizá-lo tanto para cepas coagulase negativa quanto para positivas. Trata-se de um método rápido, sensível e reprodutível, com a vantagem de manter viáveis as colônias no meio de cultura, permitindo sua utilização para ensaios posteriores.

O AVC é composto por meio *Brain Heart Infusion* (BHI), sacarose, ágar e corante Vermelho Congo. Baseia-se na produção de EPS por cepas de estafilococos, cujo crescimento é favorecido pelo meio de cultura enriquecido. A mudança de coloração do

meio, de vermelho intenso a preto, ocorre, geralmente, nas últimas horas de incubação, sugerindo a ação de um produto secundário sobre o meio de cultura, formado após as 12 primeiras horas e supostamente relacionado à produção de EPS.

Para avaliar a coloração das colônias, é adotada uma escala de seis tons de cores, variando do vermelho ao preto (Arciola et al., 2002). São consideradas produtoras de biofilme cepas que se apresentam sob a forma de colônias muito pretas, pretas ou acinzentadas. Amostras cujas colônias se apresentam com cores variando de vermelho intenso a bordô são consideradas negativas para a produção de EPS (Figura 1).

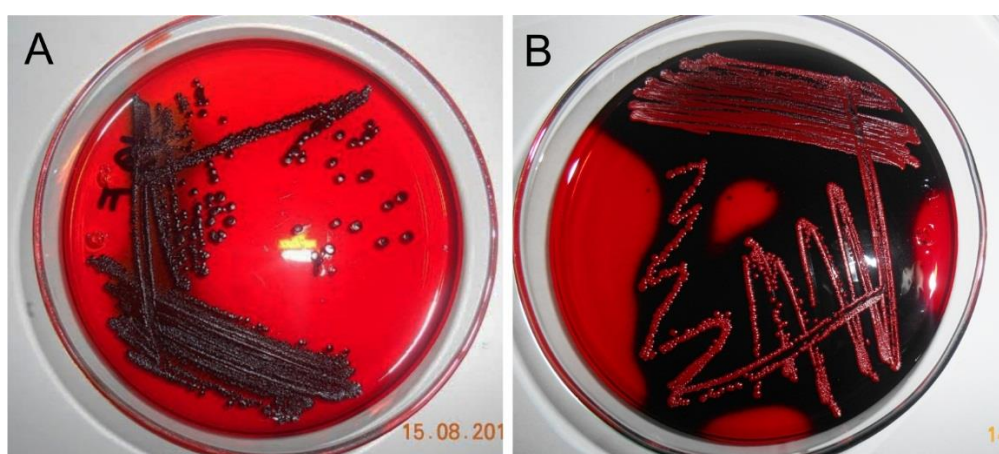


Figura 1. Ágar Vermelho Congo: A) Cepa formadora de biofilme (+); B) Cepa não-formadora de biofilme (-). Fonte: Autores.

Para quantificar a produção de *slime*, podem ser realizados estudos em microplacas de 96 poços de poliestireno. Culturas bacterianas são cultivadas, padronizadas, distribuídas entre os poços da microplaca e incubadas. Após a remoção das culturas, aplica-se na placa um corante para visualizar as células aderidas nas paredes dos poços. Tais células são, então, ressuspendidas em solução específica e submetidas à análise por ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*). A partir dessa análise, as cepas são classificadas em não-produtoras, fracas, moderadas ou fortes produtoras de biofilmes (Lee, 2012).

Uma ferramenta essencial na visualização dos biofilmes formados compreende a Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). A partir de microfotografias obtidas por essa técnica, podem-se analisar a distribuição das células na superfície de adesão, a

densidade populacional, irregularidades na superfície de estudo, resíduos de alimentos aderidos, bem como a estrutura de EPS que abarca a comunidade bacteriana (Figura 2).

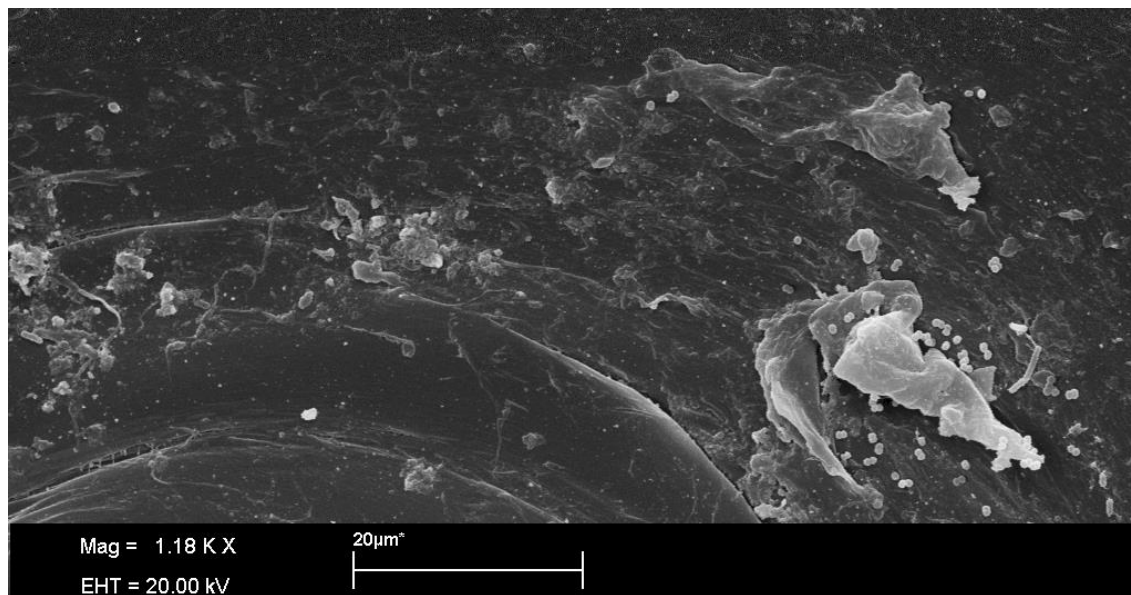


Figura 2. *S. aureus* isolado de um laticínio aderido à superfície de polipropileno, em meio a resíduos de alimentos. Fonte: Autores.

Geralmente, em estudos que envolvem a utilização de MEV empregam-se ensaios *in vitro* utilizando cupons produzidos a partir do material de interesse, que pode ser de aço inoxidável, vidro, plástico, polipropileno. Os cupons, são, então, submetidos a condições semelhantes às encontradas na prática, como temperatura, pH, presença de filme de condicionamento, fluxo do meio circundante, por meio de um sistema de suspensão de cupons ou reatores de biofilmes, os quais consistem em um sistema hermeticamente fechado por onde circulam o meio, detergentes, soluções de enxágue e sanitizantes, por exemplo, permitindo o estudo da eficiência dos processos de higienização utilizados na indústria de alimentos (Travagin, 2010).

A partir dos cupons tratados e submetidos a todos os protocolos de pesquisa pré-estabelecidos, eles são submetidos a uma série de tratamentos, que incluem, geralmente, fixação com solução de Karnovsky ou tetróxido de ósmio, desidratação do material em concentrações crescentes de acetona ou etanol, secagem ao ponto crítico de CO₂, com a subsequente metalização em ouro para observação em microscópio eletrônico de varredura (Ribeiro-Furtini, 2005; Travagin, 2010). Os protocolos para pré-tratamento das amostras podem variar entre diferentes laboratórios.

6. Considerações finais

A problemática da ocorrência de biofilmes dentro do ambiente de processamento de alimentos é real e de grande importância, tanto em termos financeiros quanto de Saúde Pública. Com o ritmo cada vez mais intenso na produção de alimentos, faz-se necessário o rigoroso controle de biofilmes, visando à redução de custos por parte da indústria, bem como à diminuição de riscos à saúde dos consumidores.

Nesse sentido, novos estudos acerca do estabelecimento de biofilmes são imprescindíveis. O entendimento dos processos de adesão, regulação gênica envolvida na produção de EPS e desenvolvimento de resistência a sanificantes auxiliam na resolução do problema, bem como na adoção de medidas para que se previna a ocorrência de biofilmes na indústria de alimentos.

Referências

- AIT-OUAZZOU, A.; LÓRAN, S.; ARAKRAK, A.; LAGLAOUI, A.; ROTA, C.; HERRERA, A.; PAGÁN, R.; CONCHELLO, P. Evaluation of the chemical composition and antimicrobial activity of *Mentha pulegium*, *Juniperus phoenicea*, and *Cyperus longus* essential oils from Morocco. **Food Research International**, 45: 313-319, 2012.
- ANDRADE, N.J.; PINTO, C.L.D.O.; LIMA, J.C. Adesão e formação de biofilmes microbianos. In: ANDRADE, N.J. (Ed.). **Higiene na indústria de alimentos: avaliação e controle da adesão e formação de biofilmes bacterianos**. São Paulo: Varela, 2008. p.15-66.
- ARCIOLA, C.R.; CAMPOCCIA, D.; GAMBERINI, S.; CERVELLATI, M.; DONATI, E.; MONTANARO, L. Detection of slime production by means of an optimised Congo red agar plate test based on a colourimetric scale in *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates genotyped for *ica locus*. **Biomaterials**, 23: 4233-4239, 2002.
- BEECH, I.B.; GAYLARDE, C.C. Recent advances in the study of biocorrosion – an overview. **Revista de Microbiologia**, 30: 177-190, 1999.
- BONSAGLIA, E.C.R. et al. Production of biofilm by *Listeria monocytogenes* in different materials and temperatures. **Food Control**, 35: 386-391, 2014.
- CHMIELEWSKI, R.A.N.; FRANK, J.F. Biofilm Formation and Control in Food Processing Facilities. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, 2: 22-32, 2003.
- COSTERTON, J.W.; LEWANDOWSKI, Z.; CALDWELL, D.E.; KORBER, D.R.; LAPPIN-SCOTT, H.M. Microbial biofilms. **Annual Review of Microbiology**, 49: 711-45, 1995.
- DA SILVA MEIRA, Q.G.; BARBOSA, I.M.; ATHAYDE, A.J.A.A; SIQUEIRA-JUNIOR, J.P.; SOUZA, E.L. Influence of temperature and surface kind on biofilm formation by *Staphylococcus aureus* from food-contact surfaces and sensitivity to sanitizers. **Food Control**, 25: 469-475, 2012.
- DONLAN, R.M. Biofilms: Microbial Life on Surfaces. **Emerging Infectious Disease Journal**, 8: 881-890, 2002.
- DUNNE, W.M. Bacterial Adhesion: Seen Any Good Biofilms Lately? **Clinical Microbiology Reviews**, 15: 155-166, 2002.
- FLEMMING, H.C.; WINGENDER, J.; GRIEBE, T.; MAYER, C. Physico-chemical Properties of Biofilms. In: EVANS, L.V. (Ed.). **Biofilms: recent advances in their study and control**. Amsterdam: Harwood Academic Publishers, 2005. 491 p.

- FLINT, S.; PALMER, J.; BLOEMEN, K.; BROOKS, J.; CRAWFORD, R. The growth of *Bacillus stearothermophilus* on stainless steel. **Journal of Applied Microbiology**, 90: 151-7, 2001.
- FREEMAN, D.J.; FALKINER, F.R.; KEANE, C.T. New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. **Journal of Clinical Pathology**, 42: 872-874, 1989.
- FROLUND, B.; PALMGREN, R.; KEIDING, K.; NIELSEN, P.H. Extraction of extracellular polymers from activated sludge using a cation exchange resin. **Water Research**, 30: 1749–1758, 1996.
- FURUKAWA, S.; AKIYOSHI, Y.; KOMORIYA, M.; OGIHARA, H.; MORINAGA, Y. Removing *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* biofilms on stainless steel by cleaning-in-place (CIP) cleaning agents. **Food Control**, 21: 669-672, 2010.
- GOLLER, C.; WANG, X.; ITOH, Y.; ROMEO, Y. The cation-responsive protein NhaR of *Escherichia coli* activates *pgaABCD* transcription, required for production of the biofilm adhesin poly- β -1,6-*N*-acetyl-D-glucosamine. **Journal of Bacteriology**, 196: 8022-8032, 2006.
- HAMMER, B.K.; BASSLER, B.L. Quorum sensing controls biofilm formation in *Vibrio cholerae*. **Molecular Microbiology**, 50: 101–104, 2003.
- HOURY, A.; BRIANDET, R.; AYMERICH, S.; GOHAR, M. Involvement of motility and flagella in *Bacillus cereus* biofilm formation. **Microbiology**, 156: 1009-1018, 2010.
- JADHAV, S.; SHAH, R.; BHAVE, M.; PALOMBO, E.A. Inhibitory activity of yarrow essential oil on *Listeria* planktonic cells and biofilms. **Food Control**, 29: 125-130, 2013.
- JOSEPH, B.; OTTA, S.K.; KARUNASAGAR, I. Biofilm formation by *Salmonella* spp. on food contact surfaces and their sensitivity to sanitizers. **International Journal of Food Microbiology**, 64: 367-372, 2001.
- KAMAZERI, T.S.; SAMAH, O.A.; TAHER, M.; SUSANTI, D.; QARALLEH, H. Antimicrobial activity and essential oils of *Curcuma aeruginosa*, *Curcuma mangga*, and *Zingiber cassumunar* from Malaysia. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, 5: 202-209, 2012.
- KAPLAN, J. B.; VELLIYAGOUNDER, K.; RAGUNATH, C.; ROHDE, H.; MACK, D.; KNOBLOCH, J. K.-M.; RAMASUBBU, N. Genes involved in the synthesis and degradation of matrix polysaccharide in *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Actinobacillus pleuropneumoniae* biofilms. **Journal of Bacteriology**, 186: 8213-20, 2004.
- LEE, S.H.I. **Identificação molecular de *Staphylococcus aureus* formadores de biofilmes em ambiente de ordenha**. 2012. 71p. Dissertação (Mestrado em Ciências da Engenharia de Alimentos). Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga.
- MCLANDSBOROUGH, L.; RODRIGUEZ, A.; PÉREZ-CONESA, D.; WEISS, J. Biofilms: at the interface between biophysics and microbiology. **Food Biophysics**, 1: 94-114, 2006.
- MEIRA, Q.G.S.; BARBOSA, I.M.; ATHAYDE, A.J.A.A.; SIQUEIRA-JUNIOR, J.P.; SOUZA, E.L. Influence of temperature and surface kind on biofilm formation by *Staphylococcus aureus* from food-contact surfaces and sensitivity to sanitizers. **Food Control**, 25: 469-475, 2012.
- MITTELMAN, M.W. Structure and Functional Characteristics of Bacterial Biofilms in Fluid Processing Operations. **Journal of Dairy Science**, 81: 2760–2764, 1998.
- MONROE, D. Looking for chinks in the armor of bacterial biofilms. **PLoS Biology**, 5: 2458-2461, 2007.
- NANDRE, R.M.; MATSUDA, K.; CHAUDHARI, A.A.; KIM, B.; LEE, J.H. A genetically engineered derivative of *Salmonella* Enteritidis as a novel live vaccine candidate for salmonellosis in chickens. **Research in Veterinary Science**, 93: 596-603, 2012.
- NOTERMANS, S.; DORMANS, J.A.N.A.; MEAD, G.C. Contribution of surface attachment to the establishment of micro-organisms in food processing plants: a review. **Biofouling**, 5: 21-36, 1991.
- OLIVEIRA, M.M.M.; BRUGNERA, D.F.; CARDOSO, M.G.; ALVES, E.; PICCOLI, R.H. Disinfectant action of *Cymbopogon* sp. essential oils in different phases of biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on stainless steel surface. **Food Control**, 21: 549-553, 2010.

- PAGEDAR, A.; SINGH, J. Influence of physiological cell stages on biofilm formation by *Bacillus cereus* of dairy origin. **International Dairy Journal**, 23: 30-35, 2012.
- RIBEIRO-FURTINI, L.L. **Caracterização e isolamento de microrganismos aderidos em tubulação de laticínio e seu comportamento frente à detergência**. 2005. 80p. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2005.
- SAUER, K.; RICKARD, A.H.; DAVIES, G.D. **Biofilms and Biocomplexity**, 2: 347-353, 2007.
- SHI, X.; ZHU, X. Biofilm formation and food safety in food industries. **Trends in Food Science Technology**, 20: 407-413, 2009.
- TANG, X.; FLINT, S.H.; BENNETT, R.J.; BROOKS, J.D. The efficacy of different cleaners and sanitisers in cleaning biofilms on UF membranes used in the dairy industry. **Journal of Membrane Science**, 352: 71-75, 2010.
- TARVER, T. Biofilms: a threat to food safety. **Food Technology Magazine**, 63: 46-52, 2009.
- TRAVAGIN, B.N.F.S. **Estudo da formação de biofilmes de *L. monocytogenes* frente a diferentes condições encontradas em laticínios**. 2010. 98p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba-SP, 2010.
- TRENTIN, D.S.; GIORDANI, R.B.; MACEDO, A.J. Biofilmes bacterianos patogênicos: aspectos gerais, importância clínica e estratégias de combate. **Revista Liberato**, 14: 113-238, 2013.
- VALERIANO, C.; OLIVEIRA, T.L.C.; CARVALHO, S.M.; CARDOSO, M.G.; ALVES, E.; PICCOLI, R.H. The sanitizing action of essential oil-based solutions against *Salmonella enterica* serotype Enteritidis S64 biofilm formation on AISI 304 stainless steel. **Food Control**, 25: 673-677, 2012.
- VASUDEVAN, P.; NAIR, M.K.M.; ANNAMALAI, T.; VENKITANARAYANAN, K.S. Phenotypic and genotypic characterization of bovine mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* for biofilm formation. **Veterinary Microbiology**, 92: 179-185, 2003.
- VISVALINGAM, J.; HOLLEY, R.A. Adherence of cold-adapted *Escherichia coli* O157:H7 to stainless steel and glass surfaces. **Food Control**, 30: 575-579, 2013.
- WATERS, C.M.; BASSLER, B.L. Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, 21: 319-46, 2005.

Projeto Hortiescolha – Apoio à tomada de decisão na escolha, aquisição, controle de qualidade e utilização de frutas e hortaliças *in natura*

Fabiane Mendes da Camara

Anita de Souza Dias Gutierrez

Marta Helena Fillet Spoto

Sabrina Leite de Oliveira

Gabriel Vicente Bitencourt de Almeida

Thiago de Oliveira

José Guilherme Prado Martin

1. Introdução

O Programa Nacional de Alimentação Escolar (PNAE), considerado um dos mais abrangentes e duradouros do mundo na área de alimentação escolar e único com atendimento universalizado (Peixinho, 2013), é um programa de política pública na área de Segurança Alimentar e Nutricional regulamentado pela Lei Federal nº. 11.947 de 2009, e suas alterações pela Lei Federal nº. 12.982 de 2014.

O PNAE tem por objetivo contribuir para o crescimento e desenvolvimento biopsicossocial, aprendizagem e rendimento escolar, por meio de ações de educação alimentar e nutricional e da oferta de refeições durante o período letivo. O programa, gerenciado pelo Fundo Nacional de Desenvolvimento da Educação (FNDE), promove o fornecimento de refeições para 43,3 milhões de alunos durante todo o período letivo, através da transferência de recursos financeiros suplementares aos Estados, ao Distrito Federal e aos Municípios (Fundo Nacional de Desenvolvimento da Educação, 2014).

A operacionalização das ações do PNAE cabe aos secretários estaduais e/ou municipais de educação; as etapas de elaboração dos cardápios, participação dos processos de descrição e aquisição dos gêneros e ações de educação alimentar é de responsabilidade do nutricionista responsável técnico (BRASIL, 2013).

A Resolução nº. 26 de 2013, que dispõe sobre a oferta da alimentação escolar no âmbito do PNAE, estabelece que os cardápios contemplem gêneros alimentícios básicos, respeitando sempre as referências nutricionais, os hábitos e cultura alimentar da

localidade e também contribua com a oferta mínima semanal de três porções de frutas e hortaliças (200 g aluno⁻¹). A aquisição destes gêneros deverá ser realizada através de licitação pública nas suas diferentes modalidades ou chamada pública para agricultura familiar, sendo esta de responsabilidade dos estados e municípios brasileiros (BRASIL, 2013).

A alimentação oferecida nas escolas é um estímulo à redução da evasão escolar e da repetência; porém, é recomendado que todas as ações de educação alimentar estejam atreladas ao projeto pedagógico de cada escola (Gabriel, 2013). Estudos realizados por Assao et al. (2014) demonstraram que, pela ótica infantil, a alimentação escolar não é restrita ao ato da alimentação, englobando também a relação com os alimentos, com o ambiente escolar e com os pares.

Em 2013, os pesquisadores envolvidos no programa Hortiescolha aplicaram uma entrevista aos nutricionistas da alimentação escolar dos municípios paulistas. Os entrevistados relataram a existência de problemas e/ou dificuldades no processo de descrição do objeto de compra (frutas e hortaliças) e falta de transparência nas regras para entendimento do produto (variedade e classificação) entre o comprador e fornecedor, tanto para os processos de licitação como para chamada pública. A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” da Universidade de São Paulo, sob o protocolo N° 135/2012.

As frutas e hortaliças *in natura* são componentes essenciais no cardápio da alimentação escolar pelo seu valor nutricional e por oferecer às crianças a oportunidade de descobrir e apreciar novos aromas, sabores, cores, formatos e texturas e desfrutar o prazer da sua ingestão (Issa et al., 2014). Em muitos municípios brasileiros, o cardápio da alimentação escolar é restrito a poucas frutas e hortaliças (Gabriel, 2013), deixando de lado muitas espécies de mesma função alimentar e que podem resgatar o consumo de frutas e hortaliças produzidas por pequenos produtores, alavancando a agricultura local (Bleil et al., 2009), realidade reforçada pelos nutricionistas entrevistados em 2013 no programa Hortiescolha.

A elaboração do memorial descritivo para a compra pública é complexa e busca por melhor preço e garantia da qualidade. A execução por órgãos públicos exige procedimentos específicos para garantir a execução do processo, como, por exemplo, autorizações, pedidos, especificação completa, definição de unidades e quantidades,

levantamento de preços, cotações, documentos de habilitação, obediência à legislação, entre outros (Batista; Maldonado, 2008). As atividades administrativas e burocráticas são exercidas muitas vezes com dificuldades por alguns gestores, devido à sua formação técnica (Chaves et al., 2013).

O crescente distanciamento entre o consumidor e a agricultura, decorrente da urbanização, e a inexistência de denominações claras e mensuráveis de tamanho e qualidade para produto, variedade e classificação, tornam complexo o processo de elaboração do memorial descritivo e de controle de qualidade de frutas e hortaliças *in natura*. O gestor ainda deve atentar-se para que não ocorram grandes alterações nos cardápios propostos, devido ao planejamento inadequado sobretudo em virtude da alegação da falta de ingredientes (Issa et al., 2013).

O memorial descritivo é parte integrante do edital de licitação ou chamada pública, e deve conter, no mínimo, informações sobre características gerais e sensoriais, caracterização mensurável, padrão de qualidade, padrão de embalagem, além das condições e entrega e transporte, levantamento de preços e cotações e estudo da sazonalidade para elaboração de cardápios que ofertem produtos na sua melhor época de compra e consumo. Todo o processo de aquisição para a alimentação escolar deve obedecer à Lei Federal 11.947, de 2009 (alterada pela Lei Federal 12.982, de 2014), à Resolução CD/FNDE nº 26 de 2013 e também à legislação específica para licitação pública e contratos administrativos (Lei 8.666, de 1993), de forma a não direcionar o processo de compra para um determinado fornecedor, e também permitir que o maior número de fornecedores possa participar do processo (Fundo Nacional de Desenvolvimento da Educação, 2014). O produto ainda deve estar de acordo com a legislação vigente do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), e Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), bem como a legislação estadual e municipal.

O programa “Hortiescolha – Apoio à tomada de decisão do serviço de alimentação escolar na escolha, aquisição, controle de qualidade e utilização de frutas e hortaliças *in natura*” é um programa de políticas públicas com objetivo de representar uma ferramenta de auxílio que simplifique a escolha e a aquisição, aumente a diversidade e garanta a qualidade das frutas e hortaliças frescas para os serviços de alimentação escolar. O trabalho teve aporte financeiro da Fundação de Amparo à

Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo 2010/52337-0, e contou com a parceria do Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” da Universidade de São Paulo e do Centro de Qualidade em Horticultura da Companhia de Entrepósitos e Armazéns Gerais do Estado de São Paulo – CEAGESP, para o desenvolvimento da ferramenta.

O programa, que está disponível no endereço eletrônico <http://www.hortiescolha.com.br>, disponibiliza os elementos essenciais para a elaboração do cardápio num formato de fácil acesso e correlação. Com ele, o gestor acessa as informações das principais frutas e hortaliças comercializadas na CEAGESP, além de informações sobre variedades, classificações e diferença de preço entre as mesmas, rendimento e sazonalidade.

O Hortiescolha orienta o gestor para a substituição por produtos semelhantes em relação ao valor nutricional e uso culinário e também por produtos de melhor custo-benefício na época, contribuindo assim para uma maior economia e melhor utilização de recursos públicos, diminuição de perdas, maior diversidade de produtos, aromas, sabores, cores, texturas, a introdução de frutas e hortaliças pouco conhecidas e de produtos da agricultura local no cardápio, bem como o aumento do consumo de frutas e hortaliças frescas.

2. Escopo da ferramenta

A ferramenta Hortiescolha permite a consulta das características físico-químicas e também as relacionadas à qualidade, preço e sazonalidade de 94 produtos e suas variedades. A ferramenta também permite aos usuários, após um breve cadastro, o acesso a uma área personalizada para elaboração de documentos de apoio para o memorial descritivo de frutas e hortaliças *in natura* e ferramentas para o controle de qualidade do produto. A ferramenta é dividida em: 1) Consulta – Página principal; 2) Hortipedia; e 3) Blog Hortiescolha.

2.1. Consulta - Página principal

Na página principal, o usuário visualiza as frutas e hortaliças de sazonalidade alta, média e baixa. A indicação é realizada com base na evolução de preços da cotação

CEAGESP e sazonalidade histórica do produto. O sistema ainda permite a consulta a sazonalidade de cada produto e variedade e sugestões de substituição.

O cadastramento do usuário e acesso ao link “Crie sua lista” permite, ainda, elaborar uma lista de produtos para compor o memorial descritivo em licitação e/ou chamada pública. O usuário recebe na escolha de cada produto e variedade informações sobre os meses de melhor oferta, com a indicação da classificação de melhor custo-benefício e sugestões de diversificação por produtos de valor nutricional e preparo semelhantes. Nas abas laterais, o usuário visualiza a diversidade da sua lista e sazonalidade, os principais macronutrientes e micronutrientes presentes nos produtos selecionados e a oferta de cada produto escolhido pela agricultura local (município de cadastro do usuário).

Após a escolha do produto e da sua quantidade, torna-se disponível, para cada produto, o memorial descritivo de especificação de compras para utilização em licitação e/ou chamada pública e controle de qualidade.

2.2. Hortipedia

O “Hortipedia” caracteriza as frutas e hortaliças *in natura* e seus grupos varietais, sendo composto por:

- a) Guia de identificação do produto com foto e nome científico;
- b) Guia de Variedades, com as principais variedades ou grupos varietais comercializados na CEAGESP;
- c) Tabela de equivalência, onde é possível caracterizar os produtos através da utilização de características mensuráveis e sua equivalência pela Cotação de Preços da CEAGESP e pela denominação do Mercado Atacadista;
- d) Índices Hortiescolha:
 - i. Índice de Aproveitamento – IA: fator utilizado para planejar quantitativamente um cardápio e seus gêneros. Está relacionado ao tamanho, qualidade, maturidade do produto e técnicas utilizadas no preparo. O IA, que considera o Fator de Correção e o Índice de Cocção, é medido para cada variedade e classificação de cada produto.
 - ii. Índice de Valoração – IV: fator utilizado para calcular a relação entre o preço de cada classificação e a classificação menos valorizada de cada produto

e variedade. A Cotação de Preços da CEAGESP, realizada diariamente, monitora o preço praticado do atacado para o varejo das diferentes classificações de cada produto e variedade. Através dos dados históricos da Cotação de Preços da CEAGESP foi calculado o IV por produto e variedade.

iii. Índice de Escolha – IE: fator utilizado para indicar a classificação de melhor custo-benefício (maior IE), que considera a diferença de aproveitamento (IA) e a grande diferenciação de valor por variedade e classificação para cada produto no mesmo dia (IV). A escolha da classificação de melhor custo-benefício (maior IE) pode significar até o dobro do produto no prato com o mesmo recurso:

$$\text{Índice de Escolha} = \frac{\text{Índice de Aproveitamento}}{\text{Índice de Valoração}}$$

e) Sazonalidade, identificando a melhor época de aquisição e consumo de cada produto de acordo com os dados históricos da CEAGESP;

f) Padrão mínimo de qualidade, onde o usuário visualiza para cada produto os defeitos que não devem ser tolerados por inviabilizar o consumo do alimento ou por reduzir o rendimento;

g) Sugestões de substituição, onde o usuário visualiza produtos que poderiam ser substituídos sem grandes mudanças na forma de preparo e sem grandes prejuízos na composição final do cardápio, como uma oportunidade para alavancar maior diversidade no mesmo.

2.3. Blog Hortiescolha

O “Blog Hortiescolha” é uma interface que permite uma maior interação com o usuário e uma rápida atualização de material através de artigos, apresentações, vídeos, entre outros.

3. Considerações finais

A universalização dos conhecimentos gerados para o Projeto Hortiescolha e sua disponibilização amigável via página eletrônica foi um desafio para os pesquisadores

envolvidos. Todo o trabalho foi realizado após pesquisas e entrevistas com os futuros usuários, com o objetivo de orientar para uma melhor utilização dos recursos públicos envolvidos no processo de aquisição de frutas e hortaliças *in natura* para alimentação escolar, oferecendo uma maior diversidade e qualidade.

Referências

ASSAO, T.Y.; WESTPHAL, M.F.; BÓGUS, C.M.; LARA, B.R.; CERVATO-MANCUSO, A.M. School feeding: what children's drawings reveal. **Revista Brasileira de Crescimento e Desenvolvimento Humano**, 24: 98-105, 2014.

BATISTA, M.A.C.; MALDONADO, J.M.S.V. O papel do comprador no processo de compras em instituições públicas de ciência e tecnologia em saúde (C&T/S). **Revista de Administração Pública**, 42: 681-699, 2008.

BLEIL, R.A.T.; SALAY, E.; SILVA, M.V. Adesão ao programa de alimentação escolar por alunos de instituições públicas de ensino no município de Toledo, PR. **Segurança Alimentar e Nutricional**, 16: 65-82, 2009.

BRASIL. Ministério da Educação. Fundo Nacional de Desenvolvimento da Educação. Resolução FNDE nº. 26, de 17 de junho de 2013. Dispõe sobre o atendimento da alimentação escolar aos alunos da educação básica no âmbito do Programa Nacional de Alimentação Escolar – PNAE. Disponível em: <https://www.fnde.gov.br/fndelegis/action/UrlPublicasAction.php?acao=abrirAtoPublico&sgl_tipo=RES&num_ato=00000026&seq_ato=000&vlr_ano=2013&sgl_orgao=FNDE/MEC>. Acesso em: 07 jul 2014.

CHAVES, L.G.; SANTANA, T.C.M.; SANTANA, T.C.M.; GABRIEL, C.G.; VASCONCELOS, F.A.G. Reflexões sobre a atuação do nutricionista do Programa Nacional de Alimentação Escolar no Brasil. **Ciência & saúde coletiva**, 18: 917-926, 2013.

FUNDO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO DA EDUCAÇÃO. Programa Nacional de Alimentação Escolar. 2014. Disponível em: <<http://www.fnde.gov.br/programas/alimentacao-escolar>>. Acesso em: 07 jul 2014.

GABRIEL, C.G. **Programa nacional de alimentação escolar: construção de modelo de avaliação da gestão municipal**. 2013. 254p. Tese (Doutorado em Saúde Coletiva) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

ISSA, R.C.; MORAES, L.F.; FRANCISCO, R.R.J.; SANTOS, L.C.; ANJOS, A.F.V.; PEREIRA, S.C.L. Alimentação escolar: planejamento, produção, distribuição e adequação. **Revista Panamericana de Salud Pública**, 35: 96-103, 2014.

PEIXINHO, A.M.L. A trajetória do Programa Nacional de Alimentação Escolar no período de 2003-2010: relato do gestor nacional. **Ciência e saúde coletiva**, 18: 909-916, 2013.

Engenharia de Biosistemas

Tecnologias aplicadas à Engenharia de Biosistemas

Vanessa de Fátima Grah

Hugo Thaner dos Santos

Otávio Neto Almeida Santos

Pedro Paulo Silva Barros

Hermes Soares da Rocha

Irineu Pedro de Sousa Andrade

Érica Silva Nakai

Alan Bernard Oliveira de Sousa

Bruno Patias Lena

Isaac de Matos Ponciano

1. Introdução

A Engenharia de Biosistemas é a aplicação das ciências matemáticas e das engenharias na agricultura, nos recursos naturais, no ambiente e na relação entre os sistemas biológicos e os processos produtivos do agronegócio. Mediante o uso e gestão de tecnologias inovadoras, podem-se projetar sistemas que beneficiam a produção no campo, de maneira produtiva e sustentável. Entre os processos envolvidos no estudo dessa ciência está a proteção ambiental com interface entre plantas, animais e solo, promovendo um entendimento do ambiente, das máquinas e mecanismos. Ou seja, a Engenharia de Biosistemas, atua em todo o processo de implantação, gerenciamento e manutenção das tecnologias que aperfeiçoam o agronegócio e maximizam a precisão da agropecuária. Ela garante que a crescente população mundial tenha abundância e qualidade de alimento, água pura e potável, combustíveis renováveis, fontes de energia alternativas e um ambiente seguro e saudável. Nesse contexto, serão apresentadas algumas dessas tecnologias que auxiliam no desenvolvimento de uma produção agrícola alinhada com os anseios da sociedade, o aumento da demanda de alimentos e a preservação dos recursos naturais.

2. Instrumentação aplicada à Engenharia de Biosistemas

A instrumentação tem papel fundamental no manejo dos biosistemas por proporcionar ao homem informações essenciais para o correto manejo dos recursos naturais. Notadamente, quando o manejo deste sistema é feito de forma eficiente há significativa melhoria da produtividade, economia de recursos financeiros e conservação do meio ambiente. Para que a instrumentação seja uma ferramenta eficaz no gerenciamento de decisões, alguns aspectos importantes devem ser levados em consideração, como a incerteza instrumental (inerente a todos os instrumentos de medição) e a sua relação com os processos físico, químicos e biológicos a serem monitorados. De forma geral, ao se calibrar um equipamento busca-se a medição de grandezas físicas e o resultado final é sempre uma aproximação do valor verdadeiro.

A figura 1 apresenta dois gráficos resultantes do processo de calibração de um higrômetro simplificado em comparação ao método padrão.

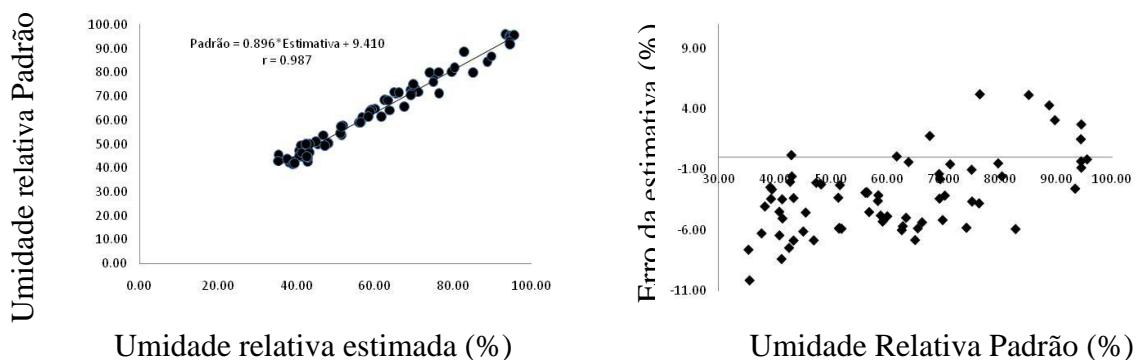


Figura 1. Estudo do erro relacionado à calibração de um higrômetro.

No gráfico da esquerda é obtido o coeficiente de correlação (r), que indica quanto os pontos se aproximam de uma reta, ou seja, a aproximação ao valor padrão. Para o referido caso o “ r ” é de 0.987. Este procedimento é largamente empregado na calibração simplista de vários instrumentos, não obstante o erro associado a cada medição é desconhecido. Pelo gráfico da direita, observa-se que o erro instrumental desta calibração pode chegar até 11% para baixos valores de umidade relativa. O estudo auxiliar do erro neste caso, ajuda no conhecimento das incertezas associadas à calibração; auxiliando assim na correta tomada de decisão. Há diversas formas de se investigar as incertezas associadas à medição de grandezas físicas, para um

aprofundamento no tema, recomenda-se a leitura de Vuolo (1996) e Balbinot e Brusamarello (2010).

Outra importante área da instrumentação, aplicada à Engenharia de Biosistemas, é o desenvolvimento de novas tecnologias com foco na sustentabilidade das pequenas propriedades rurais. Medici (1995) desenvolveu um dispositivo para a automação simplificada de sistemas de irrigação, que se tem mostrado eficiente na automação da irrigação localizada em sistemas orgânicos de produção vegetal. O equipamento é constituído de um pressostato de lavadora de roupas ligado a uma cápsula cerâmica por meio de um tubo flexível (Figura 2), conforme detalhadamente descrito por Medici et al. (2010).

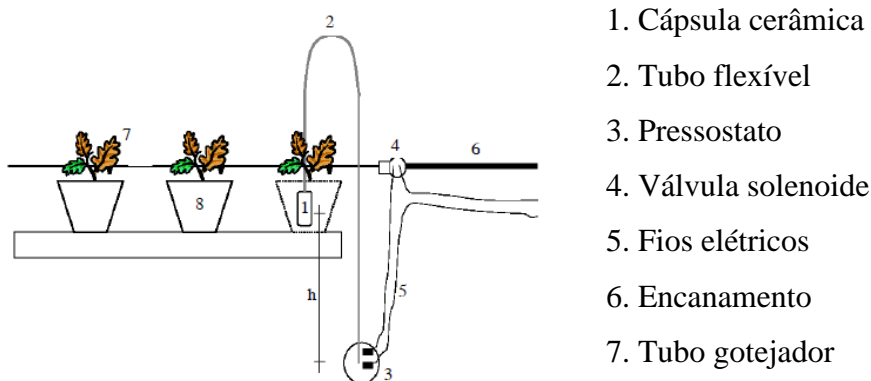


Figura 2. Esquema ilustrativo de montagem do “acionador simplificado para irrigação” (patente MU 8700270-1).

O pressostato deve ser posicionado abaixo da planta e a cápsula instalada no solo próximo ao sistema radicular (as profundidades de instalação da capsulo pode variar de 0,3 a 1,0 m), de tal modo que a coluna d’água dentro do tubo flexível mantenha o contato elétrico do pressostato desligado. Com a absorção de água pela planta o solo terá sua umidade reduzida, gerando uma sucção que anula a pressão da coluna d’água e aciona o sistema de irrigação através da válvula solenoide, instalada no início da linha lateral do sistema de irrigação. Com o acionamento da irrigação, é reestabelecido o equilíbrio de energia da solução do solo e a água contida na cápsula, com isso há um aumento da pressão no interior da mesma e, conseqüentemente, o desligamento do sistema de irrigação.

Com base no que foi apresentado, nota-se que a instrumentação é uma prática que deve ser estimulada, pois viabiliza a implementação de práticas agrícolas cada vez mais

adequadas sob os pontos de vista técnico, econômico e ambiental. Isto, por sua vez, pode potencializar avanços rumo ao desenvolvimento sustentável, tópico constantemente discutido na sociedade contemporânea.

3. Geotecnologia como ferramenta para tomada de decisões

O advento das geotecnologias permitiu observar grandes extensões de terra em uma simples tela de computador, possibilitando pontuar com incrível precisão onde ocorrem os problemas, facilitando uma ação mitigadora. As geotecnologias são o conjunto de tecnologias para coleta, processamento, análise e disponibilização de informação com referência geográfica, e estão intimamente ligadas aos avanços de informática e geociências (Rosa, 2005). São compostas por soluções em *hardware*, *software* e *peopleware*, que juntos se constituem em poderosas ferramentas para a tomada de decisões.

As geotecnologias são representadas, entre outros, por: Sistemas de Informação Geográfica (SIG), Sensoriamento Remoto, Sistema de Posicionamento Global (ex. GPS), Cartografia, Radiometria. Essas são ferramentas que facilitam a produção de informações em pouco tempo e a baixo custo para estudar fenômenos, analisar interações entre variáveis, apoiar tomada de decisões. A seguir serão abordados os aspectos gerais de cada ferramenta.

Os Sistemas de Informação Geográfica (SIG) correspondem às ferramentas computacionais de geoprocessamento, que permitem a realização de análises complexas, ao integrar dados de diversas fontes e ao criar bancos de dados georeferenciados (Câmara et al., 2005).

O Sensoriamento remoto "é a aquisição de informações sobre um objeto sem que haja um contato físico" (Colwell, 1983). A obtenção dessas informações geralmente depende da energia eletromagnética refletida ou emitida pelos alvos de interesse. As fotografias aéreas foram o primeiro produto a ser utilizado e posteriormente as imagens foram obtidas através da utilização de satélites. O sensoriamento remoto envolve basicamente duas fases, uma de aquisição de dados e outra de utilização. A fase de aquisição de dados envolve os processos de detecção e registro de informação. A fase de utilização envolve o tratamento e a extração de informação dos dados coletados,

além da aplicação em diferentes áreas, tais como a Pedologia, Hidrologia, Agronomia, Engenharia e outras (Sausen, 2008).

O Sistema de Posicionamento Global - GPS (Global Positioning System) foi projetado para se obter o posicionamento instantâneo bem como a velocidade de um ponto na superfície da terra ou próximo a ela. É um sistema de navegação baseado em satélites, que permite saber a localização 24 horas por dia em uma cobertura mundial. Atualmente, permitem determinar distâncias, direções e coordenadas (Albuquerque, 2008). A cartografia, etimologicamente “descrição de cartas”, foi introduzida em 1839. Sua concepção compreende: traçado de mapas; arte do traçado de mapas; ciência, a arte e a técnica de representar a superfície terrestre.

A radiometria utiliza equipamentos capazes de detectar e registrar a radiação para medir radiação eletromagnética. O radiômetro, dependendo do nível de coleta dos dados, é a ferramenta empregada para obter a resposta espectral em diferentes áreas como agricultura, geologia, exploração de petróleo e minerais, ambiental e locais urbanos. A radiação pode ser refletida ou emitida e convertida num produto que possa ser interpretado para fornecer informações úteis. Este produto pode ser uma imagem, uma fotografia, um gráfico ou uma tabela. Cada faixa de comprimento de onda tem seus próprios pontos fortes em termos de gerar informação, que contribuem nos processos do sensoriamento remoto (Richards; Jia, 2006).

3.1. Usos e aplicações

Com a utilização das Geotecnologias envolvendo ferramentas como: o Sensoriamento Remoto, os SIG's e o GPS, o tempo médio para a obtenção das informações necessárias foi abreviada para semanas, permitindo que várias alternativas sejam avaliadas de forma eficaz e relativamente rápida. Essas possibilidades levaram a uma mudança qualitativa na forma como muitas análises podem ser realizadas, tais vantagens justificam a ampla aceitação e a demanda por essas tecnologias.

Propostas metodológicas tais como: impactos ambientais, análises de viabilidade ou planejamento agrícola, fiscalização de crédito agrícola, previsão de safras e ferramentas de apoio à decisão, demonstram potencial para utilização das geotecnologias no âmbito da Engenharia de Biosistemas.

Na área agrícola o sensoriamento remoto tem-se tornado uma ferramenta muito útil, uma vez que auxilia na estimativa de safras agrícolas, visando fortalecer o planejamento agrícola. No estudo da vegetação e uso da terra, é possível quantificar parâmetros da mesma a diferentes escalas, em relação a medidas de fisiologia e estrutura da planta, tais como índice de área foliar, teor de água, teor de pigmentos de plantas (clorofila, carotenos), distinção de espécies vegetais, quantificação de biomassa, de nitrogênio, arquitetura e densidade do dossel, doenças, níveis de estresse de plantas.

Para o levantamento de solos, o sensoriamento remoto também tem sido de grande apoio, uma vez que é uma ferramenta não destrutiva e de baixo custo, reduzindo o tempo de operabilidade nas análises de solos. A diferenciação entre tipos de solos, caracterização mineralógica de solos, mapeamento de solos, estimativas de umidade, textura, matéria orgânica são exemplos de parâmetros auxiliados pelo sensoriamento remoto.

O sensoriamento remoto torna-se uma ferramenta chave, para o estudo e monitoramento dos recursos naturais, tais como o controle de queimadas, análise cronológica de bacias hidrográficas, estudos de modificações climáticas, acompanhamento de emissões e ação de poluentes, gerenciamento florestal de desmatamento e reflorestamento.

4. Manejo de irrigação e evapotranspiração

A água é um dos recursos naturais primordiais para a sobrevivência de todos os organismos vivos. Com o crescente aumento populacional e, conseqüente aumento da demanda por água doce, fica evidente a necessidade de preservar tal recurso para que novas gerações possam vir a utilizá-lo. A água doce de fácil acesso é utilizada para diversos fins, tais como na indústria, no abastecimento urbano e na irrigação de culturas. Somente a irrigação tem uma participação de 70% no volume total utilizado, sendo que os outros 30% são destinados à indústria e ao abastecimento urbano, o que permite afirmar a importância da sua utilização de forma consciente (Selborne, 2001). No período de 1961 a 2002 ocorreu um aumento de 140 para 280 milhões de hectares de área irrigada, elevando assim, a pressão pelo uso da água no país (FAO, 2002).

Com o aumento das tecnologias empregadas nas lavouras, atualmente, um produtor tem a capacidade de alimentar aproximadamente 100 pessoas, sendo que no

passado era necessário o trabalho de quatro pessoas para alimentar somente uma. Isto é um reflexo da pressão da sociedade por maiores quantidades de alimentos, conciliado com o êxodo rural. Interligado a isso, a agricultura irrigada entra em cena na produção de alimentos, pois com ela é possível obter maiores índices de produtividade dos alimentos numa mesma área de cultivo anteriormente cultivada sem irrigação. Atualmente, mais da metade da população mundial depende dos alimentos produzidos em áreas irrigadas (Mantovani et al., 2009).

O feijão irrigado, por exemplo, produz cerca de cinco vezes mais do que o feijão de sequeiro em uma mesma área, mostrando assim, a importância de se implementar essa tecnologia de forma consciente para aumentar a produção por unidade de área. Em termos gerais, a produção na agricultura irrigada é em média de 3 a 3,5 vezes maior em relação à agricultura não irrigada. Este é um dos motivos pelo qual a agricultura irrigada represente 18% da área cultivada no Brasil, respondendo por aproximadamente 44% da produção total de alimentos (Christofidis, 2005). Nesse contexto, o manejo de irrigação nas culturas torna-se uma ferramenta fundamental no uso racional da água.

O manejo racional de irrigação permite encontrar estratégias mais eficientes e adequadas na utilização da água, fazendo com que os eventuais desperdícios sejam reduzidos. Problemas como erosão do solo, queda nas produtividades e elevado consumo de energia elétrica são exemplos da utilização demasiada da água de irrigação. Por outro lado, quando a cultura é manejada de maneira adequada é possível elevar os índices de produtividade, além de garantir a sobrevivência das culturas na ocorrência de longos períodos de escassez de chuvas.

O estudo do manejo de irrigação de culturas requer um conhecimento dos processos que regem a água no sistema solo-planta-atmosfera. A dinâmica da água no solo, a absorção de água pelas plantas e as variações climáticas são algumas das áreas de conhecimento fundamentais para se realizar o manejo de irrigação adequado. Nesse sentido, é possível realizar a tomada de decisão sobre o melhor método de irrigação, lâmina de irrigação aplicada e momento certo de irrigar, de maneira a aplicar para as plantas somente a quantidade de água necessária, evitando os desperdícios e maximizando a produtividade.

Segundo Albuquerque e Durães (2008), atualmente são possíveis encontrar no Brasil diversos métodos de irrigação, dentre eles por aspersão, por superfície e método

de irrigação localizada ou microirrigação. Christofidis (2005) descreve que dos 3,4 milhões de hectares da área de irrigação no país, 50% é ocupada pela irrigação por superfície, sendo 21% para a irrigação por pivô central, 19% para a aspersão convencional e 10% para a localizada. Apesar de representarem valores mínimos, também podem ser encontrados métodos de irrigação por sulcos e microaspersão (PIRES et al., 2008).

Os principais fatores que proporcionam uma tomada de decisão acertada sobre o melhor método de irrigação a ser utilizado em uma área são: a cultura a ser implantada; o tipo de solo predominante no local e suas características físico-hídricas; a declividade do terreno e as características climáticas do local como o regime pluviométrico anual e os valores médios da temperatura, umidade relativa do ar e velocidade do vento. Por exemplo, o arroz produzido na região sul é cultivado principalmente sobre irrigação por superfície (inundado).

As hortaliças, cultivadas em quase todas as regiões do país, normalmente são produzidas com o auxílio de irrigação por aspersão convencional. Quando manejadas com irrigação, o cultivo de grandes culturas como soja e milho é realizado com irrigação por pivô central. A irrigação localizada é normalmente utilizada em casos mais específicos, principalmente em cultivos de plantas com características arbóreas como, por exemplo, o pêssigo e a laranja e em regiões com alta taxa de evapotranspiração diária como na região do perímetro irrigado da bacia do Rio São Francisco no Nordeste Brasileiro. Em vista disso, é possível prever a complexidade de se fazer o manejo de irrigação.

O manejo de irrigação das culturas pode ser realizado pela avaliação do solo, pela avaliação do clima ou pelas características de consumo de água diretamente pelas culturas. A avaliação pelo solo permite o monitoramento da umidade do solo durante o cultivo, sendo a irrigação realizada quando é verificada a necessidade de reposição de água conforme o decréscimo da umidade a partir da sua capacidade de campo. O manejo de irrigação realizado via clima é realizado com base nos dados climáticos próximos ao local de cultivo, levando em consideração a demanda atmosférica. Quando a irrigação é manejada conforme o consumo de água pelas plantas, o conceito de evapotranspiração é aplicado. Com a evapotranspiração da cultura quantificada é

possível determinar a quantidade exata de água que a cultura necessita, sendo a melhor maneira de realizar o manejo de irrigação.

A evapotranspiração (ET) está diretamente relacionada aos estudos de consumo hídrico, sendo definida como a quantidade de água consumida por uma determinada cultura. Segundo Allen et al. (1998), ET é a combinação da evaporação (E), que é proveniente do solo, e a transpiração (T), relacionada à planta. Os fatores que mais influenciam ET são as condições atmosféricas locais, tais como a temperatura, radiação solar, umidade relativa do ar e vento. Fatores relacionados ao manejo do cultivo também influenciam as taxas de ET, tais como cultivar, população de plantas, irrigação e controle de pragas e doenças. Finalmente, características de solo relacionadas à fertilidade, cor e capacidade de retenção de água também afetam as taxas de ET (Allen et al., 1998).

A medição da ET é feita por várias metodologias, com destaque para os métodos de balanço de energia, balanço de água no solo e lisimetria de pesagem. Além destes, existem os métodos de estimativa a partir de dados meteorológicos e o tanque de evaporação (Allen et al., 1998). A medição da ET com lisímetros de pesagem é o método mais preciso, além de ser possível determiná-la em um espaço de tempo variável, em intervalos de dez minutos ou menos (Faria et al., 2006; Carvalho et al., 2007).

Além do consumo de água da cultura de interesse, define-se também a evapotranspiração de referência (ET_o) que segundo Allen et al. (1998) corresponde à demanda hídrica de uma superfície padronizada de uma vegetação hipotética similar à grama, caracterizada por crescimento vegetativo vigoroso, mantida sem deficiência hídrica, com resistência aerodinâmica de 70 s m^{-1} , altura permanente de 12 cm e albedo de 0,23. Dentre os métodos para se determinar ET_o, o de Penman-Monteith (Allen et al., 1998) é considerado o método padrão, sendo ET_o calculada com dados de radiação, temperatura do ar, umidade relativa e velocidade do vento.

Por meio da razão entre ET da cultura de interesse e ET_o, determina-se o coeficiente de cultivo (K_c). Este coeficiente representa a integração dos diferentes efeitos que fazem com que a cultura de interesse apresente comportamento diferente da cultura de referência. Segundo Lascano e Sojka (2007), o K_c é requerido nas fases de dimensionamento e manejo de irrigação.

A Engenharia de Biosistemas é uma ciência complexa, e como tal se utiliza de tecnologias variadas para proporcionar o melhor uso dos recursos naturais na área agrícola. Aqui mostramos algumas das ferramentas disponíveis, que nos ajudam na tomada de decisões no tocante a produção agrícola, para que essa prática possa ser ambientalmente correta e economicamente viável, promovendo o crescimento sustentável da produção de alimentos no Brasil.

Referências

- ALBUQUERQUE, P.C.G. **Desastres naturais e geotecnologias: GPS**, caderno didático nº 3. São José dos Campos: Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais - INPE, 2008. 24 p.
- ALBUQUERQUE, P.E.P.; DURÃES, F.O.M. **Uso e manejo de irrigação**. Brasília: EMBRAPA, 2008. 528 p.
- ALLEN, R.G.; PEREIRA, L.S.; RAES, D.; SMITH, M. **Crop evapotranspiration: guidelines for computing crop water requirements**. Rome: FAO, 1998. 300 p.
- BALBINOT, A.; BRUSAMARELLO, V.J. **Instrumentação e fundamentos de medidas**. 2. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2010. 672 p.
- CÂMARA, G. **Representação Computacional de Dados Geográficos**. In: CÂMARA, G.; DAVIS, C.; CASANOVA, M. A.; QUEIROZ, G.R.D. (Ed.). Bancos de Dados Geográficos. Curitiba: Editora MundoGEO, 2005. 504 p.
- CARVALHO, D.F.; SILVA, L.D.B.; GUERRA, J.G.M.; CRUZ, F.A.; SOUZA, A.P. Instalação, construção e funcionamento de um lisímetro de pesagem. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola**, 27: 363-372, 2007.
- CHRISTOFIDIS, D. **Água na produção de alimentos: o papel da irrigação no alcance do desenvolvimento sustentável**. Brasília: Universidade de Brasília, 2005. 29 p.
- COLWELL, R.N. **Manual of remote sensing**. 2. ed. Virginia: American Society of Photogrammetry, 1983. 2440 p.
- FARIA, R.T.; CAMPECHE, F.S.M.; CHIBANA, E.Y. Construção e calibração de lisímetros de alta precisão. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, 10: 237-242, 2006.
- LASCANO, R.J.; SOJKA, R.E. **Irrigation of agricultural crops**. 2. ed. Madison: American Society of Agronomy, 2007. 664p.
- MANTOVANI, E.C.; BERNARDO, S.; PALARETTI, L.F.P. **Irrigação-princípios e métodos**. Viçosa: UFV, 2009. 355 p.
- MEDICI, L.O. Automatic controller for irrigation systems. **Revista da Propriedade Industrial**, 1288, 1995.
- MEDICI, L.O.; ROCHA, H.S.; CARVALHO, D.F.; PIMENTEL, C.; AZEVEDO, R.A. Automatic controller to water plants. **Scientia Agricola**, 67: 727-730, 2010.
- PIRES, R.C.M.; ARRUDA, F.B.; SAKAI, E.; CALHEIROS, R.O.; BRUNINI, O. Agricultura Irrigada. **Revista tecnologia e Inovação Agropecuária**, 1: 98-111, 2008.
- RICHARDS, J.A.; JIA, X. **Remote sensing digital image analysis: an introduction**. 4. ed. Berlin: Springer, 2006. 439 p.
- ROSA, R. Geotecnologias na geografia aplicada. **Revista do Departamento de Geografia**, 16: 81-90. 2005.
- SAUSEN, T.M. **Desastres naturais e geotecnologias - sensoriamento remoto**, caderno didático nº 2. São José dos Campos: Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais - INPE, 2008. 39 p.
- SELBORNE, L. **A ética do uso da água doce: um levantamento**. Brasília: UNESCO, 2001. 80 p.

VUOLO, J.H. **Fundamentos da teoria de erros**. São Paulo: Edgard Blucher, 1992. 225 p.

Estatística e Experimentação Agronômica

Análise de experimentos utilizando a interface Rstudio do *software* R

Thiago Gentil Ramires

Iuri Emmanuel de Paula Ferreira

Ana Julia Righetto

Luiz Ricardo Nakamura

Djair Durand Ramalho Frade

1. Introdução

Na área agrícola, uma das maneiras mais utilizadas para se testar novos tratamentos é a realização de experimentos, os quais têm como objetivo comparar a eficiência entre os mesmos. Novos cultivares de sementes, tipos de manejo, formulações de adubos, métodos de adubação, tipos de solo podem ser avaliados, por exemplo. Para comprovar a eficácia desses novos tratamentos, técnicas estatísticas devem ser aplicadas, mais especificamente as técnicas de estatística experimental, que visam realizar o estudo de contrastes. O estudo de contrastes é principalmente utilizado quando o experimento é composto por mais de dois tratamentos e possibilita o estabelecimento de comparações entre tratamentos (ou grupos de tratamentos) de interesse.

Alguns *softwares* estatísticos possuem programações internas prontas para as análises de diversos problemas. Dentre os mais utilizados, destacamos: SAS, STATISTICA, R e STATA. Nesse capítulo iremos abordar apenas o uso do *software* R, pois é gratuito e possui seu código de programação aberto.

2. R-Studio

A interface RStudio torna o uso do *software* R mais simples e prático, o que facilita a análise dos experimentos agrícolas. Informações sobre instalação e formas de uso podem ser encontradas no site <http://www.rstudio.com/>.

O *layout* da interface RStudio é apresentado na Figura 1, na qual é possível observar as duas principais janelas, sendo elas: “Script”, local utilizado para digitar as linhas de comando (dígitos em verde) e o “Console”, local onde são executadas as

linhas de comando. Para a execução de alguma linha de comando deve-se utilizar o botão “Run”, localizado acima da janela “Script”.

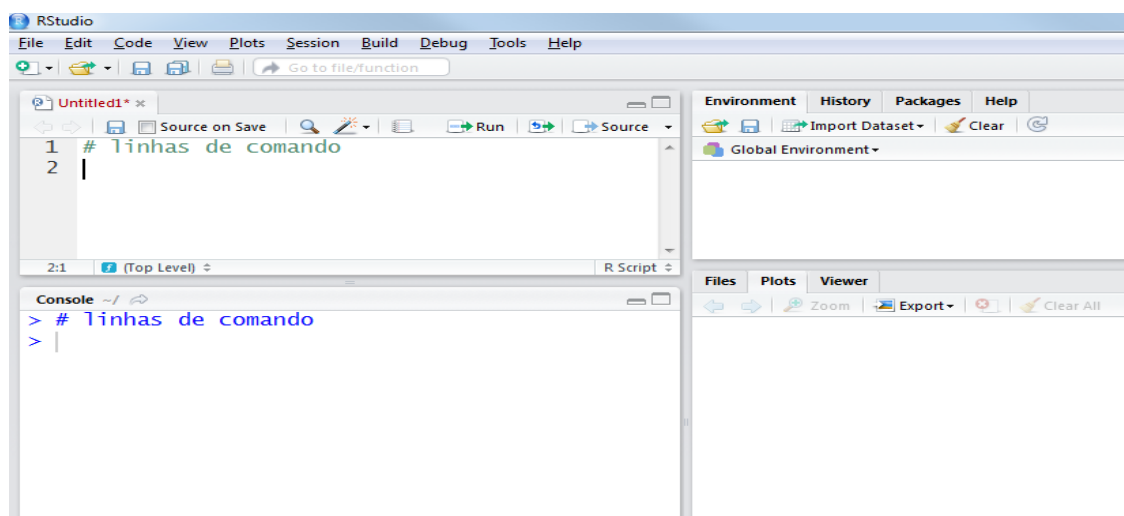


Figura 1. Layout da interface RStudio.

3. Princípios básicos de um delineamento

A experimentação tem por objetivo o estudo dos experimentos, isto é, seu planejamento, execução, análise dos dados obtidos e interpretação dos resultados obtidos. Para isso, alguns conceitos básicos de análise de experimentos devem ser definidos, tais como:

- tratamento (ou fator): é o método, elemento ou material cujo efeito deseja-se medir ou comparar em um experimento. Exemplos: variedades de milho; níveis de proteína na ração, diferentes temperaturas de pasteurização do leite, entre outros.
- unidade experimental: é a unidade que vai receber o tratamento e fornecer os dados que deverão refletir o seu efeito. Exemplos: uma fileira de plantas com 3 metros de comprimento no campo, um carneiro, um barril de leite.
- delineamento experimental: é a maneira como os tratamentos são designados às unidades experimentais. Exemplos: delineamento inteiramente casualizado, delineamento casualizado em blocos e delineamento em quadrado latino.
- esquema: quando em um mesmo experimento são avaliados dois ou mais fatores, os níveis dos fatores podem ser combinados de maneiras diferentes. O esquema é justamente a maneira utilizada pelo pesquisador ao combinar os níveis dos fatores para se obter os tratamentos. Exemplos: esquema fatorial e esquema em parcelas subdivididas.

- variável resposta: é a variável mensurada usada para avaliar o efeito de tratamentos.
- erro experimental: é o efeito de fatores que atuam de forma aleatória e que não são passíveis de controle pelo experimentador.

Os experimentos podem variar de uma pesquisa para outra, porém, todos devem seguir alguns princípios básicos, que são necessários para que as conclusões obtidas sejam válidas. Estes princípios são:

- princípio da repetição: consiste na reprodução do experimento básico, tendo por finalidade propiciar a obtenção de uma estimativa do erro experimental.
- princípio da casualização: propicia a todos os tratamentos a mesma probabilidade de serem designados a qualquer unidade experimental.
- princípio do controle local: divide um ambiente heterogêneo em sub-ambientes homogêneos, tornando o delineamento experimental mais eficiente, pela redução do erro experimental.

4. Delineamentos Experimentais

4.1. Delineamentos inteiramente casualizados

O delineamento inteiramente casualizado (DIC) é indicado quando se dispõe de um terreno uniforme, sendo inútil estabelecer blocos que apenas produzirão a diminuição do número de graus de liberdade para o resíduo. Algumas vantagens do DIC em relação a delineamentos mais complexos, segundo Pimentel-Gomes (2009), são:

- qualquer número de tratamentos ou de repetições pode ser usado e, o número de repetições não precisa ser o mesmo para todos os tratamentos;
- o número de graus de liberdade para o resíduo é o maior possível.

Considerando um experimento de um único tratamento com t níveis e r_i repetições, sendo que as parcelas são consideradas homogêneas e os tratamentos são atribuídos de forma completamente aleatória, tem-se o seguinte modelo para DIC:

$$y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij}$$

em que y_{ij} é o valor observado na unidade experimental do tratamento i com a

repetição j ; μ é o efeito geral da média; τ_i é o efeito do tratamento i e ε_{ij} é o erro aleatório.

Em um DIC, têm-se duas fontes de variação: os tratamentos em estudo e o erro aleatório. Considerando o número de repetições $r_i = r$ (experimento balanceado) e t o número de tratamentos, a análise de variância (ANOVA) pode ser elaborada de acordo com a Tabela 1.

Tabela 1. ANOVA para DIC.

Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	Teste F
Tratamento	t-1	SQTrat	QMTrat	QMTrat/QMRes
Resíduo	t(r-1)	SQRes	QMRes	-
Total	tr-1	SQTotal		-

Quando se instala um experimento no delineamento inteiramente casualizado, o objetivo é, em geral, verificar se existem diferenças significativas entre, pelo menos, duas médias de tratamentos. As hipóteses testadas são:

$$H_0: \mu_1 = \mu_2 = \dots = \mu_i$$

$$H_1: \mu_i \neq \mu_j$$

Uma forma equivalente de escrever as hipóteses anteriores é em termos dos efeitos dos tratamentos τ_i , dado por:

$$H_0: \tau_1 = \tau_2 = \dots = \tau_i = 0$$

$$H_1: \tau_i \neq 0, \text{ para algum } i.$$

Para a análise de um delineamento inteiramente casualizado na interface RStudio, são utilizados as principais linhas de comando, apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2. Comandos no R para DIC.

Linhas de Comando	Resultado
Modelo = aov(y ~ tratamento, data= dados)	Construção do modelo
anova(modelo)	Análise de variância
LTukey(modelo,"tratamento",conflevel=0.95)	Teste de Tukey, o qual utiliza a library 'laercio'

4.2. Delineamentos casualizado em blocos

O delineamento casualizado em blocos (DBC) é utilizado quando as unidades apresentam heterogeneidade. Neste tipo de experimento, são considerados os princípios de repetição, aleatorização e controle local, sendo que o último é representado pelos blocos. Para que o experimento seja eficiente, cada bloco deverá ser o mais uniforme possível, mas os blocos poderão diferir uns dos outros.

No DBC, as parcelas são distribuídas em blocos da forma mais uniforme possível, sendo que o número de parcelas por bloco deve ser múltiplo do número de tratamentos e estes são designados às parcelas de forma aleatória, em que essa casualização é feita dentro dos blocos. Algumas vantagens desse tipo de experimento são:

- controle das diferenças que ocorrem de um bloco para outro;
- utilização qualquer número de blocos e tratamentos.

O DBC possui dois fatores: tratamentos e blocos. Considera-se um experimento com t tratamentos, b repetições e $t * b$ parcelas, sendo essas parcelas agrupadas em b blocos homogêneos, então, tem-se o seguinte modelo:

$$y_{ij} = \mu + b_j + \tau_i + \varepsilon_{ij}$$

em que y_{ij} é o valor observado na unidade experimental do tratamento i , bloco j ; μ é o efeito geral da média; b_j é o efeito do bloco j ; τ_i é o efeito do tratamento i e ε_{ij} é o erro aleatório. O resumo da ANOVA para o DBC é apresentado na Tabela 3.

Tabela 3. ANOVA para DBC.

Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	Teste F
Blocos	b-1	SQBlocos	QMBlocos	QMBlocos/QMRes
Tratamento	t-1	SQTrat	QMTrat	QMTrat/QMRes
Resíduo	(b-1)(t-1)	SQRes	QMRes	-
Total	tb-1	SQTotal	-	-

Geralmente o teste de hipótese com relação aos efeitos de blocos não é feito por dois motivos: 1- o interesse principal é testar os efeitos de tratamento e o propósito usual dos blocos é eliminar fontes estranhas de variação, e 2- embora os tratamentos sejam distribuídos aleatoriamente às unidades experimentais, os blocos são obtidos de uma maneira não aleatória.

Para a análise de um delineamento casualizado em blocos na interface RStudio, são utilizados as principais linhas de comando, apresentadas na Tabela 4.

Tabela 4. Comandos no R para DBC.

Linhas de Comando	Resultado
<code>modelo=lm(y ~ bloco+tratamento, data= dados)</code>	Construção do modelo
<code>anova(modelo)</code>	Análise de variância
<code>LTukey(modelo,"tratamento",conf.level=0.95)</code>	Teste de Tukey

4.3 Delineamentos em quadrados latinos

Os delineamentos em quadrados latinos são utilizados quando deseja-se controlar duas fontes de variação, ou seja, considera-se o controle local aplicado em dois sentidos (Barbin, 2003). Esse tipo de delineamento tem por característica possuir o mesmo número de linhas, colunas e tratamentos – sua principal desvantagem, uma vez que o quadrado latino está restrito a ter o número de repetições igual ao número de tratamentos –, além de que cada tratamento ocorre apenas uma vez em cada linha e cada coluna, em que as linhas e colunas são cruzadas (Demétrio, 2010). Se forem considerados t tratamentos em um determinado experimento, o mesmo terá t^2 parcelas.

No caso em que $t = 4$, tem-se o seguinte esquema:

Tabela 5. Delineamento em quadrado latino 4 x 4.

Linha	Coluna			
	1	2	3	4
1	A	B	C	D
2	B	C	D	A
3	C	D	A	B
4	D	A	B	C

em que A, B, C e D são os tratamentos testados. Salienta-se aqui que o esboço foi feito utilizando a ordem padrão, sendo possível aleatorizar os tratamentos dentro das linhas e colunas, lembrando que um determinado tratamento pode ocorrer apenas uma vez em cada linha e cada coluna. O modelo matemático para este tipo de delineamento é dado por:

$$y_{ijk} = \mu + l_i + c_j + \tau_k + \varepsilon_{ijk}$$

em que μ é a média geral, l_i é o efeito da i -ésima linha ($i = 1, 2, \dots, t$), c_j é o efeito da j -ésima coluna ($j = 1, 2, \dots, t$), τ_k é o efeito do k -ésimo tratamento, $k = 1, 2, \dots, t$, e $\varepsilon \sim N(0, \sigma^2)$ é o erro aleatório associado ao modelo. Ainda, as seguintes suposições devem ser respeitadas:

$$\sum_{i=1}^t l_i = \sum_{j=1}^t c_j = \sum_{k=1}^t \tau_k.$$

O esquema da análise de variância para o delineamento em quadrado latino é dado por:

Tabela 6. ANOVA para quadrados latinos.

Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	Teste F
Tratamentos	t-1	SQTrat	QMTrat	QMTrat/QMRes
Linhas	t-1	SQLinha	QMLinha	-
Colunas	t-1	SQColuna	QMColuna	-
Resíduo	(t-2)(t-1)	SQRes	-	-
Total	t ² -1	SQTotal	-	-

Para a análise de um delineamento quadrado latino na interface RStudio, são utilizados as principais linhas de comando, apresentadas na Tabela 7.

Tabela 7. Comandos no R para QL.

Linhas de Comando	Resultado
modelo=aov(y ~ coluna+linha+tratamento)	Construção do modelo
anova(modelo)	Análise de variância
LTukey(modelo,"tratamento",conflevel=0.95)	Teste de Tukey

4.4. Delineamentos em esquema fatorial

Muitos estudos são conduzidos com o objetivo de avaliar a influência de múltiplos fatores experimentais sobre as respostas de interesse. Uma alternativa para estimar seus efeitos é variar um fator por vez, mantendo-se os demais em níveis constantes. No entanto, tal abordagem requer um grande número de parcelas e, ainda, impossibilita o estudo das interações que estes fatores possam apresentar (Hicks, 1993). A solução, neste caso, é a adoção de um esquema de tratamentos fatorial.

Os experimentos fatoriais possibilitam inferir como vários fatores experimentais afetam, simultaneamente, as respostas em estudo (Pimentel-Gomes, 2009). No esquema fatorial, cada tratamento é uma combinação possível dos níveis dos fatores experimentais. Por exemplo, se há 2 fatores, cada um com 2 níveis, temos 4 tratamentos

possíveis que formam um fatorial 2x2; já se há um fator com 3 níveis e outro com 2, formam-se 6 tratamentos de um fatorial 3x2. Observe que o número de tratamentos cresce progressivamente com o número de fatores, mas os experimentos fatoriais podem ser fracionados ou alocados em blocos incompletos por meio de técnicas de confundimento, reduzindo a quantidade de parcelas requeridas e sem acarretar grande ônus às pesquisas (Hicks, 1993).

Os experimentos fatoriais podem ser executados mediante qualquer tipo de delineamento experimental. Considera-se um caso bem simples, quando os tratamentos são atribuídos às parcelas inteiramente ao acaso (DIC) e o fatorial é constituído apenas por dois fatores, A e B. Nesta situação, o modelo de análise de variância é descrito por:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \gamma_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

em que μ é o efeito geral da média; α_i é o efeito do nível i do fator A; β_j é o efeito do nível j do fator B; γ_{ij} é o efeito da interação entre os fatores A e B; e ε_{ijk} é o erro experimental na parcela que recebeu o nível i do fator A, o nível j do fator B e na repetição k . O resumo da análise de variância para um delineamento inteiramente ao acaso com tratamentos em esquema fatorial é apresentado na Tabela 8.

Tabela 8. ANOVA para o esquema fatorial.

Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Soma de Quadrados	Quadrado médio	Teste F
Fator A	i-1	SQA	QMA	F=QMA/QMRes
Fator B	j-1	SQB	QMB	F=QMB/QMRes
AxB	(i-1)(j-1)	SQAxB	QMAxB	F=QMAxB/QMRes
Tratamento	(ij-1)	SQTrat	QMTrat	F=QMTrat/QMRes
Resíduo	ij(k-1)	SQRes	QMRes	-
Total	ijk-1	SQTotal	-	-

Nesses experimentos há o interesse de se testar os efeitos principais de cada um dos fatores experimentais, bem como os de suas interações. O primeiro passo é determinar se existem interações significativas, o que corresponde a testar o conjunto de hipóteses abaixo:

$$H_0: \gamma_{11} = \gamma_{12} = \dots = \gamma_{ij} = 0$$

$$H_1: \gamma_{ij} \neq 0, \quad \forall i, j.$$

Se há interações significativas, não podemos considerar os efeitos principais dos fatores experimentais. O problema é que, nesta situação, o comportamento da resposta ao longo dos níveis do fator A é diferente nos variados níveis do fator B e vice-versa. Assim, só faz sentido a comparação dos níveis de um fator dentro de um nível fixado do outro fator. Caso as interações não sejam significativas, deseja-se testar os efeitos principais dos fatores experimentais por meio dos seguintes conjuntos de hipóteses:

$$1. \begin{cases} H_0: \alpha_1 = \alpha_2 = \dots = \alpha_i = 0 \\ H_1: \alpha_i \neq 0 \end{cases}$$

$$2. \begin{cases} H_0: \beta_1 = \beta_2 = \dots = \beta_j = 0 \\ H_1: \beta_j \neq 0 \end{cases}$$

Para a análise de um delineamento em esquema fatorial na interface RStudio, são utilizados as principais linhas de comando, apresentadas na Tabela 9.

Tabela 9. Comandos no R para o esquema Fatorial.

Linhas de Comando	Resultado
<code>modelo=aov(y~trat1+trat2 + trat1:trat2, data= dados)</code>	Construção do modelo
<code>anova(modelo)</code>	Análise de variância
<code>LTukey(modelo,"tratamento",conf.level=0.95)</code>	Teste de Tukey

Referências

- BARBIN, D. **Planejamento e análise de experimentos agrônômicos**. Arapongas: Midas, 2003. 208 p.
- HICKS, C.R. **Fundamental concepts in the design of experiments**, 4. ed. New York: Saunders College Publishing, 1993. 509 p.
- PIMENTEL-GOMES, F. **Curso de estatística experimental**. 15. ed., Piracicaba: FEALQ, 2009. 451 p.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R**: A language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2011. Disponível em: <http://www.R-project.org>.

Fisiologia e Bioquímica de Plantas

Biotecnologia Vegetal

André Luiz Barboza

Tânia Regina Batista

Esteban Galeano Gomez

Ana Paula Preczenhak

1. Introdução

A biotecnologia vegetal compreende ferramentas que envolvem desde a cultura de tecidos até as mais diversas técnicas moleculares que são aplicadas para gerar conhecimento benéficos para o desenvolvimento científico e econômico em diversos países. Na agricultura, possibilidades biotecnológicas permitem obter a curto prazo respostas para o estabelecimento de uma agricultura sustentável, aumentando a produção e ao mesmo tempo preservando o ambiente.

O papel central da biotecnologia vegetal é gerar soluções perante os desafios do presente e do futuro, causados pelo estilo de vida e consumo da sociedade moderna. A utilização de técnicas específicas podem funcionar como ferramentas auxiliando no suprimento da demanda de alimentos, produção de sementes e o aumento de biomassa para geração de energia renovável. Neste sentido, a biotecnologia vegetal se coloca como peça chave para o aumento da produtividade, da qualidade da produção e para o desenvolvimento de plantas adaptadas às mais variadas condições ambientais.

Para ampliar a discussão sobre as práticas biotecnológicas, apresentamos uma abordagem científica de alguns dos princípios da biotecnologia vegetal. Serão discutidos alguns dos métodos e ferramentas usados na propagação de plantas e na transgenia aplicáveis à pesquisa acadêmica, que podem ser direcionadas aos processos industriais.

2. Cultura de tecidos de plantas

A cultura de tecidos de plantas é uma aplicação da biotecnologia, com ampla utilização na agricultura, na multiplicação de espécies, muitas vezes de difícil propagação e em programas de melhoramento vegetal e transformação genética. A totipotencialidade das células vegetais, que contém toda a informação genética necessária para a formação de uma planta completa é a vantagem do processo de

micropropagar plantas *in vitro*. A regeneração de uma planta a partir de uma única célula ocorre pela capacidade de proliferação desta célula em se desdiferenciar e se diferenciar para formar um tecido somático que seja capaz de levar à formação de uma planta inteira, com folha, caule e raiz (Kerbaui, 1997; Mantell et al., 1994).

Dentre as aplicações da propagação *in vitro* destacam-se aquelas relacionadas com a: i) conservação de germoplasma *in vitro*; ii) a aceleração dos programas de melhoramento pela multiplicação de clones, visando à produção de mudas, o rejuvenescimento de clones selecionados e ao potencial para produção de sementes (embriões somáticos); iii) a produção de clones livres de patógenos, onde são produzidos de culturas livres de microrganismos patogênicos, visando atender à demanda de um processo de propagação clonal sustentável; iv) o patenteamento, pela possibilidade de se patentear os processos-materiais obtidos por meio da biotecnologia; v) modelo, pois podem servir como base para o desenvolvimento de outras técnicas biotecnológicas, como a transformação genética (Xavier et al., 2009).

Em vista da potencialidade da aplicação das técnicas de propagação *in vitro* vários trabalhos continuam sendo desenvolvidos, no intuito de tornar esta tecnologia acessível e economicamente viável. No entanto, algumas desvantagens e dificuldades são encontradas durante o processo como: a necessidade de desenvolvimento de protocolos otimizados para diferentes espécies ou grupos de clones, a recalcitrância das culturas à propagação *in vitro* e os riscos da contaminação acidental das culturas por microrganismos (Xavier et al., 2007).

Os processos relativos à introdução do material *in vitro* são feitos pelo isolamento de pequenos fragmentos de tecido vivo, denominados explantes, que podem ser um fragmento de folha, caule, raiz ou qualquer outro tecido que contenha as condições de ser induzido, para regenerar uma planta inteira *in vitro* (Torres et al., 2000; Lakshmanan et al., 2005). Os explantes são fragmentos de tecidos vegetais formados por um agrupamento de células que apresentam vários estádios de desenvolvimento, com diversas atividades bioquímicas e fisiológicas que podem em muitos casos responderem a um determinado estímulo provocado pelo ambiente *in vitro*, o que pode levar à habilidade competente destas células a reações diversas, esperando-se que pelo menos algumas células desse explante sejam capazes de se desenvolverem e regenerarem uma nova planta (Mantell et al., 1994; Torres et al., 2000; Lakshmanan et al., 2005).

A regeneração de plantas *in vitro* pode ser dificultada por diversos fatores, mas três deles merecem atenção para o estabelecimento de um eficiente protocolo de cultura de tecidos de plantas: i) o genótipo, isto é, a escolha da espécie ou cultivar apropriada para ser usada na cultura de tecidos dependerá dos objetivos experimentais propostos; ii) a fonte de explantes, sua origem pode ser a partir de regiões meristemáticas, segmentos de folhas, caules e/ou raízes, destacando-se a necessidade de serem feitos testes experimentais para avaliar a viabilidade e rapidez na qual o explante será capaz de responder a determinado estímulo para a obtenção de plantas inteiras. Frequentemente, os explantes de tecidos juvenis são mais usados devido à pouca diferenciação celular; iii) a condição de cultivo, como meio de cultura específico, intensidade de luz, temperatura e recipiente utilizados são fatores que podem ser limitantes ao desenvolvimento da planta *in vitro*.

Os explantes ficam por períodos definidos em meio de cultura para induzir o desenvolvimento da embriogênese ou da organogênese. Durante a embriogênese são formados embriões somáticos a partir dos quais uma planta inteira é formada, sem vínculo vascular com o tecido de origem. Enquanto que na organogênese ocorre o desenvolvimento da planta com conexão vascular com o explante. Seja por embriogênese ou organogênese o objetivo é regenerar uma planta idêntica, isto é, um clone da planta original, por propagação assexuada de células para obter uma nova planta, mas mantendo o genótipo idêntico à planta matriz (Torres et al., 2000).

O sucesso da eficiência de se obter plantas regeneradas pela técnica da cultura de tecidos está diretamente relacionada ao estabelecimento de todos os fatores descritos anteriormente. Entretanto, muitos destes ainda necessitam ser avaliados, tais como os mecanismos pelos quais os reguladores de crescimento ou hormônios vegetais atuam sobre todos os processos que controlam o desenvolvimento da planta (Mantell et al., 1994; Caldas et al., 1998).

A aplicação prática da cultura de tecidos, em determinada atividade experimental, depende das condições de cultivo e está diretamente relacionada ao meio de cultura utilizado. Estes podem ser sólidos, semissólidos e líquidos, e os meios de cultura usados atualmente tem como base os meios desenvolvidos por White (1942; 1945), denominado meio White e posteriormente com alterações nas concentrações de sais e de nitrogênio na forma de amônio, o meio proposto por Murashige e Skoog (1962),

denominado MS. Os meios de cultura podem ainda ser complementados com reguladores de crescimento, como as auxinas (como o diclorofenoxiacético - 2,4-D), as citocininas (como a cinetina) e as giberilinas (como ácido giberélico) e em alguns casos se faz uso de inibidores, como o etileno (Thorpe, 2007; Haridassan; Ferreria, 1998). Na década de 1990 foi difundida na cultura de tecidos, a técnica de biorreatores, com sistema de imersão temporária de explantes em meio líquido, otimizado para reduzir o custo do processo da micropropagação de plantas, chegando a ser usado para propagação em larga escala de cana-de-açúcar em Cuba (Bernal, 2008; Lakshmanan, 2006) e de leguminosas e bromeliáceas com resultado de regeneração destas espécies por embriogênese somática (Mousa, 2007; Rech Filho, 2004).

Todo o processo para o manuseio de explantes conta com materiais esterilizados (pinças, bisturis e suportes), assim como o local de subcultura, com a utilização de fluxos laminares. Este cuidado é necessário pois, durante os procedimentos podem ocorrer contaminações por organismos como bactérias, fungos e leveduras que prejudicam ou até mesmo podem inibir o desenvolvimento da planta, por competirem por nutrientes ou por produzirem toxinas nocivas ao desenvolvimento da cultura *in vitro*. Os protocolos da cultura de tecidos geralmente passam por três estágios: i) a desinfestação dos explantes, ii) a indução de calos e iii) a regeneração de plantas. A desinfestação é um processo de limpeza, sendo utilizados procedimentos de lavagem da superfície do explante inoculado (Andrade, 2002). Neste processo de limpeza do material vegetal podem ser usadas substâncias como hipoclorito de sódio, álcool, fungicidas, em diferentes concentrações e água destilada autoclavada, dependendo do material e espécie vegetal.

3. Transformação genética de plantas

A transformação genética de plantas pode beneficiar vários setores industriais de produção com base nas possíveis aplicações biotecnológicas para produzir soluções para a agricultura, como o desenvolvimento de culturas resistentes às pragas, às doenças e que possa aumentar a tolerância das plantas às adversidades do ambiente (Hansen; Wright, 1999). Além de ser uma tecnologia que pode servir de auxílio ao melhoramento genético tradicional reduzindo as dificuldades do cruzamento tradicional entre as diferentes espécies, também permite reduzir o tempo de seleção de plantas. Os avanços

biotecnológicos a partir da década de 1980, como a tecnologia do DNA recombinante tornou viável a inserção de genes exógenos em plantas, conferindo resistência a estresses ambientais, herbicidas, fungos, bactérias, vírus e insetos (Carrer, 2010; Matsumoto, 2001; Perani et al., 1986).

Diferentes métodos podem ser usados para a produção de plantas transgênicas, dentre os quais se destacam a transformação indireta e a transformação direta. Na transformação indireta são usadas bactérias do gênero *Agrobacterium* que naturalmente infectam plantas e produzem um tumor conhecido como galha da coroa (Srisvastava et al., 2009; Chilton et al., 1977). Essa bactéria possui um plasmídeo denominado TI que pode ser alterado em laboratório, inserindo um gene de interesse no lugar dos genes promotores da doença. Estas bactérias modificadas, necessitam perder todo ou parte de seu DNA de transferência (tDNA), para não produzirem tumores nas plantas hospedeiras (Pitzschke; Hirt, 2010). Utilizando o mecanismo de infecção natural o gene de interesse é transportado para o interior da célula do explante alvo da planta que é colocado em contato direto com esta bactéria para o processo de transferência e consequente transformação genética do genoma da planta (Hensel et al., 2009; Brasileiro; Cançado, 2000). O método indireto de transformação de plantas deve ser experimentalmente testado, para adequar a melhor linhagem de *Agrobacterium* a ser usada, pois o método pode ser limitado muitas vezes por não haver suscetibilidade de infecção devido ao genótipo da planta (Potrikus, 1990).

Os métodos de transformação direta de plantas podem variar em eficiência e disponibilidade. Estes, sejam físicos e/ou químicos devem ser capazes de causar alterações na parede e membranas celulares das plantas, o que permitirá a inserção do gene de interesse no genoma da cultivar alvo do processo de transformação genética. Existem vários métodos de transformação dentre os quais se destacam pela eficiência a eletroporação de protoplastos, a transformação por polietilenoglicol (PeG) e o mais usado a biolística ou bombardeamento de micropartículas (Carrer et al, 2010; Fisk; Dandekar, 1993).

A transformação de plantas pela técnica de biolística permite inserir o gene de interesse pelo processo de bombardeamento do explante da planta, com micropartículas de ouro ou tungstênio revestidas pelo plasmídeo ou apenas um fragmento de DNA que contem o cassete de expressão com o gene de interesse. (Sanford et al., 1991; Xiong,

2013). Quando comparado com o método indireto por *Agrobacterium*, o método de biolística apresenta maior plasticidade para a realização da transformação genética de plantas, por permitir o uso de diferentes tipos de explantes alvo e pode apresentar maior eficiência de transformação (Brasileiro; Cançado, 2000; Jackson, 2013).

4. Técnicas moleculares

A reação em cadeia da polimerase (PCR, do inglês Polymerase Chain Reaction), é uma técnica que permite replicação *in vitro* do DNA de forma rápida. A PCR permite usar quantidades mínimas de material genético que podem ser amplificados milhares de vezes em poucas horas, permitindo a detecção rápida e fiável dos eventos transgênicos gerados pelo uso de iniciadores específicos, os oligonucleotídeos que são desenhados a partir da sequência de DNA do gene de interesse. Após a confirmação, por exemplo de um evento transgênico, pela amplificação do fragmento do gene de interesse pela PCR, pode-se realizar a análise do número de cópias inseridas no genoma da planta transgênica pela técnica do *Southern blot* e a verificação da expressão do gene de interesse por qRT-PCR (PCR em tempo real). Estes são passos importantes no processo de verificação da transgenia e da estabilidade do gene de interesse inserido no genoma vegetal para estudos de genômica funcional.

A expressão de genes é uma das mais importantes áreas de pesquisa moderna (Armañanzas et al., 2008). A técnica dos microarranjo também pode medir o nível de expressão simultaneamente ou nível em que se encontra os milhares de genes, sendo o ponto de partida é a análise da chamada matriz de expressão gênica, onde visualmente, as linhas representam os genes, as colunas representam as condições experimentais (ou de amostras) e os valores em cada posição de matriz caracterizam o nível de expressão do gene, sob uma condição experimental particular (Armañanzas et al., 2008). O estudo do transcriptoma de um conjunto de transcritos expressos, sintetizados a partir do RNA, em um genoma podem ser identificados a partir de pequenas sequências de DNA complementar (cDNA) pela técnica EST (do inglês *Expressed Sequence Tag* de 1991), ou ainda pela técnica SAGE (do inglês *Serial Analysis of Gene Expression* de 1995), ou pelas técnicas de sequenciamento de nova geração (NGS – 454/Roche de 2005) e para sequenciamento de transcritos pela técnica do RNAseq usando tecnologia de nova geração (introduzido em pelo 454/Roche de 2006), onde muitos destes sequenciamentos

continuam em andamento e os dados gerados de vários experimentos podem ser acessados para análises, através de mais diferentes interfaces WEB de código aberto (Sun et al., 2004; Teufel et al., 2006). As bases de dados mais usadas são o *Stanford Microarray Database*, o *EBI Array Express*, o *NCBI Gene Expression Omnibus* (Teufel et al., 2006) e o *NCBI SRA* para dados de sequenciamento de RNA, que podem ser obtidos via *download* e serem analisados em computadores pessoais sob diferentes perspectivas com diferentes ferramentas de análises.

5. Avanços na bioinformática

Grandes projetos de sequenciamento de genomas inteiros, bem como as diferentes informações sobre genes, expressão gênica, proteínas, metabólitos e redes metabólicas têm gerado uma enorme quantidade de dados que precisam ser analisados e correlacionados. Nesse contexto, surge a biologia computacional inserida no contexto da biologia molecular, conhecida como bioinformática, que usa as estratégias computacionais para analisar e gerar soluções para as questões biológicas. A biologia do século XXI está sendo transformada, a partir de uma ciência de laboratório em uma ciência de processamento da informação, como resultado deste novo desenvolvimento, onde muitos planejamentos de experimentos em laboratório são conduzidos com o auxílio da bioinformática.

Uma consequência do avanço computacional das últimas décadas, os algoritmos evolutivos surgiram como importantes técnicas de otimização heurística no início da década de 1980, e aliado aos avanços da biotecnologia, dispositivos modernos de alto rendimento, conjuntos de dados de várias dimensões são obtidos, a partir de genomas e tecidos vegetais analisados (Armañanzas et al., 2008). Nos anos 80, foram desenvolvidos bancos de dados como o *Medline* e o *GenBank*, mas sua disponibilidade era limitada a poucos pesquisadores (Ouzounis; Valencia, 2003). Já na década de 1990, dois grandes avanços como a automação e a ampla utilização de alinhamento de sequências múltiplas, especialmente o método de alinhamento baseado em árvore, permitiram ampliar os estudos filogenéticos e de evolução (Ouzounis; Valencia, 2003).

Uma das primeiras aplicações de análise de sequência de aminoácidos, para se descobrir motivos de proteicos foram a identificação do motivo de ligação a ATP (*ATP-binding motif*) em várias proteínas funcionalmente independentes, do motivo dedo de

zinco (*zinc-finger motif*) e do motivo zíper de leucina (*leucine-zipper motif*) (Ouzounis; Valencia, 2003). Nessa época, os mais variados programas, em diversos institutos como o *EMBL (The European Molecular Biology)* criaram departamentos exclusivos de biologia computacional, como o *EBI (The European Bioinformatics Institute)*. Nesta nova era da biologia e da genômica, a bioinformática está no conectada com novos experimentos bioquímicos e genéticos que permitem constantemente realizar novas descobertas, pelo uso de ferramentas computacionais que tornam a realização mais rápida e viável para os processos documentação científicas dos dados gerados (Roberts, 2000).

Saeyns, Inza e Larrañaga (2007) relatam que a previsão de sequências que codificam para proteínas (previsão potencial de codificação) tem sido um foco de interesse, desde os primeiros dias da bioinformática. Assim como, muitos recursos podem ser extraídos a partir de uma sequência, e as dependências ocorrem na maioria das vezes entre as posições adjacentes a estas sequências. A utilização do alinhamento de comparação de sequências baseado no *pair-wise* surge em muitas aplicações da bioinformática, associada com a busca em banco de dados a partir de uma sequência molde, onde a semelhança entre estas sequências é usada para inferir ou identificar muitas vezes uma estrutura ou função semelhante (Baker et al., 1999).

Deste modo, os pacotes de software têm sido desenvolvidos geralmente para análises completas do DNA, análise de proteínas, predições de estrutura secundária, desenho de primers, modelagem molecular, desenvolvimento de estratégias de clonagem, desenho de plasmídeos ou enzimas de restrição para análises de genômica funcional. A exemplo de aplicação, algumas empresas envolvidas no desenvolvimento de *Biosoftware* como a *Alkemi Biosystems*, *Molecular Biology Insights*, *PREMIER Biosoft International*, *Intelli Genetics Inc.*, *Hitachi Inc.*, *DNA Star*, *Advanced American Biotechnology* e a *Imaging*. No que se refere a desenho de primers, tem-se usado os programas *CODEHOP*, *Gene Fisher*, *do Primer*, *Primer3*, *Primer Selection*, *Primo Pro 3.4*, *Primo Degenerate 3.4*, *EPRIMER3*, *PrimerQuest*, *MEDUSA* e *GAP* (Abd-Elsalam, 2003).

5.1. Comparação de Sequências

Teufel et al. (2006) relatam que programas de comparação de sequências e de alinhamento são ferramentas de bioinformática essenciais e os algoritmos mais amplamente utilizados são a ferramenta de busca de alinhamento local de base (*BLAST*) bem como o *FASTA* e o *ClustalW*. Em contraste com as ferramentas de alinhamento de sequências anteriores, tais como o de *Needleman-Wunsch*, o *BLAST* utiliza uma abordagem heurística encontrando inicialmente equivalentes curtos contíguos, e cada resultado é posteriormente estendido a fim de produzir alinhamentos de pontuação mais altos, resultando em um alinhamento final mais próximo do ideal (Teufel et al., 2006).

Quando é utilizada a ferramenta *BLAST*, a qualidade do alinhamento pode ser estimada através da pontuação de alinhamento e o valor “*e*”. O valor “*e*” mede o limiar de significância estatística para relatar sequências obtidas contra o banco de dados, de cada genoma individual. Além de dezenas de valores “*e*” do alinhamento individual, o *BLAST* também retorna os alinhamentos individuais, juntamente com as taxas percentuais de identidade e similaridade de nucleotídeos ou aminoácidos, e finalmente, estes alinhamentos individuais são, então, ligados a outros bancos de dados genômicos do *NCBI*, como *EntrezGene*, *Geo Profiles*, ou *UniGene*, proporcionando fácil acesso a dados genômicos para a sequência correspondente de interesse (Teufel et al., 2006).

Já para o alinhamento de sequências múltiplas o programa mais utilizado é o *ClustalW*, o qual foi implementado como uma combinação das abordagens filogenéticas e heurísticas. Em um primeiro passo, uma árvore filogenética é gerada utilizando métodos de *neighbor-joining*, e posteriormente, começando com as duas sequências menos distantes, todas as sequências vizinhas são alinhadas por um algoritmo heurístico, finalmente levando a um alinhamento completo de todas as sequências. (Teufel et al., 2006).

5.2. Predição e estrutura de genes e proteínas

Programas de predição de genes como *GENESCAN* ou *AUGUSTUS*, fornecem um nível aceitável de precisão e são, portanto, de uso significativo na análise de sequências genômicas (Teufel et al., 2006). Como os genomas estão sendo sequenciados em um ritmo crescente, a necessidade de procedimentos automáticos para anotação das sequências dos novos genomas, torna-se cada vez mais importante (Armañanzas et al.,

2008). Os autores ainda explicam que um primeiro passo na anotação de genomas é a localização de genes, bem como a sua estrutura correta e uma visão global de previsão gênica. Esta é constituída por componentes diferentes, sendo que cada componente ajuda na identificação de elementos estruturais do gene, os quais podem ser o início do gene (códon de iniciação), o final de um gene (o códon de parada) e as transições entre as partes de codificação e não codantes do gene (como os locais de *splicing*). O programa *PromoterScan* tem a capacidade de identificar as regiões promotoras utilizando-se a sequência *TATA-box*, com matriz posicional de pesos combinado com a densidade de sítios de ligação de fatores de transcrição específicos (Teufel et al., 2006).

O objetivo da previsão da estrutura de proteínas é o de desvendar a estrutura nativa de uma proteína, a partir da sua sequência, cumprindo alguns requerimentos funcionais e estruturais, minimizando uma função de energia no espaço onde está sendo modelada (Armañanzas et al., 2008). Muitas metodologias de análises de sequências envolvem o reconhecimento de sinais de curta duração, mais ou menos conservadas na sequência, representando sítios de ligação para várias proteínas ou complexos protéicos (SAEYS et al., 2007). Os autores informam ainda que uma abordagem comum para encontrar motivos regulatórios é relacioná-los com os níveis de expressão, utilizando uma abordagem de regressão.

5.3. Ontologias gênicas

Os dados funcionais anotados de genes individuais estão atualmente dependentes das anotações ontológicas que estão disponíveis no *Gene Ontology Consortium*, sendo que o projeto *Gene Ontology* utiliza termos padronizados de ontologias gênicas (GO) que descrevem três aspectos principais de informação biológica de um gene, seus processos biológicos, função molecular e a localização celular. Embora as anotações GO podem ser transformadas em uma ferramenta poderosa no futuro, elas ainda são consideradas limitadas e incompletas, visto que são dependentes de entradas de dados por pesquisadores individuais. Uma vez que as informações de GO de um gene são registradas, a ontologia é assim otimizada para a análise de alto rendimento computacional, que pode permitir uma comparação altamente eficiente e com uma grande quantidade de dados funcionais, permitindo que a anotação com GO seja uma

ferramenta poderosa para estudo das análises gênicas e para trabalho em bioinformática (Teufel et al., 2006).

Referências

- ABD-ELSALAM, K.A. Bioinformatic tools and guideline for PCR primer design. **African Journal of Biotechnology**, 2: 91–95, 2003.
- ARMAÑANZAS, R.; INZA, I.; SANTANA, R.; SAEYS, Y.; FLORES, J.L.; LOZANO, J.A.; VAN DE PEER, Y.; BLANCO, R.; ROBLES, V.; BIELZA, C.; LARRAÑAGA, P. A review of estimation of distribution algorithms in bioinformatics. **BioData Mining**, 1: 1-6, 2008.
- ANDRADE, S.R.M. **Princípios da cultura de tecidos vegetais**. Planaltina: Embrapa, 2002. 16 p.
- BAKER, P.G.; GOBLE, C.A.; BECHHOFFER, S.; PATON, N.W.; STEVENS, R.; BRASS, A. An ontology for bioinformatics applications. **Bioinformatics**, 15: 510–20, 1999.
- BASNAYAKE, S.W.V., MORGAN, T.C., WU, L.G. AND BIRCH, R.G. Field performance of transgenic sugarcane expressing isomaltulose synthase. **Plant Biotechnology Journal**, 10: 217–225, 2011
- BERNAL, A.; MACHADO, P.; CORTEGAZA, L.; CARMONA, E.R.; RIVERO, O.; ZAYAS, C.M.; NODARSE, O.; PEREZ, A.; SANTANA, I.; ARENCIBIA, A.D. Priming and biopriming integrated into the sugarcane micropropagation technology by temporary immersion bioreactors (TIBS). **Sugar Technology**, 10: 42-47, 2008.
- BRASILEIRO, A.C.M.; CANÇADO, G.M.A. Plantas transgênicas. **Informe Agropecuário**, 21: 28-35, 2000.
- CALDAS, L.S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M.E.; Meios nutritivos. In: TORRES, A . C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA, 1998. p. 87-132.
- CARRER H., BARBOSA A.L., RAMIRO D.A. Biotecnologia na Agricultura. **Estudos Avançados**, 24: 156-157, 2010.
- CHILTON, M-D.; DRUMMOND, M.H.; MERLO, D.J.; SCIAKY, D.; MONTOYA, A.L.; GORDON, M.P.; NESTER, E.W. Stable incorporation of plasmid DNA into higher plant cells: the molecular basis of crown gall tumorigenesis. **Cell**, 11: 263-71, 1977.
- FERREIRA, M.A.; CALDAS, L.S.; PEREIRA, E.A. **Aplicações da cultura dos tecidos no melhoramento genético de plantas**. In: TORRES, A . C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa SPI: Embrapa CNPH, 1998. p. 21-43.
- FISK, H.J.; DANDEKAR, A.M. The introduction and expression of transgenes in plants. **Scientia Horticulture**, 55: 5-36, 1993.
- GIRIDHAR, P.; KUMAR, V.; RAVISHANKAR, G.A. Somatic embryogenesis, organogenesis, and regeneration from leaf callus culture of *Decalepis hamiltonii* Wight & Arn., an endangered shrub. **In Vitro Cell and Developmental Biology - Plant**, 40: 567–571, 2004.
- HANSEN, G.; WRIGHT, MS. Recents advances in the transformation of plants. **Trends in Plant Science**, 4: 226-31, 1999.
- HENSEL, G.; KASTNER, C.; OLESZCZUK, S.; RIECHEN, J.; KUMLEHN, J. AGROBACTERIUM-mediated gene transfer to cereal crop plants: Current protocols for barley, wheat, triticale, and maize. **International Journal of Plant Genomics**, 2009: 1-9, 2009.
- JACKSON, M.A., ANDERSON, D.J. AND BIRCH, R.G. Comparison of Agrobacterium and particle bombardment using whole plasmid or minimal cassette for production of high-expressing, low-copy transgenic plants. **Transgenic Research**, 22: 143–151, 2013.
- KERBAUY, G.B. Clonagem de plantas in vitro. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, 1: 30-33, 1997.

- LAKSHMANAN, P.; GEIJSKES, R.J.; AITKEN, K.S.; GROF, C.L.P.; BONNETT, G.D.; SMITH, G.R. Invited review: sugarcane biotechnology: the challenges and opportunities. **In Vitro Cell and Developmental Biology - Plant**, 41: 345-63, 2005.
- LAKSHMANAN, P. Invited review addendum somatic embryogenesis in sugarcane –An addendum to the invited review ‘sugarcane biotechnology: the challenges and opportunities,’ in vitro cell. Dev. Biol. Plant 41(4):345–363; 2005. **In Vitro Cell and Developmental Biology – Plant**, 42: 201–205, 2006.
- MANTELL, S. H.; MATTHEWS, J. A. ; McKEE, R. A. **Técnicas de cultura de tecidos**. In: MANTELL, S. H.; MATTHEWS, J. A.; McKEE, R. A. (Ed.). **Princípios de biotecnologia em plantas: uma introdução à engenharia genética em plantas**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1994. p. 101-181,
- MATSUMOTO, K. Híbridos somáticos. **Biotecnologia, Ciência e desenvolvimento**, 20: 26, 2001.
- MIKULA, A.; TYKARSKA, T; KURAS, M; RYBCZYŃSKI, J. J. Somatic embryogenesis of *Gentiana cruciata* (L.): Histological and ultrastructural changes in seedling hypocotyls explant. **In Vitro Cell and Developmental Biology - Plant**, 41: 686–694, 2005.
- MOUSA, N.A.; SIAGURU, P.; WIRYOWIDAGDO, S.; WAGIH, M.E. Establishment of regenerative callus and cell suspension system of licorice (*Glycyrrhiza glabra*) for the production of the sweetener glycyrrhizin *in vitro*. **Sugar Technology**, 9: 72-82, 2007.
- MOORE, J.H.; ASSELBERGS, F.W.; WILLIAMS, S.M. Bioinformatics challenges for genome-wide association studies. **Bioinformatics**, 26: 445–55, 2010.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, 15: 473–497, 1962.
- OUZOUNIS, C.A.; VALENCIA, A. Early bioinformatics: the birth of a discipline—a personal view. **Bioinformatics**, 19: 2176–2190, 2003.
- PERANI, L.; RADKE, S.; WILKE-DOUGLAS, M.; BOSSERT, M. Gene transfer methods of crop improvement: introduction of foreign DNA into plants. **Physiologia Plantarum**, 68: 566-70, 1986.
- PITZSCHKE, A.; HIRT, H. New insights into an old story: *Agrobacterium*-induced tumour formation in plants by plant transformation. **The EMBO Journal**, 29: 1021- 32, 2010.
- POTRYKUS, I. Gene transfer to Plants: assessment and perspectives. **Physiologia Plantarum**, 79: 125-34, 1990.
- ROBERTS, R.J. The early days of bioinformatics publishing. **Bioinformatics**, 16: 2–4, 2000.
- SAEYS, Y.; INZA, I.; LARRAÑAGA, P. A review of feature selection techniques in bioinformatics. **Bioinformatics**, 23: 2507–17, 2007.
- RECH FILHO, A. **Biorreatores de imersão temporária e unidades encapsuláveis como ferramentas na consolidação de protocolos de micropropagação de bromélias**. 2004. 74 p. Dissertação Mestrado (Recursos Genéticos Vegetais) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2004.
- SANDFORD, J. C.; DEVIT, M.J.; RUSSELL, J.A.; SMITH, F.D.; HARPENDING, P.R.; ROY, M.K.; JOHNSTON, S.A. An improved, helium-driven biolistic device. **Technique**, 3: 3-16, 1991.
- SRIVASTAVA, T.; DAS, S., SOPORY, S.K.; SRIVASTAVA, P.S. A reliable protocol for transformation of *Catharanthus roseus* through *Agrobacterium tumefaciens*. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, 15: 93-8, 2009.
- STEINMACHER, D.A.; KROHN, N.G.; DANTAS, A.C.M.; STEFENON, V.M.; CLEMENT, C.R.; GUERRA, M.P. Somatic embryogenesis in peach palm using the thin cell layer technique: induction, morphohistological aspects and AFLP analysis of somaclonal variation. **Annals of Botany**, 100: 699–709, 2007.
- SUN, M., ZHOU, G., LEE S.; CHEN, J.; SHI, R.Z.; WANG, S.M. SAGE is far more sensitive than EST for detecting low-abundance transcripts. **BMC Genomics**, 5: 1-4, 2004.
- TEUFEL, A.; KRUPP, M.; WEINMANN, A.; GALLE, P.R. Current bioinformatics tools in genomic biomedical research (Review). **International Journal of Molecular Medicine**, 17: 967–973, 2006.

TORRES, A.C.; FERRERIA, A.T.; SÁ, F.G.; BUSO, J.A.; CALDAS, L.S.; NASCIMENTO, A.S.; BRÍGIDO, M.M.; ROMANO, E. **Glossário de biotecnologia vegetal**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2000. 128 p.

VINGA, S.; ALMEIDA, J. Alignment-free sequence comparison--a review. **Bioinformatics**, 19: 513–523, 2003.

XAVIER, A.; OTONI, W.C. Aplicações da micropropagação na clonagem de Eucalyptus no Brasil. **Agronomía Costarricense**, 33: 303-307, 2009.

XAVIER, A.; OTONI, W.C.; PENCHEL, R.M. Micropropagação e enxertia *in vitro* de espécies florestais. In: BORÉM, A. (Ed.). **Biotecnologia florestal**. Viçosa: UFV, 2007. p. 55-74.

XIONG, Y.; JUNG, JH.; ZENG, Q.; GALLO, M.; ALTPETER, F. Comparison of procedures for DNA coating of micro-carriers in the transient and stable biolistic transformation of sugarcane. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 112: 95–99, 2013.

ZIV, M. Bioreactor technology for plant micropropagation. **Horticultural Reviews**, 24: 1-30, 2000.

Uso de mutantes e transgênicos de tomateiro no estudo de fisiologia vegetal

Ariadne Felicio Lopo de Sá

Guilherme Pereira de Oliveira

Frederico Almeida de Jesus

Marcela Morato Notini

Eloisa Vendemiatti

Maísa de Siqueira Pinto

Stevan Ricardo Bordignon

1. Introdução

Mutantes são organismos com fenótipo distinto do original (controle, selvagem), devido a uma mutação em seu material genético. A utilização desses materiais com alteração gênica herdável na área de Fisiologia Vegetal possibilitou a descoberta do papel de diversas moléculas, a descrição de várias rotas metabólicas e inclusive incrementos de produção por meio da aplicação do conhecimento aplicado. A existência de grande coleções de mutantes bem como a disponibilidade de informações em extensas bases de dados internacionais são importantes fatores que contribuem para o sucesso no desenvolvimento de estudos utilizando mutantes.

Neste capítulo, iremos discorrer um pouco sobre estudos e perspectivas de pesquisas com mutantes de tomateiro, principalmente no background da cultivar Micro-Tom que tem sido usado como modelo vegetal devido à suas características como pequeno porte, ciclo de vida curto, alta acessibilidade, fácil manipulação, genoma relativamente pequeno, ampla conservação de mecanismos, métodos adequados de cruzamentos, transformação e regeneração e coleção de mutantes. Além disso, a cultivar Micro-Tom ter vantagem de apresentar importância econômica potencial, o que possibilita o desenvolvimento de estudos que unam as ciências básica e aplicada.

2. Mutações contra herbivoria

As plantas, como organismos sésseis, criaram diferentes estratégias de defesa que afastam as pragas que podem lhe causar danos (Peiffer et al., 2009). Uma destas estratégias é a presença de tricomas, que de acordo com Levin (1973), são apêndices que se estendem da epiderme dos tecidos aéreos, ocorrendo em múltiplas formas: podem ser uni ou multicelulares, glandulares ou não glandulares, em linha reta, espiral, em forma de gancho ou tortuosa, simples, peltada, ou estrelada. Há uma variação em densidade ou forma de uma espécie para outra.

Tricomas glandulares produzem metabólitos secundários usados, por exemplo, na droga anti-malária conhecida como artemisina (*Artemisia annua*). Como tais tricomas são ausentes em *Arabidopsis thaliana*, o tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) tem sido proposto como o principal modelo genético para esse tipo de estudo (Goffreda et al., 1988) por possuir mutantes que apresentam alterações bem definidas no padrão de seus tricomas.

O tomateiro apresenta tricomas revestindo quase que a totalidade da superfície externa da planta, dificultando desde a movimentação até o desenvolvimento dos herbívoros. A barreira para a locomoção e oviposição dos artrópodes é geralmente feita por tricomas não glandulares, chamados de tectores. Os tricomas glandulares exsudam, em contato com os predadores, substâncias pegajosas e/ou tóxicas que podem aprisionar, irritar e matar a praga (Lara, 1991). Diversas substâncias do metabolismo secundário podem ser produzidas pelos tricomas de tomateiro, entre elas estão o zingibereno (zgb) e a metil-cetonas (MK), que possuem efeito tóxico aos insetos, e o acil-açúcar (AS) que, por apresentar aspecto pegajoso, aprisiona pequenos insetos. O tomateiro cultivado, em geral, não possui aleloquímicos em quantidades suficientes para se tornar resistente às suas principais pragas. Contudo, algumas espécies selvagens relacionadas ao tomateiro podem ser fontes de alto conteúdo de aleloquímicos, como ocorre em *S. habrochaites* (antigo *L. hirsutum*), o qual produz altas quantidades de zgb e MK (Simmons; Gurr, 2005; Bleeker et al., 2009), ou *S. pennelli* e *S. galapagense* (antigo *L. cheesmanii* f. *minor*), os quais possuem folhas pegajosas típicas de acúmulo de AS (Blauth et al., 1998).

Em geral, para o cultivo do tomateiro é necessária a utilização de defensivos agrícolas em larga escala, o que eleva o valor final de comercialização do fruto e pode

acarretar danos ambientais. Dentre as principais causas de perdas durante o cultivo, estão os artrópodes herbívoros, como o ácaro vermelho (*Tetranychus evansi*), a traça (*Tuta absoluta*) e a mosca-branca (*Bemisia spp.*). Essas pragas afetam a produtividade de modo direto, diminuindo a área fotossintética ativa, e indiretamente, pois são vetores de vírus e/ou abrem caminho para bactérias e fungos patogênicos, gerando lesões nos frutos que inviabilizam sua comercialização.

Dentre as estratégias de combate a pragas, a resistência baseada nos tricomas da planta hospedeira é uma abordagem relativamente nova que tem potencial na redução de utilização de pesticidas, aumentando a sustentabilidade da cultura e reduzindo os efeitos negativos associados ao uso de agroquímicos (Simmons; Gurr, 2005).

Assim a utilização de mutantes disponíveis no background MT que apresentam padrões alterados para densidade de tricomas e quantidade de aleloquímicos associados à defesa (ZGB, AS e MK) tem sido utilizados no intuito de um melhor entendimento das vias de desenvolvimento de tais estruturas bem como o acúmulo de compostos nessas células.

3. Mutações afetando cores e formas de tomates

O formato do fruto depende da divisão e do alongamento das células do ovário em determinado ponto do desenvolvimento do órgão. A variabilidade na coloração dos frutos, por sua vez, vem da diferença no acúmulo de compostos. *Ovate* e *sun* são genes que podem apresentar mutações naturais que levam alteração do formato do fruto. Essas alterações gênicas têm sido bastante utilizadas no melhoramento genético de tomateiro.

O gene *ovate* (*o*) confere o formato ovóide às muitas variedades comerciais, como as chamadas *grape*. O gene mutado controla o alongamento do fruto no eixo longitudinal, podendo sofrer regulação de outros genes, assim em determinados casos mesmo que a mutação esteja presente, o fruto pode não adquirir a forma ovóide. O *OVATE* interage com padrões gênicos em estágios primordiais do desenvolvimento do gineceu (Van Der Knaap, 2014).

O gene *SUN* (*sun*) esse também controla o alongamento do fruto, no entanto, é encontrado em cultivares de tomates tipo italiano. A mutação nesse gene leva a maior expressão gênica durante o desenvolvimento da flor e do fruto, consequentemente o

fruto se torna extremamente alongado. Isso sugere uma alteração no padrão de divisões celulares são cruciais para o formato do fruto (Van Der Knaap, 2014).

A coloração dos frutos é afetada principalmente por duas classes de mutações, as que influenciam o acúmulo de carotenoides e as que influenciam a via biossintética de antocianinas. Os carotenoides são pigmentos de cores amarela, laranja ou vermelha que participam de processos como captação da luz e fotoproteção em plantas (Ronen, 1999). Esses pigmentos possuem função relevante na nutrição humana, devido à sua atividade de provitamina A, e de proteção contra doenças cardiovasculares e alguns tipos de cânceres, além de serem antioxidantes lipofílicos (Agarwal, 2000; Ronen, 2000; Martin, 2013).

A mutação dominante *Beta carotene (B)* é evidenciada pelos frutos de coloração laranja, devido ao aumento da expressão do gene que codifica a enzima licopeno β -ciclase (CrtL-b), levando a alta concentração de β -caroteno (Ronen, 2000). Para o mesmo locus ocupado pelo mutante *B*, há um alelo de perda de função denominado *old gold (og)*. Desse modo, esse mutante recessivo é alélico ao mutante *B* e apresenta fruto de intensa coloração vermelha. No mutante *og*, a perda de função do gene CrtL-b causa o aumento da concentração de *trans*-licopeno nos frutos, ocorrendo pouca conversão deste em β -caroteno (Ronen, 2000).

A mutação *Delta carotene (Del)* também é dominante e aumenta a expressão do gene que codifica a enzima licopeno ϵ -ciclase (CrtL-e), promovendo a conversão de licopeno em δ -caroteno, causando seu acúmulo nos frutos maduros (Ronen, 1999).

Dois outras mutações recessivas são *tangerine (t)* e *yellow flesh (r)*. O mutante *t* é caracterizado pela ausência da isomerização promovida pela enzima carotenoide isomerase (CRTISO), causando o acúmulo de prolicopeno e outros *cis*-carotenoides nos frutos (Isaacson, 2004). O mutante *r* possui fruto amarelo, devido à prevalência do flavonoide rutina na ausência de carotenoides, causada por ineficiência da enzima fitoeno sintase (PSY1) (Fray; Grierson, 1993).

As antocianinas também afetam a coloração dos frutos, como dito anteriormente, elas são denominadas flavonoides, sendo produzidas pelo metabolismo secundário das plantas e armazenados nos vacúolos. Tais moléculas possuem coloração do vermelho ao roxo e azul, dependendo do tipo específico e pH que se encontra. Ao contrário do licopeno e β -caroteno, as antocianinas são moléculas hidrofílicas, e por isso sua ação

antioxidante é complementar aos antioxidantes hidrofóbicos. Assim, um tomate rico em antocianinas e licopeno une ações distintas, potencializando os benefícios deste alimento.

Variações genéticas naturais oriundas de espécies selvagens relacionadas ao tomateiro levam ao acúmulo de antocianinas em diferentes tecidos da planta, inclusive no fruto.

A mutação dominante *Anthocyanin fruit* (*Aft*) provém da espécie selvagem *Solanum chilense* e provoca acúmulo de antocianina na epiderme dos frutos como um mecanismo de proteção contra alta radiação luminosa, o que pode resultar em frutos arroxeados (Rehder, 2011).

A mutação *atroviolaceum* (*atv*), originária de *Solanum chesmaniae*, causa acúmulo de antocianina por toda a planta. Provavelmente esta mutação é um alelo não funcional de um regulador negativo de fotomorfogênese (Sestari, 2014).

4. Mutantes e transgênicos: ferramentas para estudos da resistência à salinidade

Estima-se que a salinização resultante de ações antrópicas será responsável por um decréscimo de 50% das terras disponíveis para a agricultura até 2050 (Wang et al. 2003).

A resistência à salinidade apesar de ser complexa, poligênica e envolver diversos mecanismos fisiológicos, a transferência ou alteração da expressão de um ou alguns genes pode resultar em aumento da resistência das plantas às condições salinas (revisado por Flowers, 2004), o que permite sugerir o uso de mutantes e transgênicos como ferramentas úteis para a identificação e entendimento de mecanismos fisiológicos envolvidos na resistência à salinidade, o que poderia contribuir para desenvolvimento de materiais resistentes a esse tipo de estresse no futuro.

Na natureza e na agricultura, observa-se uma variação na resistência à salinidade entre as espécies e culturas relacionadas de acordo com a região de origem. O tomateiro é considerado moderadamente sensível à salinidade (Dasgan et al., 2002). Mas, *Solanum galapagense* S. Darwin & Peralta (LA1401), uma espécie selvagem relacionada ao tomateiro endêmica da orla marítima das Ilhas Galápagos, apresenta nível elevado de resistência (Rick; Bowman, 1961). Assim é possível que as variações na resistência à salinidade sejam resultados apenas de diferenças na regulação dos

processos, pois espécies mais resistentes normalmente possuem efetores de resposta à salinidade e rotas regulatórias similares aos das espécies mais sensíveis (Zhu, 2000).

Variações genéticas que afetam o status hormonal são possíveis responsáveis por determinadas diferenças na resistência à salinidade entre espécies. Os hormônios vegetais estão envolvidos no controle das mais diversas atividades: aclimatação a ambientes adversos, funcionamento de canais iônicos (HAUSER et al., 2011) e aquaporinas (Ghanem et al., 2011), formação e diferenciação de órgãos, entre outros papéis desempenhados.

Alguns trabalhos de resistência a estresse tem usado enxertia como ferramenta de estudo, uma vez que essa técnica permite a manipulação de sinais hormonais entre parte aérea e o sistema radicular por meio da combinação, por exemplo, de partes distintas de mutantes ou transgênicos. White (2010) obteve plantas de tomateiro mais resistentes ao estresse com características vantajosas, como maior eficiência do uso da água e capacidade de restringir à abertura estomática sem reduções na produção de biomassa, a partir de porta-enxertos transgênicos expressando constitutivamente enzimas participantes da biossíntese de ácido abscísico, 9-cis-epoxicarotenoide dioxigenase (NCED), β -caroteno hidroxilase (BCH) e fitoeno sintase (PSY).

De forma geral, o papel que os hormônios vegetais desempenham em plantas expostas a concentrações elevadas de sal ainda é relativamente pouco entendido, sendo a maior parte dos estudos pouco conclusivos. Mas, a utilização de mutantes e transgênicos hormonais tem contribuído ao poucos com preenchimento dessa lacuna de conhecimento.

5. Mutações no estudo da arquitetura foliar

As folhas são órgãos de desenvolvimento determinado, e principais responsáveis pela fotossíntese nas plantas. Morfologicamente, as folhas podem ser classificadas quanto à divisão de sua lâmina. Lâminas únicas, sem divisão do limbo, são classificadas como folhas simples, enquanto folhas que possuem a lâmina foliar subdividida em folíolos, são classificadas como folhas compostas.

As folhas são iniciadas a partir do recrutamento de algumas células do meristema apical caulinar, as quais passam a expressar genes diferencialmente, culminando na especialização gradual das células em tecido foliar. Este processo de desenvolvimento é

dividido em três fases: iniciação, morfogênese primária e morfogênese secundária (Hagemman; Gleisseberg, 1996). Durante a iniciação, as células que são recrutadas no meristema apical caulinar, deixam de expressar genes da família *KNOTTED1-LIKE HOMEODOMAIN* (*KNOX*). Uma das diferenças entre folhas simples e folhas compostas está relacionada à expressão dos genes *KNOX* após a iniciação. Em espécies de folhas simples, os genes *KNOX* continuam tendo sua expressão reprimida, enquanto espécies de folhas compostas retomam a expressão destes genes durante a morfogênese primária (Efroni et al., 2010; Hay; Tsiantis, 2010).

Apenas três exemplos de mutações serão explorados, dois que aumentam a complexidade da folha de forma ectópica em espécies de folha simples, e um que reduz a complexidade da folha em espécies de folhas compostas.

O mutante de *Arabidopsis asymmetric leaves-1 (as1)*, apresenta crescimento irregular do limbo foliar, devido a não repressão dos genes *KNOX* durante a fase de morfogênese primária, que leva ao estabelecimento de pontos de crescimento em regiões inadequadas (Byrne et al., 2000). Outro exemplo de falha na repressão de genes *KNOX* durante a morfogênese primária em espécies de folhas simples é encontrado no mutante de milho *rough-sheath-2 (rs2)*, no qual o limbo apresenta defeitos na formação de nervura principal, desde a ausência de formação da mesma, como a formação de múltiplas nervuras principais ao invés de uma única nervura. O mutante *rs2* também apresenta a bainha foliar enrugada (Schneeberger et al., 1998).

Em espécies de folhas compostas, onde a expressão dos genes *KNOX* é retomada na fase de morfogênese primária, mutações que levam a redução da expressão dos genes *KNOX* ou que encurtam a fase de morfogênese primária, levam a redução da formação de folíolos, reduzindo a complexidade das mesmas. Um exemplo da drástica simplificação de folhas compostas pode ser observado no mutante de tomateiro *Lanceolate*. Devido ao encurtamento da fase de morfogênese primária, na qual os genes *KNOX* atuam para reiterar o processo de formação de novos pontos de crescimento, os quais levam a formação de lóbulos ou novos folíolos na lâmina foliar, o mutante *Lanceolate* apresenta folha simples (Ori et al., 2007).

6. Regeneração *in vitro* em tomateiro

A capacidade de regeneração de novos órgãos após o desenvolvimento embrionário é uma característica particular dos organismos vegetais importante para a domesticação de plantas de propagação não sexuada e para o cultivo *in vitro*, extensamente utilizado em práticas biotecnológicas. Este processo depende de diversos fatores, como tipo de explante utilizado, suplementação de nutrientes, hormônios adicionados ao meio de cultivo, além de condições ambientais como temperatura e luminosidade.

No entanto, apesar de sua evidente importância, o processo de organogênese *in vitro*, ou seja, a capacidade de formar novos órgãos a partir de uma população de células, ainda é pouco entendida, embora avanços notáveis tenham ocorrido com a utilização de plantas mutantes e transgênicas nos últimos anos.

A organogênese pode ser dividida em três etapas distintas, de acordo com as funções e o requerimento de hormônios vegetais exógenos: i) aquisição de competência morfogênica, ii) indução de novos órgãos, na qual as células e tecidos já competentes tornam-se determinados para formação de órgãos específicos em resposta a hormônios exógenos, e iii) diferenciação morfológica, onde a estrutura então determinada passa a se desenvolver independente de hormônios exógenos (Christianson; Warnick, 1988).

Desde o trabalho clássico de Skoog e Miller (1957) que ressaltou a importância do balanço entre auxina e citocinina na organogênese, o controle hormonal permanece sendo peça chave nos processos de organogênese. Altas razões citocinina/auxina induzem gemas caulinares adventícias, enquanto o oposto leva ao desenvolvimento de raízes. Além disso, o balanço intermediário entre esses dois hormônios leva a formação de aglomerados de células denominadas calos. Entretanto, pouco se sabe a respeito do papel do balanço hormonal endógeno do explante durante esse processo.

Uma das estratégias para investigação da influência do balanço hormonal endógeno na regeneração é a utilização de plantas transgênicas sensíveis a classes hormonais específicas carregando promotores de marcação de expressão como as enzimas beta-glucuronidase (GUS) e green fluorescent protein (GFP) (Atta et al., 2009; Sugimoto et al., 2010).

O início da organogênese e da aquisição de competência para brotações e emissão de raízes apresentam uma via comum, a partir de uma população de células pré-

existentes com estrutura e função semelhante ao periciclo (Atta et al., 2009; Sugimoto et al., 2010, 2011). Essas células provavelmente sofrem estímulo da auxina, presente no meio indutor de calos, que favorece a aquisição de competência (Motte et al., 2011). Portanto, acredita-se que a auxina seria um dos prováveis indutores molecular de genes responsáveis pelo controle da aquisição de competência (Che et al., 2007).

Estudos de indução de calos, utilizando materiais contendo promotor sintético responsivo à auxina (*DR5*), mostram uma forte indução deste promotor, com redução da expressão ao longo do tempo, sendo a marcação indistinguível em calos desenvolvidos (Gordon et al. 2007).

Outro hormônio envolvido no processo de organogênese citado anteriormente é a citocinina. A utilização de material genético contendo o gene *ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATOR 5 (ARR5)*, cuja transcrição e expressão estão correlacionadas aos níveis de citocininas, permitiu verificar a expressão desse gene repórter em áreas de iniciação e desenvolvimento de meristemas caulinares, mas não em primórdios dos órgãos (Gordon et al. 2007; Atta et al., 2009). Assim, é possível que as citocininas participem do particionamento da identidade celular e do direcionamento da célula do calo.

O tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) é um excelente modelo para os estudos de organogênese, não apenas pela existência de transgênicos neste background contendo genes repórteres sensíveis a hormônios, mas também por apresentar variações genéticas naturais que controlam a capacidade de regeneração *in vitro*. Algumas espécies selvagens aparentadas ao tomateiro comercial possuem alta capacidade organogênica. Dentre estas espécies, destaca-se a *S. peruvianum*, cuja alta capacidade organogênica está associada principalmente a dois alelos dominantes denominados *Rg1* e *Rg2* (Koornneef et al., 1987). Esse alelo foi mapeado no cromossomo 3 próximo ao locus do gene *FITOENO SINTASE* específico de cromoplasto (Koornneef et al., 1993), para qual *S. peruvianum* carrega um alelo recessivo, *yellow flesh (r)*, de perda de função que confere a cor amarela aos frutos quando introgridido no background de *S. lycopersicum* (Fray; Grierson, 1993).

A presença do alelo *r* em espécies de frutos verdes possibilitou sua utilização como marcador morfológico para a introgressão do alelo *Rg1* em espécies cultivadas de tomateiro. Usando esse procedimento, este alelo foi introgridido para a cultivar MT

(Lombardi, 2008), gerando um genótipo com alta capacidade de regeneração e porte anão que foi proposto como base para a transformação genética do modelo MT (Pino et al., 2010).

Recentemente, estudos demonstraram que a presença do gene *Rg1* no background MT, confere maior formação de gemas caulinares e de raízes *in vitro* (Lombardi-Crestana et al., 2012), além de reversão de baixa taxa de regeneração em mutantes com tal característica como o *procera*. Esse mutante possui resposta constitutiva à giberelina através da perda de função de uma proteína DELLA pertencente à família de fatores de transcrição GRAS (Jasinski et al., 2008). A reversão da baixa formação de órgãos do mutante *procera* pelo *Rg1*, no duplo mutante *proRg1*, demonstra a ocorrência de epistasia entre as duas mutações (Lombardi-Crestana et al., 2012), o que é indicativo de que estejam em vias de transdução de sinal que convergem em algum ponto.

A capacidade de regeneração *in vitro* de outra espécie de frutos verdes, *S. pennellii* também é alta (Arikita et al., 2012), o que sugeria a presença de outros loci controlando a capacidade de regeneração *in vitro* de tomateiro (Koorneef et al., 1987; Faria et al., 2002).

Para uma possível identificação de loci com alta capacidade de regeneração, foi utilizada uma coleção de 50 ILs (Introgression lines) desenvolvida por Eshed e Zamir (1994), cada uma contendo um pequeno segmento de um determinado cromossomo de *S. pennellii* 'LA716' introgridido e mapeado na cultivar M82, o que possibilitou a identificação de 6 linhagens de introgressão contendo loci (RG3C, RG7H, RG8F, RG9DE, RG10F, RG6A) que conferem alta capacidade de regeneração, semelhante àquela observada ao parental *S. pennellii*. Essas ILs foram parcialmente introgrididas em MT e avaliou-se sua capacidade de regeneração. Dos seis alelos introgrididos e testados, quatro apresentaram capacidade elevada tanto para a formação de gemas caulinares quanto de raízes (*Rg3C*, *Rg7H*, *Rg8F*, *Rg10F*), indicando que provavelmente esses alelos estão relacionados com a fase de aquisição de competência. Os outros dois alelos que conferem alta capacidade de formação apenas de gemas caulinares estão provavelmente relacionados à fase de indução da organogênese (Arikita et al., 2012).

Como visto anteriormente, genes de espécies relacionadas ao tomateiro podem conferir maior capacidade de regeneração, assim mutações presentes em tais espécies

que levam a alteração de formação de órgãos foliares podem também afetar a capacidade de regeneração.

Várias mutações que afetam a arquitetura foliar em tomateiro estão relacionadas a fatores de transcrição do tipo *KNOTTED 1-LIKE HOMEODOMAIN* (KNOX) como os mutantes *clausa (clau)* e *Mouse-ear (Me)* que aumentam a complexidade das folhas. Outras mutações que diminuem a complexidade da folha são relacionadas a fatores de transcrição do tipo *MYB* no caso do mutante *potato-leaf (c)*, *DELLA* no caso de *procera (pro)*, *AUX/IAA* no caso de *entire (e)*.

Trabalhos visando relacionar mutações que afetam a arquitetura foliar com a capacidade de regeneração *in vitro* infelizmente são inexistentes, bem como conhecimento do papel dos genes que controlam as diferentes fases de regeneração permanecem incertos, e muitas de suas relações com os hormônios auxina e giberelina. Assim, estudos de regeneração *in vitro* utilizando mutantes com alteração na arquitetura foliar podem ajudar inferir como genes relacionados à arquitetura foliar em conjunto com certos hormônios agem sobre o processo de regeneração, bem como elucidar quais processos ditam a morfogênese *in vitro*, além de tornar possível verificar se o processo de morfogênese *in vivo* das folhas, como proposto por Hay et al. 2004, está relacionado de forma direta com o *in vitro*.

Referências

- AGARWAL, S.; RAO, A.V. Tomato lycopene and its role in human health and chronic diseases. **Cmaj**, 163: 739-44, 2000.
- ARIKITA, F.N.; AZEVEDO, M.S.; SCOTTON, D.C., PINTO, M.S., FIGUEIRA, A., PERES, L.E. Natural genetic variation controlling the competence to form adventitious roots and shoots from the tomato wild relative *Solanum pennellii*. **Plant Science**, 199-200: 121-130, 2013.
- ATTA, R.; LAURENS, L.; BOUCHERON-DUBUISSON, E.; GUIVARCH, A.; CARNERO, E.; GIRAUDAT-PAUTOT, V.; RECH, P.; CHRIQUI, D. Pluripotency of *Arabidopsis* xylem pericycle underlies shoot regeneration from root and hypocotyl explants grown *in vitro*. **Plant Journal**, 57: 626-644, 2009.
- BLAUTH, S.L.; CHURCHILL, G.A.; MUTSCHLER, M.A. Identification of quantitative trait loci associated with acylsugar accumulation using intraspecific populations of the wild tomato, *Lycopersicon pennellii*. **Theoretical and Applied genetics**, 96: 458-467, 1998.
- BLEEKER, M.P.; DIERGAARDE, P.J.; AMENT, K.; GUERRA, J.; WEIDNER, M.; SCHÜTZ, S.; DE BOTH, M.T.; HARING M.A.; SCHUURINK, R.C. The role of specific tomato volatiles in tomato-whitefly interaction. **Plant Physiology**, 151: 925-935, 2009.
- BYRNE, M.E.; BARLEY, R.; CURTIS, M.; ARROYO, J.M.; DUNHAM, M.; HUDSON, A.; MARTIENSSEN, R.A. Asymmetric leaves1 mediates leaf patterning and stem cell function in Arabidopsis. **Nature**, 408: 967-971, 2000.

- CHE, P.; LALL, S.; HOWELL, S.H. Developmental steps in acquiring competence for shoot development in *Arabidopsis* tissue culture. **Planta**, 226: 1183-1194, 2007.
- CHRISTIANSON, M.L.; WARNICK, D.A. Organogenesis *in vitro* as a developmental process. **HortScience**, 23: 515-519, 1988.
- DASGAN, H.Y.; AKTASA, H.; ABAKA, K.; CAKMAK, I. Determination of screening techniques to salinity tolerance in tomatoes and investigation of genotype responses. **Plant Science**, 163: 695–703, 2002.
- EFRONI, I.; ESHED, Y.; LIFSCHITZ, E. Morphogenesis of simple and compound leaves: a critical review. **Plant Cell**, 22: 1019-1032, 2010.
- ESHED, Y.; ZAMIR, D. A genomic library of *Lycopersicon pennellii* in *L. esculentum*: A tool for fine mapping of genes. **Euphytica**, 79: 175–179, 1994.
- FARIA, R.T.; DESTRO, D.; BESPALHOK FILHO, J.C.; ILLG, R.D. Introgression of *in vitro* regeneration capability of *Lycopersicon pimpinellifolium* Mill. into recalcitrant tomato cultivars. **Euphytica**, 124: 59-63, 2002.
- FLOWERS, T.J. Improving crop salt tolerance. **Journal of Experimental Botany**, 55: 307-319, 2004.
- FRAY, R.G.; GRIERSON, D. Identification and genetic analysis of normal and mutant phytoene synthase genes of tomato by sequencing, complementation and co-suppression, **Plant Molecular Biology**, 22: 589-602, 1993.
- GHANEM, M.E.; ALBACETE, A.; SMIGOCKI, A.C.; FRÉBORT, I.; POSPÍŠILOVÁ, H.; MARTÍNEZ-ANDÚJAR, C.; ACOSTA, M.; SÁNCHEZ-BRAVO, J.; LUTTS, S.; DODD, I.C.; PÉREZ-ALFOCEA, F. Root-synthesized cytokinins improve shoot growth and fruit yield in salinized tomato (*Solanum lycopersicum* L.). **Journal of Experimental Botany**, 62: 125–140, 2011.
- GOFFREDA, J.C.; MUTSCHLER, M.A.; TINGEY, W.M. Feeding behavior of potato aphid affected by glandular trichomes of wild tomato. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, 48: 101-107, 1988.
- GORDON, S.P.; HEISLER, M.G.; REDDY, G.V.; OHNO, C.; DAS, P.; MEYEROWITZ, E.M. Pattern formation during de novo assembly of the *Arabidopsis* shoot meristem. **Development**, 134: 3539-3548, 2007.
- HAGEMMAN, W.; GLEISSEBERG, S. Organogenetic capacity of leaves: the significance of marginal blastozone in angiosperms. **Plant Systematics and Evolution**, 199: 3-4, 1996.
- HAY, A., CRAFT, J., TSIANTIS, M. Plant hormones and homeoboxes: bridging the gap? **BioEssays**, 26: 395-404, 2004.
- HAY, A.; TSIANTIS, M. KNOX genes: versatile regulators of plant development and diversity. **Development**, 137: 3153-3165, 2010.
- ISAACSON, T.; OHAD, I.; BEYER, P.; HIRSCHBERG, J. ANALYSIS *in vitro* of the enzyme CRTISO establishes a poly-cis-carotenoid biosynthesis pathway in plants. **Plant Physiology**, 136: 4246-4255, 2004.
- JASINSKI, S.; TATTERSALL, A.; PIAZZA, P.; HAY, A.; MARTINEZ-GARCIA, J.F.; SCHMITZ, G.; THERES, K.; MCCORMICK, S.; TSIANTIS, M. *PROCERA* encodes a *DELLA* protein that mediates control of dissected leaf form in tomato. **The Plant Journal**, 56: 603–612, 2006.
- KOORNNEEF, M.; HANHART, C. J.; MARTINELLI, L. A genetic analysis of cell culture traits in tomato. **Theoretical and Applied Genetics**, 74: 633-641, 1987.
- LARA, F.M. **Princípios de resistência de plantas aos insetos**. 2. ed. São Paulo: Ícone, 1991. 336 p.
- LEVIN, D.A. The role of trichomes in plant defense. **The quarterly Review of Biology**, 48: 3-15, 1973.
- LOMBARDI-CRESTANA, S.; LOMBARDI-CRESTANA, S., DA SILVA AZEVEDO, M.; SILVA, G.F.; PINO, L.E.; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; FIGUEIRA, A.; NOGUEIRA, F.T.; PERES, L.E. The tomato (*Solanum lycopersicum* cv Micro-Tom) natural genetic variation *Rg1* and the *DELLA* mutant *procera* control the competence necessary to form adventitious roots and shoots. **Journal of Experimental Botany**, 63: 5689-5703, 2012.
- MARTIN, C.; ZHANG, Y.; TONELLI, C.; PETRONI, K. Plants, diet, and health. In: MERCHANT, S.S. (Ed.).

Annual Review of Plant Biology, 64:19-46, 2013.

MOTTE, H.; VERSTRAETEN, I.; WERBROUCK, S.; GEELEN, D. *CUC2* as an early marker for regeneration competence in *Arabidopsis* root explants. **Journal of Plant Physiology**, 168: 1598-1601, 2011.

ORI, N.; COHEN, A.R.; ETZIONI, A.; BRAND, A.; YANAI, O.; SHLEIZER, S.; MENDA, N.; AMSELLEM, Z.; EFRONI, I.; PEKKER, I.; ALVAREZ, J.P.; BLUM, E.; ZAMIR, D.; ESHED, Y. Regulation of *LANCEOLATE* by miR319 is required for compound-leaf development in tomato. **Nature Genetics**, 39: 787-791, 2007.

PEIFFER, M.; TOOKER, J.F. LUTHE, D.S.; FELTON, G.W. Plants on early alert: glandular trichomes as sensors for insect herbivores. **New Phytologist**, 184: 644-656, 2009.

PINO, L.E.; Lombardi-Crestana, S.; Azevedo, M.S.; Scotton, D.C.; Borgo, L.; Quecini, V.; Figueira, A.; Peres, L.E.P. The Rg1 allele as a valuable tool for genetic transformation of the tomato 'Micro-Tom' model system. **Plant Methods**, 6: 1-11, 2010.

REHDER, G. G. **Introgessão e piramidação de alelos para alta qualidade de frutos em tomateiro (*Solanum lycopersicum* L. Syn. *Lycopersicon esculentum* Mill.)**. 2011. 40 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Bacharelado em Ciências Biológicas) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. 2011.

RICK, C.M.; BOWMAN, R.I. Galápagos tomatoes and tortoises. **Evolution**, 15: 407-417, 1961.

RONEN, G.; CARMEL-GOREM, L.; ZAMIR, D.; HIRSCHBERG, J. An alternative pathway to beta-carotene formation in plant chromoplasts discovered by map-based cloning of beta and old-gold color mutations in tomato. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 97: 11102-11107, 2000.

RONEN, G.; COHEN, M.; ZAMIR, D.; HIRSCHBERG, J. Regulation of carotenoid biosynthesis during tomato fruit development: Expression of the gene for lycopene epsilon-cyclase is down-regulated during ripening and is elevated in the mutant Delta. **Plant Journal**, 17: 341-351, 1999.

SESTARI, I.; ZSÖGÖNB, A.; REHDER, G.G.; TEIXEIRA, L.L.; HASSIMOTTOC, N.M.A.; PURGATTOC, E.; BENEDITO, V.A.; PERES, L.E.P. Near-isogenic lines enhancing ascorbic acid, anthocyanin and carotenoid content in tomato (*Solanum lycopersicum* L. cv Micro-Tom) as a tool to produce nutrient-rich fruits. **Scientia Horticulturae**, 175: 111-120, 2014.

SIMMONS, A.T.; GURR, G.M. Trichomes of *Lycopersion* species and their hybrids: effects on pests and natural enemies. **Agricultural and Forest Entomology**, 7: 265-276, 2005.

SKOOG, F., MILLER, C.O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. **Symposium of the Society of Experimental Biology**, 11: 118-231, 1957.

SUGIMOTO, K.; GORDON, S.P.; MEYEROWITZ, E.M. Regeneration in plants and animals: dedifferentiation, transdifferentiation, or just differentiation? **Trends in Cell Biology**, 21: 212-218, 2011.

VAN DER KNAAP, E.; CHAKRABARTI, M.; CHU, Y.H.; CLEVINGER, J.P.; ILLA-BERENQUER, E.; HUANG, Z.; KEYHANINEJAD, N.; MU, Q.; SUN, L.; WANG, Y.; WU, S. What lies beyond the eye: the molecular mechanisms regulating tomato fruit weight and shape. **Frontiers in Plant Science**, 5: 227, 2014.

WANG, W.; VINOCCUR, B.; ALTMAN, A. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. **Planta**, 218: 1-14, 2003.

WHITE, C.A. **Increasing the water use efficiency (WUE) of tomato (*S. lycopersicum*) via manipulation of the abscisic acid (ABA) biosynthesis pathway**. 2010. 316 f. Thesis (Doctor of Philosophy) - University of Nottingham, Nottingham, 2010.

ZHU, J-K. Genetic analysis of plant salt tolerance using *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, 124: 941-948, 2000.

Fitotecnia

Fruticultura: biotecnologia, propagação e pós-colheita

Lígia Erpen

Tatiane de Oliveira Tokairin

Raphael Branco de Araujo

Jaqueline Visioni Tezotto-Uliana

Tatiana de Souza Moraes

Natália Arruda

Introdução

A fruticultura é uma das áreas do agronegócio nacional de grande importância, representando o país nas primeiras posições nos rankings de produção e exportações com seus produtos *in natura* ou processados. O Brasil, em sua vasta extensão territorial, possui diferentes tipos de solos e climas que o torna capaz de produzir uma grande diversidade de frutas nativas ou exóticas que despertam o interesse dos consumidores do mundo inteiro.

Esta representatividade mundial implica na necessidade de atender um mercado externo exigente por produtos de alta qualidade, assim como, manter a distribuição de produtos de qualidade para as diferentes regiões do país durante todo o ano. Estes desafios têm sido vencidos pela fruticultura brasileira com êxito através de pesquisas e desenvolvimento do setor, aliado às instituições de ensino e pesquisa públicas e privadas.

A excelência dos resultados encontrados são frutos de um trabalho integrado e continuado que compõe todas as áreas desde a produção de mudas até a pós-colheita das frutas. A ESALQ/USP tem tradição nestas linhas de estudos, sendo referência nas pesquisas de biotecnologia, propagação e pós-colheita de frutas, temas que serão apresentados neste capítulo.

Biotecnologia aplicada à fruticultura

A biotecnologia, utilizando técnicas de transformação genética tornou-se uma poderosa ferramenta para o melhoramento genético de árvores frutíferas, visto que essas espécies encontram limitações dos métodos tradicionais de melhoramento devido a características de sua biologia reprodutiva. Os trabalhos de transformação genética aplicados a fruticultura vem sendo desenvolvido usando diferentes estratégias para incorporar características úteis em cultivares comerciais. Porém, a busca por resistência a doenças constitui o principal objetivo da maioria dos trabalhos (Gambino; Gribaldo, 2012).

Entre as frutíferas cultivadas nacionalmente, destaca-se o cultivo do citros, que mostra-se bastante vulnerável a diversas doenças que foram surgindo juntamente com sua expansão, as quais têm causado grandes perdas em produtividade. Entre as doenças mais expressivas estão a gomose, causada por *Phytophthora* spp., a tristeza causada pelo vírus da tristeza dos *Citrus* (CTV), o cancro cítrico, causado pela bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *Citri*, a clorose variegada do citros (CVC), causada pela bactéria *Xylella fastidiosa* e o *Huanglongbing* (HLB), associado à bactéria *Candidatus Liberibacter* spp., considerada, atualmente, a mais destrutiva (Mattos et al., 2005).

Para a maioria das doenças citadas, principalmente o HLB, os métodos de controle disponíveis não são totalmente eficazes. Além disso, não há variedade comercial de copa ou porta enxerto resistente. Nesse sentido, destaca-se a importância dos trabalhos de transformação genética visando obtenção de variedades resistentes como estratégia de controle

Transformação genética de plantas

A transformação genética permite a modificação de genótipos pela introdução de genes capazes de conferir uma característica desejável, podendo ser oriundos de organismos semelhantes ou filogeneticamente distantes do hospedeiro, excluindo-se a introdução por fecundação (Singh et al., 2006).

A transformação de plantas exige a elaboração de construções gênicas contendo três elementos básicos: o promotor, responsável por regular a expressão gênica, o gene, que codifica a proteína de interesse, e o terminador, que determina o final do processo

de transcrição (Visarada et al., 2009). Além do gene de interesse, deve ser inserido um gene de seleção, para selecionar as células que foram transformadas (Anami, 2013).

As sequências de interesse são então introduzidas na planta através de técnicas de transferência diretas ou indiretas de DNA. A primeira utiliza processos físicos que causam modificações nas membranas celulares, como a eletroporação de protoplastos e o bombardeamento de partículas (Dale et al., 1993). A segunda utiliza um vetor para promover a transferência de DNA exógeno, a exemplo do co-cultivo com *Agrobacterium tumefaciens* (Lee; Gelvin, 2008), que representa o método mais utilizado para a transformação genética de citros.

A *A. tumefaciens* é o agente etiológico causal da doença galha-de-coroa e sua capacidade de infectar células vegetais está associada à presença de um plasmídeo, denominado Ti. No processo de infecção de uma planta por *A. tumefaciens* ocorre a transferência de genes presentes no plasmídeo Ti (região do T-DNA) para a planta (Brasileiro; Lacorte, 2000). O conhecimento do mecanismo de infecção por *A. tumefaciens* permitiu a construção de plasmídeos modificados contendo seqüências de interesse que são transferidas e integradas ao genoma vegetal, sem afetar a regeneração da célula em uma planta normal (Lee; Gelvin, 2008).

Após o cultivo de um explante vegetal com uma linhagem de *A. tumefaciens* contendo o gene de interesse, a obtenção de uma nova planta dependente do poder de regeneração da célula transformada por meio de técnicas de cultura de tecidos *in vitro*. Dessa forma, o explante transformado é transferido para um meio de cultura contendo os elementos necessários para a regeneração de brotos e um agente de seleção que será responsável pela inibição do crescimento das células não transformadas (Anami, 2013).

Grupo de pesquisa de transformação genética de citros no PPG Fitotecnia

Os trabalhos envolvendo transformação genética de citros tiveram início em 1998, com o grupo de pesquisa coordenado pelos professores Francisco de Assis Alves Mourão Filho, responsável pelo Laboratório de Biotecnologia de Plantas Hortícolas (ESALQ/USP) e Beatriz Madalena Januzzi Mendes, responsável pelo Laboratório de Biotecnologia Vegetal (CENA/USP).

Ao longo desses anos, o grupo de pesquisa tem produzido plantas transgênicas de cultivares copa e porta-enxertos de citros com diferentes genes relacionados à

resistência às principais doenças como, por exemplo, plantas transgênicas de limão ‘Cravo’ apresentando redução dos sintomas causados por gomose (Azevedo et al., 2006) e plantas de laranja doce apresentando redução do cancro cítrico (Barbosa-Mendes et al., 2009). Utilizando outra estratégia, como genes que codificam peptídeos antibacterianos, cultivares de laranja doce também conferiram menor suscetibilidade ao cancro cítrico (Boscariol et al., 2006; Cardoso et al., 2010). Genes derivados do próprio patógeno foram utilizados para obter plantas transgênicas resistentes ao CTV (Muniz, 2012).

Atualmente, as atividades têm sido voltadas a busca de cultivares de laranja doce resistentes ao HLB, dada a importância desta doença no cenário atual. Para isso, têm sido desenvolvidos trabalhos que envolvem identificação e clonagem de genes relacionados à ativação de mecanismos de defesa das plantas e que codificam peptídeos antibacterianos, assim como controle do inseto vetor por meio do mecanismo de RNA de interferência.

Propagação de plantas frutíferas

A propagação é a multiplicação das plantas que podem ocorrer naturalmente ou por métodos controlados pelo homem. A propagação controlada é realizada por meio de estruturas, formadas no ciclo assexuado da planta, denominadas propágulos (Silva et al., 2011). Sua importância consiste em seu amplo uso na agricultura, principalmente na fruticultura, com o intuito de garantir a uniformidade genética de plantas em campo. Deste modo, os métodos mais adequados para a produção de mudas frutíferas são através da propagação, pois possibilitam a transferência de características desejáveis da planta matriz. A propagação da origem a um clone, ou seja, um ser vivo independente, mas geneticamente idêntico à planta matriz. Contudo, seu fenótipo é variável, pois depende do ambiente em que está inserido. Para que a propagação de plantas seja realizada com sucesso é necessária a presença de um tipo de tecido meristemático primário ou secundário (Figura 1).



Figura 1. Tecido meristemático primário - gema lateral de videira (a) e tecido meristemático secundário - câmbio da casca exposto de um porta-enxerto de macieira variedade 'Marubakaido' (b). Fonte: João A. Scarpore Filho (ESALQ/ LPV).

Existem diversas vantagens para a utilização da propagação. Fachinello et al. (2005) destacam que a principal delas baseia-se na manutenção das características genéticas desejáveis da planta matriz. Outras vantagens podem ser: combinação de duas ou mais espécies em uma mesma planta através da enxertia; produção em escala industrial de mudas *in vitro* através da micropropagação e cultura de tecidos; redução do período de juvenildade, adiantando o período produtivo de frutíferas. Contudo, existem algumas desvantagens: os propágulos possuem maior tamanho para transporte e armazenamento; maior possibilidade de transmissão de doenças; torna-se um processo de maior custo que a utilização de sementes.

Dentre os métodos de propagação destaca-se a estaquia, que consiste na utilização de secções da planta matriz para o desenvolvimento de novos clones a partir da rizogênese, ou seja, da formação de raízes adventícias em estacas (Augustí; Fonfría, 2010). A regeneração dessas partes associa-se diretamente ao sucesso do método de estaquia. Existem diferentes tipos de estacas, de acordo com a idade cronológica dos ramos e lignificação: herbáceas, semi-lenhosas e lenhosas. Outra classificação de estacas é conforme a região da planta matriz que o propágulo é oriundo, podendo ser estaca de folha, de ramo ou de raiz. A escolha do tipo de estaca para a produção de mudas deve ser de acordo com a infraestrutura do local, com as condições fisiológicas da planta matriz e condições climáticas do ambiente de armazenamento das estacas e mudas. Estacas de algumas espécies como figueira, amoreira-preta e goiabeira necessitam indução de brotação com biorregulador ácido indolbutírico (AIB). Quanto

ao ambiente, é importante a conservação de alta umidade relativa, para evitar-se a desidratação e morte de estacas principalmente herbáceas e semi-lenhosas.

Outro método de propagação consiste no enraizamento de um ramo ainda ligado à planta matriz, chamado alporquia. A indução ao enraizamento consiste na exposição do câmbio a um substrato úmido. Após o enraizamento é feita a retirada do alporque através de corte e desligamento da planta matriz. O alporque é colocado em sacola plástica com substrato para a confecção de uma nova muda. A lichia e a jaboticabeira são exemplos de plantas frutíferas propagadas por esse método. A mergulhia é um processo semelhante à alporquia, com a variação de que a propagação ocorre com parte do ramo inserido no solo.

A união de seções de diferentes plantas é realizada no método de enxertia. Denomina-se porta-enxerto a planta que possui o sistema radicular e colo de planta e enxerto a parte que representa a copa (Biasi et al., 1997). Características desejáveis de um porta-enxerto geralmente são resistência à patógenos de solo, resistência à seca ou encharcamento de solos. O enxerto deve possuir boas características de produção de frutos. O principal aspecto de sucesso da enxertia consiste na cicatrização entre as partes enxertadas através do câmbio (meristema secundário). Existem diversos tipos de enxertia, destacando-se a borbulhia em T normal, T invertido, placa, janela fechada, além de garfagem e encostia (Figuras 2 e 3).

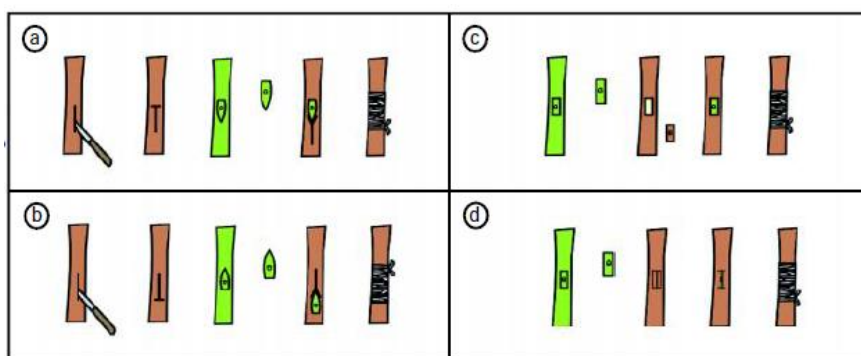


Figura 2. Borbulhia “T” normal (a); Borbulhia “T” invertido (b); Borbulhia em placa ou janela aberta(c); Borbulhia janela fechada (d). Fonte: Silva et al. (2002).

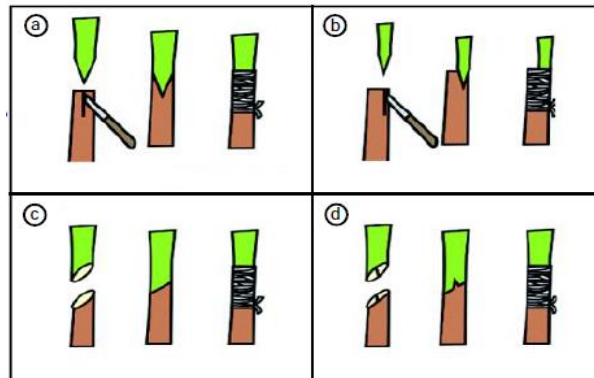


Figura 3. Garfagem fenda cheia (a); Garfagem meia fenda (b); Garfagem inglês simples (c); Garfagem inglês complicado (d). Fonte: Silva et al. (2002).

Algumas espécies frutíferas possuem estruturas especializadas de órgãos vegetativos que possibilitam sua propagação. Tais estruturas possuem capacidade de se multiplicarem, originando novos clones. A bananeira possui um rizoma subterrâneo que possibilita a produção de mudas denominada chifres. Outro exemplo de estrutura especializada é no abacaxizeiro, que possui a coroa, os filhotes e os rebentos (Coelho et al., 2007). O estolho ou estolão é um tipo de caule aéreo do morangueiro, que emite raízes quando entra em contato com o solo, possibilitando a propagação da planta mãe.

Finalmente, a micropropagação é um método que possibilita a produção de mudas em larga escala. Utiliza o meristema apical como base da propagação, e possibilita a clonagem de centenas de plantas a partir de um mesmo meristema (Camolesi et al., 2007). Uma vantagem da micropropagação é a possibilidade de limpeza de vírus e outros patógenos dos clones, de modo a se obter mudas saudáveis e com alta qualidade genética.

2.1 Grupo de pesquisa de propagação de plantas no PPG Fitotecnia

A Propagação de Plantas é uma das áreas de pesquisa e ensino do Departamento de Produção Vegetal da ESALQ. A equipe de professores pesquisadores da área são: João Alexio Scarpore Filho, Keigo Minami, Simone Rodrigues da Silva, Francisco de Assis Alves Mourão Filho, Paulo Hercilio Viegas Rodrigues. Dentro da propagação, as linhas de pesquisa dividem-se quanto o tipo, como fruticultura, olericultura, plantas ornamentais e micropropagação. O LPV oferece para a pós-graduação a disciplina

“LPV 5723 – Propagação de Plantas” que aborda tópicos de propagação, ministrada pelos professores Keigo Minami, João Alexio Scarpore Filho e Simone Silva.

3. Pós-colheita

A pós-colheita consiste da adoção de um conjunto sequencial de técnicas que visam manter o máximo da qualidade da fruta, pelo maior tempo possível. Tais técnicas iniciam na colheita e terminam no momento em que a fruta é consumida, entretanto, só existe pós-colheita enquanto a fruta permanecer com o metabolismo ativo, ou seja, viva.

Diversos trabalhos comprovam que todas as técnicas empregadas nos laboratórios de biotecnologia e propagação e todos os cuidados aplicados no campo, durante o cultivo e a colheita, refletem na pós-colheita. Assim, pode se afirmar que a qualidade das frutas vem do campo e não pode ser incrementada na pós-colheita. Nesta etapa, ocorrem perdas quantitativas e qualitativas, sendo a redução dessas perdas o principal objetivo da adoção das tecnologias pós-colheita.

De acordo com dados publicados pela Fundação Getúlio Vargas (FGV) e a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO), em média, 30% das frutas produzidas são perdidas após a colheita. Em casos extremos, estima-se que essas perdas possam atingir 50% (Chitarra; Chitarra, 2005).

A perda pós-colheita juntamente com o aumento da exigência do consumidor por produtos saudáveis e com qualidade, a necessidade da comercialização a grandes distâncias e o mercado externo (exportação/importação) são os fatores que contribuem para a importância do estudo da fisiologia e bioquímica pós-colheita, uma vez que o desenvolvimento de técnicas objetiva sempre solucionar e minimizar tais entraves.

Nos últimos anos, o número de pesquisadores que se dedicam à pós-colheita de frutas tem aumentado e os resultados refletem para o setor produtivo de forma vantajosa, pois viabiliza o cultivo de novas espécies de frutíferas nas diversas regiões, o aumento das exportações e da qualidade da fruta ofertada também no mercado interno.

A Pós-Graduação da ESALQ/USP tem diversas dissertações e teses defendidas e em andamento sobre o tema. Essas pesquisas abordam desde a caracterização da pós-colheita de determinada fruta até a aplicação de tecnologias de conservação. Vale ressaltar que para o teste das possíveis tecnologias pós-colheita é necessário um conhecimento prévio do comportamento da fruta, bem como do principal problema a ser

solucionado. A elaboração das dissertações e teses consiste do preparo detalhado de revisões bibliográficas sobre o assunto a ser estudado, da seleção de produtores ou grupos de cultivos, da realização ou acompanhamento da colheita, da aplicação de tecnologias, quando for o caso, e da realização das mais diversas análises.

Quando se fala em aplicação de tecnologia pós-colheita, o primeiro tratamento que deve ser estudado e empregado é a refrigeração, dado sua facilidade e eficiência. As demais técnicas de controle do amadurecimento e da incidência de doenças são complementares à redução da temperatura de armazenamento e dificilmente produzem bons resultados se não estiverem associadas a ela. A refrigeração consiste do processo de remoção do calor das frutas; sem esse cuidado, o processo de deterioração é mais rápido devido à maior produção de calor vital e liberação de CO₂, decorrente da respiração (Kluge et al., 1997; Chitarra; Chitarra, 2005).

Existem várias outras tecnologias fundamentais à boa conservação e extensão da vida útil das frutas e que vêm sendo estudadas, sendo as principais: o uso de atmosfera modificada, através de filmes plásticos ou recipientes; aplicação de ceras e recobrimentos, como carnaúba e quitosana; aplicação de reguladores vegetais, como etileno exógeno e 1-metilciclopropano (1-MCP); destanização; e irradiação.

A forma de aplicação, tempo de exposição e demais cuidados necessários à aplicação de todas essas tecnologias variam de fruta para fruta. Sendo que, a recomendação de cada técnica necessita da realização de ensaios e análises experimentais.

Para realização de um estudo pós-colheita é necessário a realização de análises simples e corriqueiras como perda de massa fresca, coloração, pH, teores de sólidos solúveis, incidência de podridão até as análises mais delicadas e complexas como enzimas de parede e de escurecimento, atividade antioxidante, pigmentos, atividade respiratória e produção de hormônios, quantificação e identificação de compostos fenólicos e vitamínicos.

4.1 Grupo de pesquisa de pós-colheita de frutas e hortaliças no PPG Fitotecnia

Os mais recentes trabalhos pós-colheita publicados pelos pesquisadores do programa de Fitotecnia:

- Aplicação do 1-metilciclopropeno e sua influência no processo de remoção da adstringência com etanol em caqui 'Giombo' refrigerado (Terra et al., 2014);
- Aplicação de quitosana em pré ou pós-colheita prolonga a vida útil e a qualidade de framboesas frescas (Tezotto-Uliana et al., 2014);
- Armazenamento de morango 'Oso Grande' em atmosfera controlada contendo óxido nitroso (Cunha et al., 2013);
- Desverdecimento e armazenamento refrigerado de tangor 'Murcott' em função de concentração e tempo de exposição ao etileno (Jomori et al., 2014);
- O sistema de colheita afeta a qualidade de conservação de lima ácida Tahiti' (Bassan et al., 2013);
- Ponto de colheita e maturação de frutos de camu-camu colhidos em diferentes estádios (Pinto et al., 2013).

Referências

- AGUSTÍ, M.; FONFRÍA, M. A. **Fruticultura**. Madri: Mundi-Prensa Libros, 2010. 507 p.
- ANAMI, S; NJUGUNA, E; COUSSENS, G; AESAERT, S.; VAN LIJSEBETTENS, M. Higher plant transformation: principles and molecular tools. **The International Journal of Developmental Biology**, 57: 483-494, 2013.
- AZEVEDO, F.A.; MOURÃO FILHO, F.A.A.; MENDES, B.M.J.; ALMEIDA, W.A.B.; SCHINOR, E.H.; PIO, R.; BARBOSA-MENDES, J.M.; GUDETTI-GONZALEZ, S.; CARRER, H.; LAM, E. Genetic transformation of rangpur lime (*Citrus limonia* Osbeck) with the *b0* (Bacterio-Opsin) gene and its initial evaluation for *Phytophthora nicotianae* resistance. **Plant Molecular Biology Reporter**, 24: 185-196, 2006.
- BARBOSA-MENDES, J.M.; MOURÃO FILHO, F.A.A.; BERGAMIN FILHO, A.; HARAKAVA, R.; BEER, S.V.; MENDES, B.M.J. Genetic transformation of *Citrus sinensis* cv. 'Hamlin' with *hrpN* gene from *Erwinia amylovora* and evaluation of the transgenic lines for resistance to citrus canker. **Scientia Horticulturae**, 122: 109-115, 2009.
- BASSAN, M.M.; MOURÃO FILHO, F.A.A.; CARON, V.C.; COUTO, HILTON THADEU ZAH.T.Z.; JACOMINO, A.P. The harvesting system affects the quality and conservation of the 'Tahiti- acid lime. **Scientia Horticulturae**, 155:72-77, 2013.
- BOSCARIOL, R.L.; MONTEIRO, M.; TAKAHASHI, G.K.; CHABREGAS, S.M.; VIEIRA, M.L.C.; VIEIRA, L.G.E; PEREIRA, L.F.P.; MOURÃO FILHO, F.A.A.; CARDOSO, S.C., CHRISTIANO, R.S.C.; BERGAMIN FILHO, A; BARBOSA, J.M.; AZEVEDO, F.A.; MENDES, B.M.J. *Attacin* A gene from *Tricloplusia ni* reduces susceptibility to *Xanthomonas axonopodis* pv. citri in transgenic *Citrus sinensis* cv. Hamlin. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, 131: 530-536, 2006.
- BRASILEIRO, A.C.M.; LACORTE, C. Agrobacterium: um sistema natural de transferência de genes para plantas. **Biotecnologia**, 15: 12-15, 2000.
- BIASI, L.A.; POMMER, C.V.; PINO, P.A.G.S. Propagação de porta-enxertos de videira mediante estaquia semilenhosa. **Bragantia**, 56: 367-376, 1997.
- CAMOLESI, M.R.; KAIHARA, E. S.; SACONI, C.G.; FARIA, R. T. D.; NEVES, C. Redução da oxidação na propagação in vitro da bananeira 'Maçã'. **Ciência e Agrotecnologia**, 31: 1237-1241, 2007.
- CARDOSO, S.C.; BARBOSA-MENDES, J.M.; BOSCARIOL, R.L.C.; CHRISTIANO, R.S.C.; BERGAMIN FILHO, A.; VIEIRA, M.L.C.; MENDES, B.M.J.; MOURÃO FILHO, F.A.A. Transgenic sweet orange (*Citrus*

sinensis L. Osbeck) expressing the *attacin A* gene for resistance to *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. **Plant Molecular Biology Reporter**, 28: 185-192, 2010.

CHITARRA, M.I.F.; CHITARRA, A.B., **Pós-colheita de frutas e hortaliças Fisiologia e Manuseio**, 2. ed. Lavras: UFLA, 2005. 785 p.

COELHO, R.I.; CARVALHO, A.J.C.D., LOPES, J.C., TEIXEIRA, S.L., MARINHO, C.S. Coroa do abacaxi 'SmoothCayenne' na produção de mudas do tipo rebentão. **Ciência e Agrotecnologia**, 31: 1867-1871, 2007.

CUNHA JUNIOR, L.C.; JACOMINO, A.P.; TREVISAN, M.J.; TEIXEIRA, G.H.A. Storage of 'Oso Grande' strawberries in controlled atmosphere containing nitrous oxide (N₂O). **HortScience**, 48: 1283-1287, 2013.

DALE, P.J.; IRWIN, J.A.; SCHEFFLER, J.A. The experimental and commercial release of transgenic crops plants. **Plant Breeding**, 111: 1-22, 1993.

FACHINELLO, J.C.; HOFFMANN, A.; NACHTIGAL, J.C. **Propagação de plantas frutíferas**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2005. 221p.

GAMBINO, G.; GRIBALDO, I. Genetic transformation of fruit trees: current status and remaining challenges. **Transgenic Research**, 21: 1163-1181, 2012.

JOMORI, M.L.L.; SASAKI, F.F.C.; BERNO, N.D.; GIMENES, L.C.; KLUGE, R.A. Desverdecimento e armazenamento refrigerado de tangor 'Murcott' em função de concentração e tempo de exposição ao etileno. **Semina. Ciências Agrárias**, 35: 825, 2014.

KLUGE, R.A.; NACHTIGAL, J. C.; FACHINELLO, J. C.; BILHALVA, A. B. **Fisiologia e manejo pós-colheita de frutas de clima temperado**. Pelotas: Editora Universitária - UFPEL, 1997. 163 p.

LEE, L.Y.; GELVIN, S.B. T-DNA Binary vectors and systems. **Plant Physiology**, 146: 325-332, 2008.

MATTOS JÚNIOR, D.; NEGRE, J.D.; PIO, R.M.; POMPEU JÚNIOR, P. **Citros**. Campinas: Instituto Agrônomo e Fundag, 2005. 929 p.

MUNIZ, F.R.; SOUZA, A.J.; STIPP, L.C.L.; SCHINOR, E.H.; FREITAS JUNIOR, W.; HARAKAVA, R.; STACH-MACHADO, D.R.; REZENDE, J.A.M.; MOURÃO FILHO, F.A.A.; MENDES, B.M.J. Genetic transformation of *Citrus sinensis* with citrus tristeza virus (CTV)-derived sequences and reaction of transgenic lines to CTV infection. **Biologia Plantarum**, 56: 162-166, 2012.

PINTO, P.M.; JACOMINO, A.P.; SILVA, S.R.; ANDRADE, WIPPICH, C.A. Ponto de colheita e maturação de frutos de camu-camu colhidos em diferentes estádios. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 48: 605-612, 2013.

SILVA, S.R.; DIAS, K.F.; SCARPARE FILHO, J. A. **Propagação de árvores frutíferas**. Piracicaba: USP/ESALQ/Casa do Produtor Rural, 2011. 63 p.

SINGH, O.V.; GHAI, S.; PAUL, D.; JAIN, R.K. Genetically modified crops: Success, safety assessment, and public concern. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 71: 598-607, 2006.

TERRA, F.A.M.; EDAGI, F.K.; SASAKI, F.F.C. ; FRASSETO FILHO, M.E.; SILVA, M.M.; GIRO, B.; BERNO, N.D. ; KLUGE, R.A. Aplicação do 1-metilciclopropeno e sua influência no processo de remoção da adstringência com etanol em caqui 'Giombo' refrigerado. **Ciência Rural**, 44: 210-216, 2014.

TEZOTTO-ULIANA, J.V.; FARGONI, G.P.; GEERDINK, G.M.; KLUGE, R.A. Chitosan applications pre- or postharvest prolong raspberry shelf-life quality. **Postharvest Biology and Technology**, 91: 72-77, 2014.

VISARADA, K.B.R.S.; KANTI MEENA, C.; ARUNA, S.; SRUJANA, N.; SAIKISHORE, N. Transgenic breeding: perspectives and prospects. **Crop Science**, 49: 1555-1563, 2009.

Sementes: os avanços da tecnologia

Danielle Otte Carrara Castan

Francisco Guilhien Gomes Junior

Natália Arruda

Tatiane Tokairin de Oliveira

A importância da utilização de sementes na agricultura brasileira é incontestável. Cerca de 70% das espécies vegetais, de expressão econômica, descritas pelo homem são multiplicadas por sementes. A semente pode ser considerada como um pacote de tecnologias onde estão congregados os resultados do trabalho árduo de uma equipe profissional multidisciplinar altamente qualificada (Marcos-Filho, 2005).

Nesse sentido, a utilização de sementes de alta qualidade é indispensável para o sucesso de uma cultura. Isso ocorre porque a qualidade de sementes, que é determinada pelos atributos genético, físico, fisiológico e sanitário, está diretamente associada ao estabelecimento adequado do estande ao desenvolvimento inicial das plantas no campo.

As vantagens da utilização de sementes de alta qualidade são verificadas pela germinação e emergência de plântulas mais rápidas, uniformes e mais resistentes às condições adversas (Marcos-Filho, 2005). A legislação vigente no país para certificação do comércio de sementes exige a realização de testes considerados de rotina, como a análise de pureza e o teste de germinação. No entanto, no âmbito da Tecnologia de Sementes, a definição do potencial fisiológico é mais abrangente, com critérios baseados em parâmetros bioquímicos, fisiológicos e de resistência a estresses, além do tradicional teste de germinação realizado em condições controladas.

Ciência e Tecnologia de Sementes – PPG Fitotecnia

Constituída por profissionais altamente qualificados, tem a responsabilidade de solucionar os problemas associados ao estabelecimento da cultura no campo e aprimoramento das técnicas de produção e análise de sementes em pré e pós-colheita. Esses conhecimentos gerados certamente exercem um papel fundamental para o avanço tecnológico e aumento da competitividade do agronegócio brasileiro.

Vinculado ao LPV essa linha é composta pelos Laboratórios de Análise de Sementes, Análise de Imagens e uma Unidade de Beneficiamento de Sementes.

Laboratório de Análise de Sementes

O laboratório está equipado para o desenvolvimento de análises de pureza física, grau de umidade, germinação e testes de vigor (envelhecimento acelerado, de frio, de condutividade elétrica, emergência de plântulas em areia/campo e de tetrazólio). Vários trabalhos têm sido desenvolvidos contemplando diferentes espécies de grandes culturas, hortaliças, oleícolas, além de espécies forrageiras e florestais. Dentre os temas estudados podem ser destacados a definição da temperatura ótima para germinação de espécies não contempladas pelas Regras para Análise de Sementes (RAS), padronização e desenvolvimento de novas metodologias para determinação do vigor de sementes, estudos de maturação e secagem e efeitos do tratamento químico e do condicionamento fisiológico de sementes.

Laboratório de Análise de Imagens

É o primeiro no Brasil para avaliação de sementes e plântulas utilizando técnicas de análise de imagens. Foi construído e equipado em 2001 com recursos da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e, dentre os métodos de análise de imagens, são destacados o teste de raios X e a avaliação automatizada do vigor de sementes.

As pesquisas utilizando o teste de raios X têm sido realizadas com sementes de inúmeras espécies como: soja, milho, arroz, feijão, tomate, mamona, quiabo, milho-doce, alface, pimentão, amendoim e florestais. As pesquisas contemplam a avaliação de diferentes injúrias (mecânicas, insetos, umidade e secagem inadequada) até a identificação de alterações na morfologia interna das sementes e de anormalidades embrionárias. A partir de imagens radiográficas, programas de computador realizam a avaliação de espaços vazios no interior de sementes ou do grau de desenvolvimento embrionário associando os resultados a germinação.

A viabilidade do teste de raios X está associada ao fato das baixas doses de radiação utilizadas não provocarem mutações e efeitos negativos sobre a germinação e,

por se tratar de um método não destrutivo há possibilidade da semente radiografada ser submetida a testes de germinação ou vigor.

Na determinação automatizada do vigor de sementes têm sido utilizados programas computacionais baseados no crescimento de plântulas. Após três ou quatro dias de germinação, as plântulas são digitalizadas por meio de um escâner e o vigor é determinado com base em valores numéricos variando de 0 a 1000, sendo que mais próximo de 1000, maior é o vigor do lote. Essas análises têm sido realizadas por meio do software *Seed Vigor Imaging System* (SVIS[®]) e os procedimentos já foram padronizados para a avaliação do vigor de sementes de várias espécies (soja, milho, milho-doce, melão, crotalária, pepino, amendoim, trigo, girassol, tomate, berinjela). Dentre as vantagens da determinação automatizada do vigor de sementes podem ser destacadas a maior rapidez na obtenção dos resultados em relação aos testes de germinação, de envelhecimento acelerado e de frio, por exemplo, e a eliminação de possíveis erros de interpretação humana, por se tratar de uma avaliação computadorizada.

As técnicas de análise de imagens, diante da sua ampla aplicabilidade, se destacam com grandes contribuições científicas. A qualidade e importância das pesquisas realizadas no Laboratório de Análise de Imagens tem sido medida pelo destaque nacional e internacional com a premiação dos trabalhos em congressos na área de sementes.

A disponibilidade e o entusiasmo dos professores e pesquisadores do setor de sementes da ESALQ no aprimoramento do conhecimento, tendo em vista as novas tecnologias e tendências internacionais, proporcionaram importantes parcerias no desenvolvimento de pesquisas com instituições renomadas dos Estados Unidos e da Europa. Atualmente, os alunos da área de Ciência e Tecnologia de Sementes podem desenvolver programas de intercâmbio na *Ohio State University*, localizada nos Estados Unidos e no *Plant Research International*, na Holanda.

Referências

MARCOS-FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Piracicaba: Fealq, 2005. 495 p.

MARCOS-FILHO, J. Teste de envelhecimento acelerado. In: KRZYZANOWSKI, F.C.; VIEIRA, R.D.; FRANÇA NETO, J.B. (Ed.). **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, 1999. p. 3.1-3.24.

Genética e Melhoramento de Plantas

Genética de populações

Nancy Farfan Carrasco

Tatiane de Oliveira Gonçalves

Thais Melega Tomé

Gabriel Dequigiovanni

Tábata Berbonci

Elizabeth Ann Veasey

1. Introdução

Desde a síntese moderna, quando a teoria da seleção natural de Darwin foi revisitada à luz da teoria mendeliana da hereditariedade, a genética de populações tem proporcionado análises de grande relevância para estudos evolutivos. Os clássicos trabalhos de R.A. Fisher, J. B. S. Haldane e Sewall Wright, independentemente lançaram, na primeira metade do século XX, os alicerces sobre os quais a genética de populações se desenvolveu espalhando a síntese moderna por áreas diferentes da biologia evolutiva (Ridley, 2006).

As populações naturais de seres vivos que compõem os ecossistemas possuem uma particularidade entre si: apresentam, em geral, variação genética como consequência da combinação de seus genótipos e, assim, exercem papéis fundamentais na adaptação ao longo das gerações (Hartl; Clark, 2011). Fatores evolutivos, tais como seleção natural, deriva genética, fluxo gênico, mutação etc, estão estritamente relacionados com a variabilidade genética presente nas populações, uma vez que esses fatores estão associados às mudanças nas frequências gênicas e genotípicas que as compõem, bem como na criação de novos alelos, no caso da mutação. Para estudos dessa dinâmica microevolutiva, a biologia incorporou o estudo de genética de populações justamente para estudar esses processos que fornecem subsídios para a compreensão da evolução biológica (Ridley, 2006; Hartl; Clark, 2010). Desse modo, um dos principais objetivos da genética de populações é entender os fatores que determinam a mudança evolutiva e o padrão de variação genética dentro e entre populações (Hedrick, 2005; Hartl; Clark, 2007).

Basicamente, indivíduos de uma determinada população que se encontram em fase reprodutiva produzem descendentes e, assim, fornecem seus genótipos para a progênie. Essa continuidade contempla a diversidade genética dentro da população, considerada a unidade evolutiva. Dentro desse contexto, tornou-se possível a caracterização da diversidade genética intra e interpopulacional e, conseqüentemente, este assunto tem se tornado uma das principais questões da biologia evolutiva desde o seu início (Solferini; Selivon, 2012). Por essa razão, tornou-se possível estimar níveis de variação em populações a partir de amostras com o emprego do princípio de Hardy-Weinberg.

O matemático G. H. Hardy e o médico W. Weinberg criaram, independentemente em 1908, um modelo que embora simples e limitado, possibilita descrever atributos populacionais, servindo como base para modelos mais realistas (Templeton, 2011). Neste modelo, por meio da amostragem da população, estima-se o genótipo em situação de equilíbrio, para um determinado loco. O Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) reflete a manutenção das frequências alélicas e genotípicas da população quando a população é infinitamente grande, quando os acasalamentos ocorrem ao acaso (panmixia) e não há pressões evolutivas tais como seleção, mutação, deriva e migrações, após sucessivas gerações. Este modelo trata de população com indivíduos diplóides e de reprodução sexuada (Futuyma, 2009; Pierce, 2011).

Este texto pretende apresentar as ideias iniciais acerca do tema genética de populações, bem como apresentar aos alunos de graduação as possibilidades de pesquisa dentro desta área.

2. Alelos e polimorfismo

A variabilidade genética ocorre por diversas razões, dentre as quais, a segregação independente durante a divisão meiótica, quando da formação de gametas, a recombinação durante o *crossing-over* na Meiose I e a fecundação, por sua característica estocástica, mecanismos comuns em eucariotos. Há ainda outros mecanismos (exclusivos de procariotos) capazes de produzir variabilidade como conjugação, transdução e transformação. A atividade de elementos de transposição e mutações atuam acrescentando variabilidade tanto em eucariotos quanto em procariotos (Futuyma, 2009; Pierce, 2011).

Em eucariotos, o DNA está organizado em cromossomos. Os cromossomos, em geral², ocorrem em pares homólogos, sendo metade proveniente da fêmea e metade do macho. A homologia é resultado de uma origem em comum, ou seja, uma ancestralidade compartilhada (Pierce, 2011). Desta forma, quando se examina um pareamento meiótico regular observa-se o pareamento de dois cromossomos homólogos. Ao longo dos cromossomos estão os locos, regiões em que estão situados os genes - porções nucleotídicas que codificam proteínas. Quando existem variantes para um determinado loco, diz-se que ele é polimórfico, ou seja, há diferentes formas de gene para um mesmo loco. Diz-se, então, que há variabilidade genética. No caso de não haver variante do gene, trata-se de um loco monomórfico (Futuyma, 2009).

Quando se analisa a diversidade genética de uma população trata-se, portanto, de inferir sobre quanta variabilidade há nela. Além dos mecanismos mencionados anteriormente, há ainda fontes externas que amplificam a variabilidade genética, tais como fluxo gênico, hibridação (quando espécies próximas se cruzam) e transferência horizontal (transferência de genes entre organismos distantemente relacionados) (Futuyma, 2009).

Para abordar os fatores evolutivos que podem levar populações ao desequilíbrio, segundo o princípio de Hardy-Weinberg, é importante refletir sobre algumas questões. Ricklefs (2011) conceitua população como unidade organizacional na ecologia em que indivíduos de uma espécie se reproduzem misturando o *pool* gênico - todos os alelos de todos os genes de todos os indivíduos da unidade - da população e assegurando a continuidade através do tempo. O próprio conceito apresentado já encerra em si uma limitação: trata-se de uma unidade organizacional na ecologia. Na natureza os organismos não se distribuem conforme uma unidade organizacional da ecologia. Como, então, delimitar onde começa e onde termina, de fato, uma população? A dispersão de indivíduos em uma população está relacionada à heterogeneidade de habitat e as interações sociais (Ricklefs, 2011). Nem sempre é fácil ou possível delimitar populações. Esse conceito serve-nos, portanto, ao estudo. Para entendermos os padrões encontrados na natureza, reduzimos o objeto de estudo para melhor investigá-lo

² Em aloploidoides há dois ou mais genomas diferentes e, portanto, não há homologia ou há em poucas porções do material genético.

devendo, posteriormente, haver uma reflexão cuidadosa sobre a abrangência e a limitação do estudo realizado.

Também não se pode perder de vista aspectos de natureza geológica. O tectonismo moveu porções continentais separando ambientes outrora interligados (Teixeira et al., 2000). É possível que aquilo que identificamos hoje como populações diferentes tenha sido uma população maior que foi se fragmentando ao longo da ocupação humana daquele território, por exemplo. Mudanças geomorfológicas ocorrem ao longo da escala de tempo alterando paisagens (Press et al., 2003). Condições climáticas diferenciadas ocorrem dentro da escala de tempo geológico, alterando habitats e, por conseguinte, a dispersão dos indivíduos. Períodos extensos de aquecimento global intercalados por períodos muito frios, caracterizados por glaciações continentais, marcaram a história do planeta (Press et al., 2003).

Feito essas reflexões, podemos seguir explorando o que pode acrescentar ou reduzir variabilidade genética em populações. Ao observarmos uma população natural, percebemos que há indivíduos um pouco mais próximos de uns do que de outros. Será que os acasalamentos são sempre ao acaso? Se há populações relativamente próximas, será que os indivíduos ou genes (no caso de organismo sésil) não saem ou entram de uma população para outra? Será que todos os indivíduos se reproduzem com a mesma intensidade? Será que sobrevivem a taxas iguais, todos os indivíduos de uma população? Essas questões serão vistas nas seções seguintes.

3. Seleção natural

Os indivíduos de uma população disputam por recursos e parceiros reprodutivos nos ambientes em que ocupam (Ricklefs, 2003; Ridley, 2006). Alguns indivíduos podem ter maior capacidade de sobrevivência - viabilidade. Uma vez que isso ocorra, podem ainda ter maior capacidade de deixar descendentes férteis - fertilidade (Templeton, 2011), ou seja, o indivíduo é a unidade da seleção natural. Num determinado ambiente estes indivíduos possuem vantagens adaptativas, ou *fitness*. De fato, suas características perpetuarão na população já que eles deixarão um número maior de descendentes.

Em contrapartida, indivíduos com menor *fitness* deixarão menos descendentes e alelos poderão ser eliminados da população, uma vez que certos genótipos não são tão

bem sucedidos dentro da população, seja por morrerem precocemente, seja por falta de capacidade reprodutiva (Pierce, 2011). Ao passo que genótipos podem estar mais aptos em certos ambientes, outros podem estar sofrendo pressões seletivas, ao ponto de desaparecerem ao longo das gerações. Os mais aptos estão, portanto, mais adaptados àquelas condições (Ridley, 2006).

O valor adaptativo (W) de um determinado genótipo, nos modelos matemáticos de genética de populações, varia de 0 a 1. Quando $W=0$, há 0% de valor adaptativo (ou seja, indivíduo infértil) e quando $W=1$, há o máximo de valor adaptativo (100%). O coeficiente de seleção (S) é uma estimativa do efeito seletivo, sendo complementar ao valor adaptativo. Desta forma, se o valor adaptativo de um genótipo na população é $W=0,52$, então $S=0,48$.

Se, dentro de uma população, um determinado genótipo não tem a mesma aptidão reprodutiva que os demais ocorrerá desvios nas proporções genotípicas esperadas no EHW. Na distribuição de Hardy-Weinberg, espera-se uma proporção $p^2:2pq:q^2$ para os genótipos homocigoto dominante, heterocigoto e homocigoto recessivo, respectivamente, onde p é a frequência do alelo dominante e q a do recessivo (Futuyma, 2009).

Há duas considerações importantes sobre este aspecto: o caráter relativo desses índices, isto é, um genótipo é comparado em relação ao outro, então há genótipos mais adaptados ou não. E o fato de que a viabilidade de um genótipo está associada ao ambiente, ou seja, em um ambiente distinto aquele mesmo genótipo pode não ter maior *fitness*.

4. Deriva genética

Os sistemas biológicos são susceptíveis aos efeitos do acaso. A deriva genética também pode levar à eliminação de genótipos e alelos, sobretudo em populações bastante pequenas (Kageyama; Gandara, 1998). Em curto prazo, pode haver perda da variabilidade genética, induzindo a uma redução de aptidão individual da espécie, inviabilizando o remanescente populacional; e em longo prazo, a redução da riqueza alélica, limitando a habilidade das espécies a responderem às mudanças devido à ação das forças seletivas. Em populações muito grandes os efeitos do acaso não produzem efeitos expressivos (Ridley, 2006; Futuyma, 2009; Pierce, 2011).

Para se ter um melhor entendimento do efeito da deriva sobre a frequência gênica, deve-se levar em consideração que a população é uma amostra de genes que são transmitidos de uma geração a outra. No caso de populações grandes, as populações não sofrem grandes desvios em virtude do acaso ao longo das gerações.

É importante observar que, em populações pequenas, a probabilidade de cruzamento entre parentes é maior, e isso pode afetar um dos requisitos básicos para o modelo de EHW, a panmixia. Com esse tipo de cruzamento pode haver cruzamentos entre indivíduos com cópias gênicas idênticas por descendência. A cada evento de reprodução endogâmica há uma redução da heterozigosidade à metade, ao passo que aumenta a homozigose. À medida que a homozigose é elevada, certos alelos - deletérios em homozigose - que antes existiam em heterozigose, acabam se manifestando, sem representar a morte do indivíduo, caracterizando a depressão endogâmica (Ridley, 2006; Futuyma, 2009).

A autofecundação de plantas consiste num padrão extremo de endogamia. Quanto maior a taxa de autogamia - autocruzamento-, maior a probabilidade de características que comprometem a viabilidade do organismo se manifestem. Em contrapartida, plantas alógamas, cujos cruzamentos se dão entre indivíduos diferentes, apresentam frequências menores de endogamia. Há mecanismos como dioicismo, dicogamia e auto-incompatibilidade, que desfavorecem a ocorrência de autofecundação (Futuyma, 2009).

5. Mutação

A mutação é a principal fonte de variação e pode originar-se devido a erros na duplicação do DNA, danos causados por irradiação etc. A mutação aumenta a diversidade; entretanto, dado que as mutações espontâneas são pouco frequentes, a taxa de mudança da frequência gênica é muito baixa. Em consequência, a mutação por si só não induz à evolução de populações e espécies (Lopez; Fulton, 2004).

A mutação mais simples é aquela que modifica apenas um nucleotídeo na sequência de DNA de um gene. Esse tipo de mutação pode alterar o alelo mutado, deixando consequências que podem ser reversíveis ou irreversíveis para o DNA, tais como a dominância ou recessividade e o surgimento de novos alelos. As mutações podem ser também consideradas favoráveis, desfavoráveis ou neutras. Muitas serão desfavoráveis e desaparecerão. No entanto, se são convenientes para o indivíduo, as

frequências desses alelos aumentarão de geração em geração e, ainda, poderão migrar para outras populações e, assim, se propagarem (Lopez; Fulton, 2004).

6. Fluxo gênico

O fluxo gênico em populações de plantas ocorre durante as gerações gametofíticas e esporofíticas, através da dispersão de pólen e de semente. São diferentes as consequências da colonização de habitats vazios pela dispersão de sementes e da imigração de pólen, e/ou sementes para populações já estabelecidas (Levin, 1984).

No primeiro caso, pode ocorrer uma alteração da estrutura espacial da espécie, com a formação de colônias, conduzindo, muitas vezes, a um aumento de heterogeneidade da frequência gênica entre as populações. No segundo caso, o nível de variação dentro da população tende a aumentar e a diferença entre a estrutura genética das diferentes populações tendem a diminuir. Para Wright (1943), populações separadas por longas distâncias e com limitado fluxo gênico podem se tornar diferenciadas geneticamente umas das outras pelo processo de “isolamento por longas distâncias”.

As plantas apresentam grande diversidade de sistemas reprodutivos, desde aqueles envolvendo reprodução assexuada, até os de sistema com endogamia completa e alogamia (Solbrig, 1979). O fluxo de genes, tanto dentro como entre populações, dependerá da estrutura reprodutiva, estando praticamente impedida no caso de populações que se reproduzem assexuadamente; ocorrendo ainda em diferentes modos e graus, no caso de populações com reprodução sexuada. Em espécies autógamas, por exemplo, o fluxo gênico através de sementes é mais importante do que através do pólen, embora ocasionais cruzamentos à longa distância possam ter grande influência na diferenciação de populações (Jain; Bradshaw, 1966).

Portanto, na conservação de recursos genéticos *in situ*, é essencial obter dados sobre estrutura e comportamento reprodutivo das populações, pois os padrões de distribuição da variabilidade genética estão correlacionados com os sistemas reprodutivos. As taxas de imigração, mesmo quando muito reduzidas, podem ter um grande impacto tanto sobre a estrutura como a diferenciação de populações, o qual é estimado em relação à produção do pólen e semente da população que está recebendo esses disseminadores. Quanto maior for a produção local de pólen e semente, menor será a taxa (Sodero, 1987).

7. Parâmetros genéticos

Na caracterização da estrutura populacional, do ponto de vista ecológico, procura-se determinar a densidade populacional, a natureza das relações entre os indivíduos e os diversos fatores ambientais, e as interações existentes entre os indivíduos e populações locais. A abordagem genética e evolutiva, por outro lado, procura quantificar a variabilidade genética existente entre os indivíduos, seu comportamento reprodutivo, padrões de fluxo gênico, e as estratégias adaptativas aos ambientes. Neste contexto, a frequência alélica, que é a medida da frequência relativa de um alelo em um loco genético em uma população, é um dos principais parâmetros utilizados para estudos de genética de populações, permitindo caracterizar a diversidade e estrutura de uma população (Lopez; Fulton, 2004). Outro parâmetro é a proporção de indivíduos heterozigotos para um loco em uma população. Segundo Weir (1996), o conhecimento da proporção de heterozigotos é importante em estudos de diversidade, porque cada heterozigoto carrega diferentes alelos, o que mostra a existência de variação genética em uma população. Geralmente calcula-se as heterozigosidades observada e esperada. A primeira é a proporção de indivíduos heterozigotos observados em uma amostra, sendo calculada a partir dos genótipos encontrados na população para um loco ou para todos os locos. Já a heterozigosidade esperada, se refere à diversidade genética definida como a probabilidade de que dois alelos selecionados aleatoriamente de um indivíduo qualquer sejam diferentes.

A análise da estrutura genética pode ainda ser feita através de outro parâmetro genético conhecido como a estatística de Wright, também denominado de Índice de fixação, a qual permite medir a divergência genética entre as populações (Índice de fixação entre as populações ou F_{ST}), assim como também o grau de redução da heterozigosidade dentro de uma população (Índice de fixação dentro de uma população ou F_{IS}), e a diminuição global da heterozigosidade (Índice de fixação para uma população F_{IT}) com relação a uma população total.

8. A pesquisa em genética de populações

Embora não existam populações isentas de pressões evolutivas, o teorema de Hardy-Weinberg é importante no âmbito conceitual e na pesquisa aplicada (Ridley,

2006). Inferências acerca da diversidade dentro e entre populações são importantes para diferentes estudos, tais como os mencionados por Hartl e Clark (2010):

- Melhoramento de plantas - com o conhecimento da base genética, é possível escolher genes de interesse para o melhoramento, por suas características, a exemplo da resistência a fatores bióticos e abióticos ou frutos maiores;
- Aconselhamento genético - no caso de doenças hereditárias, servindo de apoio aos familiares com históricos dessas doenças;
- Identificação de genes de suscetibilidade a doenças;
- Conservação - a partir de dados de populações de espécies, é possível inferir programas de cruzamentos para a conservação das espécies ameaçadas;
- Amostragem de áreas naturais com o intuito de estimar a distribuição e o grau de variabilidade de populações para fins de preservação *in situ* e *ex situ*;
- Relações evolutivas - estudos de genes e genomas de populações são imprescindíveis quando se busca entender, através de hipóteses, o processo evolutivo das espécies, ou seja, a investigação da variação genética nos diz sobre a história das espécies.

Desde o surgimento da técnica de eletroforese de isoenzimas até o uso recente de técnicas moleculares no estudo de genética de populações, tem sido possível inferir, com mais precisão e abrangência, os resultados para interpretação em genética de populações. Essas ferramentas são importantes, pois oferecem dados que permitem análises mais robustas, capazes de elucidar melhor questões referentes às populações, com maior amplitude de informações e também permitem desenvolver modelos evolutivos mais complexos. Além do mais, a partir do desenvolvimento de *softwares* cada vez mais aplicados à genética de populações, é possível ter maior acurácia nos resultados e inferir mais adequadamente o estado em que as populações se encontram.

Referências

- FUTUYMA, D.J. **Biologia Evolutiva**. 3. ed. Ribeirão Preto: FUNPEC Editora, 2009. 631 p.
- HARTL, D.L.; CLARK, A.G. **Princípios de genética de populações**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 660 p.
- HARTL, D.L.; CLARK, A.G. **Principles of Population Genetics**. 4. ed. Sunderland: Sinauer Associates. A recent summary of the principles of population genetics. 2007.
- HEDRICK, P. Genetic polymorphism in heterogeneous environments: the age of genomics. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, 37: 67–93, 2006.

- JAIN, S.K.; BRADSHAW, A.D. Evolutionary divergence among adjacent plant population 1. The evidence and its theoretical analysis. **Heredity**, 21: 407-441, 1996.
- LEVIN, D.A. Inbreeding depression and proximity-dependent crossing success in *Phlox drummondii*. **Evolution**, 38: 116-127, 1984.
- LOPEZ, F.V.; FULTON, T. **Genetic diversity analysis with molecular marker data**: learning module. IPGRI, 2004. 85 p.
- PRESS, F.; GROTZINGER, J.; SIEVER, R.; JORDAN, T.H. **Para entender a Terra**. 4. ed. Porto Alegre: Bookman, 2006.
- RICKLEFS, R.E. **A Economia da Natureza**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2011. 470 p.
- RIDLEY, M. **Evolução**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2006. 450 p.
- SODERO, M.P. Estrutura populacional, fluxo gênico e conservação "in situ". **Instituto de pesquisa e estudos florestais**, 35: 71-78, 1987.
- SOLBRIG, O.T., SOLBRIG, D.J: **Introduction to population biology and evolution**. London: Addison-Wesley Educational Publishers, 1979. 480 p.
- SOLFERINI, V. N.; SELIVON, D. Polimorfismo de isoenzimas. In: MATIOLI, S.R.; FERNANDES, F.M.C. (Ed.). **Biologia molecular e evolução**. Ribeirão Preto: Holos, Editora Sociedade Brasileira de Genética. 2012. 165-170 p.
- TEIXEIRA, W.; TOLEDO, M.C.M.; FAIRCHILD, T.R.; TAIOLI, F. **Decifrando a Terra**. São Paulo: Oficina de Textos, 2000. 568 p.
- TEMPLETON, A.R. **Genética de populações e teoria microevolutiva**. Ribeirão Preto: Holos; 2011. 705p.
- WEIR, B.S. **Genetic data analysis II**. Massachusetts: Sinauer Associates, 1996. 445p.
- WRIGHT, S. Isolation by distance. **Genetics**, 28: 114-138, 1943.

Genética e microbiologia aplicadas ao estudo de doenças em plantas: o carvão da cana-de-açúcar e o fungo *Sporisorium scitamineum*

Daniel Prezotto Longatto

Leila Priscila Peters

Nathália de Moraes

Suzane Saito

Bianca Ribeiro

Gabriel Dequigiovanni

Tábata Bergonci

1. Introdução

A cana-de-açúcar é uma gramínea pertencente ao gênero *Saccharum*, tendo-seis espécies pertencentes a esse gênero (Daniels; Roach, 1987 *apud* Lu et al., 1994). O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar e, segundo a União da Indústria de Cana-de-Açúcar (UNICA, 2014), a área plantada no país para a safra de 2012 foi de 9.752.328 hectares. Para a safra 2013-2014 a CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento) estimou que a área plantada com produção destinada ao setor sucroalcooleiro terá um aumento de 3,7% em relação à safra anterior, sendo que a situação geral da cultura de cana-de-açúcar no país para a temporada é de expansão (CONAB, 2013).

Apesar da expansão da cultura, há doenças que ameaçam a produção da cana-de-açúcar. No mundo, considerando o contexto histórico, as doenças mais importantes para a cultura da cana-de-açúcar são: carvão, escaldadura das folhas, raquitismo da soqueira e mosaico da cana-de-açúcar (Santos, 2003). No Brasil já foram diagnosticadas 40 doenças causadas por fungos, bactérias, vírus e micoplasmas (Sanguino, 1998).

A doença conhecida como carvão foi detectada pela primeira vez em 1887 na África do Sul (Luthra et al., 1940 *apud* Sundar et al., 2012) e, hoje, é amplamente distribuída pelo mundo (Figura 1). O sintoma mais evidente de que a cana-de-açúcar está infectada pelo fungo do carvão é a formação e a emissão de um chicote no ápice da planta. O chicote é uma estrutura de coloração preta e é composta por tecidos da planta

e hifas do fungo, sendo responsável pela produção e liberação de milhões de esporos (teliósporos) (Santos, 2003). O nome carvão provém dessa estrutura de cor escura (lembrando um carvão) que ao se romper expõe a massa de teliósporos pretos (Tokeshi, 1997; Sathe et al., 2008).

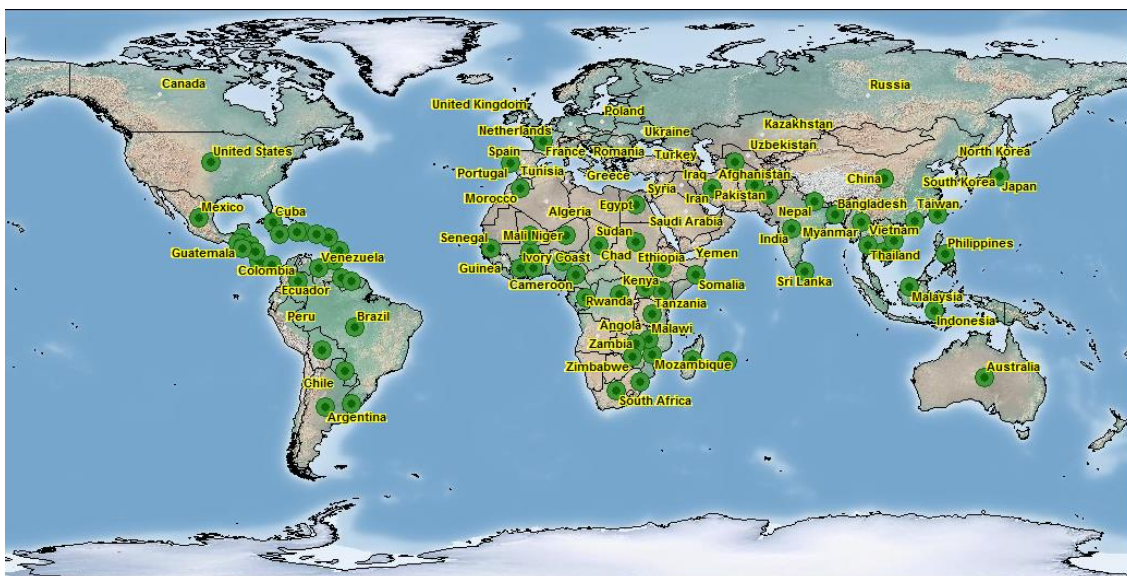


Figura 1. Distribuição mundial da doença carvão da cana-de-açúcar. Adaptado de Plantwise, 2014.

O carvão da cana-de-açúcar pode causar grandes perdas em relação à produção da massa fibrosa e à qualidade do caldo da cana. Além disso, as condições ambientais influenciam no desenvolvimento e severidade da doença, sendo que o manejo consiste, entre outras ações, em remover os chicotes que surgirem no campo para diminuir o inóculo do patógeno e em identificar o mecanismo de resistência de variedades de cana ao patógeno (Sundar et al. 2012).

O agente causador dessa doença é o fungo *Sporisorium scitamineum*, anteriormente classificado como *Ustilago scitaminea*, pertencente ao grupo dos Basidiomicetos juntamente a outras espécies de carvões da ordem Ustilaginales (Piepenbring et al., 2002).

2. A reação sexual e a patogenicidade de *Sporisorium scitamineum*

A infecção da cana-de-açúcar pelo fungo *S. scitamineum* é feita exclusivamente por hifas dicarióticas (que possuem dois núcleos haplóides) do patógeno. Essas hifas

são formadas pela combinação (anastomose) de dois esporóides (hifas haplóides) de tipos de reação sexual compatíveis (Izadi; Moosawi-Jorf, 2007). Em *S. scitamineum* e nos demais fungos causadores de carvão em gramíneas, a compatibilidade ocorre quando dois esporóides apresentam alelos diferentes em dois *loci* genômicos simultaneamente, chamados de a e b, formando um sistema duplo de auto-incompatibilidade (Bakkeren et al., 2008). O *locus* a é responsável pelo reconhecimento químico celular dos esporóides e formação da hifa dicariótica, enquanto o *locus* b governa o reconhecimento entre os núcleos coexistentes na hifa dicariótica e controla a transcrição de genes associados à manutenção do crescimento dicariótico, o qual culminará com a emissão de um apressório, estrutura que auxiliará o fungo durante a infecção da planta (Bakkeren; Kronstad, 1993, 1994; Bölker, 2001). A contribuição genética de cada *locus* na formação da hifa dicariótica está representada na Figura 2.

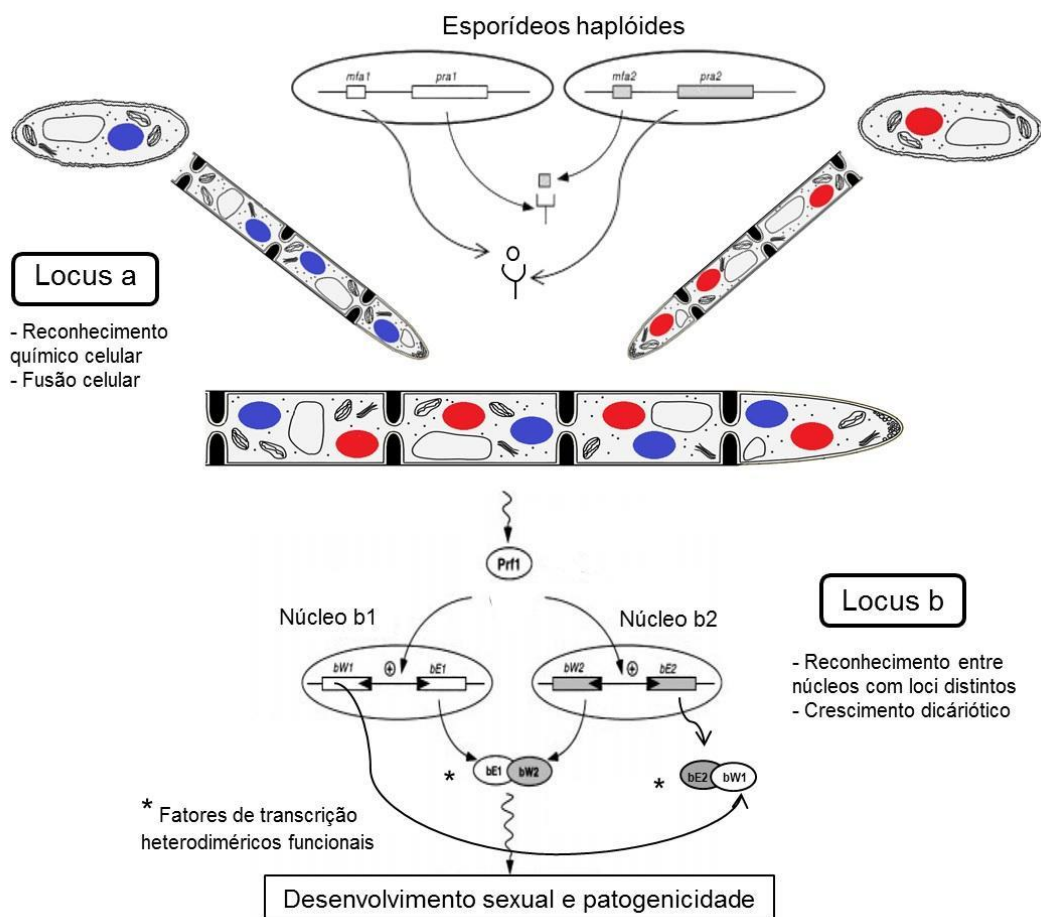


Figura 2. Contribuição dos *loci* a e b na formação da hifa dicariótica infectiva de *Sporisorium scitamineum*. Os núcleos azuis representam o tipo de reação sexual ‘A’ e

os núcleos vermelhos o tipo de reação sexual ‘B’, o sistema de reconhecimento químico e de formação do fator de transcrição heterodimérico foram adaptados de Bölker (2001) por Longatto (2014).

O *locus a* apresenta dois genes principais: *Mfa* e *Pra*. O gene *Mfa* codifica a produção de um ferormônio lipopeptídico que é liberado no meio extracelular, o qual é reconhecido por receptores de membrana codificados pelos genes *Pra*. Como não existe descrição de eventos de recombinação entre esses dois genes, cada esporídeo haplóide apresentará apenas uma cópia de cada gene (exemplo: *Mfa1* e *Pra2*, ou *Mfa2* e *Pra1*). Com isso, produzirá um ferormônio (gene *Mfa1*) que seu receptor de membrana (gene *Pra2*) não será capaz de reconhecer, pois este receptor conseguirá reconhecer apenas o ferormônio produzido pelo esporídeo do outro tipo de reação sexual (gene *Mfa2*). Comportamento similar é observado considerando-se o esporídeo do outro tipo de reação sexual. Havendo a compatibilidade química, decorrente da detecção do ferormônio liberado pelo indivíduo de tipo de reação sexual distinto, haverá a interrupção do crescimento por brotamento realizado até então, e ocorrerá emissão de uma hifa haplóide de cada esporídeo. Essas hifas se desenvolverão em direção a concentrações crescentes do ferormônio compatível, que é detectado pelos receptores de membrana. Com isso, as hifas produzidas por esporídeos de tipos de reação sexual diferentes crescerão uma em direção à outra, se fundirão em suas extremidades e formarão a hifa dicariótica representada na Figura 2. Nesta, os núcleos provenientes da fusão de esporídeos de tipos de reação sexual compatíveis coexistem dentro de cada célula que a compõe.

Uma vez formada, a hifa dicariótica apenas continua a crescer dessa forma pela ação de um fator de transcrição heterodimérico. A produção das duas subunidades que o compõem é governada a nível transcricional pelo *locus b*, que apresenta dois genes que compartilham a mesma região promotora e que são transcritos de forma divergente, chamados de *bE* (*bEast*) e *bW* (*bWest*) (Bakkeren; Kronstad, 1994, 1996). Para ser funcional, esse fator de transcrição deverá obrigatoriamente ser composto por duas subunidades diferentes, codificadas por diferentes formas alélicas de *bE* e *bW*. Cada um dos núcleos presentes na hifa dicariótica codificará a produção de duas subunidades que serão liberadas no citoplasma, sendo que cada subunidade possui homeodomínios de classes distintas (HD1 e HD2) (Gillissen et al., 1992; Kronstad; Staben, 1997). Na

Figura 2, observa-se que as subunidades produzidas por cada núcleo serão $bE1$ e $bW1$, ou $bE2$ e $bW2$. No entanto, a funcionalidade do fator de transcrição heterodimérico somente será alcançada pela combinação das subunidades originadas de núcleos distintos, isto é, $bE1+bW2$ e $bE2+bW1$ (Kronstad; Staben, 1997).

Mediante a regulação pelo fator de transcrição heterodimérico há a possibilidade de ocorrer transcrição à jusante de genes responsáveis pela continuidade do crescimento sob a forma dicariótica e, inclusive, pela formação de apressório, que capacita o fungo a infectar os tecidos meristemáticos do vegetal (Banuett; Herskowitz, 1994; Hartmann; et al., 1996; Moosawi-jorf; Izadi, 2007). Nos fungos causadores de carvão em gramíneas, os *loci* a e b podem estar localizados em cromossomos separados, possibilitando a segregação independentemente durante a meiose. Quando isso ocorre, o sistema é chamado tetrapolar, descrito para *U. maydis*, causador do carvão do milho, e *S. reilianum*, causador de carvão em milho e cevada (Bakkeren et al., 2008). Caso os *loci* a e b sempre segreguem juntos como se fossem um único *locus*, o sistema é chamado bipolar, como descrito para *U. hordei*, causador do carvão em cevada, e *S. scitamineum*, causador do carvão em cana-de-açúcar. No sistema bipolar foram descritos os seguintes *loci* de reação sexual: MAT1 (que apresenta os *subloci* a1 e b1) e MAT2 (que possui os *subloci* a2 e b2) cada qual portador de alelos distintos entre si nos *subloci* a e b. (Bakkeren; Kronstad, 1993, 1994, 1996; Alexander; Srinivasan, 1966; Kmit, 2014).

Considerando o fungo *S. scitamineum*, a aplicação dos *loci* de reação sexual em estudos genéticos mostrou-se importante por algumas razões, dentre elas, o fato desses *loci* serem expressos por todos os indivíduos e o seu papel essencial na ocorrência da doença. Também foi descrito o uso de sequência do *sublocus* b para a detecção do fungo em tecidos vegetais doentes (Albert; Schenck, 1996; Izadi; Moosawi-Jorf, 2007; Moosawi-Jorf; Izadi, 2007) e a estrutura genética dos *subloci* a e b foi estudada por Kmit (2014). Mais recentemente, destaca-se a importância da determinação do tipo de reação sexual durante o isolamento dos esporóides provenientes da germinação de teliósporos produzidos em ciclos sucessivos da doença. Em Longatto (2014) foi descrita ocorrência de desequilíbrio na proporção de esporóides de cada tipo de reação sexual, recuperados a partir da germinação *in vitro* de teliósporos, que não ocorreu como o esperado de 1:1. Dessa forma, a inclusão do tipo de reação sexual aumentou a

representatividade dos produtos meióticos isolados, já que é durante a meiose que ocorre segregação dos *loci* de reação sexual.

3. Teste para determinar os *mating-type* (tipo de reação sexual) entre leveduras de *Sporisorium scitamineum*

Visando ilustrar um teste de reação sexual (*mating-type*) em placa, foram empregados dois esporóides (aqui chamados 39A e 39B) como referenciais para os respectivos tipos de reação sexual, A e B. Ainda, quatro esporóides isolados a partir da germinação de um teliósporo foram combinados com esses referenciais, de modo a determinar qual seria seu tipo de reação sexual. Os esporóides foram inoculados em placas de Petri com auxílio de palitos em seis pontos diferentes. O meio de cultura utilizado foi o *Yeastmalt* (YM), composto por: 3g L⁻¹ de extrato de levedura; 3g L⁻¹ de extrato de malte; 5g L⁻¹ de peptona; 10g L⁻¹ de glicose; 15g L⁻¹ de ágar bacteriológico. O primeiro ponto representou a combinação do esporóide 39A com os demais nas diferentes placas, tendo sido feito procedimento semelhante com os esporóides 39B e os candidatos chamados de 3, 4, 5 e 6, conforme esquematizado na Figura 3A. O resultado de todas as combinações é mostrado na Figura 3B (Bauch, 1923; Alexander; Srinivasan, 1966; Moosawi-Jorf; Izadi, 2007).

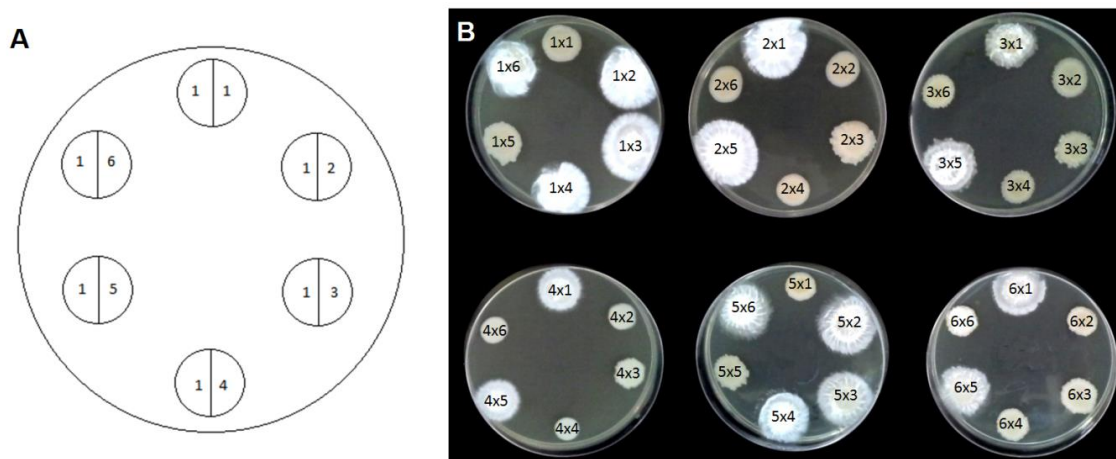


Figura 3. A: Esquema de placa de Petri com meio YM para testar o *mating-type* entre as leveduras 1, 2, 3, 4, 5 e 6. Duas dessas leveduras (1 e 2) são as referências para cada tipo sexual (controles positivos, A e B, respectivamente), e a combinação da levedura consigo mesma refere-se ao controle negativo. B: Resultado de teste de compatibilidade sexual em placa (*plate mating-type reaction*). Os esporóides utilizados foram respectivamente: 1: 39A- controle positivo; 2: 39B- controle negativo; 3, 4 e 6:

indivíduos diferentes cujo tipo de reação sexual observado foi 'B'; 5: Indivíduo cujo tipo de reação sexual observado foi 'A'. Foto de Daniel Prezotto Longatto, 2014.

O teste de compatibilidade sexual em placa (*plate mating-type reaction*) mostrou que os controles negativos (interação da levedura com ela mesma) funcionaram em todas as seis placas, não havendo interação entre esporídeos iguais (idênticos geneticamente em relação aos genes de reação sexual). Os controles positivos, referentes à interação dos esporídeos A e B, também funcionaram, nesse caso, mostrando a interação entre eles.

Em relação aos esporídeos testados (3, 4, 5 e 6), pode-se observar que o esporídeo 3 interagiu com 1 (tipo de reação A) e 5 (tipo de reação anteriormente desconhecida). O esporídeo 4 interagiu com esporídeo 1 e 5, ocorrendo resultado semelhante com o esporídeo 6, que interagiu com 1 e 5. Com esses resultados, conclui-se que os esporídeos 3, 4 e 6 são do tipo de reação B, já que interagem com A. Também conclui-se que o esporídeo 5 é do tipo A, pois interage com os demais (ainda, a placa referente as reações do esporídeo 5 mostra interação com o esporídeo 2, controle do tipo B, e com os demais esporídeos do tipo B, 3, 4 e 6).

Referências

- ALBERT, H.H.; SCHENCK, S. PCR amplification from a homolog of the bE mating-type gene as a sensitive assay for the presence of *Ustilago scitaminea* DNA. **Plant Disease**, 80: 1189-1192, 1996.
- ALEXANDER, K.C.; SRINIVASAN, K.V. Sexuality in *Ustilago scitaminea* Syd. **Current Science**, 35, n. 23: 603-604, 1966.
- BANUETT, F.; HERSKOWITZ, I. Morphological transitions in the life cycle of *Ustilagomaydis* and their genetic control by the a and b loci. **Experimental Mycology**, 18: 247-266, 1994.
- BAKKEREN, G.; KRONSTAD, J.W. Conservation of the b mating-type gene complex among bipolar and tetrapolar smut fungi. **Plant Cell**, 5: 123-136, 1993.
- BAKKEREN, G.; KRONSTAD, J.W. Linkage of mating-type loci distinguishes bipolar from tetrapolar mating in basidiomycetous smut fungi. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 91: 7085-7089, 1994.
- BAKKEREN, G.; KRONSTAD, J.W. The pheromone cell signalling components of the *Ustilago a* mating type loci determine intercompatibility between species. **Genetics**, 143: 1601-13, 1996.
- BAKKEREN, G.; KÄMPER, J.; SCHIRAWSKI, J. Sex in smut fungi: structure, function and evolution of mating-type complexes. **Fungal Genetics and Biology**, 45: S15-S21, 2008.
- BAUCH, R. Über *Ustilago longissima* und ihre varietät macrospora. **Zeitschrift für Botanik**, 15: 241-279, 1923.

BÖLKER, M. *Ustilagomaydis*: a valuable model system for the study of fungal dimorphism and virulence. **Microbiology**, 147: 1395-1401, 2001.

CONAB. Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar (safra 2013-2014 - segundo levantamento - agosto de 2013). Brasília. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13_08_08_09_39_29_boletim_cana_portugues_-_abril_2013_1o_lev.pdf>. Acesso em 23 ago. 2014. 2013.

GILLISSEN, B.; BERGEMANN, J.; SANDMANN, C.; SCHROEER, B.; BÖLKER, M.; KAHMANN, R. A two-component regulatory system for self/nonself recognition in *Ustilagomaydis*. **Cell**, 68: 647-657, 1992.

HARTMANN, H.A.; KAHMANN, R.; BÖLKER, M. The pheromone response factor coordinates filamentous growth and pathogenic development in *Ustilago maydis*. **EMBO Journal**, 15: 1632-1641, 1996.

IZADI, M.B.; MOOSAWI-JORF, S.A. Isolation and identification of yeast-like and mycelial colonies of *Ustilago scitaminea* using specific primers. **Asian Journal of Plant Sciences**, 6: 1137-1142, 2007.

KMIT, M.C.P. **Caracterização de genes associados ao tipo de reação sexual em *Sporisorium scitamineum*, agente causador do carvão de cana-de-açúcar**. 2014. 98 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2014.

KRONSTAD, J.W.; STABEN, C. Mating type in filamentous fungi. **Annual Review of Genetics**, 31: 245-276, 1997.

LONGATTO, D.P. **Herança dos polimorfismos de restrição associados à região subtelomérica de *Sporisorium scitamineum* em análise de cruzamentos sexuais do fungo *in planta***. 2014. 96 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2014.

LU, Y.H.; D'HONT, A.; WALKER, D.I.T.; RAO, P.S.; FELDMANN, P.; GLASZMANN, J.C. Relationships among ancestral species of sugarcane revealed with RFLP using single copy maize nuclear probes. **Euphytica**, 78: 7-18, 1994.

MOOSAWI-JORF, S.A.; IZADI, M.B. *In vitro* detection of yeast-like and mycelial colonies of *Ustilago scitaminea* in tissue-cultured plantlets of sugarcane using Polymerase Chain Reaction (PCR). **Journal of Applied Sciences**, 7: 3768-3773, 2007.

PLANTWISE, 2014. Pest distribution map. Disponível em <<http://www.plantwise.org/KnowledgeBank/PWMap.aspx>>. Acesso em 23 ago. 2014.

PIEPENBRING, M.; STOLL, M.; OBERWINKLER, F. The generic position of *Ustilago maydis*, *Ustilago scitaminea*, and *Ustilago esculenta* (Ustilaginales). **Mycological Progress**, 1: 71-78, 2002.

SATHE, T.V.; SHINDE, K.P.; SHAIKH, A. L.; RAUT, D.K. **Sugarcane pests and diseases**. New Delhi: Manglam Publishers, 2008. 174 p.

SANGUINO, A. Situação atual da pesquisa em doenças da cana-de-açúcar. **Summa Phytopathologica**, 24: 90-91, 1998.

SANTOS, A.S. **Doenças causadas por fungos e bactérias em cana-de-açúcar**. Disponível em: <http://www.biologico.sp.gov.br/rifib/IX_RIFIB/santos1.PDF>. Acesso em 23 ago. 2014. 2003.

SUNDAR, A.R.; BARNABAS, E.L.; MALATHI, P.; VISWANATHAN, R. A mini-review on smut disease of sugarcane caused by *Sporisoriumscitamineum*. In: MWORIA, J.K. (Ed.). **Botany**. Croatia: InTech, 2012. p.107-128.

TOKESHI, H. Doenças de cana-de-açúcar (híbridos de *Saccharum* spp.). In: KIMATH, H.; AMORIM,L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M (Ed.). **Manual de Fitopatologia**. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, 1997. p. 207-225.

UNICA. **Área plantada com cana-de-açúcar na safra 2012 no Brasil** (estatística de produção). Disponível em: <<http://www.unicadata.com.br/historico-de-area-ibge.php?idMn=33&tipoHistorico=5>>. Acesso em 23 ago. 2014. 2014.

Microbiologia Agrícola

Microbiologia agrícola: das bases biológicas à biotecnologia

Marcelo Gomes Marçal Vieira Vaz

Patricia Dayane Carvalho Schaker

Gabriela Machineski da Silva

Gilda Mariano Silva

Juliana Lorenz Mandro

Nathália Torres Correa

Sérgio Birello Sartori

1. Introdução

A microbiologia é uma ciência focada no estudo de organismos microscópicos, sejam de natureza procariótica ou eucariótica. As diversas subáreas da microbiologia contemplam a diversidade (morfológica, metabólica, entre outras) e a evolução dos micro-organismos, buscando entender os processos envolvidos no surgimento e diversificação deste grupo, além de usar tais conhecimentos em benefício dos seres humanos. Do ponto de vista da ciência básica, a microbiologia desenvolve métodos para entender processos celulares e de interação dos micro-organismos entre si e com o ambiente. Por fim, os conhecimentos gerados servem de base para a resolução de questões práticas em áreas como a medicina, indústria e agropecuária.

1.1. Diversidade microbiana

Os micro-organismos surgiram há bilhões de anos e representam, tanto em número de espécies quanto em biomassa, a maior parte da diversidade encontrada na biosfera. A diversidade atual, observada nas células microbianas, é resultado da longa história evolutiva deste grupo, a qual se reflete na morfologia celular, fisiologia, mecanismos de divisão celular, reprodução, patogenicidade e ampla distribuição geográfica. Essa grande diversidade microbiana tem reflexo direto sobre diversos ciclos biogeoquímicos que além de permitir o estabelecimento dos grupos microbianos, são de extrema importância para a manutenção da vida na Terra (Madigan et al., 2010).

Os micro-organismos foram descobertos e, primeiramente, visualizados em meados dos anos 1660, após a invenção do microscópio. O advento deste equipamento

permitiu notáveis descobertas, as quais foram iniciadas pelos cientistas Robert Hooke e Antoni van Leeuwenhoek, tidos como os maiores descobridores do universo microbiano (Gest, 2004). Dois séculos depois, em 1870, Ferdinand Cohn, Louis Pasteur e Robert Koch deram seguimento aos estudos microbiológicos, aprofundando o entendimento da morfologia e fisiologia deste grupo de organismos. Cohn descobriu os endósporos em *Bacillus* e criou o conceito de espécie para as bactérias. Pasteur contestou a teoria da geração espontânea, resultando no desenvolvimento de procedimentos de esterilização, ao mesmo tempo em que Koch introduziu o meio de cultura solidificado com ágar e o conceito de isolamento de culturas puras de micro-organismos. Estas descobertas forneceram ferramentas cruciais para estudos microbiológicos (Keller; Zengler, 2004), que revelaram os micro-organismos como os principais causadores de doenças infecciosas em plantas, animais e humanos (Atlas; Bartha, 1998).

Uma vez percebida a importância dos micro-organismos, pesquisadores concentraram esforços no desenvolvimento de técnicas para isolar, cultivar em laboratório e classificar esses organismos, muitas das quais ainda em uso. Os estudos proporcionaram importantes descobertas como a utilização dos micro-organismos na síntese de antibióticos, na produção de enzimas e produtos com diversas aplicações. Durante muitos anos, os métodos dependentes de cultivo, baseados em fatores morfofisiológicos, foram a principal forma de identificar e avaliar a vida microbiana a partir de amostras da natureza. No entanto, essas técnicas ofereciam uma visão limitada do mundo microbiano. Estima-se que um grama de solo contenha aproximadamente 10^{10} bactérias e que um mililitro de água do mar abrigue cerca de 10^6 células microbianas (Torsvik et al., 1990). Entretanto, 99% desses organismos não podem ser cultivados pelas técnicas convencionais (Amann et al., 1995).

Após a elucidação da estrutura do DNA, por Watson e Crick em 1953, diversos métodos foram desenvolvidos, contribuindo para o aprofundamento dos estudos da biologia e potencialidades funcionais de seres microscópicos. O uso de técnicas moleculares nos últimos vinte anos tem fornecido métodos para identificação dos indivíduos de comunidades microbianas em ambientes naturais sem a necessidade de cultivo, resultando em uma importante e inexplorada diversidade a ser estudada (Hugenholtz et al., 1998). Métodos baseados em sequenciamento do DNA associados ao estudo de fatores físico-químicos de diversos ambientes geraram uma gama de

informações que permitem inúmeros questionamentos, tais como: Quais são os fatores ambientais com maior influência sobre a diversidade microbiana? Como os micro-organismos estão distribuídos globalmente? Quais as possíveis aplicações biotecnológicas dos micro-organismos e de seus produtos metabólicos? Essa visão holística sobre a microbiologia e suas potencialidades proporciona uma ampla área de estudos com aplicações biotecnológicas de interesse social, econômico e ambiental.

2. Aplicações da Microbiologia

2.1. Degradação de poluentes: fungos basidiomicetos ligninolíticos e ensaios ecotoxicológicos

O grupo dos fungos se destaca em relação aos demais micro-organismos por sua ampla capacidade de degradar diversos substratos de forma muito eficiente, apresentando papel relevante em ecossistemas florestais. Sua importância se dá na degradação de componentes da madeira, favorecendo a reincorporação de nutrientes nos ciclos biogeoquímicos. Os fungos degradadores de madeira pertencem a duas categorias: fungos da podridão marrom e da podridão branca. Dentre os fungos da podridão branca estão os basidiomicetos ligninolíticos, que somam mais de 200.000 espécies, sendo os mais estudados quanto ao seu potencial degradador, em razão da alta atividade ligninolítica (Bononi, 1997). Um exemplo de membros deste grupo são os basidiomicetos do gênero *Pleurotus*, capazes de degradar vários tipos de resíduos (Aguiar Filho, 2008), pois produzem um vasto complexo enzimático com ação extracelular. Esse complexo pode atuar sobre misturas complexas de resíduos (bagaço e vinhaça de cana-de-açúcar, corantes têxteis e lodo de estações de tratamento de esgoto) que contenham estruturas fenólicas e similares, levando à mineralização ou degradação parcial (Rodríguez-Rodríguez et al., 2013).

A vinhaça é um resíduo com elevada carga poluidora que se forma no processo final da destilação do álcool e é caracterizada por possuir baixo pH, altos valores de demanda química e bioquímica de oxigênio, matéria orgânica, corrosividade e grande quantidade de K, Ca, Mg e compostos fenólicos (Ferreira, 2009). O bagaço de cana-de-açúcar é um dos muitos resíduos lignocelulósicos provenientes da agricultura que tem sido empregado na fermentação sólida, nos campos da biodegradação e biorremediação, sobretudo pelo seu papel adsortivo (Pereira et al., 2009; Karp et al., 2012). Esse resíduo

é predominantemente constituído de celulose, hemicelulose e lignina, constituindo-se como substrato promissor para o crescimento dos basidiomicetos ligninolíticos e para a expressão de suas enzimas (Aguiar Filho, 2008; Pompeu, 2010). Efluentes contendo corantes são potencialmente tóxicos, afetam a solubilidade de gases em corpos d'água e interferem na qualidade estética do ambiente (Faraco et al., 2009). Esses corantes são recalcitrantes e não respondem bem aos tratamentos convencionais, em razão de sua estabilidade e complexidade molecular (Fu; Viraraghavan, 2001). A tecnologia enzimática, por outro lado, pode ser aplicada nos tratamento desse resíduo, pois é ativa sobre moléculas persistentes e em altas concentrações, não sendo necessária uma etapa de adaptação da microbiota e gerando-se pouco lodo (Karam; Nicell, 1997). O lodo, por sua vez, também pode ser empregado como aditivo em solo agrícola. Contudo, sua reutilização é profundamente dependente do estudo das características do lodo a ser reciclado (Botero et al., 2009).

O tratamento de um resíduo ou efluente por vias biológicas e o seu consequente reuso deve ser complementado por estudos ecotoxicológicos, visto que a degradação enzimática pode produzir moléculas nocivas e/ou mais persistentes que os substratos (Vidali, 2001). Os testes ecotoxicológicos são uma boa ferramenta para averiguar os resultados de uma degradação, especialmente quando esta envolve efluentes de composição complexa, pois as respostas biológicas evidenciam efeitos sinérgicos, aditivos, antagônicos e de potencialização que não aparecem em análises físico-químicas.

2.2. Microbiologia e indústria alimentícia: produção de açúcar cristal

A cana-de-açúcar foi introduzida no Brasil durante o período colonial e se transformou em uma das principais culturas da nossa economia, adaptando-se em regiões com clima tropical, quente e úmido, onde as temperaturas variam entre 19 a 32 °C e as chuvas são bem distribuídas. Além disso, desenvolve-se em solos com baixa fertilidade e condições físicas desfavoráveis, e por isso, pode ser cultivada em diversas regiões do Brasil. A partir da cana-de-açúcar podem ser obtidos inúmeros produtos como o açúcar e o álcool, a energia obtida a partir da queima do bagaço residual da extração e até mesmo a utilização dos subprodutos do processo de produção de açúcar e

álcool que são danosos ao meio ambiente, mas que se tratados podem ser usados no campo para o melhoramento agrícola.

Para que se obtenha sucesso no processamento de uma matéria-prima e na sua transformação em produtos finais é essencial conhecer e compreender cada etapa individualmente, a fim de corrigi-las e/ou aperfeiçoá-las. Uma etapa importante e que merece atenção durante o processamento da cana-de-açúcar é o controle microbiológico.

O Grupo de Pesquisa Hugot-Bioenergia, presente no setor de Açúcar e Álcool do LAN/ESALQ/USP há 4 anos, atua em diversas áreas que compreendem o conhecimento em açúcar, álcool e energia. Algumas das pesquisas realizadas pelo grupo estão direcionadas a processos alternativos à clarificação do caldo de cana-de-açúcar (ou processos oxidativos avançados – POA), análises de formação de flocos de açúcar, degradação térmica da sacarose, análise de escurecimento enzimático da cana-de-açúcar e caracterização da biomassa para produção de energia por gaseificação. O uso de POA com ozônio e peróxido, ao invés da sulfitação, traz consequências importantes, pois ambos, além de serem agentes germicidas, possivelmente não levam à formação de subprodutos durante o processamento. Essas substâncias podem ainda agir reduzindo a cor ICUMSA do caldo de cana-de-açúcar para produção de açúcar cristal branco de melhor qualidade.

Outra linha de pesquisa é a avaliação de parâmetros formadores de flocos de açúcar na indústria de refrigerantes. Tais flocos podem influenciar na qualidade e composição do açúcar que será utilizado na fabricação da bebida, pela ação de polissacarídeos, como a dextrana, que é produzida por micro-organismos. A degradação térmica da sacarose em concentrações e temperaturas baseadas no processo de evaporação do caldo de cana-de-açúcar é outro direcionamento das pesquisas seguidas pelo grupo e baseia-se em dois princípios de redução: o da cor ICUMSA e o da contaminação microbiana, os quais podem ocorrer em consequência dos processos de aquecimento do caldo de cana-de-açúcar em evaporadores. O acompanhamento do aumento do escurecimento enzimático da cana-de-açúcar deve ser realizado para se aferir o impacto, do tempo entre a colheita e o processamento, sobre a contaminação microbiana da cana-de-açúcar. A determinação da composição química do bagaço para

produção de energia via gaseificação permitirá determinar a escolha do processo de conversão e compreender as dificuldades de processamento subsequentes.

2.3. Interação plantas – patógenos microbianos

Uma vasta gama de micro-organismos exerce influência benéfica sobre o desenvolvimento das plantas, sendo fundamentais nos processos de disponibilização do nitrogênio atmosférico em formas assimiláveis, na captura de nutrientes do solo e na promoção do crescimento vegetal. Por outro lado, muitos micro-organismos são conhecidos como fitopatogênicos, ou seja, causam doenças em plantas, gerando grandes perdas econômicas na agricultura. A pesquisa na área da fitopatologia é desafiadora e busca diminuir essas perdas, tendo em sua essência uma causa nobre: garantir a disponibilidade de alimentos tanto para os humanos quanto para outros animais.

Se considerarmos a diversidade de micro-organismos e a diversidade de plantas existente, e sabendo que ambos apresentam uma distribuição cosmopolita na Terra, parece difícil explicar por que ainda assim a doença é uma exceção na natureza e por que os micro-organismos ainda não dizimaram as plantas. A explicação para tal fato é que somente uma combinação específica de genes da planta e do patógeno culmina em uma planta doente (Agrios, 2005).

As plantas, por serem organismos sésseis, durante sua evolução foram desafiadas por uma grande variedade de inimigos e desenvolveram diversas estratégias de defesa. Dentre as mais estudadas e compreendidas destaca-se a síntese de compostos do metabolismo secundário, como fitoalexinas e moléculas antimicrobianas, espécies reativas de oxigênio (“ROS”, *Reactive Oxygen Species*), ativação de sistemas de fluxo iônico, fosforilação e defosforilação de proteínas, reforço da parede celular, indução da resposta de hipersensibilidade (morte celular programada) e mudanças na sinalização hormonal (Berger et al., 2007; Doehlemann et al., 2008).

Uma das defesas mais eficazes das plantas é mediada pelos genes “R” que detectam raças de patógenos específicos pelo reconhecimento das proteínas de avirulência (“AVR”, *Avirulence*) codificadas pelo patógeno, na chamada resistência “gene-a-gene”. Essa defesa está associada a uma rápida necrose de células no local da infecção, chamada de “resposta de hipersensibilidade” (Feys; Parker, 2000). Em termos evolutivos, um patógeno seria beneficiado pela eliminação dessas proteínas Avr, pois impediria seu

reconhecimento pela planta, no entanto, estudos mostram que esses genes são essenciais para a patogenicidade do micro-organismo (Alfano; Collmer, 2004).

Além da resposta de resistência localizada, as plantas desenvolveram mecanismos que criam uma espécie de “estado de alerta” em todos os tecidos vegetais, chamada “resistência sistêmica adquirida” (“SAR”, *Systemic Acquired Resistance*). Essa resposta de defesa é sinalizada pelo ácido salicílico, um hormônio vegetal que dispara a expressão de diversos genes PR (*Pathogenesis Related*), que estão relacionados com a síntese de moléculas antimicrobianas (Chen et al., 2009). Considerando-se esses cenários, é possível concluir que a presença de um patógeno envolve uma redistribuição massiva da energia da planta para sustentar a resposta de defesa (Bolton, 2009). Isso culmina na modificação do metabolismo primário e secundário da planta e, conseqüentemente, influencia no crescimento e desenvolvimento da mesma. Por um lado, o patógeno tenta manipular o metabolismo de carboidratos da planta para o seu próprio crescimento, enquanto a planta tenta reorganizar o fluxo de carbono nos tecidos a fim de evitar a disseminação do patógeno (Berger et al., 2004).

Dentre os micro-organismos fitopatogênicos destacam-se as bactérias, os fungos, vírus, protozoários e nematoides (Agrios, 2005). A capacidade de atacar as plantas é possível porque durante a sua evolução os micro-organismos adquiriram a habilidade de utilizar as substâncias produzidas pela planta. Alguns patógenos se tornaram tão dependentes do seu hospedeiro que eliminaram partes essenciais de seus genomas e, assim, utilizam produtos sintetizados pela planta, tornando-se altamente dependentes da mesma. Por exemplo, a bactéria *Leifsonia xyli* no seu estado atual de evolução genômica não possui genes funcionais responsáveis pela síntese dos aminoácidos cisteína e metionina e das vitaminas biotina, nicotinato e tiamina, tornando-a muito dependente fisiologicamente da planta hospedeira (Soares et al., 2011).

Para superar as barreiras de defesa da planta, os patógenos utilizam diversas estratégias. As primeiras etapas da infecção necessitam da produção por parte do hospedeiro de enzimas capazes de quebrar as cadeias de pectina, cutina, celulose, hemicelulose, suberina e lignina, que são os compostos encontrados na superfície das plantas e correspondem às barreiras físicas de defesa. Uma vez dentro da célula, os micro-organismos necessitam utilizar os compostos produzidos pela planta, incluindo o amido, sacarose, proteínas e lipídeos, como fonte de energia e de carbono (Agrios, 2005).

Os patógenos de plantas são tão especializados que possuem mecanismos que burlam o sistema de defesa do hospedeiro. Por exemplo, no genoma do fungo causador da doença do carvão no milho, *Ustilago maydis*, foi identificado um transportador de sacarose (*UmSTR1*) que possui alta afinidade pelo substrato, e permite o uso direto da sacarose na interface planta-fungo sem hidrólise extracelular, e assim, sem a produção de monossacarídeos extracelulares que poderiam elicitar a resposta de defesa da planta (WAHL *et al.*, 2010). O mesmo fungo é capaz de produzir e secretar a enzima *corismato mutase*, aumentando o fluxo de corismato do plastídeo para o citosol e, conseqüentemente, reduzindo a quantidade de substrato disponível para a síntese do ácido salicílico, que é produzido no plastídeo e está envolvido na resposta de defesa sistêmica da planta (Djamei *et al.*, 2011).

Os estudos na área de interação planta-patógeno se baseiam essencialmente nos conhecimentos e nas técnicas de microbiologia e biologia molecular, incluindo a manipulação de genes, bioinformática e microscopia. Os objetivos desses estudos englobam desde os aspectos básicos, como os mecanismos de infecção e estabelecimento no hospedeiro, até a aplicação desses conhecimentos, como por exemplo, no controle biológico de patógenos e o melhoramento de espécies vegetais. Apesar de muitas respostas reveladas, o estudo da interação planta-patógeno tem muito a ser descoberto e entendido, e por isso é uma área tão desafiadora e ao mesmo tempo empolgante.

2.4. Produtos naturais como alternativa no controle de fitopatógenos

Há muitos séculos a humanidade tem conhecimentos sobre os benefícios da utilização de produtos naturais para os mais diversos fins, tais como remédios, cosméticos, corantes e outros. Um exemplo foi o isolamento da morfina (Figura 1, estrutura 1) da planta *Papaver somniferum* (papoula), por Friedrich Wilhelm Sertürner em 1806, que é utilizada até hoje para fins medicinais como um potente analgésico. Nos últimos anos tem sido crescente o isolamento de novas substâncias obtidas a partir de diversos organismos, incluindo plantas, algas, animais e micro-organismos. Outro exemplo muito importante foi o isolamento do antibiótico penicilina (Figura 1, estrutura 2), produzido pelo fungo *Penicillium notatum*. Essa descoberta foi realizada em 1928 por Alexander Fleming revolucionando o tratamento de doenças infecciosas. Há também substâncias isoladas de organismos marinhos, como os nucleosídeos

espongotimidina (Figura 1, estrutura 3) e espongouridina (Figura 1, estrutura 4), isolados da esponja *Cryptotethya crypta*, permitindo o desenvolvimento de substâncias com ação antiviral e anticancerígena.

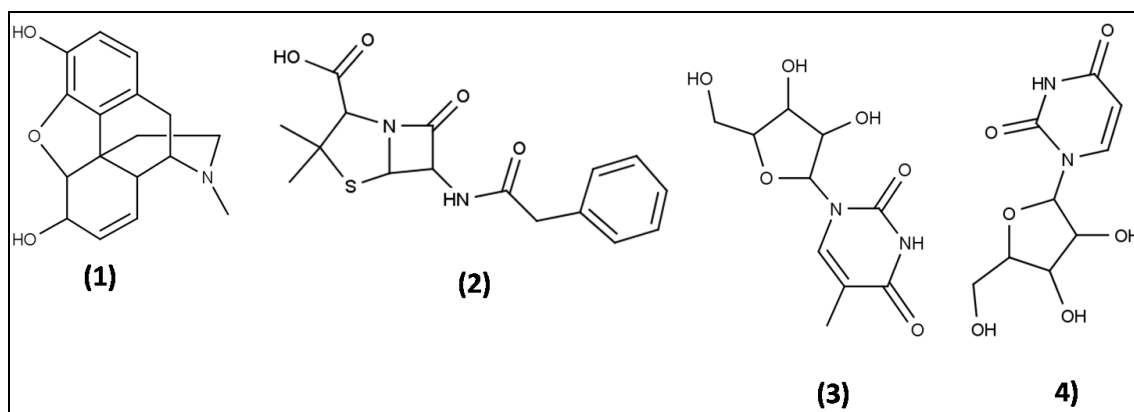


Figura 1. Compostos isolados de plantas e micro-organismos com potencial biotecnológico. 1 Morfina; 2 antibiótico penicilina; 3 nucleosídeo espongotimidina; 4 nucleosídeo espongouridina.

Os metabólitos secundários, fontes de produtos naturais, são considerados como não essenciais à vida, mas definem a capacidade de sobrevivência de cada espécie no ecossistema em que se encontra inserida. Sua produção é controlada por condições ambientais, como a disponibilidade de nutrientes e interação com outros organismos, e são codificados por conjuntos de genes específicos. Estas substâncias apresentam grande variedade estrutural e fazem parte de diferentes classes químicas: alcalóides, flavonóides, fenilpropanóides, lignanas, peptídeos, esteróides, xantonas, fenóis, isocumarinas, quinonas, terpenóides, citocalasinas, alifáticos, clorados e outros. Devido às suas propriedades químicas e biológicas, estes metabólitos secundários têm sido utilizados como marcadores para classificação de diversos grupos biológicos (aliada à morfologia); investigação de processos evolutivos (evolução química) e compreensão da convivência no sistema ambiental (ecologia química) dos organismos vivos. Muitos destes metabólitos têm sido empregados para fins biotecnológicos, como antibióticos, antivirais, antitumorais, agentes hipocolesterolemiantes, inibidores tumorais e imunossuppressores. Além disso, podem ser aplicados agronomicamente, constituindo alternativas às formas tradicionais de controle de pragas e manejo integrado.

O Brasil abriga a maior diversidade genética do mundo, englobando mais de dois milhões de espécies de plantas, animais e micro-organismos. O Laboratório de Microbiologia e Química Orgânica de Produtos Naturais possui como linha de pesquisa o estudo dos metabólitos de plantas e fungos endofíticos visando o isolamento de substâncias ativas contra fungos fitopatogênicos. Estudos realizados com extratos de plantas têm apresentado resultados promissores na área agrônômica, como a descoberta da atividade antifúngica da α -tomatina, isolada de folhas de *Solanum lycopersicum*, contra o fitopatógeno *Moniliophthora perniciosa*, fungo causador da doença vassoura-de-bruxa no cacauzeiro. Este grupo de pesquisa tem sido responsável pelo isolamento de uma grande quantidade de fungos endofíticos a partir de plantas coletadas na floresta Amazônica, Mata Atlântica e ilhas oceânicas. Os extratos obtidos destes fungos têm apresentado atividade promissora contra fitopatógenos dos gêneros *Colletotrichum*, *Fusarium* e *Phomopsis*. Desta forma, pretende-se contribuir cientificamente, tanto no conhecimento sobre a biodiversidade brasileira, como na descoberta de novos compostos ativos de interesse biotecnológico.

Referências bibliográficas

- AGUIAR FILHO, J.M.M. **Análise enzimática de fungos lignocelulolíticos cultivados em vinhaça e bagaço de cana-de-açúcar**. 2008. 79 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- ALFANO, J.R., COLLMER, A. Type III secretion system effector proteins: double agents in bacterial disease and plant defense. **Annual Reviews of Phytopathology**, 42: 385-414, 2004.
- AGRIOS, G. **Plant pathology**, 5. ed. New York: Academic Press, 2005. 922 p.
- AMANN, R.I.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K.H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiological Reviews**, 59: 143-169, 1995.
- ATLAS, R.M.; BARTHA, R. **Microbial ecology: fundamentals and applications**. 4. ed. Redwood: Benjamin Cumins, 1998. 640 p.
- BERGER, S.; PAPADOPOULOS, M.; SCHREIBER, U.; KAISER, W.; ROITSCH, T. Complex regulation of gene expression, photosynthesis and sugar levels by pathogen infection in tomato. **Physiologia Plantarum**, 122: 419-428, 2004.
- BERGER, S.; SINHA, A.K.; ROITSCH, T. Plant physiology meets phytopathology: plant primary metabolism and plant-pathogen interactions. **Journal of Experimental Botany**, 58: 4019-4026, 2007.
- BOLTON, M.D. Primary Metabolism and Plant Defense - Fuel for the Fire. **Molecular Plant-microbe Interactions**, 22: 487-497, 2009.
- BONONI, V.L. Biodegradação de organoclorados no solo por basidiomicetos ligninolíticos. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. (Ed.). **Microbiologia Ambiental**. Jaguariúna: Embrapa, 1997. p. 243-268.
- BOTERO, W.G.; SANTOS, A.; OLIVEIRA, L.C.; ROCHA, J.C. Caracterização de lodo gerado em estações de tratamento de água: perspectivas de aplicação agrícola. **Química Nova**. São Paulo, v.32(8), p. 2018-2022, 2009.

- CHEN, Z.; ZHENG, Z. HUANG, J.; LAI, Z.; FAN, B. Biosynthesis of salicylic acid in plants. **Plant Signaling & Behavior**, 6: 493-496, 2009.
- DJAMEI, A. *et al.* Metabolic priming by a secreted fungal effector. **Nature**, 478: 395-398, 2011.
- DOEHLEMANN, G.; WAHL, R.; HORST, R.J.; VOLL, L.M.; USADEL, B.; POREE, F.; STITT, M.; PONS-KUHNEMANN, J.; SONNEWALD, U.; KAHMANN, R.; KAMPER, J. Reprogramming a maize plant: transcriptional and metabolic changes induced by the fungal biotroph *Ustilago maydis*. **The Plant Journal**, 56: 181-195, 2008.
- FARACO, V.; PEZZELLA, C.; MIELE, A.; GIARDINA, P.; SANNIA, G. Bio-remediation of colored industrial wastewaters by the white-rot fungi *Phanerochaete chrysosporium* and *Pleurotus ostreatus* and their enzymes. **Biodegradation**, 20: 209-220, 2009.
- FERREIRA, L.F.R. **Biodegradação de vinhaça proveniente do processo industrial de cana-de-açúcar por fungo**. 2009. 135p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- FEYS, B.J.; PARKER, J.E. Interplay of signaling pathways in plant disease resistance. **Trends in Genetics**, 16: 449-455, 2000.
- FU, Y.Z.; VIRARAGHAVAN, T. Fungal decolorization of dye wastewaters: a review. **Bioresource Technology**, 79: 251-262, 2001.
- GEST, H. The discovery of microorganisms by Robert Hooke and Antoni van Leeuwenhoek, fellows of the royal society. **Notes and Records: The Royal Society Journal**, 58: 187-201, 2004.
- HUGENHOLTZ, P.; GOEBEL, B.M.; PACE, N.R. Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. **Journal of Bacteriology**, 180: 4765-4774, 1998.
- KARAM, L.; NICELL, J.A. Potential Applications of Enzymes in Waste Treatment. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, 69: 141-153, 1997.
- KARP, S.G.F.; FARACO, V.; AMORE, A.; BIROLO, L.; GIANGRANDE, C.; SOCCOL, V.T.; PANDEY, A.; SOCCOL, C.R. Characterization of laccase isoforms produced by *Pleurotus ostreatus* in solid state fermentation of sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, 114: 735-739, 2012.
- KELLER, M.; ZENGLER, K. Tapping into microbial diversity. **Nature Reviews Microbiology**, 2: 141-150, 2004.
- MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; DUNLAP, P.V.; CLARK, D.P. **Microbiologia de Brock**. 12. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 1160 p.
- PEREIRA, F.V., GURGEL, L.V.A., DE AQUINO, S.F., GIL, L.F. Removal of Zn (2+) from electroplating wastewater using modified wood sawdust and sugarcane bagasse. **Journal of Environmental Engineering**, 135: 102-110, 2009.
- POMPEU, G. B. **Comportamento enzimático de quatro fungos ligninolíticos crescidos em bagaço e palha de cana-de-açúcar e expostos a duas concentrações de nitrogênio, visando à produção de etanol**. 2010. 96 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ, C.E.; CASTRO-GUTIÉRREZ, V.; CHIN-PAMPILLO, J.S.; RUIZ-HIDALGO, K. On-farm biopurification systems: role of white rot fungi in depuration of pesticide-containing wastewaters. **Federation of European Microbiological Societies**, 345: 1-12, 2013.
- SOARES, R.C.; MORAES, N.; SAITO, S.; QUECINE, M.C.; CAMARGO, L.E.A.; PAULINO, L.C.; MONTEIRO-VITORELLO, C.B. Towards the development of a chemically defined medium for the sugarcane pathogen *Leifsonia xyli subsp. Xyli* based on its genome sequence. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, 57., 2011, Águas de Lindóia. **Resumos...** Águas de Lindóia: Sociedade Brasileira de Genética, 2011.
- TORSVIK, V.; GOKSØYR, J.; DAAE, F.L. High diversity in DNA of soil bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, 56: 782-787, 1990.
- VIDALI, M. Bioremediation: An overview. **Pure and Applied Chemistry**, 73: 7, 2001.

WAHL, R.; WIPPEL, K.; GOOS, S.; KAMPER, J.; SAUER, N. A novel high-affinity sucrose transporter is required for virulence of the plant pathogen *Ustilago maydis*. **PLoS Biology**, 8: e1000303, 2010.

SOBRE OS AUTORES DOS CAPÍTULOS³

Alan Bernard Oliveira de Sousa - Doutorando em Engenharia de Sistemas Agrícolas, Departamento Engenharia de Biossistemas, ESALQ / USP

Ana Julia Righetto - Doutoranda em Agronomia (Estatística e Experimentação Agronômica), Departamento de Ciências Exatas, ESALQ / USP

Ana Paula Preczenhak- Doutoranda em Fisiologia e Bioquímica de Plantas, Departamento de Ciências Biológicas, ESALQ / USP

André Luiz Barboza - Doutorando em Fisiologia e Bioquímica de Plantas, Departamento de Ciências Biológicas, ESALQ / USP

Anita de Souza Dias Gutierrez - Doutora em Produção Vegetal, chefe do Centro de Qualidade em Horticultura da Companhia de Entrepósitos e Armazéns Gerais de São Paulo e presidente do Instituto Brasileiro de Qualidade em Horticultura – HortiBrasil

Ariadne Felício Lopo de Sá - Doutoranda em Fisiologia e Bioquímica de Plantas, Departamento de Ciências Biológicas, ESALQ / USP

Bianca Ribeiro - Mestre em Genética e Melhoramento de Plantas, Departamento de Genética, ESALQ / USP

Bruno Patias Lena - Doutorando em Engenharia de Sistemas Agrícolas, Departamento de Engenharia de Biossistemas, ESALQ / USP

Daniel Prezotto Longatto - Mestre em Genética e Melhoramento de Plantas, Departamento de Genética, ESALQ / USP

Danielle Otte Carrara Castan - Mestranda em Fitotecnia, Departamento de Produção Vegetal, ESALQ / USP

Djair Durand Ramalho Frade - Doutorando em Agronomia (Estatística e Experimentação Agronômica), Departamento de Ciências Exatas, ESALQ / USP

Elizabeth Ann Veasey - Doutora em Genética e Melhoramento de Plantas, Professora do Departamento de Genética, ESALQ / USP

Eloisa Vendemiatti - Mestranda em Fisiologia e Bioquímica de Plantas, Departamento de Ciências Biológicas, ESALQ / USP

Érica Silva Nakai - Doutoranda em Engenharia de Sistemas Agrícolas, Departamento de Engenharia de Biossistemas, ESALQ / USP

³ Dados extraídos do currículo Lattes

Ernani Porto - Doutor em Ciência de Alimentos, Professor do Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição, ESALQ / USP

Esteban Galeano Gomez - Doutorando no programa Internacional em Biologia Celular e Molecular Vegetal, Departamento de Ciências Biológicas, ESALQ / USP

Fabiane Mendes da Camara - Doutoranda em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição, ESALQ / USP

Francisco Guilhien Gomes Junior - Doutor em Fitotecnia, pesquisador na área de Tecnologia de Sementes, ESALQ / USP

Frederico Almeida de Jesus - Doutorando em Fisiologia e Bioquímica de Plantas, Departamento de Ciências Biológicas, ESALQ / USP

Gabriel Dequigiovanni - Doutorando em Genética e Melhoramento de Plantas, Departamento de Genética, ESALQ / USP

Gabriel Vicente Bittencourt de Almeida - Engenheiro Agrônomo da Companhia de Entrepósitos e Armazéns Gerais de São Paulo (CEAGESP), doutorando em Horticultura, UNESP / FCA

Gabriela Machineski da Silva - Mestranda em Microbiologia Agrícola, Departamento de Ciência do Solo, ESALQ / USP

Gilda Mariano Silva - Mestranda em Microbiologia Agrícola, Departamento de Ciência do Solo, ESALQ / USP

Guilherme Pereira de Oliveira - Mestrando em Fisiologia e Bioquímica de Plantas, Departamento de Ciências Biológicas, ESALQ / USP

Hermes Soares da Rocha - Doutorando em Engenharia de Sistemas Agrícolas, Departamento de Engenharia de Biossistemas, ESALQ / USP

Hugo Thaner dos Santos - Mestrando em Engenharia de Sistemas Agrícolas, Departamento de Engenharia de Biossistemas, ESALQ / USP

Irineu Pedro de Sousa Andrade - Doutorando em Engenharia de Sistemas Agrícolas, Departamento de Engenharia de Biossistemas, ESALQ / USP

Isaac de Matos Ponciano - Doutorando em Engenharia de Sistemas Agrícolas, Departamento de Engenharia de Biossistemas, ESALQ / USP

Iuri Emmanuel de Paula Ferreira - Doutorando em Agronomia (Estatística e Experimentação Agronômica), Departamento de Ciências Exatas, ESALQ / USP

Jaqueline Visioni Tezotto-Uliana - Doutoranda em Fitotecnia, Departamento de Produção Vegetal, ESALQ / USP

José Guilherme Prado Martin - Doutorando em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição, ESALQ / USP

Juliana Lorenz Mandro - Mestranda em Microbiologia Agrícola, Departamento de Ciência do Solo, ESALQ / USP

Leila Priscila Peters - Doutoranda em Genética e Melhoramento de Plantas, Departamento de Genética, ESALQ / USP

Lígia Erpen - Doutoranda em Fitotecnia, Departamento de Produção Vegetal, ESALQ / USP

Luiz Ricardo Nakamura - Doutorando em Agronomia (Estatística e Experimentação Agrônômica), Departamento de Ciências Exatas, ESALQ / USP

Maísa de Siqueira Pinto - Doutoranda em Fisiologia e Bioquímica de Plantas, Departamento de Ciências Biológicas, ESALQ / USP

Manoel Divino da Matta Junior - Doutorando em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição, ESALQ / USP

Marcela Morato Notini - Doutoranda em Fisiologia e Bioquímica de Plantas, Departamento de Ciências Biológicas, ESALQ / USP

Marcelo Gomes Marçal Vieira Vaz - Doutorando em Microbiologia Agrícola, Departamento de Ciência do Solo, ESALQ / USP

Marta Helena Fillet Spoto - Doutora em Tecnologia Nuclear, Professora do Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição, ESALQ / USP

Melina Luz Mary Cruzado Bravo - Ingeniera Agroindustrial, Universidad Nacional de Trujillo, Perú

Nancy Farfan Carrasco - Doutoranda em Genética e Melhoramento de Plantas, Departamento de Genética, ESALQ / USP

Natália Arruda - Doutoranda em Fitotecnia, Departamento de Produção Vegetal, ESALQ / USP

Nathália de Moraes - Mestranda em Genética e Melhoramento de Plantas, Departamento de Genética, ESALQ / USP

Nathália Torres Correa - Mestranda em Microbiologia Agrícola, Departamento de Ciência do Solo, ESALQ / USP

Otávio Neto Almeida Santos - Mestrando em Engenharia de Sistemas Agrícolas, Departamento Engenharia de Biosistemas, ESALQ / USP

Patricia Dayane Carvalho Schaker - Doutoranda em Microbiologia Agrícola, Departamento de Ciência do Solo, ESALQ / USP

Pedro Paulo Silva Barros - Doutorando em Engenharia de Sistemas Agrícolas, Departamento de Engenharia de Biosistemas, ESALQ / USP

Raphael Branco de Araujo - Mestrando em Fitotecnia, Departamento de Produção Vegetal, ESALQ / USP

Sabrina Leite de Oliveira - Mestre em Tecnologia Pós-Colheita, Engenheira agrônoma da Companhia de Entrepósitos e Armazéns Gerais de São Paulo (CEAGESP)

Sérgio Birello Sartori - Doutorando em Microbiologia Agrícola, Departamento de Ciência do Solo, ESALQ / USP

Stevan Ricardo Bordignon - Mestrando em Fisiologia e Bioquímica de Plantas, Departamento de Ciências Biológicas, ESALQ / USP

Suzane Saito - Mestranda em Genética e Melhoramento de Plantas, Departamento de Genética, ESALQ / USP

Tábata Berbonci - Doutoranda em Genética e Melhoramento de Plantas, Departamento de Genética, ESALQ / USP

Tânia Regina Batista - Doutoranda em Fisiologia e Bioquímica de Plantas, Departamento de Ciências Biológicas, ESALQ / USP

Tatiana de Souza Moraes - Mestranda em Fitotecnia, Departamento de Produção Vegetal, ESALQ / USP

Tatiane de Oliveira Gonçalves - Mestranda em Genética e Melhoramento de Plantas, Departamento de Genética, ESALQ / USP

Tatiane de Oliveira Tokairin - Doutoranda em Fitotecnia, Departamento de Produção Vegetal, ESALQ / USP

Thais Maria Ferreira de Souza Vieira - Doutora em Tecnologia de Alimentos, Professora do Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição, ESALQ / USP

Thais Melega Tomé - Mestranda em Genética e Melhoramento de Plantas, Departamento de Genética, ESALQ / USP

Thalita Riquelme Augusto - Doutoranda em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição, ESALQ / USP

Thiago de Oliveira - Técnico da Companhia de Entrepostos e Armazéns Gerais de São Paulo

Thiago Gentil Ramires - Doutorando em Agronomia (Estatística e Experimentação Agronômica), Departamento de Ciências Exatas, ESALQ / USP

Vanessa de Fátima Grah - Doutora em Engenharia de Sistemas Agrícolas, ESALQ / USP, Professora do Instituto Federal Goiano