

SEBASTIÃO DA SILVA JÚNIOR

**BIOPROTETOR COM BACTÉRIA DIAZOTRÓFICA MAIS QUITOSANA FÚNGICA
EM COMPARAÇÃO COM FERTILIZANTE MINERAL SOLÚVEL NA UVA ISABEL**

**RECIFE
PERNAMBUCO - BRASIL
2012**

SEBASTIÃO DA SILVA JÚNIOR

**BIOPROTETOR COM BACTÉRIA DIAZOTRÓFICA MAIS QUITOSANA FÚNGICA
EM COMPARAÇÃO COM FERTILIZANTE MINERAL SOLÚVEL NA UVA ISABEL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Área de concentração Química, Fertilidade e Microbiologia do Solo, da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE, PE), como parte dos requisitos para obtenção do grau de Doutor em Ciência do Solo.

**RECIFE
PERNAMBUCO - BRASIL
2012**

SEBASTIÃO DA SILVA JÚNIOR

**BIOPROTETOR COM BACTÉRIA DIAZOTRÓFICA MAIS QUITOSANA FÚNGICA
EM COMPARAÇÃO COM FERTILIZANTE MINERAL SOLÚVEL NA UVA ISABEL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Área de concentração Química, Fertilidade e Microbiologia do Solo, da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE, PE), como parte dos requisitos para obtenção do grau de Doutor em Ciência do Solo.

Orientador

Prof. Newton Pereira Stamford, Dr.

Conselheiros

Dr^a. Carolina Etienne de Rosália e Silva Santos,

Dr^a. Profa. Luciana de Oliveira Franco, Dr^a.

RECIFE

PERNAMBUCO - BRASIL

2012

**BIOPROTETOR COM BACTÉRIA DIAZOTRÓFICA MAIS QUITOSANA FÚNGICA
EM COMPARAÇÃO COM FERTILIZANTE MINERAL SOLÚVEL NA UVA ISABEL**

SEBASTIÃO DA SILVA JÚNIOR

Tese defendida e aprovada em 31 de julho de 2012, pela Banca Examinadora:

ORIENTADOR:

Prof. Dr. Newton Pereira Stamford

EXAMINADORES:

Dra. Maria Manuela Esteves Pintado - UCP

Dr. José de Paula Oliveira - IPA

Dra. Luciana de Oliveira Franco - UFRPE

Dra. Maria de Fátima Cavalcanti Barros – UFRPE

Á Deus

Nada é coincidência tudo é providência.

Dedico

Aos meus pais, Sebastião da Silva (*in memoria*) e Helena Marques da Silva por toda dedicação, afeto, carinho e amor em toda a fase da minha existência. Aos meus três amores: Emily Beatriz, Sabrina Miky e Rosângela Santana pelo apoio, amor, companheirismo ao longo dessa etapa de formação acadêmica. Aos meus irmãos que sempre estiveram ao meu lado corroborando nas minhas decisões, com apoio, palavras de conforto e estímulo para vencer os obstáculos. A todos os amigos e familiares que me incentivaram com torcida para minha conquista de cada fase da vida.

AGRADECIMENTOS

Ao Deus supremo, onipresente, onipotente pelo dom da vida, por estar sempre do meu lado nos momentos mais difíceis da minha vida, iluminando, guiando e mostrando o caminho certo;

A Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), em particularmente ao Programa de Pós-graduação em Agronomia – Ciência do Solo, pela oportunidade de realizar o Doutorado. Ao Prof. Dr. Valdomiro Severino de Souza Júnior – Coordenador do programa pelo apoio;

Agradeço ao Prof. Dr. Newton Stamford, pela orientação, apoio, compreensão, paciência, amizade, auxílio, motivação e estímulo imensurável em fazer sempre o melhor no alcance deste grande objetivo;

Aos meus pais Sebastião da Silva (*in memoria*) e Helena Marques da Silva, por terem dedicado todos os dias com afeto, ensinamento e amor incondicional nos momentos mais difíceis da minha vida. Dedico aos meus irmãos por acreditarem no meu potencial em ultrapassar barreiras e obstáculos dos limites da vida;

A toda a minha família pelo incentivo e motivação em todos os momentos;

A FACEPE pelo apoio financeiro com bolsa de pesquisa concedida;

Ao meu grande amor Rosângela pela ajuda e apoio inesgotável e crucial na realização desse projeto de vida na realização do nosso trabalho;

Aos pesquisadores, professores e alunos do Núcleo de Fixação Biológica do N₂ nos Trópicos (NFBNT – UFRPE). Em especial, a professora Carolina Etienne pela co-orientação, estímulo, amizade nas atividades acadêmica;

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Agronomia – Ciência do Solo por contribuírem por minha formação acadêmica;

Ao Banco do Nordeste do Brasil - BNB por fornecer todo suporte quanto aos recursos quanto a implantação e condução da pesquisa com apoio em infraestrutura do laboratório de biotecnologia ambiental;

A Fundação Apolônio Salles – FADURPE pelo apoio no repasse dos recursos do BNB, em especial a Eliane pela gerência, amizade e ajuda na efetivação da pesquisa;

A todos da Empresa Vinícola Botticelli que colaboraram com a liberação da área experimental e materiais (sistema de irrigação por microaspersão computadorizada), acessibilidade, além, de uma equipe técnica habilitados voltada

para uma melhor troca de informações na condução do experimento. Em especial, Sr. Gualberto de Freitas Almeida proprietário da Vinícola Botticelli/Milano, Santa Maria da Boa Vista- PE, e seu filho, o engenheiro Agrônomo, Ricardo de Almeida por contribuírem na liberação da área e infra-estrutura de forma decisiva como parceiros na realização da pesquisa científica. E toda equipe técnico de apoio da unidade experimental: Raimundo, Nelson e Gregório e todos os funcionários da administração da Fazenda;

Ao enólogo Tedesco pelo apoio constante na obtenção dos dados analíticos do mosto e estímulo e troca de conhecimento no mundo do suco e vinho da uva;

Ao IPA por ter cedido o espaço físico (laboratório de Biologia do Solo na preparação dos inoculantes e casa de vegetação para condução e preparação da produção do Biofertilizante de nova geração), sem esquecer do apoio dos pesquisadores: Dr^a. Marcia do Vale Figueiredo e Dr. José de Paula de Oliveira, e a todos bolsistas e funcionários do setor de biologia do solo do IPA – Recife;

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), em especial a EMBRAPA SOLOS do Rio de Janeiro - RJ, com ajuda constante da REDE FERTBRASIL, em particular ao pesquisador Dr. Caio Teves pelo apoio a pesquisa nos momentos emergenciais e cruciais para realização das atividades de campo;

Aos funcionários da UFRPE, em especial Maria do Socorro e Josué pelo carinho e apoio;

Aos amigos do Curso de Pós Graduação em Ciência do Solo, em especial Hammady Ramalho, Fernando de Oliveira, Wanderson, Wagner, Antonio, Fabiana, pela amizade, convívio, companheirismo e troca de conhecimento durante a realização das atividades laboratoriais e etapas de campo, tornando o ambiente mais alegre e descontraído;

E aos pesquisadores e professores do exterior, Portugal, Europa, em especial a professora Manuela Pintado e professor Bruno Sarmiento pelo apoio inesgotável para conclusão de mais uma etapa do trabalho realizado no exterior;

Agradeço a CAPES por todo apoio financeiro e pela bolsa concedida ao longo do período do curso de Doutorado Sanduíche no exterior;

Enfim, a todos que direta ou indiretamente, contribuíram na realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	10
LISTA DE FIGURAS.....	11
LISTA DE APÊNDICE	13
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	14
RESUMO GERAL.....	15
GENERAL ABSTRACT	16
INTRODUÇÃO GERAL.....	17
CAPÍTULO I	35
CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADE INIBITÓRIA DA QUITOSANA COM DIFERENTES PESOS MOLECULARES CONTRA <i>BOTRYTIS CINEREA</i>	35
RESUMO.....	36
ABSTRACTS.....	37
INTRODUÇÃO.....	39
MATERIAIS E MÉTODOS.....	40
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
CONCLUSÃO.....	49
AGRADECIMENTOS.....	48
REFERÊNCIAS	48
CAPÍTULO II.....	53
BIOPROTETOR COM BACTÉRIA DIAZOTRÓFICA E QUITOSANA FÚNGICA NA PRODUTIVIDADE DA UVA ISABEL E EM ATRIBUTOS DO SOLO COMPARADO COM FERTILIZANTE MINERAL	53
RESUMO.....	54
ABSTRACT	55
INTRODUÇÃO	55
MATERIAIS E MÉTODOS.....	57
RESULTADOS	62
DISCUSSÃO	69
CONCLUSÕES	73
AGRADECIMENTOS.....	73
CAPÍTULO III.....	79
BIOPROTETOR COM BACTÉRIA DIAZOTRÓFICA DE VIDA LIVRE E QUITOSANA FÚNGICA NO ESTADO NUTRICIONAL DA UVA	79
RESUMO	80
ABSTRACT	81

INTRODUÇÃO	81
MATERIAL E MÉTODOS	83
RESULTADOS	87
DISCUSSÃO	94
CONCLUSÕES	95
AGRADECIMENTOS.....	96
REFERÊNCIAS	97
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	104

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1. Percentuais de carbono, nitrogênio, hidrogênio, a relação carbono / nitrogênio e o grau de desacetilação das amostra de quitosana Aldrich do fabricante (QC)..... 43

Tabela 2. Atividade inibitória da quitosana (baixo peso molecular) contra *Botrytis cinerea* em diferentes tempos de crescimento do fungo (h) em meio de cultura BDA (5 repetições)..... 45

Tabela 3. Atividade inibitória da quitosana (médio peso molecular) contra *Botrytis cinerea* em diferentes tempos de crescimento do fungo (h) em meio de cultura BDA (5 repetições)..... 46

Tabela 4. Atividade inibitória da quitosana (alto peso molecular) contra *Botrytis cinerea* em diferentes tempos de crescimento do fungo (h) em meio de cultura BDA (5 repetições)..... 46

CAPÍTULO II

Tabela 1. Caracterização química e física do solo em duas profundidades.....60

Tabela 2. Adubação da uva (*Vitis labrusca*), para o Estado de Pernambuco 61

CAPÍTULO III

Tabela 1. Caracterização química e física do solo em duas profundidades.....85

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO - I

Figura 1. Espectro de RMN 1H da quitosana Aldrich do Fabricante42

CAPÍTULO - II

Figura 2. Produtividade da uva *Vitis labrusca* (cv. Isabel) cultivada no Vale do São Francisco, Pernambuco, em função dos tratamentos de fertilização (NPKP, NPKF e o controle (composto de uva)).63

Figura 3. pH do solo após colheita da uva (cv Isabel) sob fertilização com biofertilizante (P) e fertilizante mineral solúvel (F) nas profundidades de 0-20 e 20-40 cm.....64

Figura 4. N total (A) e sulfato (S-SO₄-2) solúvel (B) no solo, em amostras coletadas após as duas colheitas, em função dos tratamentos de fertilização (biofertilizante, fertilizante solúvel e controle com composto de uva) aplicados em duas profundidades (0-20 e 20-40 cm).....65

Figura 5. P disponível (A) e K disponível (B) no solo, em amostras coletadas antes da 2ª colheita (abril de 2012), em função dos tratamentos de fertilização (P e F) e o controle com composto de uva aplicados em duas profundidades (0-20 e 20-40 cm).66

Figura 6. Ca trocável (A) e Mg trocável (B) do solo, antes da 2ª colheita (abril de 2012), em função dos tratamentos de fertilização (biofertilizante, fertilizante convencional e controle com composto de uva) aplicados em duas profundidades (0-20 e 20-40 cm).68

CAPÍTULO - III

Figura 1. Concentração de N total no limbo (A) e no pecíolo (B) nas folhas da videira (cv. Isabel) em função da fertilização e da profundidade de aplicação dos fertilizantes (0-20 e 20-40 cm).....88

Figura 2. Concentração de P total no limbo (A) e no pecíolo (B) nas folhas da videira (cv. Isabel) em função da fertilização e da profundidade de aplicação dos fertilizantes (0-20 e 20-40 cm).....89

Figura 3. Concentração de K total no limbo (A) e no pecíolo (B) nas folhas da videira (cv. Isabel) em função da fertilização e da profundidade de aplicação dos fertilizantes (0-20 e 20-40 cm).....90

Figura 4. Concentração de Ca total no limbo (A) e no pecíolo (B) nas folhas da videira (cv. Isabel) em função da fertilização e da profundidade de aplicação dos fertilizantes (0-20 e 20-40 cm).....91

Figura 5. Concentração de Mg total no limbo (A) e no pecíolo (B) nas folhas da videira (cv. Isabel) em função da fertilização e da profundidade de aplicação dos fertilizantes (0-20 e 20-40 cm).....93

LISTA DE APÊNDICE

FIGURA 1. Preparo do bioprotetor com revolvimento das rochas moídas e material orgânico	105
FIGURA 2. Crescimento da bactéria diazotrófica de vida livre NFB10001. A: fase inicial de crescimento B: crescimento bacteriano após 5 dias.....	105
FIGURA 3. Inoculação com a bactéria NFB10.001 e biomassa do <i>Cunninghamella elegans</i> (UCP 542)	105
FIGURA 4. Monitoramento dos parâmetros das atividades em incubação por 35 dias.....	106
FIGURA 5. Implantação do experimento de campo na área experimental	106
FIGURA 6. Tratos culturais aplicados na videira da área experimental	106
FIGURA 7. Atividade de manejo da fase de crescimento e condução da copa	106
FIGURA 8. Tratamento controle (composto uva) 2ª colheita.....	107
FIGURA 9. Produção com fertilizante convencional (2ª colheita) nas doses A:1,0; B: 1,5 e C: 2,0 vezes o recomendado	107
FIGURA 10. Produção com Bioprotetor (2ª colheita) nas doses A:1,0; B: 1,5 e C: 2,0 vezes o recomendado	107

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ChD – desacetilação da quitosana
GD – grau de desacetilação;
PM – peso molecular;
RMN – ressonância magnética nuclear;
C/N – razão de carbono/nitrogênio;
GPC – cromatografia de permeação em gel;
pH– potencial Hidrogeniônico
ha – hectare;
planta ha⁻¹ – planta por hectare;
DR- dose recomendada
% - percentual;
g – grama;
m – metro;
cm – centímetro;
mg – miligrama;
kg – quilograma;
L – Litro;
t ha⁻¹ ano⁻¹ – tonelada por hectare por ano;
g kg⁻¹ – grama por quilo;
mg mL⁻¹ – miligrama por mililitro;
cmol_c dm⁻³ – centimol de carga por decímetro cúbico;
mg dm⁻³ – miligrama por decímetro cúbico;
mmol_c dm⁻³ – milimol de carga por decímetro cúbico;
kg planta⁻¹ – quilo por planta;
g mol⁻¹ – grama por mol (massa molar);
TFSA – terra fina seca ao ar;
N-NO₃⁻ – nitrogênio nítrico;
N-NH₄⁺ – nitrogênio amônio;
BK - biofertilizante de rocha potássica;
BP - biofertilizante de rocha fosfática;
(F) – fertilizante mineral solúvel;
(P) – bioprotetor.

Silva Júnior, Sebastião da. Dr. Universidade Federal Rural de Pernambuco. Julho de 2012. Resumo Geral. Bioprotetor com bactéria diazotrófica e quitosana fúngica em comparação com fertilizante mineral solúvel na uva Isabel. Orientador: Prof. Dr. Newton Pereira Stamford. Conselheiros: Prof^a. Dr^a. Carolina Etienne de Rosália e Silva Santos e Prof^a. Dr^a. Luciana de Oliveira Franco.

RESUMO GERAL

A uva *Vitis labrusca* contribui ativamente para o desenvolvimento sócioeconômico do País, em particular da região semiárido do médio São Francisco. Para incremento da produtividade da uva é necessário a aplicação de fertilizantes. É reconhecido, atualmente, que a quitosana possui propriedades específicas que mostram grande potencial para inúmeras aplicações em vários produtos comerciais, especialmente devido a sua biocompatibilidade, biodegradabilidade e reatividade do grupo amínico. A quitosana possa ser aplicada na agricultura com ação de proteção de planta contra agentes fitopatogênicos. Ensaio *in vitro* foram realizados com o objetivo de caracterizar e avaliar os efeitos de quitosana de camarão com diferentes pesos moleculares (baixo, médio e alto) contra o fungo patogênico *Botrytis cinerea* causador da “podridão cinzenta” em frutos de uva. Paralelamente foi produzido o bioprotetor (P) a partir de biofertilizante de rochas em mistura com mais matéria orgânica inoculada com bactéria diazotrófica de vida livre e com *Cunninghamella elegans* que possui quitosana, biopolímero que atua fornecendo nutrientes e protege a planta contra fitopatógenos, podendo ser uma alternativa para substituição aos insumos convencionais. Em experimento de campo realizado na Vinícola Botticelli, procurou-se avaliar o efeito do bioprotetor (P) em atributos químicos do solo e na produtividade da uva, visando comparar o efeito de bioprotetor (P) e fertilizante mineral solúvel (F). Também foi avaliada a nutrição da videira que constitui um fator dos mais importantes para o desempenho produtivo, especialmente considerando os macronutrientes. De uma maneira geral, os resultados mostraram que o bioprotetor pode ser alternativo em substituição a fertilizantes convencionais solúveis, tendo em vista que mostrou maior liberação de nutrientes para o solo e para a planta, e também apresenta potencial para uso antimicrobiano, especialmente contra o fungo *Botrytis cinerea* causador da podridão cinzenta nos frutos da uva.

Palavras chave: *Cunninghamella elegans*; *Vitis labrusca*; Biofertilizante de rochas; fertilização do solo; Nutrição mineral; Produtividade da uva.

JÚNIOR, SEBASTIÃO DA SILVA. Dsc.at Universidade Federal Rural de Pernambuco. August 2012. Chapter 1. Bioprotector with diazotrophic bacteria and fungal chitosan compared to mineral fertilizer soluble grape Isabel. Adviser: Prof. Dr. Newton Pereira Stamford. Co-Advisers: Prof^a. Dr^a. Carolina Etienne de Rosália e Silva Santos e Prof^a. Dr^a. Luciana de Oliveira Franco.

GENERAL ABSTRACT

The grapes *Vitis labrusca* contributes actively for the Brazilian development social and economic, particularly in reference to the semiarid region of the médium San Francisco Irrigated area. To the improvement of the grape productivity is necessary the fertilizers application. Actually is recognized that the chitosan biopolymer has specific properties that display great potential for application to obtain various commercial products, especially due to its biocompatibility, biodegradability and reativity inerent to the aminic group. The chitosan may be applied in agriculture for plant protection against phytophatogenic agents. Assays “in vitro” were carried out with the aim to characterize and evaluate the effects of shrimp chitosan produced with different molecular weight (low, medium and high) against the pathogenic fungus *Botrytis cinerea* that promote the “Gray mold disease” on grape fruits. At the same time it was produced the bioprotector (P) from P and K rock biofertilizers mixed with organic matter inoculated with free living diazotrophic bacteria and with the fungi *Cunninghamella elegans* that produce the biopolymer chitosan that act increasing nutrient content and protect the plants against phitopatogens, and may be alternative furnishing nutrients and substitute the conventional fertilizers. In field experiments conductes at the Fine wine viniculture (Bottiecelli Company), were evaluated the effects of the bioprotector (P) in chemical soil attributes and in the grape yield, comparing the bioprotector effect (P) with the mineral soluble fertilizer (F). It was also evaluated the grape nutrition that constitute one of the most important factor that have influence on the yield parameter, especially for macronutrients. In a general way, the results showed that the bioprotector (P) may be alternative in substitution for conventional soluble fertilizers, because displayed great liberation of nutrients to the soil system and for the plants, and also present potential for antimicrobial use, in special against the *Botrytis cinerea* fungi that produce gray mold disease in grape fruits.

Key words: *Cunninghamella elegans*; *Vitis labrusca*; Rock biofertilizers; Soil fertilization; Mineral nutrition; yield of grapes.

INTRODUÇÃO GERAL

A viticultura é uma atividade consolidada no Brasil e de grande importância sócio-econômica, concentrando sua produção nas regiões Sul, Sudeste e Nordeste. Em Pernambuco, a região do Submédio São Francisco se destaca como uma das principais frutas de exportação brasileira. O Submédio do Vale do São Francisco é um dos grandes pólos em expansão, volume, produção e área cultivada com uva, sendo configurada como pioneira em exportação de uvas finas de mesa, segunda em produção Nacional, maior em produtividade (Agrianual, 2011).

Conforme dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE (2012), foi verificado que a produção de videira no Brasil entre os anos de 2009 e 2010 cresceu 2,5% em áreas plantadas por há, com uma produção Nacional obtida em 2010 na ordem dos 1.295.442 t. De acordo com levantamento sistemático da produção agrícola do país, IBGE ano (2012), a produção no Nordeste era de 246.508 t em 2009 passando para 299.701 t em 2010 o que proporcionou um avanço de área cultivada com videira na ordem de 13,4 % da produção Brasileira.

O Estado de Pernambuco contribuiu com 66% da área colhida na região Nordeste, aumentando sua participação regional na produção passando de 168.225 em 2009 para 299.765 t em 2010, o que elevou a sua participação de 68% para 78,19% e que o Vale do São Francisco apresentou 92% de área total plantada neste Estado (IBGE, 2012).

Conforme trabalhos realizados por Silva et al. (2009) relatam que no Nordeste, em particular, na região semiárida as mudanças fisiológicas da cultura ocasionada pelas diversidades edafo-climáticas, como baixa precipitação e temperaturas médias mensais normais variando de 24 a 28 ° C favorecem a adoção de técnicas de produção adequadas. De acordo com Souza Leão et al. (2004) a uva desta região pode-se diferenciar em comportamento e adaptação, podendo anualmente obter mais de dois ciclos sucessivos de produção ao ano, com alta produtividade e qualidade, entretanto, é necessária mediação e intervenções do manejo. O Submédio São Francisco, apresenta assim como grande potencial uma nova fronteira na produção de frutas de uvas para exportação, numa região tropical com características diferentes das regiões tradicionais vitivinícolas do mundo, fato

decorrente da obtenção de produtividade que podem superar 30 t.ha⁻¹.ano⁻¹, ultrapassando as médias anuais de outras regiões nacionais.

Com base em realizado estudo por Grigoletti jr & Sônego (1993) a vinífera *Vitis labrusca* cv. *Isabel* apresenta características agronômicas bastante peculiares, com variabilidades a condições edafoclimáticas das regiões como semi-árido, relativa rusticidade, resistência a oídio e obtenção de alta produção. As espécies americanas *Isabel* respondem por 2/5 do volume de uvas processadas no país, com valores próximos de 200 mil toneladas por ano de matéria-prima para produção de vinhos. De acordo pos Rizzon et al. (2000), este cultivar pode ter consumo direto *in natura* ou processada para produção de geléias, vinagre, vinhos tintos e sucos.

Os processos bioquímicos, fisiológicos de crescimento e desenvolvimento da uva são refletidos direto da fertilidade do solo, participando como componente chave nutrição mineral da videira. Muitos trabalhos destacam a potencialidade da fertilização mineral influenciando a produção e qualidade desta cultura. A carência ou excesso nutricional induzirá anormalidade no crescimento e tamanho da planta, em particular nos frutos da uva, folhas e ramos, produzirá efeitos deformações anatômicas e alterações químicas diretas ou indiretas no metabolismo, causando perdas na produção e qualidade dos frutos (Albuquerque, 1996). De acordo com pesquisa desenvolvida por Passos & Trintin (1982) o manejo influência diretamente na produção e qualidade da videira e no mosto da uva. Fregoni, 1980 citado por Fráguas & Silva (1998) afirmam que a nutrição da cultura têm efeito nos processos bioquímicos envolvendo a uniformidade das bagas, maturação, formação das proteínas, concentração de acidez e açúcares, cor e tamanho dos frutos.

O nitrogênio é um nutriente exigido pela videira em maiores quantidades, limita o crescimento e desenvolvimento total da uva, e apresenta ao longo do seu ciclo vital teores médios que variam de 10 a 20 g kg⁻¹ da matéria seca da planta. Faria et. al (2004) afirmam que as concentrações normais na folha para videira cultivadas no Vale do São Francisco oscila em variações de teores entre 12 e 20 g Kg⁻¹ da matéria seca, apresentando faixa normal para a cultura.

De acordo com Taiz & Zeiger, (2006), no solo, as principais formas minerais de absorção de N pelos vegetais são preferencialmente as NH₄⁺ e NO₃⁻, predominantemente por fluxo de massa. Na videira a forma aniônica nítrica é a mais assimilável e apresciável pela cultura, conforme citado por Ortiz-Lopez et al., 2000, após absorção, acumulados nas células das raízes na forma nitrogenada, é

distribuída e translocada para partes aéreas da plantas via xilema na forma de ácido glutâmico, ácido aspártico e a arginina (representa mais da metade do N solúvel armazenado), indispensáveis na constituição dos aminoácidos e formação de proteína.

Bruneto (2004) relatam que o N participa ativamente na composição de moléculas de clorofila, citocininas, formação de complexos orgânicos em proteínas e enzimas, além de influenciar nas funções metabólicas, estruturais no protoplasma.

Bell & Henschke (2005) reportam que o N é necessário na multiplicação celular e no desenvolvimento de órgãos de armazenamento (raízes, tronco e ramos) elevando a capacidade da planta em armazenar carboidratos e nitrogênio, ficando prontamente disponível para translocar para as vias metabólicas da videira. No solo, apresenta as formas orgânicas (proteínas, aminoácidos) e inorgânicas (NH_4^+ e NO_3^-), observando que as forma mineral predominante é a N-NO_3^- com grande facilidade de ser translocado para subcamadas do solo (Lam et al., 1996). Na planta da videira, Keller & Hrazdina, (1998), Keller et al., (2001) reportam que o N afeta propriedades analíticas nas bagas, causando variações no pH do mosto, na acidez, teor de sólidos solúveis totais, acidez titulável e polifenóis totais. Bell & Robson, (1999) constataram que a variação dos teores de N na planta, devido o baixo suprimento de N pode comprometer acentuadamente a produção da videira.

O N tem grande mobilidade na videira, a deficiência manifesta-se primeiramente nas folhas velhas com mudança de verde a verde-clara (clorose), permanecendo inalterável a cor verde nas folhas mais jovens. Conforme os autores Albuquerque et al. (2009), sua deficiência promove menor síntese de clorofila, redução na absorção de outros nutrientes decorrente da inibição do processo energético fotossintético, queda no vigor, diminuição à síntese de proteínas, baixo desenvolvimento vegetativo, restrição do crescimento dos brotos e entrenós, com efeito direto na redução do percentual pegamento dos bagas, tamanho dos cachos e conseqüente redução da produção. Além disso, outros trabalhos demonstram que a falta deste elemento pode comprometer a produtividade e qualidade dos uva para fins de produção de vinhos e sucos.

O excesso N pode provocar acentuado vigor às plantas, manifestando crescimento excessivo das partes superiores da cultura, além do dessecamento da ráquis e dos samentos, causa o desbalanço na relação C/N, comprometendo a redução da indução das gemas dos ramos e aumento da suscetibilidade a doenças

(Srinivasan & Mullins, 1981). Conforme trabalhos desenvolvidos por Miele et al. (2009) as aplicações excessivas de N em fertilização mineral nitrogenada pode induzir a alterações fisiológicas como: e dessecamento dos cachos e muchamento das bagas influenciada pelo sobreamento do racemo. Em um estudo abrangente, Marschner, (1995) cita que o fornecimento de N em quantidades acima do recomendado pode reduzir a quantidade de carboidratos nos órgãos de reservas, inerente ao crescimento demasiado da densidade do dossel, provocando a diminuição de fotossintados, pela queda de atividades fotossintéticas nas folhas sombreadas.

Bucchetti & Intrieri (2007) obtiveram vinhos com perda de qualidade, apresentando reduzida estruturação, queda nos teores de composto etano e elevação acentuada dos teores álcoois superiores ocasionada por alterações na característica da cor do mosto.

O excesso de N de acordo com Souza Leão et al, (2004) os autores concluíram que o N total presente no solo apresenta sinergismo em relação ao íons K^+ contribuindo para desenvolvimento da cultura, diferente dos teores de Ca^{2+} e Mg^{2+} apresentaram efeitos antagônicos, dificultando a absorção íons K^+ pelo sistema radicular .

O fósforo é um nutriente que requer bastante atenção, pois é essencial no crescimento e desenvolvimento da videira, seja induzindo o crescimento radicular ou na formação dos frutos e sementes. De acordo com Leão (2007) no solo, o P encontra-se principalmente na forma íons de ortofosfato H_2PO^- ou como aniões H_2PO^{2-} com teores de absorção menos expressivos. Conforme trabalhos desenvolvidos por Costa et al., (2009) vale ressaltar que o íons ortofosfato é absorvido pela planta por difusão, restringindo assim sua mobilidade no solo. A solubilidade de P no solo está condicionada a fatores como: pH, concentração de P na solução do solo, textura e presença de teores de matéria orgânica (Arai; Sparks, 2007).

A concentração de P no tecido vegetal da folha da videira apresenta baixos teores, que variam de 0,15% a 0,25%, quando comparado com as concentrações de potássio nas folhas da mesma cultura que mostram percentuais entre 1,5% a 2,5%. Todavia, vale salientar que o P exerce funções primordiais nos diversos processos metabólicos da cultura, na formação de estruturas energéticas (ATP e ADP), na transferência energética, na respiração, divisão e crescimento celular, com estímulo

no desenvolvimento das raízes, no metabolismo de açúcares e na composição de proteínas, substratos metabólitos, ácidos nucleicos (difosfato e trifosfato de adenosina), além de participar da fotossíntese e no transporte de energia para o cloroplasto (Donati, 2002).

Faria et al. (2004) afirmam que sintomas de deficiência por diagnose visual, inicia-se nas folhas mais velhas, fato decorrente da alta mobilidade nos tecidos mais velhos para os meristemáticos ativos. Em casos de severa deficiência a planta apresenta baixo vigor vegetativo, com redução do sistema radicular, as folhas apresentam coloração roxo-violeta, pelo acúmulo de antocianinas, caracterizando clorose, podendo evoluir para desfolha, secamento e necrose, atraso da maturação dos frutos, lignificação dos tecidos celulares e redução da produtividade (Albuquerque, 2007). Também é importante ressaltar que a deficiência acentuada de P manifesta-se com o surgimento da redução do número de frutos, limitação no crescimento das raízes, retardando o tamanho e crescimento dos tecidos e desenvolvimento dos brotos na planta (Fregoni, 1980).

Com relação ao excesso Malavolta, (2004); Fregoni (1980), Raij (1991) afirmam que o excesso de P promove acentuada deficiência de zinco e ferro nos vinhedos. Também, vale salientar, que a disponibilidade excessiva pode promover a transferência do excesso para as formas de polifosfatos na planta, acarretando o chamado “consumo de luxo”.

No solo, a planta absorve o fósforo da solução do solo, sendo transferido incorporado pelo sistema radicular para dentro da planta e imediatamente transformado em compostos orgânicos (Malavolta et al., 1997). Na obtenção de 1000 kg de frutos a cultura absorve 1 kg de P_2O_5 (Melo, 2005). São requeridas maiores proporções em fase de brotações da videira, conforme observado por Donati (2002) este elemento participa decisivamente na estrutura energética das células no fornecimento de ATP e ADP, ajudando no crescimento dos brotos.

Dos macronutrientes, o potássio é considerado um dos mais importantes na nutrição da videira, sendo absorvido pela planta na forma de íons K^+ e não forma de compostos químicos. No solo, conforme Raij (1991) está associado a minerais primários e secundários, e na forma trocável é adsorvido aos colóides, e na solução do solo encontra-se na forma disponível. No processo de absorção os íons K^+ são transportados pelo sistema radicular para dentro da célula, principalmente por difusão (Malavolta et al., 1997).

Os teores de K na folha normalmente variam de 15 a 25 gkg⁻¹ na matéria seca, sendo o cátion mais abundante nas células da videira. O K afeta funções vitais como a fotossíntese, respiração e transpiração na planta, regula a abertura e fechamento dos estômatos pela sua concentração nas células, limitando as perdas de água na planta. O K atua no transporte de carboidratos para a maturação dos cachos, é ativador de coenzimas e enzimas que participam nos processos metabólicos da uva, afetando diretamente no sabor e aroma do vinho (Marschner,1995). Rizon & Miele (2004) observaram que o cátion K⁺ tem um importante papel na qualidade das uvas para elaboração dos vinhos e sucos, pois seus teores na planta determinam a composição da parte sólida da uva (50% das cinzas).

De acordo com Smart et al. (1985) a deficiência em K⁺ acarreta prejuízos no transporte dos carboidratos formados nas folhas mais velhas. É transportado para outros órgãos de reservas da videira e também tem influência na fisiologia da planta, seja no controle do potencial osmótico, na redução de atividades enzimáticas e bem como no controle do potencial de absorção de açúcares e íons (Conde et al 2007). O K é um elemento com mobilidade acetuada, cuja deficiência ocorre primeiramente nas folhas mais velhas com clorose internerval, e posteriormente atinge as áreas do limbo foliar (Soares & Souza Leão, 2009). Trabalhos desenvolvidos na videira por Delgado et al. (2011) foi constatado acúmulo dos teores de nitrogênio e potássio na folha, na formação e no rendimento dos frutos e nas características da qualidade do suco, quando estes nutrientes foram aplicados simultaneamente.

Christensen & Kearney (2000) observaram que a carência de K interfere na síntese protéica causando elevação na qualidade de aminoácidos livres, retardando a maturação e promovendo a produção de cachos com tamanho reduzido das bagas. O K é exigido em grande quantidade no estágio de maturação das bagas e lignificação dos ramos.

Jacobs (2002) avaliou que o excesso de potássio em videiras produtivas promove o acúmulo de ácido málico na baga, com valores foliares acima de 25 gkg⁻¹ compromete as características do vinho, com classificação inferior ao desejado pelo consumidor.

A deficiência do cálcio na videira é evidenciada principalmente nas raízes e ramos. Nas partes inferiores da planta, provoca redução no tamanho das raízes, e na parte aérea manifesta paralização ou redução do crescimento dos tecidos

meristemático como os ramos, seguido de atrofiamento e presença de nervuras cloróticas nas folhas novas (Albuquerque et al., 2009). As folhas jovens evidenciam os primeiros sintomas, da ausência deste nutriente, devido a baixa mobilidade na planta.

Giovannini, (1999) afirma que o cálcio absorvido pela cultura forma o pectato de cálcio que é altamente necessário para o crescimento apical dos ramos e raízes, também pode atuar na inibição da toxidez promovida pelo ácido oxálico na cultura da videira. Além de ser essencial para o fortalecimento dos tecidos da parede celular, contra ações causadas por bactérias e fungos (Malavolta, 2006).

Outro nutriente de destaque na videira é o magnésio, que participa na ativação de várias enzimas, atua na transferência de nucleotídeos, e no processo da fotossíntese, tem papel estrutural, participando como elemento central e constituinte do pigmento da clorofila (Silva et al., 2009). Sua ausência na videira mostra o efeito de sintomas com clorose internerval nas folhas basais, e pode apresentar dessecamento da ráquis, além de aparecimento de brotos curtos e cachos com falhas (Malavolta et al 1997).

O enxofre é um nutriente que participa ativamente como essencial no desenvolvimento e crescimento da videira. De uma forma geral participa de reações bioquímicas, sendo elemento chave na síntese de proteína, e sua ausência pode causar deficiência nas folhas mais novas, fato decorrente da baixa mobilidade do elemento na planta, causando queda considerada na produção de frutos e biomassa seca de planta. Pode participar como ativador enzimático, e de acordo com Bezerra (2010) a deficiência aparece nas folhas novas, fato decorrente da baixa mobilidade no floema das plantas (Silva et al., 2009).

De acordo com Brunetto (2007) a fertilização correta visa atender o aporte de nutrientes em quantidades equilibradas e balanceadas no solo, contribuindo de forma direta e acentuada para elevação da produtividade, do rendimento e na qualidade da uva.

Como fonte alternativa em substituição a fertilizantes convencionais pode ser utilizado o biofertilizante produzido a partir de rochas fosfatadas e potássicas, com adição de enxofre elementar S^{*} inoculado com *Acidithiobacillus*, que possui ação comprovada na oxidação de enxofre, com produção de ácido sulfúrico. O uso de biofertilizantes de rochas visa elevar os teores de nutrientes no solo, além de promover aumento de produtividade e na qualidade dos frutos. Diversos trabalhos

evidenciam efeitos satisfatórios de biofertilizantes de rochas em diferentes solos e plantas (Andrade et al., 2009; Stamford et al., 2007a; Lima et al., 2007, Andrade, 2007, Stamford et al., 2008, Stamford et al., 2009, Stamford et al., 2011a, Stamford et al., 2011b, Silva et al., 2011). Os resultados mostraram que aplicação dos biofertilizante de rocha fosfatada, em comparação com os convencionais, promove o crescimento da planta com valores superiores na produção de matéria seca da parte aérea e fornecimento de P disponível no solo.

Moura et al (2007), trabalhando com *Cucumis melo L.*, avaliando o efeito do biofertilizante de rochas potássica e fosfática, em comparação com outros fertilizantes convencionais, encontraram resultados satisfatório no peso médio dos frutos e produtividade, além da elevação nos teores de P, K, Mg e SO_4^{2-} . Stamford et al. (2011a) no cultivo de *Vitis vinifera L.*, no Vale do São Francisco em um Planossolo hidromórfico distrófico, com aplicação de biofertilizantes de rochas com P e K mais enxofre inoculado com *Acidithiobacillus* constataram redução no pH do solo e aumento no incremento de P e K disponível, no Ca, Mg trocável e no S-SO_4^{2-} solúvel.

Stamford et al (2011b) em ensaio de campo com *Vitis vinifera* cv. "Itália" em Planossol distrófico com textura média, em avaliação dos teores nutricionais acumulados nas folhas e frutos com tratamentos de biofertilizante de rochas com K inoculado com *Acidithiobacillus* em comparação aos fertilizantes sóluveis, evidenciaram que o biofertilizante mostraram adequada absorção de K, S-SO_4^{2-} , Fe, no cultivo da uva.

Em busca de melhorar a qualidade do biofertilizante de rochas com P e K, com adição de N total ao produto foi incorporado material orgânico com inoculação de bactéria diazotrófica de vida livre. Lima et al. (2010) encontraram incremento superior a 100% de nitrogênio, após incubação de compostos orgânicos (húmus de minhoca) com bactérias diazotróficas de vida livre (NFB 10001), que promoveu aumento no teor de N total, provavelmente por efeito do processo de fixação biológica do N e também pelo aumento da mineralização.

Já a quitosana que tem ação direta, inibindo microrganismos patogênicos em função de suas propriedades fungistática e fungicida, além de ativar mecanismo de defesa da planta (Mazaro et al., 2008). Coqueiro & Piero (2011) observaram em trabalho *in vitro* o efeito fungistático da quitosana com diferentes pesos moleculares

sobre o crescimento do fungo *Alternaria solani*, em inibição do crescimento e da germinação do micélio.

A quitosana é um polímero natural, podendo ser encontrado nos crustáceos, moluscos e na parede celular de alguns fungos, principalmente da Classe Zygomycetes (Silva et al., 2010; Stamford et al., 2007b). O biopolímero tem comprovada ação na inibição do crescimento do fungo patogênico *Botrytis cinerea*, causador de doenças de uvas “mofo cinzento da videira”, fato revelado independente da concentração utilizada que variou de 0,5 a 2,0% de quitosana (Camili et al., 2007).

Investigações foram realizadas com o biofertilizante de rochas com P e K, com adição da quitosana de crustáceo contribuindo para melhorar na indução de plantas a resistência a patógenos, além de incrementar de nutrientes para as plantas e devido essas propriedades fungicida e fungicida vem recebendo a denominação de bioprotetor (Berger et al., 2010).

A aplicação do bioprotetor com a adição da quitosana fúngica (massa micelial de *Cunninghamella elegans* (UCP 542) que tem promissora potencialidade no combate ao fungo patogênicos de plantas. Fato comprovado cientificamente com trabalho *in vitro* visando avaliar ação antifúngica do fungo patogênico *Pythium*, potente parasítico da cultura do alface (Felix , 2012). Como também atuar como fonte alternativa na liberação de nutrientes para o solo ajudando no incremento da produtividade da cultura.

De acordo com Franco (2011) a quitosana de origem fúngica além de atuar com ação antifúngica pode, pela adição da biomassa fúngica, liberar polifosfato inorgânico e de outros minerais. Desta forma, torna-se necessário a realização de pesquisas que venham acrescentar informações para melhorar a nutrição e proteção das plantas contra fitopatógenos, e contribuir para o sucesso do estabelecimento da videira.

O objetivo do trabalho foi avaliar bioprotetor (P) a partir de rochas (fosfatadas e potássicas) inoculadas com *Acidithiobacillus*, em mistura com húmus de minhoca enriquecido com bactéria diazotrófica de vida livre e com adição de fungo *Cunninghamella elegans* (UCP 542) avaliando os efeitos dos diferentes pesos moleculares da quitosana de camarão (baixo, médio e alto) aplicada em doses crescentes, contra o fungo *Botrytis cinerea* em *in vitro* com a determinação do percentual de inibição em vários tempos de crescimento. Como também a eficiência

agronômica do (F) e do (P) no incremento da nutrição e produtividade da uva cv. Isabel.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRIANUAL (2011): **anuário da agricultura brasileira**. São Paulo: FNP Consultoria e Comércio, 482p.

ALBUQUERQUE, T. S. (2007). Potencial agrícola do solo: fator de nutrição das plantas. Petrolina, PE: Embrapa Semi-Árido. Disponível em: <<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/CPATSA/35799/1/OPB1323p>>.

ALBUQUERQUE, T.C.S. DE; SILVA, D.J.; FARIA, C.M.B. DE; PEREIRA, J.R. Nutrição e adubação. In: SOARES, J.M.; LEAO, P.C. de S. (Ed.).(2009) **A vitivinicultura no Semiárido brasileiro**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica; Petrolina: Embrapa Semi - Árido. p.431 - 480.

ALBUQUERQUE, T.C.S. (1996) **Uva para exportação: aspecto técnico da produção**. Brasília: EMBRAPA, 53 p. (Publicações técnicas FRUPEX, 25).

ANDRADE, I. P. (2007) **Biofertilizante de rochas fosfatadas com enxofre inoculado com Acidithiobacillus na adubação da uva (*Vitis vinifera* L.) em planossolo do vale do São Francisco**. Tese de doutorado em Ciências do Solo, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.2007.

ANDRADE, M. M. M. ; STAMFORD, N.P. ; SOUZA, C. A. ; SILVEIRA, A. C. G. A.; FREITAS, A. D. S. ; SANTOS, C.E. R. S. ; STAMFORD, N. P. (2009) Fertilização mineral e biofertilizante de rochas com Bradyrhizobium e fungos micorrízicos arbusculares em caupi. **Agrária** (Recife. Online), v. 4, p. 289-292.

ANDRADE, M. M. M.; STAMFORD, N. P.; SOUSA, C. A.; SILVEIRA, A. C. G. A.; FREITAS, A. D. S.; SANTOS, C. E. R. S.(2009) Fertilização mineral e biofertilizante de rochas com Bradyrhizobium e fungos micorrízicos

- arbusculares em caupi. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 4, n. 3, p. 289-292.
- ARAI, Y.; SPARKS, D.L.(2007) Phosphate reaction dynamics in soils and soil minerals: A multiscale approach. **Advances in Agronomy**, San Diego, v. 94, p. 135-179.
- BELL, J. S. (1991) The effect of nitrogen fertilization on growth, yield, and juice composition of *Vitis vinifera* cv. Cabernet Sauvignon grapevines. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON NITROGEN IN GRAPES AND WINE, 1991, Washington. Proceeding Washington: **The American Society for Enology and Viticulture**.
- BELL, S. J.; HENSCHKE, P. A. (2005) Implications of nitrogen nutrition for grapes, fermentation and wine. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, Adelaide, v. 11, n. 3, p. 242–295.
- BELL, S. J.; ROBSON, A.(1999) Effect of nitrogen fertilization on growth, canopy density, and yield of *Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 50, p. 351-358.
- BERGER, L.R.R. (2010) **Efeito da quitosana e do biofertilizante-bioBioprotetor na murcha-de-fusário em caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp)**. 74p. (Dissertação de Mestrado) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.
- BRUNETTO, G. (2004) **Absorção e redistribuição do nitrogênio aplicado em plantas de videira**. 74f. (Dissertação de Mestrado) - Mestrado em Ciência do Solo, Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria.
- BRUNETTO, G.; CERETTA, C. A. ; KAMINSKI, L.O. (2007) Aplicação de fertilizantes minerais em videiras na Campanha Gaúcha: produtividade e características químicas do mosto da uva. **Ciência Rural**, v.37, n.2, p. 298-303, mar-abr, 2007.

- BUCCHETTI, B.; INTRIERI, C. (2007) Effetti della carenza di luce sulla via biosintetica dei flavonoidi nelle uve cv. Sangiovese. **Frutticoltura**, Bologna, n. 5.
- CAMILI, E. C.; BENATO, E. A.; PASCHOLATI, S. F.; CIA, P. (2007). Avaliação de quitosana, aplicada em pós-colheita, na proteção de uva 'Itália' contra Botrytis cinerea. **Summa Phytopathologica**, v.33, p.3, p.215-22.
- CHRISTENSEN, L. P.; KASIMATIS, A. N.; JENSEN, F. L. (1978). Grapevine nutrition and fertilization in the San Joaquin Valley. Berkeley: University of California, **Agricultural Science Publication**,40p.
- CHRISTENSEN, P.; KEARNEY. U. C. (2000) Use of tissue analysis in viticulture. **Cooperative Extension Work in Agriculture the University of California**. n. 10, p. 01-09, Dez.
- CONDE, C.; SILVA, P.; FONTES, N.; DIAS, A.C.P.; TAVARES, R.M.; SOUSA, M.J.; AGASSE, A.; DELROT, S.; GERÓS, H. (2007) Biochemical changes throughout grape berry development and fruit and wine quality. **Food**, v.1, p.1-22.
- COQUEIRO; D.S.O.; PIERO; R.M. DI. (2011). Atividade de quitosanas com diferentes pesos moleculares sobre *Alternaria solani*. **Arquivo Instituto Biológico**, São Paulo, v.78, n.3, p.459-463, jul./set.
- COSTA, J. P. V.; BASTOS, A. L.; REIS, L. S.; MARTINS, G. O.; SANTOS, A. F. (2009). Difusão de fósforo em solos de Alagoas influenciada por fontes do elemento e pela umidade. **Revista Caatinga**, v. 22, n. 3, p. 229- 235.
- DECHEN AR; NACHTIGALL GR. (2007). Elementos requeridos à nutrição de plantas. In: NOVAIS RF; ALVAREZ VVH; BARROS NF; FONTES RLF; CANTARUTTI RB; NEVES JCL (eds). **Fertilidade do Solo**. Viçosa: SBCS/UFV. p. 92-132.

- DELGADO, R.; MATÍN, P.; ÁLAMO, M.; GONZÁLEZ, M. R. (2011) Changes in the phenolic composition of grape berries during ripening in relation to vineyard nitrogen and potassium fertilisation rates. **Journal of the Science of Food and**. Acesso: 10 de Julho de 2011.
- DONATI, G. L. (2002) **Effetto Del potássio e dell irrigazione sullo stato nutrizionale della vite (cv. Trebbiano Romagnolo) e sulla qualita delle uve**. 2002. 73 p. Tesi - Corso di Laurea in Scienze e Tecnologie Agrarie, Università degli Studi di Bologna.
- DONATI, G. L. (2004) **Effetto Del potássio e dell irrigazione sullo stato nutrizionale della vite (cv. Trebbiano Romagnolo) e sulla qualita delle uve**. EL GHAOUTH, A.; ARUL, J.; WILSON, C.; BENHAMOU, N. Ultrastructural and FARRA, C.M.B.. et al. (2004) Cultivo da videira . Petrolina: EMBRAPA Semi-árido, 102 p.
- FARRA, C.M.B.; SOARES, J. M.; LEÃO, P. C. S. (2004) Adubação verde com leguminosas em videira no Submédio São Francisco. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, n. 28 p. 641-648, 2004.
- FRANCO, L.O., ALBUQUERQUE, C.D.C., STAMFORD, N. P., LIMA, M.A.B., TAKAKI, G.M.C.(2011). Avaliação da atividade ácida e alcalina e acúmulo de fosfato inorgânico em amostras de *Cunninghamella elegans*. **Analytica**, v.54, p.70 – 78. 2011.
- FREGONI, M. (1980). Nutricione e fertilizzazione della vinha. **Edagricole**. p. 400-418.
- GIOVANNINI, E. Cultivares. In: GIOVANNINI, E. (Ed.).(1999). Produção de uvas para vinho, suco e mesa. Porto Alegre: **Ed.Renascença**, Cap.7, p.81-132.
- GRIGOLETTI Jr., A.; SÔNEGO, O.R.(1993) Principais doenças fúngicas da videira no Brasil. Bento Gonçalves. **EMBRAPA-CNPUV**, 36p.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA.(2012) Banco de dados. Disponível em: <[http:// www.sidra.ibge.gov.br/](http://www.sidra.ibge.gov.br/)>. Acesso em 10 jun. 2012.

JACOBS, A. (2002). A Balanced Approach To Vine Nutrition. Cooperative Research Centre for Viticulture. **Viticare News**. v .3, Nov. série 11. p. 01-06.

KELLER, M.; KUMMER, M.; VASCONCELOS, M. C. (2001) Reproductive growth of grapevines in response to nitrogen supply and rootstock. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, Adelaide, v. 7, p. 12-18.

KELLER, M; HRAZDINA, G.(1998). Interaction of nitrogen availability during bloom and light intensity during veraison. II. Effects on anthocyanin and phenolic development during grape ripening. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v.49, p.341-349.

LAM, H. M.; COSCHIGANO, K. T.; OLIVEIRA, I. C.; MELO-OLIVEIRA, R.; CORUZZI, G. M. (1996). The molecular-genetics of nitrogen assimilation into amino acids in higher plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 47, p. 569-593.

LEÃO, A. B.; ANDRADE, A.R.S.A.; CHAVES, L. R.S.; CHAVES, I. B.; GUERRA, H.O.C. Variabilidade espacial de fósforo em solo do perímetro irrigado Engenheiro Arcoverde, PB. **Revista Ciência Agronômica**, v. 38, n. 01, p. 1-6, 2007.

LEAO, P.C. de S.; RODRIGUES, B.L. Manejo da copa. In: SOARES, J.M.; LEÃO, P.C. de S. (Ed.). (2009). A vitivinicultura no Semiárido brasileiro. Brasília: **Embrapa Informação Tecnológica**; Petrolina: Embrapa Semi-Árido, p.295-347.

LIMA, F. S., STAMFORD, N. P., SOUSA, C. S., LIRA JUNIOR, M. A., MALHEIROS, S. M. M., STRAATEN, P.(2010) Earthworm compound and rock biofertilizer

- enriched in nitrogen by inoculation with free living diazotrophic bacteria. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.26, p.1769 – 1775.
- LIMA, R. C. M., STAMFORD, N. P., LIRA JUNIOR, M. A., SANTOS, C. E. R. S & DIAS, S. H. L.(2007) Eficiência e efeito residual de biofertilizantes de rochas 368 com PK com *Acidithiobacillus* em alface cultivada no cariri cearense. **Brazilian Journal of Horticulture**, Brasília 25, 402-407.
- MALAVOLTA, E. (2004) **Absorção, transpote e redistribuição de potássio na planta**. Piracicaba: POTAFOS. Informações Agronômicas, n. 108. 16 pg.
- MALAVOLTA, E. (2006) **Manual de nutrição mineral de plantas**. Sao Paulo. Ceres. 638p.
- MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S. A.(1997) **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações**. Piracicaba: Potafos, 319 p.
- MARSCHNER, H. (1995) Mineral Nutrition of higher plants. 2.ed. San Diego: **Academic Press**, 889p.
- MAZARO, S. M.; DESCHAMPS, C.; MAY DE MIO, L. L.; BIASI, L. A.; GOUVEA, A. de; SAUTTER, C. K. (2008) Comportamento pós-colheita de frutos de morangueiro após a aplicação pré-colheita de quitosana e acibenzolar-s-metil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 30, n. 1, p. 185-190.
- MAZARO, S.M., DESCHAMPS, C., MAY-DE MIO, L.L., BIASI, L.A., GOUVEA A., SAUTTER, C.K. (2008) Comportamento pós-colheita de frutos de morangueiro após a aplicação pré-colheita de quitosana e acibenzolar-S-metil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, 30:185- 190.
- MELO, G. W. (2005) **Adubação e manejo do solo para a cultura da videira**. Rio Grande do Sul: EMBRAPA-CNPV, 56 p.

- MENDONÇA, J.F.B. (2010) **Solo: substrato da vida** / José Francisco Bezerra Mendonça. 2ª Ed.-Brasília: Embrapa Informação Tecnológica , 129 p.
- MIELE, A, RIZZON, L. A., GIOVANNINI, E. (2009) Efeito do porta-enxerto no teor de nutrientes em tecidos da videira 'Cabernet sauvignon'. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 31, n. 4, p. 1141-1149.
- MOURA, P. M.; STAMFORD, N. P.; DUENHAS, L. H.; SANTOS, C. E. R. S.; NUNES, G. H. de S. (2007) Eficiência de biofertilizantes de rochas com *Acidithiobacillus* em melão, no Vale do São Francisco. **Revista Brasileira Ciências Agrárias**, Recife, v.2, n.1, p.1-7, 2007.
- ORTIZ-LOPEZ, A.; CHANG, H. C.; BUSH, D. R.(2000) Amino acid transporters in plants. **Biochimica et Biophysica Acta**, n. 1465, p. 275-280.
- PASSOS, L. P.; TRINTIN, P. L. (1982) **Resposta da videira à variação da época de poda seca: V. efeitos na qualidade do fruto da cv. Cabernet Franc. Bento Gonçalves**: Embrapa–CNPUV, 4p (Pesquisa em Andamento, 8).
- RAIJ, B. VAN.(1991) Fertilidade do solo e adubação. São Paulo: **Agronômica Ceres**, 1991. 343p.
- RIZZON, L. A.; MIELE, A. (2004) Avaliação da cv. Tannat para elaboração de vinho tinto. **Ciência Tecnologia de Alimentos** , vol.24 no.2 Campinas Apr./June.
- RIZZON, L. A.; MIELE, A.; MENEGUZZO, J.(2000) Avaliação da uva cv. Isabel para a elaboração de vinho tinto. **Ciência Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.20, n.1, p.115-121.
- SILVA R.C, ANDRADE JR. M.A.S, CESTARI, A.R. (2010) **Química Nova**, v.33, n.4,p. 880.

SILVA, M. O.; STAMFORD, N.P.; AMORIM, L.B. de; ALMEIDA JÚNIOR, A.B. de; SILVA, M. O. (2011) Diferentes fontes de P no desenvolvimento do meloeiro e disponibilidade de fósforo no solo. **Revista Ciências Agronômicas**, vol.42, n.2, pp. 268-277.

SILVA, M.C.F.; STAMFORD, T.C.M.; FRANCO, L.O.F.; CAMPOS-TAKAKI, G.M. (2006) Effect of salinity and glucose on chitin and chitosan production by *Cunninghamella elegans*. **Asian Journal of Chitin**, 2, 29-38.

SILVA, P.C.G. da; CORREIA, R.C.; SOARES, J.M. Histórico e importância socioeconômica. In: SOARES, J.M.; LEÃO, P.C. de S. (Ed.) (2009). A vitivinicultura no Semiárido brasileiro. Brasília: **Embrapa Informação Tecnológica**; Petrolina: Embrapa Semi-Árido. p.21-34.

SMART, R. E.; ROBINSON, J. R.; DUE, G. R.; BRIEN, C. J.(1985) Canopy microclimate modification for the cultivar Shiraz II. Effects on must and wine composition. **Vitis**, Siebeldingen, v. 24, p. 119-128.

SOUZA LEÃO, P. C. de S; SOARES, J. M.; FARIA, T.P.(2004) **Uva de mesa produção** (Aspectos técnicos). Petrolina: Embrapa, Semi-árido,p.128. (Frutas do Brasil n.13).

SRINIVASAN, C.; MULLINS, M.G. (1981) Physiology of flowering in the grapevine - A review. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v.32, n.1, p.47-63.

STAMFORD NP; SANTOS PR; SANTOS CERS; FREITAS ADS; DIAS SHL LIRA JÚNIOR MA. (2007a). Agronomic effectiveness of biofertilizers with phosphate rock, sulphur and *Acidithiobacillus* in a Brazilian tableland acidic soil grown with yam bean. *Bioresource Technology* 98: 1311-1318.

STAMFORD, N. P.2009STAMFORD, N. P., MOURA, P.M., LIRA JÚNIOR, M. A., SANTOS, C. E. R. E. S., DUENHAS, M. L., GAVA, C.A.T. (2009) Chemical

- Attributes of an Argissol of the San Francisco Valley After melon Growth with P and K Rock Biofertilizers. **Horticultura Brasileira** (Impresso), v.27, p.442 - 447.
- STAMFORD, N. P., SANTOS, P. R., SANTOS, C. E. R. S., FREITAS, A. D. S., DIAS, S. H. L., LIRA JUNIOR, M. A. (2007) Agronomic effectiveness of biofertilizers with phosphate rock, sulphur and *Acidithiobacillus* in a Brazilian tableland acidic soil grown with yam bean. **Bioresour Technol.** 98:1311–1318.
- STAMFORD, N.P., ANDRADE, I. P. , SILVA JÚNIOR, S., LIRA JÚNIOR, M., SANTOS, C.R. S., FREITAS, A. S., VAN STRAATEN, P. (2011a) Soil properties and grape yield affected by rock biofertilisers with earthworm compound, **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, 11 (4), 15-25.
- STAMFORD, N.P., ANDRADE, I. P. , SILVA JÚNIOR, S., LIRA JÚNIOR, M., SANTOS, C.R. S., FREITAS, A. S., VAN STRAATEN.(2011b) Nutrient uptake by grape in a Brazilian soil affected by rock biofertilizer, **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, 11 (4), 79-88.
- STAMFORD, T. C. M.; STAMFORD, T. L. M., FRANCO, L. O. (2008). Produção, propriedades e aplicações da quitosana na agricultura e no ambiente in Figueiredo, M. V. B; Burity, H. A.; Stamford, N. P.; Santos, C. E. R. S.(2008) *Microrganismos e Agrobiodiversidade: o novo desafio para a agricultura*. 1 ed, Guaíba: **Agrolivros**, 568 p.
- STAMFORD, T.C.M.; STAMFORD, T.L.M.; STAMFORD, N.P.; NETO, B.B.; CAMPOS-TAKAKI, G.M. (2007b). Growth of *Cunninghamella elegans* UCP 542 and production of chitin and chitosan using yam bean medium. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 10, p. 1-8.
- TAIZ, L. & ZEIGER, E.(2006). *Fisiologia vegetal*. **3a Ed. Artmed**. Porto Alegre.
- TESI (2002) **Corso di Laurea in Scienze e Tecnologie Agrarie**, Università degli Studi di Bologna, 73p.

ZOECKLEIN, B.W.; FUGELSANG, K.C.; GUMP, B.H.; NURY, F.S. Análisis y producción de vino. Zaragoza. **Acribia**. 613 p. 2001.

CAPÍTULO I

CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADE INIBITÓRIA DA QUITOSANA COM DIFERENTES PESOS MOLECULARES CONTRA *BOTRYTIS CINEREA*

Artigo enviado para a Revista “**Journal of Polymers and the Environment**”

RESUMO

Ensaio em laboratório (placas de Petri) foram realizados com o objetivo de caracterizar e avaliar os efeitos de quitosana extraída da carapaça de camarão com diferentes pesos moleculares (baixo, médio e alto) contra o fungo patogênico *Botrytis cinerea* causador da “podridão cinzenta” em frutos de uva. Análises foram realizadas em diferentes tempos de crescimento do fungo (0, 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas), submetido a concentrações crescentes de quitosana. A quitosana foi previamente submetida a desacetilação (ChAD) para obter 80 a 98% de grau de desacetilação. No processo de despolimerização foram usadas duas concentrações de peróxido de hidrogênio (5% e 15%) modificando o peso molecular de $5,6 \cdot 10^5 \text{ g mol}^{-1}$ a $1,6 \cdot 10^3 \text{ g mol}^{-1}$. A quitosana foi caracterizada e em seguida avaliada contra o crescimento do fungo patogênico da uva. A quitosana de camarão com baixo, médio e alto peso molecular foi obtida da Sigma-Aldrich®, caracterizada por espectrometria vibracional na região infravermelha, grau de desacetilação (determinado utilizando duas técnicas (RMN ^1H e análise elementar), e estimada a massa molar através da medida da viscosidade. Após a repicagem do patógeno foi determinada a atividade inibitória da quitosana com diferentes pesos moleculares, durante o crescimento do fungo, medida pelo diâmetro do halo (mm), e procedida a avaliação da atividade antifúngica até o fungo atingir o crescimento máximo na placa. Os melhores resultados da atividade inibitória do crescimento do fungo (88,2 %) foram com aplicação da quitosana de médio peso molecular, mostrando máximo crescimento fúngico na concentração $3,75 \text{ mg mL}^{-1}$. Não foi obtida inibição completa máxima (100%) do desenvolvimento do crescimento do fungo *B. cinerea*, entretanto houve efeito fungistático ao invés de fungicida. Os resultados demonstram que a quitosana pode ser utilizada como alternativa contra o fungo patogênico *Botrytis cinerea*, causador da doença “podridão cinzenta” em frutos de uva.

Palavras-chave: Análises da quitosana; biopolímeros; inibição de crescimento; efeitos do peso molecular; fungo patogênico; grau de desacetilação

Characterization and inhibitory activity of chitosan with different molecular weights against *Botrytis cinerea*

ABSTRACTS

Assays were conducted in laboratory (Petri dishes) with the aim to evaluate the effects of chitosan from shrimps with different molecular weight (Low, medium and height) against *Botrytis cinerea* which promote the gray mold disease in grape fruits. The fungi grown in several growth times (0, 24, 48, 72, 96, 120, 144 and 168h) and was submitted to crescent concentration rates of chitosan. Chitosan was subjected to deacetylation (ChAD) to obtain 80% to 98% deacetylation degree. The depolymerization process used two concentrations of hydrogen peroxide (5% to 15%) and changed the viscosimetric molecular weight (ChC) of $5.6 \times 10^5 \text{ g mol}^{-1}$ to $1.6 \times 10^3 \text{ g mol}^{-1}$. The chitosan was previously characterized and followed tested against the fungi pathogen for grapes. The chitosan (low, medium and high molecular weight) were purchased from Sigma-Aldrich® and characterized by vibratory spectroscopy (infrared region), deacetylation degree analyzed by two different techniques (RMN ^1H and elementary analyzes), and molar mass estimated using the viscosity measurement. After the pathogen replication was determined the inhibition activity of the different chitosan during fungi growth, by measure of the halo diameter (mm), and proceeded to evaluate the activity until the fungus reaches the maximum growth in the plates. The Best results of inhibitory activity were obtained when applied chitosan with medium molecular weight (88,2 %) and showed the maximum antifungal capacity in chitosan concentration $3,75\% \text{ mg mL}^{-1}$. The maximum effect on the fungi pathogenic growth (100% of inhibition activity) was not observed but the results demonstrate that chitosan may be used as alternative against the fungi pathogenic *Botrytis cinerea*.

Keywords: biopolymers; chemical analyzes of chitosan; desacetylated degree; effects of molecular weight; fungi pathogen; growth inhibition; pathogenic growth.

INTRODUÇÃO

A quitosana é um polímero natural, cujo monômero são N-acetilglucosamina e a D-glicosamina através de ligação β 1,4 ligadas, com potencialidade para aplicação em diversos setores da economia (Chatterjee et al. 2005). A quitosana é encontrada na natureza fazendo parte da parede celular de alguns fungos, particularmente da Classe *Zygomycetes* e em alguns moluscos (Silva et al. 2006). Usualmente a quitosana é obtida da desacetilação da quitina de crustáceos, sob condições alcalinas, com os grupos N-acetil submetidos a vários graus de desacetilação (Synowiecki & Al-Khatteb 2003; Tharanathan and Kittur 2003). O produto obtido raramente alcança completo grau de desacetilação, tendo em vista que a reação de desacetilação leva muito tempo para ser realizada totalmente, e durante este tempo a despolimerização chega ao final da cadeia da quitosana (Tolaimate et al. 2003).

A quitosana possui propriedades específicas que mostram grande potencial para inúmeras aplicações em vários produtos comerciais, especialmente devido a sua biocompatibilidade, biodegradabilidade e reatividade do grupo amínico (Fai et al. 2008; Synowiecki & Al-Khatteb 2003). Tais propriedades possibilitam que a quitosana possa ser utilizada em várias aplicações, como ação antimicrobiana (Kong et al 2010, Feng & Xia 2011). De acordo com Badawy & Rabea (2008) a quitosana pode promover efeito inibitório antifúngico, com ação mais acentuada sobre *B. cinerea* a medida que diminui o seu peso molecular.

O fungo *Botrytis cinerea* causador da podridão cinzenta da uva é responsável pela redução na produtividade com a destruição das bagas e perdas total dos cachos, além de provocar a redução na qualidade dos vinhos por alterando a composição química do mosto com a redução do açúcar simples e aumento de enzimas que catalizam a oxidação de compostos fenólicos no processo de vinificação (Meneguzzo, 2006).

Como um fator importante que tem grande influência na produtividade e na qualidade dos cultivos econômicos tem sido considerado a resistência das plantas a doenças.

Para melhorar a resistência das plantas contra doenças fungicas é necessário serem avaliados novos produtos que não promovem problemas para as plantas e para a qualidade do ambiente, e em especial com referência à nutrição humana e animal (Amorim et al. 2001, 2006).

Em estudos recentes a quitosana tem demonstrado sua importância como produto que induz mecanismos de defesa da planta contra doenças, especialmente as causada por fungos, e como principal hipótese tem sido sugerido que o biopolímero altera a permeabilidade da membrana plasmática (Benhamou 1996) e também promove estresse oxidativo no fungo patogênico (Di Piero & Garda 2008). Ensaio de laboratório conduzidos em placas de Petri corroboraram a ação antibiótica da quitosana em diferentes microrganismos tais como, *Salmonella enterica*, *Pseudomonas aeruginosa* (Yavad et al. 2004), *Bacillus cereus*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Helminthosporium* sp. (Costa Silva et al. 2006), *Fusarium oxysporum* f.sp. *chrysanthemi* (Pinto et al. 2010).

Considerando que as propriedades da quitosana são intrinsecamente relacionadas com o grau de desacetilação e com o peso molecular, este trabalho visa avaliar a influência da desacetilação e despolimerização da quitosana, e principalmente os efeitos dos diferentes pesos moleculares da quitosana de camarão (baixo, médio e alto) aplicada em doses crescentes, contra o fungo *Botrytis cinerea* que causa a podridão cinzenta em frutos da uva, com determinação da atividade antifúngica em vários tempos de crescimento.

MATERIAIS E MÉTODOS

Efeito antifúngico da quitosana

Ensaio foram conduzidos em laboratório (placas de Petri) com o objetivo de avaliar o efeito da quitosana de camarão com diferentes pesos molecular, pela determinação da atividade inibitória do fungo *Botrytis cinerea* em vários tempos de crescimento (0, 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168h) submetido a adição de doses crescentes de quitosana. A quitosana com diferentes pesos moleculares foram da Sigma-Aldrich® com grau de desacetilação de 80% e pureza 85%. O pH do meio BDA (Batata dextrose Agar) foi ajustado para 5,6 com NaOH 1M, apresentando concentração final de quitosana de 0; 0,2 ; 0,4 ; 0,8 ; 1,1 ;1,5 ;1,9 ;2,3 e 3,8 mg mL⁻¹, seguindo a metodologia modifica por Di Piero & Garda (2008). Usou-se um controle absoluto (CA) onde foi utilizado apenas meio BDA, e um controle relativo (CR)

aplicando ácido acético substituindo a quitosana. Todos os tratamentos foram realizados em cinco repetições.

Na preparação do gel de quitosana foi preparado primeiramente (1L) de solução aquosa de ácido acético a 0,5% (v/v) em água deionizada, para serem utilizados como solvente de quitosana. Quantidades pré-definidas das amostras de quitosana (baixo, médio e alto peso molecular) foram cuidadosamente pesadas e vagarosamente adicionadas a uma solução de acética a 0,5%, sob agitação com auxílio de um agitador magnético para evitar a formação excessiva de grumos, de forma que se obtivessem ao final um gel de quitosana a 2,0%. Utilizou-se becher de 250mL envolvido com filme PVC e manteve-se o sistema quitosana- solução acética sob rotação constante de 300 rpm, à temperatura ambiente durante 24h para garantir a dissolução completa do biopolímero.

O Gel de quitosana foi ajustado o pH para 5,6 (NaOH a 1 %) e com o meio BDA foram esterilizados separadamente em autoclave (120°C por 20 min)., visando evitar contaminação. Após a esterilização a quitosana (baixo, médio e alto peso molecular) e o meio BDA foram combinados e colocados em placas de Petri nas concentrações finais 0,0; 0,19; 0,38; 0,75; 1,13; 1,5; 1,88; 2,25 e 3,75 mgmL⁻¹.

Em seguida, após 96 horas de crescimento em BDA a 26°C, sob luz constante, disco (0.5cm diâmetro) com cultivo recente de *B. cinerea* foi colocado no centro de cada placa de Petri com adição de quitosana com as diferentes doses.

Após o inóculo do patógeno foi determinada a inibição através de avaliações realizadas por medições diárias do diâmetro do halo das colônias (mm) (média de duas medidas diametralmente opostas), 24 horas, após a instalação do experimento e durou até o momento em que as colônias fúngicas alcançou o máximo de crescimento na superfície do meio de cultura nas placas. Para o cálculo da porcentagem de inibição do crescimento micelial (PIC), segue metodologia aplicada por Bastos (1997), com aplicação da fórmula:

$$PIC = \left(\frac{\text{crescimento testemunha} - \text{crescimento tratamento}}{\text{crescimento testemunha}} \times 100 \right)$$

Caracterização da quitosana de médio peso molecular

A quitosana utilizada foi extraída de exoesqueletos de camarão (Sigma-Aldrich®) com viscosidade, fornecida pelo fabricante maior que 200000 capsúlas. Entretanto, para confirmação do grau de desacetilação, foi realizada a caracterização da quitosana de médio peso molecular, que apresentou os melhores resultados por diversas técnicas. A característica estrutural da quitosana foi observada por espectroscopia vibracional na região do infravermelho, o grau de desacetilação foi determinado utilizando duas técnicas (RMN ^1H e análise elementar).

A espectroscopia vibracional foi determinada na região do infravermelho por espectrofotometria com transformada de Fourier da Bruker (modelo IF66), de acordo com a metodologia descrita por Signimi e Campana Filho (1998). A análise do Grau de desacetilação foi procedida por Ressonância Magnética Nuclear com os espectros de RMN ^1H obtidos de acordo com Signini et al. (2000).

A espectroscopia na região do infravermelho

A espectroscopia na região do infravermelho permite observar e classificar algumas bandas relativas a vibrações características dos grupos funcionais presentes na estrutura da quitosana. As bandas observadas nos espectros da quitosana comercial de médio peso (QCM) e suas respectivas atribuições foram para intensidade e n° de anéis, respectivamente: Anéis piranosídicos - 0,675 e 1099 cm^{-1} ; (C-CH₂ - OH) C-O - 0,783 e 1384; amida_{C-N} - 0,787 e 1423; amida II_{NH} - 0,781 e 1598; amida I_{C=O} - 0,780 e 1594; C-H - 0,650 e 2923; O-H - 0,474 e 3448; amina_{NH} - 0,474 e 3448.

Os espectros obtidos para a quitosana comercial de médio peso molecular (QMC) mostram respectivamente um pico largo em 3448,09 e 3444,06 cm^{-1} , na região correspondente ao estiramento OH. Os picos em 2923,56 e 2891,42 cm^{-1} representam o estiramento C-H alifático da amostra. Os picos em 1594,84 e 1641,18 cm^{-1} correspondem ao grupo amina acetilado da quitina indicando que a amostra não está totalmente desacetilada (Figueiredo, 2002). Anjos (2005) especifica este pico em torno de 1655 cm^{-1} como sendo referente à banda de deformação axial C=O (amida I) e o modo vibracional da deformação angular da ligação N-H (amida II)

aparece como um ombro em 1607 cm^{-1} . Os picos em $1384,64$ e $1324,91\text{ cm}^{-1}$ representam respectivamente o estiramento C-O do grupo alcoólico primário ($-\text{CH}_2 - \text{OH}$) da amostra. A deformação axial de C-N da amida aparece em $1423,21$ e $1430,34\text{ cm}^{-1}$ para as quitosanas Aldrich do fabricante. A banda intensa entre 800 e 1200 cm^{-1} está relacionada aos anéis piranosídicos (Shigemasa et al., 1996).

O grau de desacetilação é considerado um dos principais parâmetros na caracterização da quitina e da quitosana, e é definido como sendo o número de grupos amina em relação ao número de grupos amida da cadeia polimérica. Entre os métodos propostos para a determinação os mais usados são: espectroscopia no infravermelho (ultravioleta, RMN ^1H , RMN ^{13}C), análise elementar e titulações potenciométrica e condutimétrica. A Figura 1 mostra o espectro de RMN ^1H para a Quitosana Aldrich.

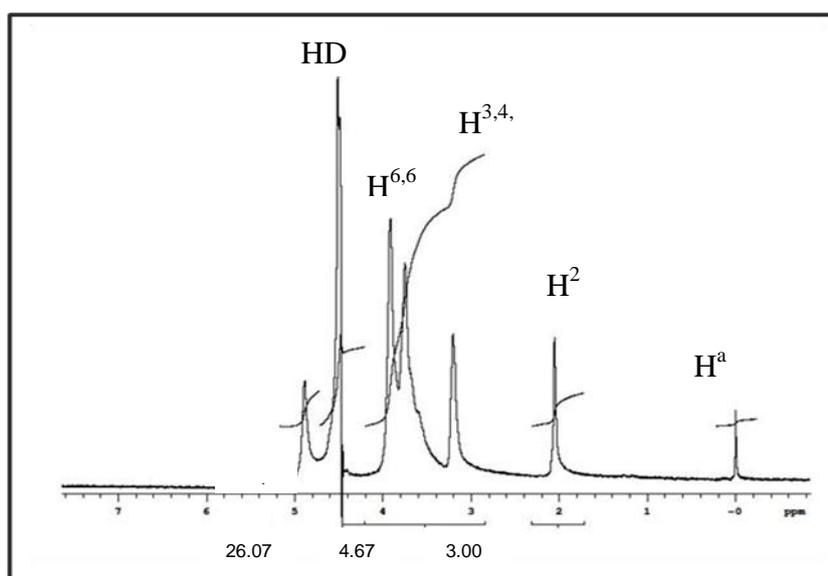


Figura 1. Espectro de ressonância magnética nuclear (RMN) da quitosana (Aldrich)

Os valores dos graus de desacetilação variaram muito pouco, sendo pela equação 1 igual a 80% e pela equação 2 igual a 79%. O grau de desacetilação foi calculado pela equação 1, utiliza os sinais dos prótons H^2 , H^3 , H^4 , H^5 , H^6 , H^6' (H^{2-6}) de ambos os monômeros e o pico referente aos núcleos do hidrogênio do grupo acetamido (H^{ac}).

$$GD(\%) = \left(1 - \left(\frac{1}{3} H^{\text{ac}} / \frac{1}{6} H^{2-6} \right) \right) \times 100 \quad (\text{Eq.1})$$

A equação 2, proposta por Signini e Campana Filho (2000), utiliza a área do pico na região de 2ppm atribuído aos núcleos de hidrogênio do grupo acetoamido (H^{ac}) e a área do pico em 3,4ppm referente ao núcleo de hidrogênio na posição 2 do anel glicopiranosídico (H^2).

$$GD\% = \left(1 - \left(\frac{H^{ac}}{3H^2} \right) \right) \times 100 \quad (\text{Eq.2})$$

A determinação do grau de desacetilação da quitosana pela análise elementar, apesar de ser um método preciso, deve ser usado com muita cautela em virtude dos diferentes teores de hidratação, que variam de acordo com as condições de armazenamento e tratamento prévio da amostra. A equação 3, foi proposta por Kassai et al.(2000), para determinar o grau de desacetilação da quitosana, em função da relação entre carbono e nitrogênio, a qual pode ser obtida pela análise elementar.

$$GD\% = \left(1 - \frac{(C/N) - 5,145}{6,816 - 5,145} \right) \times 100 \quad (\text{Eq.3})$$

Onde C/N é a razão de carbono/nitrogênio. Esta razão, de acordo com Kassai et al. (2000), varia de 5,145 em quitosana completamente desacetilada (monômero da quitosana) a 6,816 em quitina inteiramente acetilada (monômero da quitina). O grau de desacetilação encontrado na amostras de quitosana analisada foi calculado de acordo com a tabela 1.

Este método só apresenta resultado preciso para quitosana sem resíduos de proteínas, caso contrário, é necessária a purificação. No trabalho não foi preciso purificar a amostra tendo em vista que o resultado da análise elementar foi semelhante a da ressonância magnética nuclear de hidrogênio.

Tabela 1. Percentuais de carbono, nitrogênio, hidrogênio, a relação carbono / nitrogênio e o grau de desacetilação das amostras de quitosana Aldrich do fabricante (QC).

Quitosana	C %	N %	H %	C/N	GD%
QC	39.01	7.12	10.58	5.478	80%

As propriedades físico-químicas da quitosana dependem não somente do grau de desacetilação, mas também da sua massa molar média. A determinação da massa molar média de polímeros pode ser realizada por cromatografia de permeação em gel (GPC) ou por medida da viscosidade.

A cromatografia de permeação em gel também chamada de cromatografia de exclusão de tamanho é o método mais utilizado para a determinação da distribuição da massa molar de polímeros (Stevens, 1999). Uma coluna cromatográfica separa as frações cujas massas molares apresentam pequena variação. No caso da quitosana, tem sido discutido o efeito da natureza química dos padrões de calibração sobre a determinação de massa molar por GPC. Alguns artigos mostram que os melhores resultados são obtidos através de padrões de calibração da própria quitosana (Tsaih e Chen, 1999). Entretanto, a maior dificuldade surge da inexistência de amostras comerciais desses padrões. Assim, para a determinação da massa molar média da quitosana utilizada, realizou-se medida da viscosidade.

A viscosidade intrínseca da quitosana foi encontrada pela extrapolação do gráfico de viscosidade reduzida versus concentração à diluição infinita, com base na equação de Huggins (1942) mostrada abaixo:

$$\eta_{\text{red}} = [\eta] + K_H [\eta]^2 C \quad (\text{Eq. 4})$$

No presente trabalho o solvente utilizado foi o ácido clorídrico na temperatura de 25°C o qual apresenta os valores de $1,81 \times 10^{-5}$ e 0,93 para K e a , respectivamente.

$$[\eta] = K \left(\bar{M}_v \right)^a \quad (\text{Eq. 5})$$

A quitosana usada apresentou viscosidade intrínseca = $3,828 \text{ mL g}^{-1}$ e massa molar média = $5,6 \times 10^5 \text{ g mol}^{-1}$. A massa molar média da quitina está entre $1,03 \times 10^6$ a $2,5 \times 10^6 \text{ g mol}^{-1}$, mas na obtenção da quitosana pela reação de desacetilação este valor foi reduzido de 5×10^5 para $5 \times 10^4 \text{ g mol}^{-1}$. O valor da massa molar média da quitosana utilizada está de acordo com resultados relatados na literatura por Santos et al. (2003) e Anjos, (2005).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Atividade antifúngica

Os efeitos da quitosana (baixo, médio e alto peso molecular) na inibição do crescimento do fungo patogênico *Botrytis cinerea* em diferentes tempos estão apresentados nas tabelas 1, 2 e 3, respectivamente.

Tabela 2. Atividade inibitória da quitosana (baixo peso molecular) contra *Botrytis cinerea* em diferentes tempos de crescimento do fungo (h) em meio de cultura BDA (5 repetições).

Treatamento	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	120 horas	144 horas	168 horas
mg mL ⁻¹	Inibição (%)						
Q 3,75	54,2 ^A ± 0,48	60,0 ^A ± 0,39	62,8 ^A ± 0,47	70,1 ^A ± 0,45	80,6 ^A ± 0,45	79,9 ^A ± 0,03	78,6 ^A ± 0,22
Q 2,25	47,3 ^B ± 0,24	54,0 ^{AB} ± 0,26	57,2 ^{AB} ± 0,23	65,6 ^B ± 0,25	77,7 ^{AB} ± 0,25	79 ^{AB} ± 0,12	76,7 ^A ± 0,12
Q 1,88	43,5 ^B ± 0,24	50,6 ^{BC} ± 0,24	54,1 ^{BC} ± 0,25	63,1 ^B ± 0,24	76,1 ^B ± 0,24	75,3 ^{AB} ± 0,10	73,0 ^A ± 0,12
Q 1,50	41,9 ^B ± 0,48	49,3 ^{BC} ± 0,47	52,9 ^{BC} ± 0,42	62,1 ^{BC} ± 0,47	75,5 ^B ± 0,47	74,5 ^B ± 0,24	72,7 ^A ± 0,00
Q 1,13	41,6 ^B ± 0,35	46,3 ^C ± 0,12	49,2 ^C ± 0,01	57,9 ^C ± 0,12	66,5 ^C ± 0,12	69,7 ^C ± 0,02	66,5 ^{AB} ± 0,12
Q 0,75	29,3 ^C ± 0,35	35,0 ^D ± 0,12	39,9 ^D ± 0,01	43,0 ^D ± 0,12	55,3 ^D ± 0,12	52,7 ^D ± 1,89	52,8 ^{BC} ± 0,35
Q 0,38	27,0 ^C ± 0,82	26,6 ^E ± 0,24	26,0 ^E ± 1,06	22,8 ^E ± 0,24	29,4 ^E ± 0,24	27,1 ^E ± 3,65	38,9 ^C ± 0,59
Q 0,19	15,6 ^D ± 0,12	17,0 ^F ± 1,06	11,1 ^F ± 0,35	8,9 ^F ± 1,18	23,6 ^F ± 1,18	10,2 ^F ± 0,11	11,4 ^D ± 0,12
Q CA	0,0 ^E ± 0,71	0,0 ^G ± 0,24	0,0 ^G ± 0,82	0,0 ^G ± 0,04	0,0 ^G ± 0,04	0,0 ^G ± 0,12	0,0 ^E ± 0,07
Q CR	9,1 ^E ± 0,41	12,6 ^G ± 0,40	5,5 ^G ± 1,06	0,9 ^G ± 0,24	10,1 ^G ± 0,24	3,0 ^G ± 0,59	0,0 ^E ± 0,03
CV (%)	7,50	6,62	7,24	4,70	2,05	3,48	9,80

(*) Nas colunas, as médias seguidas de mesma letra, não diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey(p ≤ 0,05%).

De uma maneira geral a quitosana de camarão (Sigma) mostrou satisfatória atividade antifúngica contra *Botrytis cinerea* agente etiológico da doença “podridão cinzenta” dos frutos da uva e mostrou ser dependente da concentração da dose de aplicação do meio específico, e o efeito inibitório também mostrou estar relacionado com o tempo de crescimento do fungo.

Observou-se efeito diferenciado de acordo com o peso molecular da quitosana aplicada. A quitosana de camarão, de uma maneira geral, mostrou que aplicada na dose de 1,9 a 3,8 mg mL⁻¹ teve efeito antifúngico contra *Botrytis cinerea*. O crescimento fúngico apresentou pequena diferença comparando com o tratamento controle relativo (com ácido acético substituindo a quitosana). Para o controle absoluto, como esperado, não houve inibição, em todos os ensaios. Observou-se que a concentração final de quitosana com 0,2 mg.mL⁻¹) desenvolveu baixa

atividade fungicida contra *B. cinerea*, quando aplicada a quitosana com peso molecular médio.

Tabela 3. Atividade inibitória da quitosana (médio peso molecular) contra *Botrytis cinerea* em diferentes tempos de crescimento do fungo (h) em meio de cultura BDA (5 repetições).

Tratamento	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	120 horas	144 horas	168 horas
mg ml ⁻¹	Inibição (%)						
Q 3,75	74,1 ^A ± 0,16	81,3 ^A ± 0,13	65,5 ^A ± 0,11	75,9 ^A ± 0,12	78,4 ^A ± 0,41	84,5 ^A ± 0,05	88,2 ^A ± 0,44
Q 2,25	74,1 ^A ± 0,21	81,3 ^A ± 0,23	58,9 ^B ± 0,47	72,2 ^B ± 0,71	75,2 ^{AB} ± 0,24	82,2 ^B ± 0,02	86,4 ^B ± 0,24
Q 1,88	74,0 ^A ± 0,24	81,3 ^A ± 0,30	55,2 ^B ± 0,35	70,2 ^B ± 0,24	73,4 ^B ± 0,24	80,9 ^B ± 0,03	85,4 ^B ± 0,23
Q 1,50	74,0 ^A ± 0,50	81,3 ^A ± 0,20	41,7 ^C ± 0,02	69,4 ^B ± 0,47	59,7 ^C ± 0,24	52,6 ^C ± 0,02	63,2 ^C ± 0,35
Q 1,13	74,0 ^A ± 0,40	81,3 ^A ± 0,30	33,1 ^D ± 0,01	66 ^C ± 0,12	51,3 ^D ± 0,35	50,7 ^C ± 0,04	52,9 ^D ± 0,24
Q 0,75	74,0 ^A ± 0,20	81,3 ^A ± 0,40	9,6 ^E ± 0,35	54 ^D ± 0,12	42,9 ^E ± 0,24	43,3 ^D ± 0,06	46,5 ^E ± 0,59
Q 0,38	18,5 ^B ± 0,00	17,9 ^B ± 0,12	8,2 ^E ± 0,12	37,7 ^E ± 0,24	37,3 ^F ± 0,12	32,2 ^E ± 0,01	40,7 ^F ± 0,08
Q 0,19	15,6 ^C ± 0,47	14,4 ^C ± 2,47	4,9 ^E ± 0,35	26,5 ^F ± 1,18	8,2 ^G ± 0,12	10,2 ^F ± 0,02	13,8 ^G ± 0,35
Q CA	0,0 ^D ± 0,71	0 ^D ± 1,18	0,0 ^F ± 0,24	0,0 ^G ± 0,71	0 ^H ± 0,59	0,0 ^G ± 0,07	0 ^H ± 0,03
Q CR	0,7 ^D ± 0,12	2,6 ^D ± 0,24	0,0 ^F ± 0,10	1,0 ^G ± 0,59	0,7 ^H ± 0,12	0,2 ^G ± 0,12	0 ^H ± 0,12
CV (%)	1,20	1,86	6,29	2,20	2,79	1,56	1,01

(*) Nas colunas, as médias seguidas de mesma letra, não diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05\%$).

Os melhores resultados de atividade inibitória foram obtidos com aplicação de quitosana de médio peso molecular (88,2 %) e foi observada máxima capacidade antifúngica da quitosana na concentração 3,8 mg mL⁻¹.

Tabela 4. Atividade inibitória da quitosana (alto peso molecular) contra *Botrytis cinerea* em diferentes tempos de crescimento do fungo (h) em meio de cultura BDA (5 repetições).

Tratamento	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	120 horas	144 horas	168 horas
mg ml ⁻¹	Inibição (%)						
Q 3,75	44,0 ^A ± 0,10	65,5 ^A ± 0,35	74,6 ^A ± 0,47	58,4 ^A ± 0,12	77,8 ^A ± 0,71	79,6 ^A ± 0,12	71,5 ^A ± 0,24
Q 2,25	44,0 ^A ± 0,40	58,7 ^B ± 0,59	57,6 ^B ± 0,24	19,2 ^A ± 0,71	74,3 ^B ± 0,47	79,2 ^A ± 0,47	70,8 ^A ± 0,59
Q 1,88	44,0 ^A ± 0,20	57,7 ^B ± 0,47	54,5 ^C ± 0,71	70,2 ^A ± 0,24	73,4 ^B ± 0,35	77,8 ^A ± 0,12	65,4 ^B ± 1,41
Q 1,50	41,9 ^{AB} ± 0,10	50,5 ^C ± 1,41	42,2 ^D ± 0,25	69,4 ^A ± 0,47	56,2 ^C ± 0,12	50,9 ^B ± 0,59	49,4 ^C ± 1,18
Q 1,13	41,1 ^{AB} ± 1,60	43,0 ^D ± 0,24	35,2 ^E ± 0,94	66,0 ^A ± 0,12	49,2 ^D ± 0,12	49,2 ^B ± 0,24	42,2 ^D ± 0,35
Q 0,75	39,4 ^{AB} ± 0,35	28,6 ^E ± 0,71	17,4 ^F ± 0,47	54,0 ^B ± 0,12	39,3 ^E ± 1,30	42,6 ^C ± 0,12	31,8 ^E ± 1,30
Q 0,38	22,0 ^{AB} ± 0,24	14,7 ^F ± 0,10	15,2 ^G ± 0,00	37,7 ^C ± 0,24	34,2 ^F ± 0,00	29,7 ^D ± 1,65	10,3 ^F ± 1,57
Q 0,19	13,3 ^{AB} ± 0,10	8,7 ^G ± 0,47	5,2 ^H ± 0,82	26,5 ^D ± 1,18	8,2 ^G ± 0,47	8,8 ^E ± 0,24	5,7 ^F ± 1,06
Q CA	0,0 ^B ± 0,24	0,0 ^H ± 1,18	0,0 ^I ± 1,30	0,0 ^E ± 0,71	0,0 ^H ± 0,12	0,0 ^F ± 0,47	0,0 ^G ± 0,02
Q CR	8,0 ^{AB} ± 0,12	4,1 ^H ± 0,12	4,8 ^H ± 2,36	1,0 ^E ± 0,59	0,8 ^H ± 0,03	0,5 ^F ± 0,01	0,3 ^G ± 0,47
CV (%)	4,31	4,50	2,42	3,01	1,64	1,54	1,01

(*) Nas colunas, as médias seguidas de mesma letra, não diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% de probabilidade

pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05\%$).

O máximo efeito no crescimento do fungo patogênico (100% de atividade inibitória) não foi obtido, mas os resultados demonstraram que a quitosana de camarão (Sigma) pode ser utilizada como alternativa contra o fungo patogênico *Botrytis cinerea* causador da podridão cinzenta nos frutos de uva, sendo o efeito mais pronunciado quando aplicada a quitosana de médio peso molecular.

Resultados mostrando o efeito da quitosana com diferentes pesos moleculares foram descritos por Chen et al. (2002) em relação a outras espécies de fungos patogênicos que ocorrem em plantas econômicas. Por outro lado, Liu et al. (2007) observaram que a aplicação de quitosana de baixo peso molecular mostrou maior efeito na inibição do crescimento de *Penicillium expansum* e de *Botrytis cinerea*, e também aumentou a atividade de peroxidase e polifenoloxidase. Lauzardo et al. (2008) também constataram maior efeito inibitório quando aplicaram quitosana de baixo peso molecular sobre *Rhizopus stolonifer*, com modificações nas estruturas reprodutivas do fungo.

Coqueiro & Piero (2011) avaliando o efeito da quitosana (Sigma Aldrich) com diferentes pesos moleculares, sobre o crescimento do fungo *Alternaria solani*, demonstraram efeito fungioestático sobre o fungo na inibição no crescimento micelial e na germinação dos conídios, sem diferença significativa para os pesos moleculares, quando a quitosana foi aplicada em concentrações de 0,125 mg/mL e 0,5 mg/mL.

CONCLUSÕES

Os resultados mostram que a quitosana de camarão (Sigma) mostrou satisfatória caracterização analítica. O efeito do polissacarídeo de camarão (Sigma) com diferentes pesos moleculares apresentaram efeito fungistático, com respostas diferentes da quitosana de acordo com o peso molecular para o fungo patogênico *Botrytis cinerea* que promove a podridão cinzenta nos frutos de uva, sendo obtidos melhores resultados quando utilizada a quitosana de médio peso molecular.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), à Universidade do Porto, à Universidade Católica Portuguesa – (UCP), e à Fundação de Apoio e Tecnologia do estado de Pernambuco (FACEPE) pelo financiamento e pelas bolsas de pesquisa.

REFERÊNCIAS

- AMORIM, R. V. S.; PEDROSA, R. P.; .; FUKUSHIMA, K ;MARTÍNEZ, C. R.; LEDINGHAM, W. M.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. (2006) Alternative Carbon Sources from Sugar Cane Process for Submerged Cultivation of *Cunninghamella bertholletie* to Produce Chitosan. **Food Technology Biotechnology** 44 (4) 519-523.
- AMORIM, R.V.S; SOUZA, W.; FUKUSHIMA, K.; CAMPOS-TAKAKI G.M. (2001) **Brazilian Journal of Microbiology**, 32, 20.
- ANJOS, F.S.C. (2005) **Filmes e beads à base de quitosana: incorporação de compostos luminescentes e estudos de interações hospedeiro-hóspede**. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal de Pernambuco- Departamento de química fundamental, 93p.

- BADAWY, M.E.I.; RABEA, E.I. (2008) Potential of the biopolymer chitosan with different molecular weights to control postharvest gray mold of tomato fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v.51, n1, p.110-117.
- BASTOS, C.N. (1997) Efeito do óleo de Piper aduncum sobre Crinipelis e outros fungos fitopatogênicos. **Fitopatologia Brasileira**, v.22, n.3, p.441-3.
- BENHAMOU, N.; KLOEPPER, J.W.; TUZUN, S. (1998) Induction of resistance against Fusarium wilt of tomato by combination of chitosan with an endophytic bacterial strain: ultrastructure and cytochemistry of the host response. **Planta**, v.204, p.153-168.
- CHATTERJEE, S.; ADHYA, M.; GUHA, A. K.; CHATTERJEE, B.P. (2005) Chitosan from *Mucor rouxii*: production and physico-chemical characterization. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 395.
- CHEN, Y.; CHUNG, Y.; WANG, L.; CHEN, K. E.; LI, S. (2002) Antimicrobial properties of chitosan in waterborne pathogen. **Journal of Environmental Science and Health**, 37: 1379 – 1390.
- COQUEIRO; D.S.O.; PIERO; R.M. DI. (2011) Atividade de quitosanas com diferentes pesos moleculares sobre *Alternaria solani* . **Arquivos do Instituto Biológico**. v.78, n.3, p.459-463, 2011.
- COSTA SILVA, H.S.R; SANTOS, K.S.C.R; FERREIRA, E.I.(2006) “Quitosana: Derivados hidrosolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços” **Química Nova**, v. 29, p. 776 – 785.
- DI PIERO, N.; GARDA, A. (2008) Quitosana reduz a severidade da antracnose e aumenta a atividade de glucanase em feijoeiro-comum. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, p. 1121-1128.
- FAI, A.E.C.; STAMFORD T.C.M., STAMFORD T.L.M. (2008) **Revista Iberoamericana Polímeros**, 9(5), 435.

FENG Y, XIA W. (2011) Preparation, characterization and antibacterial activity of water-soluble O-fumaryl-chitosan .**Carbohydrate Polymers**, 83: 1169–1173.

FIGUEIREDO, J.F.D. (2002) **Compósitos hidroxiapatita: Quitosana. Preparação, caracterização e aspectos físico-químicos**. Dissertação de Mestrado. Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo. 2002. 69p.

FRANCO, L.O.; MAIA, R.C.C.; PORTO, A.L.F.; MESSIAS, A.S.; FUKUSHIMA, K., CAMPOS-TAKAKI, G.M. (2004) *Cunninghamella elegans* como fonte de quitina e quitosana. **Brazilian Journal of Microbiology**. 35:3-9.

HUGGINS, M.L. (1942) The viscosity of dilute solutions of long-chain molecules:IV. Dependence on concentration. **Journal of the American Chemistry Society**, columbus, v.64, p.2716-2718.

KASSAI, M.R.; ARUL, J.; CHARLET, C. (2000) **Journal of Polymer Science Part-B. Polymer Physics**. v.38 p.2591-2598.

KONG M, GUANG CHEN X, XING K, JIN PARK H (2010). Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review. **International Journal of Food Microbiology**, 144(1): 51-63.

LAUZARDO, H.A.N.; BAUTISTA-BAÑOS, S.; VELÁZQUEZ-DEL VALLE, M.G.; MÉNDEZ-MONTEALVO, M.G.; SÁNCHEZ-RIVERA, M.M.; BELLO-PÉREZ, L.A. (2008) Antifungal effects of chitosan with different molecular weights on in vitro development of *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.:Fr.) Vuill. **Carbohydrate Polymers**, v.73, p.541-547.

LIU, J.; TIAN, S.; MENG, X.; XU, Y. (2007) Effects of chitosan on control of postharvest diseases and physiological responses of tomato fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v.44, p.300-306.

- MENEGUZZO, J.; RIZZON, L.A.; MIELE, A.; AYUB, M.A.Z.(2006) Efeito de *Botrytis cinerea* na composição do vinho Gewürztramine. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.26, p.527-532.
- PINTO, Z.V.; BETTIOL, W.; MORANDI, M.A.B. (2010) Efeito de casca de camarão, hidrolisado de peixe e quitosana no controle da murcha de *Fusarium oxysporum* f.sp. *chrysanthemi* em crisântemo. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 35, n. 1, p. 16-23.
- SHIGEMASA, Y.; MATSUURA, H.; SASHIWA, H.; SAIMOTO, H. (1996) **International Journal of Biology Macromol**; 18:237- 42.
- SIGNINI, R.; CAMPANA FILHO, S.P. (1998) Purificação e Caracterização de Quitosana Comercial. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**. v.8, n.2, p. 63-68.
- SIGNINI, R.; DESBRIÈRESB, J.; CAMPANA-FILHO, S.P. (2000). Carbohydrate **Polymers**. 43: 351-357.
- SILVA, H. R. S. C.; SANTOS, K. S. C. R.; FERREIRA, E. I. (2006) Quitosana: derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços. **Revista Química Nova.**, v. 29 n. 4, p. 776-785.
- STAMFORD, T.C.M.; STAMFORD, T.L.M.; STAMFORD, N.P.; NETO, B.B.; CAMPOS-TAKAKI, G.M. (2007) Growth of *Cunninghamella elegans* UCP 542 and production of chitin and chitosan using yam bean medium. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 10, p. 1-8.
- STEVENS, M.P. (1999) **Polymer chemistry**: an introduction. 3th ed. Oxford: Oxford University Press.
- SYNOWIECKI J., AL-KHATTEB, N.A.A. (2003). **Critical Reviews in Food Science and Nutrition** , 43(2), 144.

THARANATHAN, R.N., AND KITTUR, F.S. (2003). Chitin: The Undisputed Biomolecule of Great Potential, **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Vol. 43, No. 1, pp. 61-87.

TOLAIMATE, A.; DESBRIERES, J.; RHAZI, M.; ALAGUI, A. Contribution to the preparation of chitins and chitosans with controlled physico-chemical properties. **Polymer**. v.44, p.7939-7952. 2003.

TSAIH, M.L.; CHEN, R.H. (1999) Molecular weight determination of 83% degree of desacetylation chitosan with non-gaussian and wide range distribution by high-performance size exclusion chromatography and capillary viscometry. **Journal of Applied Polymer Science**. v.71, p. 1905-1913.

YADAV A.V.; BHISE, S.B. (2004) Chitosan: a potential biomaterial effective against typhoid. **Current Science**, v.87, p.1176.

CAPÍTULO II

BIOPROTETOR COM BACTÉRIA DIAZOTRÓFICA E QUITOSANA FÚNGICA NA PRODUTIVIDADE DA UVA ISABEL E EM ATRIBUTOS DO SOLO COMPARADO COM FERTILIZANTE MINERAL

Artigo enviado para a Revista “**Acta Scientiarum Agronomy**”

RESUMO

A nutrição da videira constitui um dos fatores dos mais importantes para o desempenho produtivo, influenciado diretamente pelo suprimento de nutrientes, especialmente NPK. O bioprotetor (P) foi produzido a partir de biofertilizante de rochas em mistura com mais matéria orgânica inoculada com bactéria diazotrófica de vida livre e com *Cunninghamella elegans* que possui quitosana, biopolímero que atua fornecendo nutrientes e protege a planta contra fitopatógenos, podendo ser uma alternativa para substituição aos insumos convencionais. O trabalho objetivou avaliar o efeito de bioprotetor (P) e fertilizante mineral solúvel (F) na produtividade da uva americana (*Vitis labrusca* cv. Isabel) em experimento de campo realizado no período de fevereiro 2009 a abril 2012, em área experimental cedida pela Vinícola Botticelli, no município de Santa Maria da Boa Vista, Vale do São Francisco, Pernambuco, Brasil. Foi usado o arranjo fatorial (7x2), com sete tratamentos de fertilização, aplicados em duas profundidades, no delineamento experimental em parcelas subdivididas com 4 repetições. Os tratamentos foram: duas fontes (P) e (F) em três doses, mais o controle com composto de uva, aplicados em duas profundidades (0-20 e 20-40 cm). Os resultados mostraram que o bioprotetor mantém o pH em valores adequados para o desenvolvimento e produção da uva e fornece maior quantidade de nutrientes para o solo, podendo ser alternativa em substituição a fertilizantes convencionais solúveis.

Palavras chave: *Cunninghamella elegans*; *Vitis labrusca*; Biofertilizante de rochas; fertilização do solo; Nutrição mineral; Produtividade da uva.

Effect of bioprotector with diazotrophic free-living and fungi chitosan on yield and soil attributes compared with mineral soluble fertilizer

ABSTRACT

The adequate nutritional status of grape is an essential and important tool for the success of plant growth and productivity during the complete cycle, and this factor is directly influenced by the nutrients supplied by fertilization, especially NPK. The tested bioprotector (PB) was produced from PK rocks plus organic matter inoculated with free living diazotrophic bacteria and *Cunninghamella elegans* that have chitosan in their cell walls, and the biopolymer may act providing nutrients and protecting the plants against phythopatogenic microorganisms, which may be alternative for conventional incomes. The study aim to evaluate the effectiveness of the bioprotector (PB) and the mineral soluble fertilizer (F) on yield of American grape (*Vitis labrusca* cv. Isabel) in a field experiment carried out in the period February 2009 to may 2012, in Botticelli fine winery industry located in the district of Santa Maria da Boa Vista, in the San Francisco Valley, Pernambuco, Brazil. The experiment followed the factorial scheme (7x2), using seven fertilization treatments with two sources (NPKP and NPKF in three rates, and a control with grape compound, applied in two depths (0-20 and 20-40 cm), with four replicates. The results showed that the bioprotector maintain adequate soil pH for growth and grape yield and provide higher amount of nutrients in the soil, and may be alternative to replacement of conventional soluble fertilizers.

Keywords: *Cunninghamella elegans*; *Vitis labrusca*; Mineral nutrition; Rock biofertilizers; Soil fertilization; Yield of grape.

INTRODUÇÃO

A viticultura é uma atividade sustentável cultivada e comercializada por pequeno, médio e grande proprietário no cenário Brasileiro destacando-se no mercado interno regional e nacional. No cenário Nacional houve uma elevação significativa, na ordem de 12,9% da produção Brasileira, com destaque para o

Estado de Pernambuco, com cerca de 209.000 toneladas, representando 14,26 % da produção Nacional (IBGE, 2011).

A cultura da uva (*Vitis labrusca*, cv. Isabel) é de grande importância sócio-econômica para o município de Santa Maria da Boa Vista Pernambuco, Brasil, na região do Vale do São Francisco. A uva “cv. Isabel” é também conhecida como: uva Nacional, uva Americana e uva Manga que pode ser consumida “*in natura*” ou nas formas processadas como: sucos, vinagre e vinho (RIZZON et al., 2000). A uva Isabel apresenta elevado potencial de acúmulo de açúcares na baga, podendo atingir índice com variações que podem chegar de 15º a 19º Brix (CAMARGO et al., 2010).

A região do Submédio São Francisco apresenta, em relação às demais áreas produtoras de uva do país, a importante vantagem de possibilitar a obtenção de até dois ciclos sucessivos de produção, uma no primeiro e outra no segundo semestre. A cultura da uva *Vitis labrusca* de origem americana, mostra destaque para a cultivar “Isabel” como uva para a elaboração de vinho e suco na região do São Francisco, com importância social na geração de emprego (MOURA et al., 2009 ; AUGUSTINI, 2011).

Além de vários fatores ambientais, a intervenção da fertilização promove efeito direto na produtividade da uva. A cultura de acordo com a fertilidade do solo atinge índice de produtividade média de 15 t ha⁻¹, podendo alcançar até 25 t ha⁻¹, com adubação equilibrada, de acordo com IPA (2008).

De acordo com ALBUQUERQUE et al. (2005) o cultivo da uva depende do fornecimento de nutrientes, e os atributos físico, químico e biológico do solo são fatores favoráveis e necessários para o aumento da qualidade e da produtividade.

O Nitrogênio, um dos nutrientes que mais limita a produção da videira, é absorvido por fluxo de massa na forma de NH₄⁺ e NO₃⁻; O fósforo é adsorvido principalmente por difusão, na forma de anion ortofosfato H₂PO₄⁻ (MALAVOLTA et al., 2002). De acordo com Cross & Schlesinger (1995) O P é absorvido como íons ortofosfato e depende das propriedades físico-químicas e mineralógicas do solo, sendo que em solos jovens predominam P fracamente adsorvido aos colóides, e em solos intemperizados formas inorgânicas ligadas fortemente aos minerais, o que dificulta a absorção pela planta. O potássio é absorvido no solo na forma de íons K⁺, e aplicado em excesso pode promover competição com Ca e Mg trocável, reduzindo a absorção, sendo este fato mais evidenciado em solos com baixa capacidade de

troca catiônica (Dal bó, 1992). É comum a ocorrência de sintomas de deficiência de Ca e Mg em solos com reação ácida (Pearson & Goheen, 1988).

Considerando a necessidade de maiores informações sobre o comportamento dos nutrientes no solo para a cultura da Uva (cv Isabel), o presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito de diferentes fertilizações utilizando bioprotetor (P) e fertilizante mineral solúvel (F) na produtividade da uva e em atributos químicos do solo, com aplicação em diferentes doses e profundidades (0-20 e 20-40).

MATERIAIS E MÉTODOS

Produção do Bioprotetor

O biofertilizante de rocha foi produzido com rocha fosfatada (apatita de Irecê - Bahia, com 24 % de P_2O_5 total) e com rocha potássica (biotita xisto de Santa Luzia - Paraíba com 10 % de K_2O total), conforme descrito em Stamford et al., 2007. Na produção do biofertilizante foi adicionado enxofre elementar na proporção equivalente a 100 kg de S^* por 1000 kg de rocha, sendo o enxofre inoculado com a bactéria oxidante do enxofre *Acidithiobacillus thiooxidans*.

Com a finalidade de obter um biofertilizante misto rico em N, P e K, o biofertilizante de rochas com P e K foi inoculado com a bactéria diazotrófica de vida livre NFB 10001, isolada por Lima et al. (2010), proveniente de solo de São Lourenço, Pernambuco e mantida na coleção do Núcleo de Fixação Biológica do N_2 nos Trópicos (NFBNT – UFRPE) em tubos de ensaio com meio LG em óleo mineral à temperatura ambiente ($\pm 28^\circ C$). Para a preparação do inoculo, a diazotrófica foi transferida para placas de Petri contendo meio de cultura sólido LG, de acordo com a metodologia descrita por Döbereiner et al. (1995).

A inoculação foi realizada com adição de 10 L do inoculo para cada m^3 de substrato. Após a inoculação e homogeneização, foi feita incubação por 30 dias, à temperatura ambiente ($\pm 33^\circ C$), sendo realizado o controle da umidade para nível próximo a capacidade de campo, através da adição diária de água. Foi adicionado e incorporado melão como fonte de carbono em uma relação média de 25 L de melão para cada m^3 de vermicomposto de minhoca.

O nitrogênio total foi quantificado pelo método de Kjeldahl (semimicro), em analisador automático Kjeltec (modelo 1030); o P e o K disponível foram extraídos por Mehlich- 1 e a leitura efetuada por colorimetria em espectrofotômetro digital Spectronic Genesys- 2 no comprimento de onda de 660 nm, e em fotômetro de chama, respectivamente; e a leitura do pH em água relação de 1:2,5 foi realizado por potenciometria (Potenciômetro digital Quimis Mod. 400 A) de acordo com a metodologia da Embrapa (2009).

Para a produção de biomassa do fungo *Cunninghamella elegans* (UCP 542) foi usado meio de cultura líquido a base de BD (Batata – Dextrose), autoclavado por 15 minutos, a 120 °C. O pH foi ajustado para 5,6 por potenciometria (Potenciômetro digital Marconi).

Posteriormente foi realizada a repicagem do fungo *Cunninghamella elegans* (UCP 542) e após um período de crescimento do fungo *C. elegans* (4-5 dias) com suspensão esporíca através da padronização do pré inóculo: 10^6 esporos mL⁻¹, utilizando Câmara de Neubauer.

Colocou-se agitador horizontal, por 96 horas, com rotação de 150 rpm a uma temperatura de 26 -28°C. A biomassa fresca de *C. elegans*, com tempo 96 h, foi adicionada ao biofertilizante P, usando 12 litros da cultura diluído na proporção de 1 L por 10 L de água destilada, aplicando-se com pulverizador costal, em cada canteiro, na Horta Experimental da Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE. Após incubação por 3 semanas, o material foi coletado, seco, peneirado e ensacado para uso em experimentação.

O composto de uva utilizando no tratamento controle apresentou a seguinte composição: pH 7,05; carbono orgânico (%) 25,01; nitrogênio total (%) 1,25; relação C/N 20,01 e umidade (%) 4,05; fósforo (%) 0,5; Cálcio (%) 0,18; Magnésio (%) 0,15

Experimento em campo

O experimento foi desenvolvido em campo em área experimental da Fazenda Milano, pertencente ao Grupo da Vinícola Botticelli, no município de Santa Maria da Boa Vista, Pernambuco, região do Sub médio do São Francisco. A área apresenta relevo plano, com uma vegetação de caatinga Pernambucana, com latitude de 09^o 02' S, longitude de 39^o 57' W, altitude em torno de 300 m, com temperatura média de 26°C, com indicadores climáticos médios oscilando entre 350 a 550mm e clima do

tipo BSwH (climaticamente árido), de acordo com classificação de Köepen. O experimento foi iniciado em 19 de fevereiro de 2009 e concluído no dia 09 de maio de 2012, com a cultura da uva (*Vitis labrusca* cv. Isabel), com porta-enxerto IAC 313 (Tropical). As videiras foram cultivadas no sistema de latada, utilizando irrigação por gotejamento. Foram realizadas duas colheitas, sendo a primeira de 10 a 12 de dezembro de 2011 e a segunda de 09 a 11 de maio de 2012.

Caracterização física e química do solo

Foi selecionada uma área plana, com boas condições físicas e de drenagem interna para instalação do experimento de campo, e em solo classificado como Podzólico Amarelo, textura Areia franca (Embrapa, 2006), tendo baixa fertilidade natural, com baixos teores de P e K disponível (Tabela 1).

As amostras de solo foram coletadas nas profundidades de 0-20 cm e 20-40cm, separadamente, em 15 locais da área experimental, formando uma amostra composta representativa. A coleta do solo para análise seguiu a metodologia de Santos et al (2005). As amostras foram secas ao ar, destorroadas, peneiradas em malha de 2 mm para uniformização granulométrica.

O Experimento foi realizado no sistema conhecido na área por “latada” com uso de postes internos e externos, usando espaçamento entre as fileiras de 3,0 m e entre as plantas de 2,5 m. O espaçamento entre linhas de 3,0 m foi determinado pela empresa Botticelli, visando facilitar as operações mecanizadas, perfazendo uma população total de 1333 plantas ha⁻¹ (área experimental total 0,89 ha).

Inicialmente foi realizada a limpeza do terreno com destoca, seguida de capina manual, visando facilitar a aplicação dos tratamentos e dos tratos culturais da videira evitando a permanência de restos vegetais, que podem ser promover contaminação de doenças. Foram efetuadas as operações básicas normalmente recomendadas no preparo do solo como: aração, gradagem, marcação do delineamento experimental. Foi introduzido o manejo voltado para a formação da planta, incluindo: podas de formação, poda mista de produção, desbrota, desponte, desfolha, eliminação das gavinhas, amarração dos ramos, conforme Souza Leão & Soares (2009).

Posteriormente foram realizadas as análises físicas no Laboratório de Física do Solo da UFRPE seguindo a metodologia da EMBRAPA (2009). E as análises dos atributos químicos, em seis repetições, com as determinações especificadas a

seguir: reação do solo (pH em H₂O 1,0: 2,5); P disponível (mg dm⁻³), utilizando o extrator Mehlich-1 e o K disponível (cmol_c dm⁻³) utilizando o extrator Mehlich-1, por método colorimétrico e fotometria de chama, respectivamente. As amostras do solo foram coletadas da área do experimento (Fazenda Milano), de acordo com a Embrapa (2009). A características física e química foi realizada em duas profundidades ao longo do perfil de 0 - 20 e 20 - 40cm, e forneceu os seguintes resultados (Tabela 1).

Tabela 1. Caracterização química e física do solo em duas profundidades

Determinações	Profundidade	
	0 – 20cm	20 – 40cm
Atributos químicos		
pH em água (1:2,5)	6,6	6,9
Cálcio (mmol _c /dm ³)	26,0	25,6
Magnésio (mmol _c /dm ³)	32,0	22,9
Potássio (mg dm ⁻³)	42,0	120,0
Fósforo (mg dm ⁻³)	16,0	18,0
Nitrogênio Total (g kg ⁻¹)	0,42	0,21
Atributos físicos		
Areia (g kg ⁻¹)	793	730
Silte (g kg ⁻¹)	77	103
Argila (g kg ⁻¹)	130	157
Classificação Textural	Areia franca Franco arenoso	

⁽¹⁾ Teores médios de seis amostras compostas, cujas determinações foram realizadas conforme a Embrapa (2009).

As doses para fertilizante mineral solúvel (F) foram calculadas com base na recomendação para a cultura da videira (cv. Isabel), para o estado de Pernambuco (IPA, 2008) com base na tabela 2.

Tabela 2. Adubação da uva (*Vitis labrusca*), para o Estado de Pernambuco

Teor no solo	Implantação		Ciclo de produção				
	Plantio	Crescimento	1°	2°	3°	4°	5°
	-----N-----						
Nitrogênio	-	20	15	15	15	15	15
(mg dm ⁻³ de P)				P ₂ O ₅			
< 11	80	-	40	40	40	40	40
11 a 20	60	-	30	30	30	30	30
> 20	40	-	20	20	20	20	20
(cmol _c dm ⁻³ de K)				K ₂ O			
< 0,16	80	-	30	30	30	30	30
0,12 a 0,23	60	-	20	20	20	20	20
> 0,23	40	-	15	15	15	15	15

Fonte: adaptado do IPA (2008)

Delineamento experimental

O experimento foi conduzido em um arranjo fatorial (7x2), no delineamento em parcelas subdivididas, que consistiu de sete tratamentos de fertilização, usando duas fontes (Fertilizante mineral solúvel – (F) e bioprotetor – (P) em três doses, mais o controle (com composto de uva), sendo nas sub parcelas colocados os tratamentos com aplicação em duas profundidades (0-20 e 20-40 cm), com quatro repetições.

Produtividade da uva *Vitis labrusca* (cv. Isabel) e análises químicas do solo

Para estimar a produtividade da uva foram colhidos todos os frutos de dez plantas das fileiras centrais (área útil), em processamento ao acaso, para cada sub parcela, com a colheita realizada em cada bloco, com a finalidade de evitar problemas na coleta.

As amostras compostas, para cada profundidade (0-20 e 20-40 cm) foram coletadas a 20-30 cm de distância da planta, sendo bem misturadas e homogenizadas. As análises químicas seguiram a metodologia da Embrapa (2009), sendo determinados: pH, N total, P e K disponíveis (Mehlich-1), Ca e Mg trocáveis e S-SO₄⁻² solúvel.

Análise estatística

Os resultantes obtidos nas análises laboratoriais foram submetidos à análise de variância pelo programa estatístico SAS versão 9.2 (SAS Institute, 2011), empregando a ANOVA, e a comparação de médias foi realizada pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

RESULTADOS

Produtividade da uva (cv. Isabel)

Os resultados da produtividade da uva (*Vitis labrusca* cv. Isabel) submetida aos tratamentos de fertilização (bioprotetor - P, fertilizante mineral solúvel - F e o controle com aplicação composto de uva) são apresentados na Figura 1. O biofertilizante de rochas mais matéria orgânica (húmus de minhoca) enriquecida em N pela inoculação com bactéria diazotrófica (NPKB) e com quitosana fúngica pela adição de *C. elegans* (P) mostrou resposta significativa e similar ao fertilizante mineral solúvel (F) com aumento na produtividade da uva.

A aplicação de fertilizante mineral solúvel (F) na dose mais elevada (150 % DR) mostrou alta produtividade seguida pelo (P) também nas doses mais elevadas (150 e 200%). O tratamento controle (composto de uva com adição de 2,4L.planta⁻¹) apresentou a mais baixa produtividade.

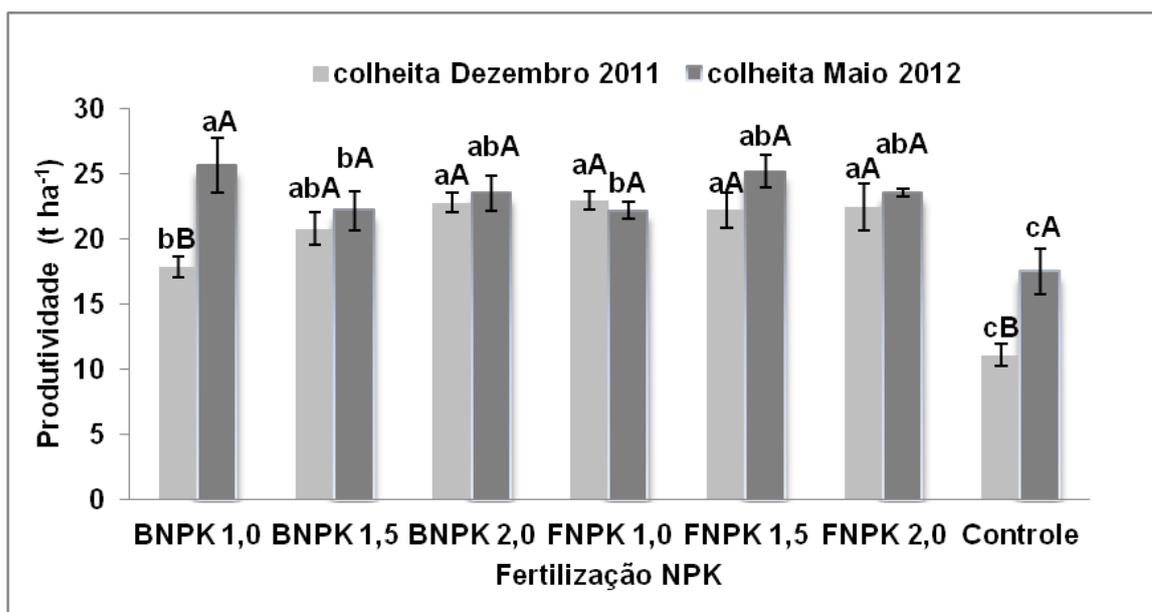


Figura 1. Produtividade da uva *Vitis labrusca* (cv. Isabel) cultivada no Vale do São Francisco, Pernambuco, em função dos tratamentos de fertilização (P), (F) e o controle (composto de uva).

(*) Médias com letras minúsculas compara os diferentes fertilizantes para uma mesma profundidade de aplicação, enquanto as letras maiúsculas comparam as duas profundidades de aplicação do mesmo fertilizante.

Os resultados obtidos estão de acordo com Stamford et al. (2008) avaliando a eficiência de biofertilizantes de rochas na cana de açúcar, comparando com o fertilizante mineral solúvel (F). Stamford et al. (2011) em experimento de campo com fertilizante de rochas e matéria orgânica (húmus de minhoca) na uva (cv. Itália), no Vale do São Francisco, Lima et al. (2007) em alface no cariri cearense, Moura et al. (2007) com melão, e Stamford et al. (2006) com cana de açúcar, em Espodossolo de Pernambuco, encontraram resultados similares ao obtidos no presente trabalho.

pH do solo

Os dados obtidos para pH do solo estão apresentados na figura 2. Os resultados revelam o efeito da fertilização com diferentes fontes e doses de aplicações de fertilizantes em comparação ao tratamento controle (composto de uva). De uma forma geral, verificou-se que não houve efeito significativo no pH do solo com aplicação dos diferentes fertilizantes nas diferentes profundidades. Foi

observado efeito no pH do solo apenas quando aplicado o tratamento controle com composto de uva, que promoveu elevação no pH do solo, quando comparado com os demais tratamentos de fertilização.

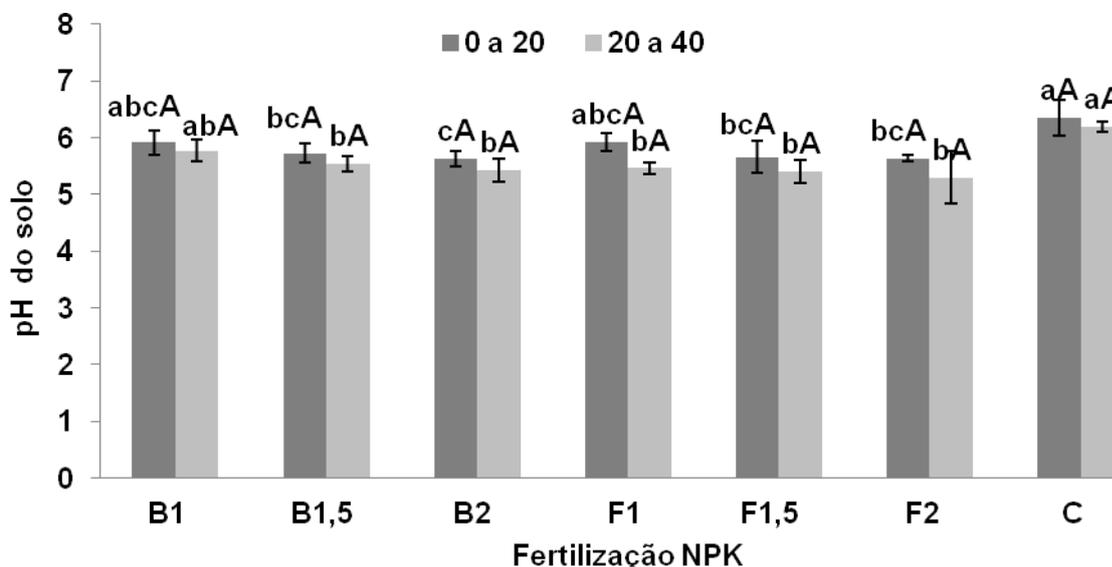


Figura 2. pH do solo após colheita da uva (cv Isabel) sob fertilização com biofertilizante (B) e fertilizante mineral solúvel (F) nas profundidades de 0-20 e 20-40 cm.

(*) Médias com letras minúsculas compara os diferentes fertilizantes para uma mesma profundidade de aplicação, enquanto as letras maiúsculas comparam as duas profundidades de aplicação do mesmo fertilizante.

A redução no pH pelos biofertilizantes, embora não significativa, deve ter sido decorrente da atuação efetiva do *Acidithiobacillus* na oxidação do enxofre, com produção de ácido sulfúrico, promovendo acidez na reação do solo, controlada na produção do (P) pela adição de matéria orgânica. Com relação ao efeito da redução pelo fertilizante solúvel a diminuição do pH foi provavelmente promovida pela atuação do sulfato de amônio, que também provoca redução do pH do solo.

N total e sulfato ($S-SO_4^{-2}$) solúvel no solo

Os resultados obtidos para N total e sulfato ($S-SO_4^{-2}$) solúvel no solo, nas profundidades de 0-20 e 20-40 cm, encontram-se na Figura 3. Verifica-se que para N total no solo, de uma maneira geral, a aplicação na profundidade de 0-20 cm,

evidencia o efeito significativo do biofertilizante, comparado com o fertilizante mineral solúvel e com o controle (composto de uva). Os melhores resultados de N total foram com aplicação do biofertilizante na dose mais elevada, na profundidade de 0-20 cm.

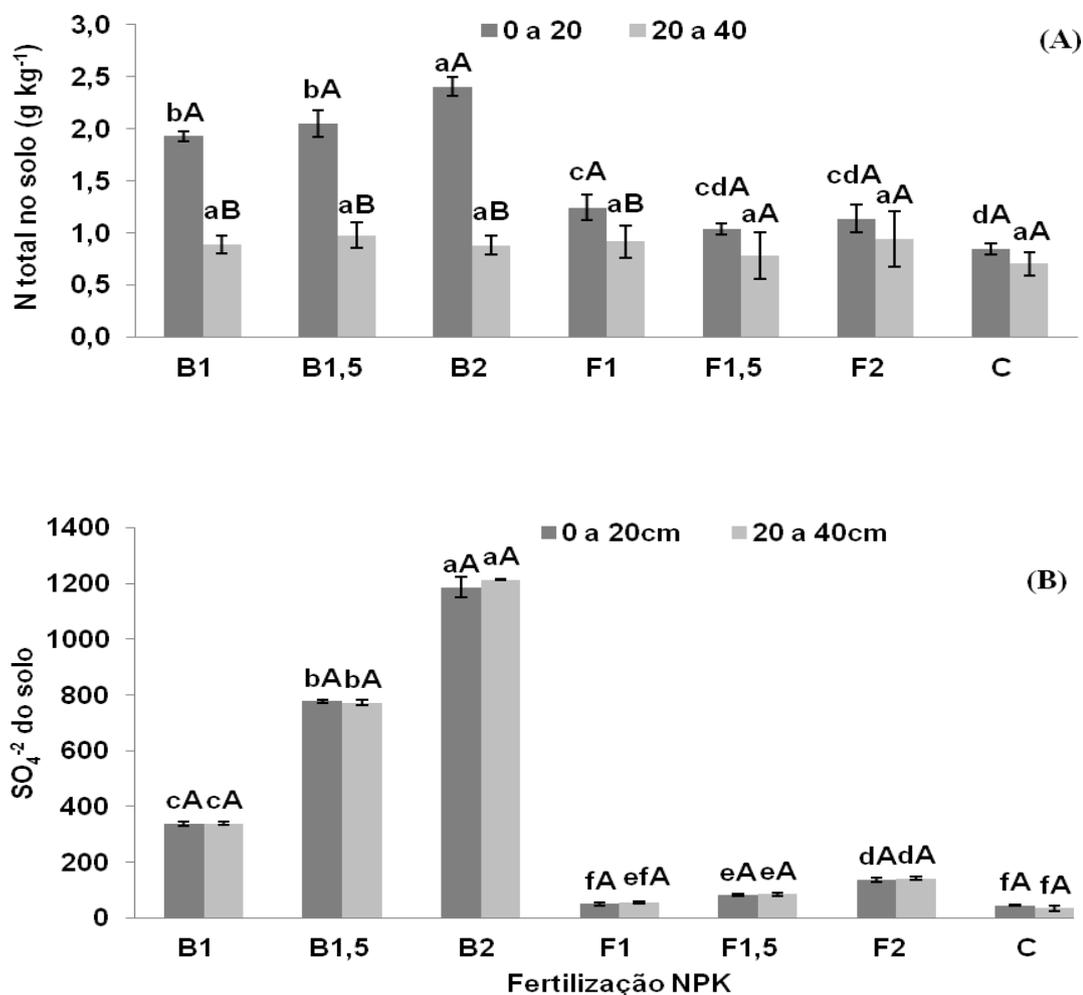


Figura 3. N total (A) e sulfato (S-SO₄⁻²) solúvel (B) no solo, em amostras coletadas após as duas colheitas, em função dos tratamentos de fertilização (biofertilizante, fertilizante solúvel e controle com composto de uva) aplicados em duas profundidades (0-20 e 20-40 cm).

(*) Médias com letras minúsculas compara os diferentes fertilizantes para uma mesma profundidade de aplicação, enquanto as letras maiúsculas comparam as duas profundidades de aplicação do mesmo fertilizante

P e K disponível no solo

Os resultados de P disponível (A) e K disponível (B) no solo, em função dos tratamentos de fertilização, com aplicação em duas profundidades (0-20 e 20-40 cm) encontram-se na Figura 4.

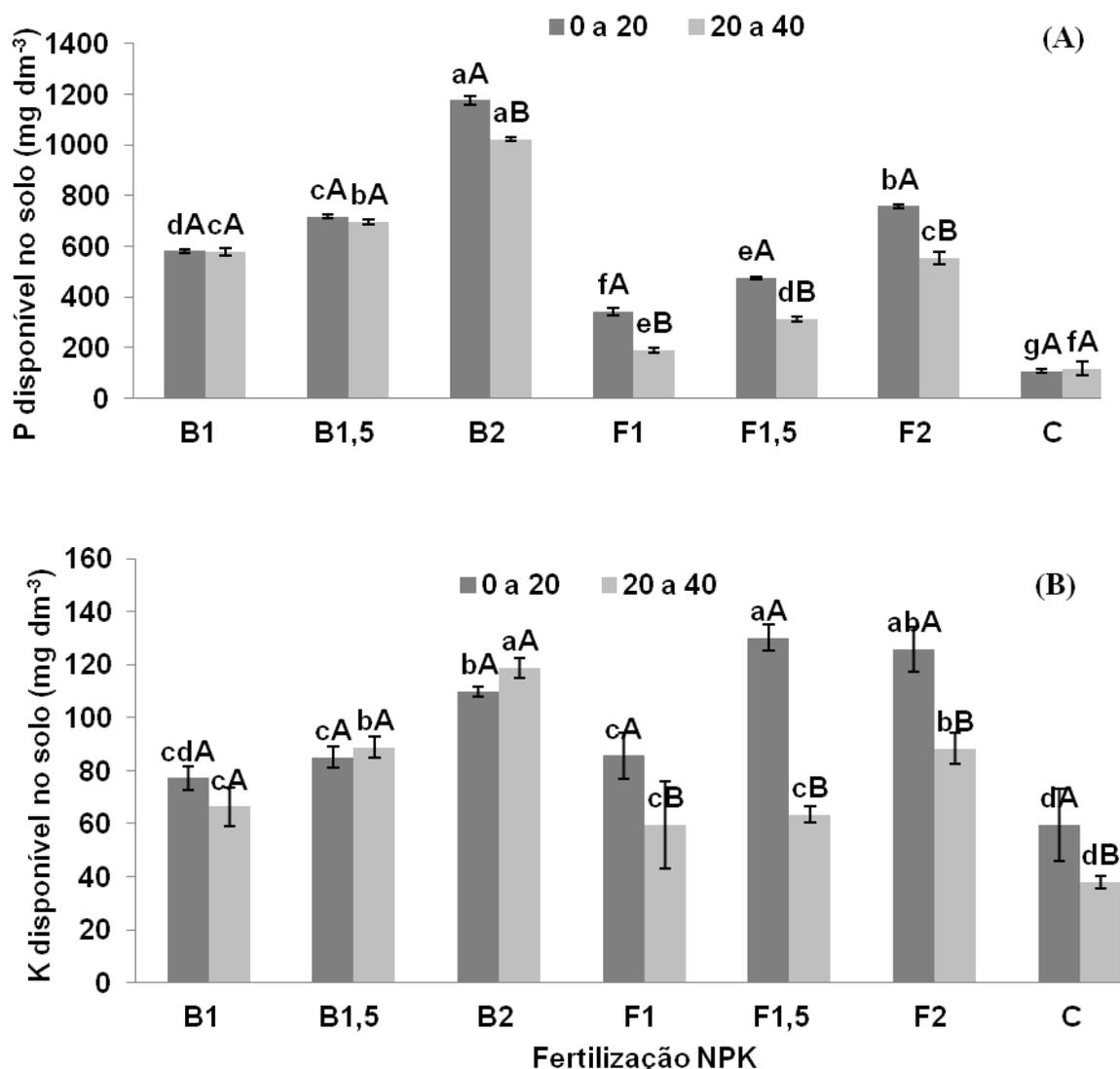


Figura 4. P disponível (A) e K disponível (B) no solo, em amostras coletadas antes da 2^a colheita (abril de 2012), em função dos tratamentos de fertilização (P) e (F) e o controle com composto de uva aplicado em duas profundidades (0-20 e 20-40 cm).

(*) Médias com letras minúsculas compara os diferentes fertilizantes para uma mesma profundidade de aplicação, enquanto as letras maiúsculas comparam as duas profundidades de aplicação do mesmo fertilizante.

Para P disponível no solo, de uma forma geral, observou-se efeito positivo da fertilização, com melhores resultados para o biofertilizante na dose mais elevada, e para o K disponível o fertilizante mineral solúvel apresentou valores mais elevados.

Ca e Mg trocáveis

Os resultados de Ca trocável (A) e Mg trocável (B) no solo, em função dos tratamentos de fertilização, com aplicação em duas profundidades (0-20 e 20-40 cm) encontram-se na Figura 5.

De uma maneira geral, para Ca trocável no solo, observou-se efeito da aplicação dos fertilizantes (biofertilizantes e fertilizante convencional), em comparação com o controle (composto de uva), com valores mais elevados com biofertilizante aplicado nas doses mais elevadas, seguido do fertilizante convencional na dose mais elevada. Houve efeito significativo da aplicação do biofertilizante e da mistura de fertilizantes minerais nas duas profundidades, sendo obtidos valores mais elevados com aplicação na profundidade de 0-20cm. Os melhores resultados foram observados com aplicação de biofertilizante nas doses mais elevadas (B 1,5 e B 2,0) na profundidade de 0-20 cm.

Com relação ao Mg trocável no solo também observou-se efeito significativo da fertilização com biofertilizante e fertilizante mineral solúvel, em comparação com o controle (composto de uva). De uma maneira geral os melhores resultados foram obtidos com aplicação na profundidade de 0-20 cm. Os melhores resultados foram obtidos com aplicação de biofertilizante nas doses mais elevadas (B1,5 e B2,0) na profundidade de 0-20cm, seguido do fertilizante convencional na dose mais elevada (B2) na profundidade de 0-20cm.

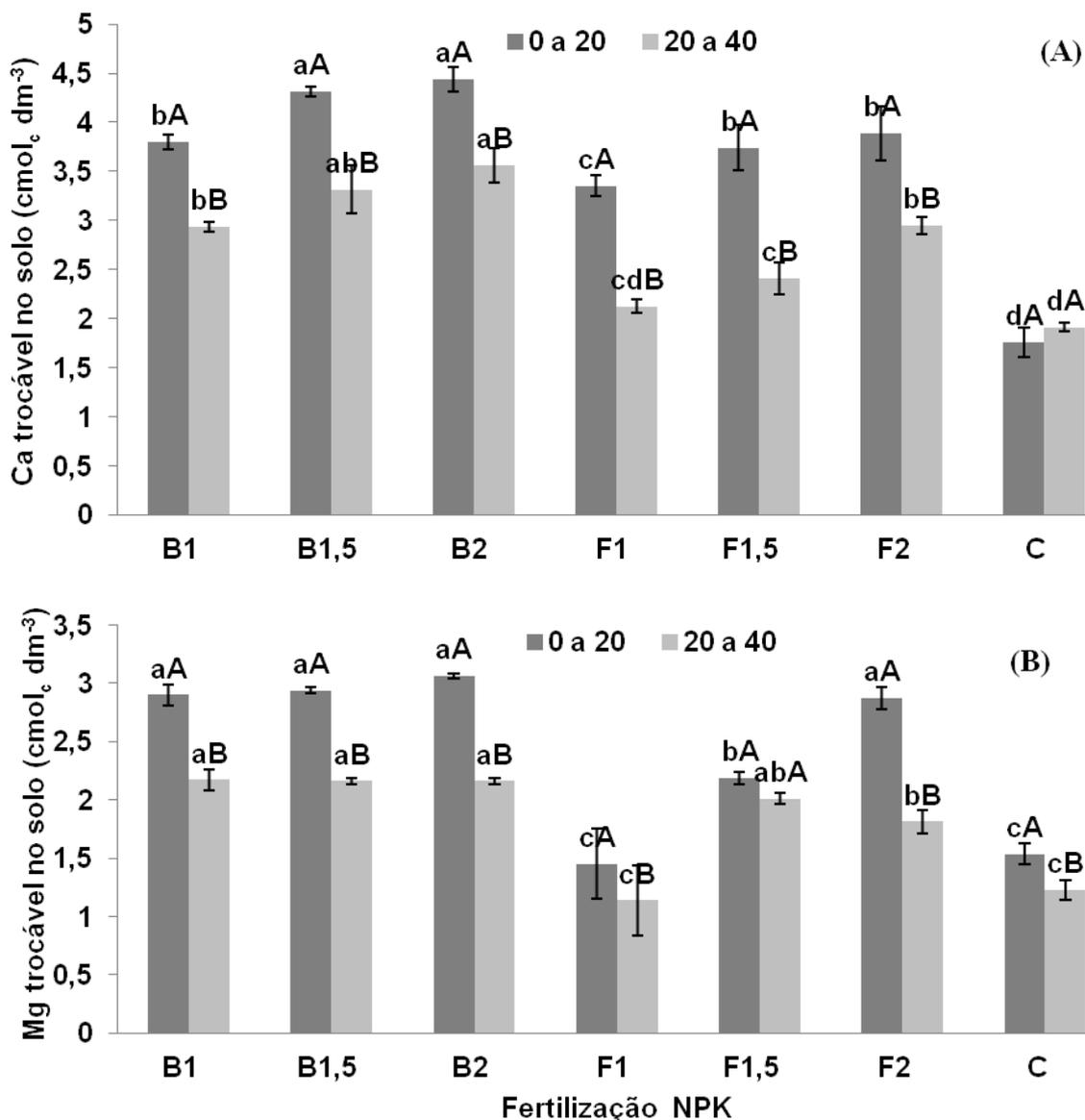


Figura 5. Ca trocável (A) e Mg trocável (B) do solo, antes da 2ª colheita (abril de 2012), em função dos tratamentos de fertilização (biofertilizante, fertilizante convencional e controle com composto de uva) aplicados em duas profundidades (0-20 e 20-40 cm).

(*) Médias com letras minúsculas compara os diferentes fertilizantes para uma mesma profundidade de aplicação, enquanto as letras maiúsculas comparam as duas profundidades de aplicação do mesmo fertilizante.

DISCUSSÃO

Produtividade da uva

Resultados semelhantes aos obtidos no presente trabalho foram encontrados por Lima et al. (2007) avaliando o efeito residual do Biofertilizante de rocha (BP) e (BK) em alface na região do Cariri. Os autores ressaltaram que no 1º ciclo da cultura foram obtidos melhores produtividades com a mistura de fertilizante comercial com aplicação de superfosfato simples (SFS) e cloreto de potássio e com o Biofertilizante de rocha fosfatada (RP) e rocha com potássio (RK), na dose mais elevada (o dobro da recomendação). No 2º ciclo, avaliando o efeito residual, os melhores resultados foram obtidos com a mistura de Biofertilizantes de rocha (BP+BK), mostrando o eficiente poder residual do Biofertilizante de rochas com fósforo e com potássio, produzidos com a bactéria *Acidithiobacillus*.

Duenhas (2004) avaliando vários adubos orgânicos em meloeiro verificou maior produtividade utilizando o biofertilizante Agrobom, com as maiores doses de substâncias húmicas (via fertirrigação) e adição de esterco. Resultados semelhantes foram obtidos por Moura et al. (2007), trabalhando com Biofertilizante de rocha fosfatada e de rocha potássica, em comparação com fertilizantes convencionais, na avaliação comercial do meloeiro no Vale do São Francisco. Pinto et al. (2008) trabalhando com o Biofertilizante orgânico (Agrobom) também observaram resultados positivos, quando feita aplicação da substância húmica.

pH do solo

Stamford et al. (2011) em pesquisa com aplicação de fertilizante de rochas mais material orgânico em uva (cv. Itália) observaram efeito não significativo no pH do solo, enquanto Silva et al. (2011), em dois solos do estado do Rio Grande do Norte avaliaram o desenvolvimento do melão usando três fontes de P (superfosfato triplo, biofertilizante de rocha fosfática e a mistura dos dois materiais) e observaram pequena elevação no pH do solo com aplicação de biofertilizante de rocha em um Latossolo Vermelho Amarelo. Lima et al. (2007) verificaram que o biofertilizante de rochas com P e K mais enxofre inoculado com *Acidithiobacillus* misturado com

húmus de minhoca com pH 7,9, em dois cultivos com alface não promoveram modificação no pH do solo.

Oliveira et al. (2010), avaliaram o efeito de resíduos agrícolas em atributos do solo e observaram uma redução linear no pH do solo, variando de 6,5 a 5,0. Stamford et al. (2004, 2006, 2009) e Moura et al. (2007), mostraram efeito de biofertilizante de rochas com P e K mais enxofre inoculado com *Acidithiobacillus*, sem adição de matéria orgânica, na redução do pH do solo. Os autores atribuíram que o efeito na acidez do solo provavelmente é promovido pelo ácido sulfúrico produzido na reação microbiana pela bactéria oxidante do enxofre. Contudo, é importante observar que nestes trabalhos não houve aplicação de matéria orgânica, como foi feito no presente trabalho.

N Total e S-SO_4^{-2} solúvel no solo após cultivo da uva

Os melhores resultados foram obtidos com aplicação de (P+ *C. elegans*). O bioprotetor aplicado em níveis mais elevados incrementou o teor de N total em nível superior a 50%, comparado com o tratamento controle. Provavelmente mais N total foi liberado pelo sulfato de amônio, e pelo (P), devido à incorporação de N pela bactéria diazotrófica e mineralização pelos microrganismos do solo. O N solubilizado deve ter sido usado para crescimento das plantas, embora uma boa parte do mesmo tenha permanecido no solo. O N do fertilizante solúvel pode ter sido mais facilmente percolado por precipitações elevadas como ocorrem na região, e por este motivo tenha apresentado menores valores de N total. No tratamento com (P) com adição de quitosana fúngica, ocorre aumento no N total de acordo com resultados obtidos por Stamford et al. (2009), avaliando a eficiência de biofertilizante de rocha com (BK) misturado com húmus de minhoca, comparado com fertilizante mineral solúvel. Os autores descrevem os efeitos positivos e consideram que provavelmente o aumento foi devido à fixação do N pela bactéria diazotrófica de vida livre, também de acordo com o incremento observado por Lima et al. (2010).

Pode ser evidenciado o efeito do bioprotetor, principalmente aplicado na dose mais elevada, no enxofre solúvel no solo, provavelmente devido à produção de ácido sulfúrico que disponibiliza mais SO_4^{-2} solúvel no solo. Na mistura de fertilizante mineral solúvel (F) foram utilizados fertilizantes simples a base de sulfato, constituindo fonte de enxofre solúvel no solo. O aumento de sulfato solúvel é

importante porque as plantas podem utilizar o nutriente em cultivos consecutivos, e realmente é observado poder residual do biofertilizante, como comprovado em trabalhos anteriores (Lima et al. 2007). É interessante observar que sempre ocorreu maior disponibilidade de nutrientes nas amostras coletadas na profundidade de 0-20 cm.

P e K disponível no solo após cultivo da uva

Os efeitos promovidos pelo biofertilizantes de rochas também devem ocorrer tendo em vista que a acidez promovida pela bactéria *Acidithiobacillus* incrementa o P e o K no solo como relatado por Stamford et al. (2006; 2007; 2008) e também porque a quitosana deve aumentar os teores de N, P e K como descrito por Kowalski et al., (2006) e Goy et al. (2009).

Pode ser observado o efeito positivo e significativo do bioprotetor no P disponível no solo após a colheita da uva. Também pode ser observado efeito no solo quando aplicado o fertilizante mineral solúvel, em comparação com o tratamento controle. Os resultados também mostram o efeito da bactéria oxidante do enxofre *Acidithiobacillus* na solubilização de minerais contidos na rocha fosfatada e potássica, o que está de acordo com Stamford et al. (2006, 2007, 2011) em vários solos e em diferentes culturas (cana de açúcar, jaca e uva).

O efeito do aumento no P disponível pode ser explicado pela solubilização promovida por outras bactérias do solo além de *Acidithiobacillus*, e alguns fungos que também promovem atividade de enzimas como fosfatases que solubilizam P no solo, inclusive *Cunninghamella elegans* que produz polifosfato inorgânico (Franco et al., 2005, 2011) e aumenta a solubilização de P e outros nutrientes.

Oliveira et al. (2010) com aplicação de resíduos orgânicos em nível 10 t ha⁻¹ obtiveram resultados similares na disponibilidade de P no solo. Os autores relatam que o efeito ocorre porque o material orgânico pode aumentar a solubilização e também resulta em maior disponibilidade de fósforo no solo.

Silva et al. (2011) aplicando diferentes fontes de P em melão verificaram o efeito positivo de biofertilizante de rocha fosfatada no aumento dos valores de P disponível no solo. Em Argissolo da região semiárida no Vale do São Francisco, Stamford et al. (2009) também observaram efeito significativo de biofertilizante de rochas com P e K em mistura com húmus de minhoca na cultura do melão comparado com fertilizante

mineral solúvel. Lima et al. (2007) avaliaram a eficácia de biofertilizante de rochas com P e K mais enxofre inoculado com *Acidithiobacillus* com adição de húmus de minhoca, e os autores descrevem que houve maior efeito residual na alface cultivada em Latossolo Vermelho Amarelo da região do Cariri cearense, em dois cultivos consecutivos.

O bioprotetor promoveu sensível aumento no K disponível no solo, sendo levemente inferior ao fertilizante mineral solúvel que apresenta no sulfato de potássio maior disponibilidade do nutriente, principalmente quando aplicados em níveis mais elevados. É interessante observar que não existem muitos trabalhos na literatura específica, mostrando os efeitos de biofertilizantes de rochas com K. Em solos da região úmida de tabuleiros costeiros de Pernambuco, Stamford et al. (2006) mostraram efeito altamente significativo da aplicação de biofertilizante de rochas com P e K na disponibilidade de K em solo cultivado com cana de açúcar, e resultados similares foram obtidos no presente trabalho.

Cálcio e magnésio trocáveis no solo

Os níveis de Ca trocável no solo foram significativos, especialmente quando aplicado (P) em doses mais elevadas. Os resultados podem ser explicados pela liberação de Ca contido na rocha fosfatada sob atuação de ácido sulfúrico produzido pela bactéria oxidante do enxofre *Acidithiobacillus*. O fertilizante mineral solúvel (F) e o tratamento controle mostraram menor nível de Ca trocável no solo, após o cultivo da uva. Entretanto vale observar que todos os tratamentos de fertilização apresentaram níveis mais elevados em comparação com os valores encontrados no solo antes da realização do experimento.

Resultados semelhantes foram encontrados por Stamford et al. (2006) com cana de açúcar em solo de tabuleiro costeiro da região da Zona da Mata de Pernambuco, com valores mais elevados pela aplicação de biofertilizante de rochas com P e K.

De forma similar pode ser observado efeito no Mg trocável do solo, que também mostraram níveis bem mais elevados quando comparado com os valores da análise do solo antes da realização do experimento. Os aumentos promovidos pela aplicação de (P) pode ser explicado pela liberação de Mg contido na rocha potássica (biotita) utilizada na produção do biofertilizante, cuja disponibilidade deve ter sido

promovida pela atuação da bactéria oxidante do enxofre *Acidithiobacillus* que produziu ácido sulfúrico atuando no S elementar usado na produção do (P).

Resultados semelhantes também foram obtidos por Stamford et al. (2006), com cana de açúcar e por Oliveira (2010) e Stamford et al. (2009) com melão no Vale do São Francisco, e Stamford et al. (2011) com uva (cv. Itália) na região do Vale do São Francisco, mostraram aumento no nível de Mg no solo quando aplicaram biofertilizante de rochas com P e K em mistura com húmus de minhoca.

CONCLUSÕES

Pode ser concluído que ocorre maior liberação de nutrientes na forma disponível devido à produção de ácido sulfúrico pela bactéria *Acidithiobacillus* que libera nutrientes das rochas, de forma mais lenta e gradual. A quitosana promove maior liberação de nutrientes aumentando a atividade de enzimas do solo e pela mineralização da matéria orgânica. Portanto, o P mostra potencial para ser utilizado como alternativa viável em substituição a fertilizantes minerais solúveis.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), à Universidade do Porto e Universidade Católica Portuguesa, e à Fundação de Apoio e Tecnologia do estado de Pernambuco (FACEPE) pelo financiamento e pelas bolsas de pesquisa.

REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, T. C. S.; ALBUQUERQUE NETO, A. A. R.; DEON, M. D. I. (2005) Exportação de nutrientes pelas videiras cvs. Italia e Benitaka cultivadas no vale do São Francisco. In Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal, 10.; Recife. **Anais.**
- ARSON, R. G.; GOHEEN, A. C. (1988) **Compendium of grape diseases.** Minnesota:APS,. 93p.
- AUGUSTINI, B. C. (2011) **Caracterização de vinhos de uvas *Vitis labrusca* por meio do seu conteúdo em aminoácidos e aminas bioativas.** 2011. 105f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.
- CROSS, A.F. & SCHLENSIGER, H.A. (1995) A literature review and evaluation of the Hedley fractionation: Applications to the biochemical cycle of soil phosphorus in natural ecosystems. **Geoderma**, 64:197-214.
- DAL BÓ, M. A. (1992) Nutrição e adubação da videira. **Agropecuária Catarinense**, Florianópolis, v.5, n.4, p.32-35.
- DÖBEREINER, J.; ANDRADE, V. de O.; BALDANI, V.L.D. (1999) **Protocolos para Preparo de Meios de Cultura da Embrapa Agrobiologia.** Seropédica: Embrapa Agrobiologia, dez. 38p. (Embrapa-CNPAB. Documentos, 110).
- DUENHAS, L.H. **Cultivo orgânico de melão: Aplicação de esterco e de biofertilizantes e substâncias húmicas via fertirrigação.** 2004, 73p. Dissertação Mestrado. Escola Superior de Agricultura Luis de Queiroz, Piracicaba, 2004.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária.(2009) **Manual de métodos de análise de solo, plantas e fertilizantes**. Centro Nacional de Pesquisa de Solos: Rio de Janeiro. 627p. .

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. (2006) **Sistema Brasileiro de Classificação de Solos**. Centro Nacional de Pesquisa de Solos: Rio de Janeiro. 412p.

FRANCO, L. O.; ALBUQUERQUE, C. D. C.; STAMFORD, N. P., LIMA, M. A. B., TAKAKI-CAMPOS, G. M. (2011) Avaliação da atividade ácida e alcalina e acúmulo de fosfato inorganico em amostras de *Cunninghamella elegans*. **Analytica** (São Paulo), v. 54, p. 70-78.

FRANCO, L. O.; STAMFORD, T. C. M.; STAMFORD, N. P.; TAKAKI, G. M. C. (2005) *Cunninghamella elegans* (IFM 46109) como fonte de quitina e quitosana. **Analytica**. 4: 40-44.

GOY, R.C., BRITTO, D.; ASSIS, O.B.G. (2009) A Review of the Antimicrobial Activity of Chitosan Polymers. **Ciência e Tecnologia**, v.9, p. 241-247.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA.(2011) Banco de dados. Disponível em: <[http:// www.sidra.ibge.gov.br/](http://www.sidra.ibge.gov.br/)>. Acesso em 30 dez. 2011.

IPA – Instituto Agrônômico de Pernambuco. **Recomendação de adubação para o estado de Pernambuco**. Recife, Brazil. 122p. 2008.

KOWALSKI, B.; TERRY, F.J.; HERRERA, L.; PEÑALVER, D.S.(2006) Application of soluble chitosan in vitro and in the greenhouse to increase yield and seed quality of potato minitubers. **Potato Research**, v.49, 167-176.

LIMA, F.S.; STAMFORD, N.P.; SOUSA, C.S.; LIRA JUNIOR, M.A.; MALHEIROS, S.M.M.; VAN STRAATEN, P.(2010) Earthworm compound and rock biofertilizer

- enriched in nitrogen by inoculation with free living diazotrophic bacteria. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.26, p. 1769-1777.
- LIMA, R.C.M.; STAMFORD, N.P.; SANTOS, C.E.R.S.; DIAS, S. H. L. (2007) Rendimento da alface e a tributos químicos de um Latossolo em função da aplicação de biofertilizantes de rochas com fósforo e potássio. **Horticultura Brasileira**, v.25, p. 224-229.
- MALAVOLTA, E.; GOMES, F. P.; ALCARDE, J. C. (2002) **Adubos e adubações**. São Paulo: Nobel, p. 66-67.
- MOURA, M.S.B.; TEIXEIRA, A.H.C.; SOARES, J.M. (Eds.). (2009). **Exigências Climáticas**. In: SOARES, J.M.; SOUSA LEO, P.C. A viticultura no semi-árido brasileiro. Petrolina:EMBRAPACPATSA , 2009. p. 257- 290.
- MOURA, P.M.; STAMFORD, N.P.; DUENHAS, L.H.; SANTOS, C.E.R.S.; NUNES, G.H.A.S. Eficiência de biofertilizantes de rochas com *Acidithiobacillus* em melão, no vale do São Francisco. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.2, p. 1-7. 2007.
- OLIVEIRA, A. E. S.; SÁ, J. R.; MEDEIROS, J. F.; NOGUEIRA, N. W.; SILVA, K. J. P. (2010)Interação da adubação organo-mineral no estado nutricional das plantas. **Revista Verde**. Mossoró – RN, v.5, n.3, p. 53 - 58 julho/setembro.
- OLIVEIRA, A.E.; SÁ, J.R.; MEDEIROS, J.F.; NOGUEIRA, N.W.; SILVA, K.J. (2010) Interação da adubação organo-mineral no estado nutricional das plantas. **Revista Verde**, v.5, p. 53-58.
- PINTO, J. M.; GAVA, C. A. T.; LIMA, M. A. C.; SILVA, A. F.; RESENDE, G. M. (2008) Cultivo orgânico de meloeiro com aplicação de biofertilizantes e doses de substância húmica via fertirrigação. **Revista Ceres**. 55(4): 280- 286.

- RIZZON, L. A.; MIELE, A.; MENEGUZZO, J. (2000) Avaliação da uva cv. *Isabel* para a elaboração de vinho tinto. **Ciência Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.20, n.1, p.115-121.
- SAS INSTITUTE (2011) **The SAS 9.2 software. System for Windows**. CD – ROM for Windows.
- SILVA, M.O.; STAMFORD, N.P.; AMORIM, L.B.; OLIVEIRA JUNIOR, A.B.; SILVA, O.M. (2011) Diferentes fontes de P no desenvolvimento do meloeiro e disponibilidade de fósforo no solo. **Revista Ciência Agronômica**, v.42, p.268 – 277.
- SOUZA LEÃO, P. C.; SOARES, J. M. (Eds.). (2009). Implantação do vilhedeo In: SOARES, J.M.; SOUSA LEAO, P.C. **A viticultura no semi-árido brasileiro**. Petrolina:EMBRAPACPATSA , 2009. p. 257- 290.
- STAMFORD, N. P.; ANDRADE, I.P.; SANTOS, C.E.R.S.; LIRA JÚNIOR, M.A.; SILVA JUNIOR, S.; FREITAS, A.D.S.; VAN STRAATEN, P. (2011) Soil properties and grape yield affected by rock biofertilizers with earthworm compound. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, v. 11, p. 79 - 88.
- STAMFORD, N. P.; SANTOS, P.R.; SANTOS, C.E.R.S.; FREITAS, A.D.S.; DIAS, S.H. L.; LIRA JUNIOR, M.A. (2007) Agronomic effectiveness of biofertilizers with phosphate rock, sulphur and *Acidithiobacillus* in a Brazilian tableland acidic soil grown with yam bean. **Bioresource and Technology**, v. 98, p. 1311–1318.
- STAMFORD, N.P.; LIMA, R.A.; SANTOS, C.E.R.S.; DIAS, S.H.L.(2006) Rock biofertilizers with *Acidithiobacillus* on sugar cane yield and nutrient uptake in a Brazilian soil. **Geomicrobiology Journal**, v. 23, p. 261-265.
- STAMFORD, N.P.; MOURA, A.M.M.F.; SANTOS, K.S.R.; SANTOS, P.R. (2004) Atuação de *Acidithiobacillus* na solubilização de fosfato natural em solo de tabuleiro cultivado com jacatupé (*Pachyrhizus erosus*). **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 28, p. 75-83.

STAMFORD, N.P.; MOURA, P.M.; LIRA JÚNIOR, M.A.; SANTOS, C.E.R.S.; DUENHAS, L.H.; GAVA, C.A.T. (2009) Chemical attributes of an Argisol of the Vale do São Francisco after melon growth with phosphate and potash rocks biofertilizers. **Horticultura Brasileira**, v.27, p. 447- 452.

STAMFORD, N.P.; SANTOS, C.E.R.S.; SILVA JUNIOR, S.; LIRA JUNIOR, M.A.; FIGUEIREDO, M.V.B. (2008) Effect of rhizobia and rock biofertilizers with *Acidithiobacillus* on cowpea nodulation and nutrients uptake in a tableland soil. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.24, p.1857 - 1865.

CAPÍTULO III

BIOPROTETOR COM BACTÉRIA DIAZOTRÓFICA DE VIDA LIVRE E QUITOSANA FÚNGICA NO ESTADO NUTRICIONAL DA UVA

submetido para publicação na Revista “**Agriambi**”

RESUMO

A nutrição da videira constitui um dos fatores mais importantes para o desempenho produtivo, influenciado diretamente pelo suprimento de nutrientes, especialmente NPK. O bioprotetor (P) foi produzido a partir de biofertilizante de rochas em mistura com mais matéria orgânica inoculada com bactéria diazotrófica de vida livre e com *Cunninghamella elegans* que possui quitosana, biopolímero que atua fornecendo nutrientes e protege a planta contra fitopatógenos, podendo ser uma alternativa para substituição aos insumos convencionais. O trabalho objetivou avaliar o efeito de bioprotetor (P) e fertilizante mineral solúvel (F) no estado nutricional da uva em experimento de campo realizado no período de fevereiro 2009 a abril 2012, em área experimental cedida pela Vinícola Botticelli, no município de Santa Maria da Boa Vista, Vale do São Francisco, Pernambuco, Brasil. Foi usado o arranjo fatorial (7x2), com sete tratamentos de fertilização, aplicados em duas profundidades, no delineamento experimental em parcelas subdivididas com 4 repetições. Os tratamentos foram: duas fontes (P) e (F) em três doses, mais o controle com composto de uva, com aplicação em duas profundidades (0-20 e 20-40 cm). Os resultados mostraram que o bioprodutor apresenta melhores teores de nutrientes nas folhas da uva e, portanto, pode ser alternativa em substituição a fertilizantes convencionais solúveis.

Palavras chave: *Cunninghamella elegans*; *Vitis labrusca*; Biofertilizante de rochas; fertilização do solo; Nutrição mineral;

Effect of bioprotector with diazotrophic free-living bacteria and fungi chitosan on nutritional status of grape cv. Isabel

ABSTRACT

The adequate nutritional status of grape is an essential and important tool for the success of plant growth and productivity during the complete cycle, and this factor is directly influenced by the nutrients supplied by fertilization, especially NPK. The tested bioprotector (PB) was produced from PK rocks plus organic matter inoculated with free living diazotrophic bacteria and *Cunninghamella elegans* that have chitosan in their cell walls, and the biopolymer may act providing nutrients and protecting the plants against phythopatogenic microorganisms, which may be alternative for conventional incomes. The study aim to evaluate the effectiveness of the bioprotector (PB) and the mineral soluble fertilizer (F) on yield of American grape (*Vitis labrusca* cv. Isabel) in a field experiment carried out in the period February 2009 to may 2012, in Botticelli fine winery industry located in the district of Santa Maria da Boa Vista, in the San Francisco Valley, Pernambuco, Brazil. The experiment followed the factorial scheme (7x2), using seven fertilization treatments with two sources (PB) and (F) in three rates, and a control with grape compound, applied in two depths (0-20 and 20-40 cm), with four replicates. The results showed that the bioprotector maintain adequate soil pH for grape growth and provide higher amount of nutrients in the soil, and may be alternative to replacement of conventional soluble fertilizers.

Keywords: *Cunninghamella elegans*; *Vitis labrusca*; Mineral nutrition; Rock biofertilizers; Soil fertilization

INTRODUÇÃO

A viticultura é uma atividade sustentável cultivada e comercializada por pequeno, médio e grande proprietário no cenário Brasileiro destacando-se no mercado interno regional e nacional. Representa uma das frutas de maior impacto

ao crescimento das exportações do país, com produção concentrada principalmente nas regiões Nordeste e Sul (Agrostat/Mapa, 2012).

A cultura da uva (*Vitis labrusca* cv. Isabel) é de grande importância sócio-econômica para o município de Santa Maria da Boa Vista Pernambuco, Brasil, região de fruticultura irrigada do Vale do São Francisco. A uva “cv. Isabel” é também conhecida como: uva Nacional, Americana e manga. A cultivar pode ser consumida “*in natura*” ou nas formas processadas como: sucos, fármacos, vinagre, e vinho comum (RIZZON et al., 2000). No seu comportamento fisiológico a cv. Isabel apresenta elevado potencial de acúmulo de açúcares na baga (Camargo et al., 2010).

No cenário Nacional houve uma elevação significativa na produção, da ordem de 13 %, com destaque para o Estado de Pernambuco com a maior produção Nacional, atingindo produção em torno de 208.660 toneladas, representando mais de 14 % da produção Nacional, com aumento de 24 % em relação a 2010 (IBGE, 2011).

A região do Submédio São Francisco apresenta, em relação às demais áreas produtoras de viticultura do país, a importante vantagem de possibilitar a obtenção de ciclos sucessivos de produção, com até duas colheitas em qualquer época do ano. A cultura da uva (*Vitis labrusca*), de origem americana, mostra destaque para a cultivar “Isabel” como uva para a elaboração de vinho e suco na região do São Francisco, com importância social na geração de emprego (Moura et al 2009; Augustini, 2011).

Além de vários fatores ambientais, é importante a fertilização, que promove efeito direto na produtividade da uva. A cultura pode alcançar índice médio de produtividade de 15 t ha⁻¹, podendo atingir, com adoção de técnicas modernas, até 25 t ha⁻¹ (Rizzon et al., 2000; Camargo & Maia, 2004; Camargo & Maia, 2010 Ritschel et al., 2010).

É conhecido que a uva possui uma elevada demanda por nutrientes, especialmente NPK, constituindo este fator como crucial para obtenção da máxima produtividade das videiras, de acordo com Leão & Soares (2000).

A produtividade é influenciada pela absorção de nutrientes e o N é um dos macronutrientes que mais limita a produção. Na videira o transporte da cadeia produtiva inicia-se na absorção pelo sistema radicular nas formas minerais N amoniacal ou N nítrico, sendo em seguida translocado para as folhas onde passa

para o estado reduzido (amoniaco), e depois é translocado na forma orgânica tanto no xilema como no floema (Miele et al., 2009).

O potássio é o nutriente mais importante para a videira, pois interfere na síntese proteínica, na translocação de açúcares, atua na maturação e tamanho dos frutos, na manutenção do turgor das bagas e no enchimento dos cachos (Christensen & Kearney, 2000).

O fósforo é um elemento imprescindível nas fases de brotações da videira. Participa ativamente no processo e na estrutura energéticas, tais como: ATP e ADP, atua na lignificação dos tecidos, crescimento das raízes, maturação do fruto e produção de açúcares (Donati, 2002).

O cálcio é absorvido pelas raízes na forma catiônica, e de acordo com Danner et al. (2009), é o terceiro nutriente mais requisitado pela videira, principalmente na fase inicial de produção e maturação dos frutos, no crescimento das raízes e alongamento dos tecidos meristemáticos nos ramos.

Outro elemento de destaque é o Mg que é componente central da clorofila, participa de funções metabólicas no processo fotossintético nas folhas, mantém a integridade dos ribossomos, interage na absorção de fósforo e na elevação da maturação dos frutos (Creswell; Eschenbruch, 1981).

Considerando a necessidade de maiores informações nutricionais na cultura da Uva (cv Isabel), o presente trabalho teve como objetivo avaliar o estado nutricional da uva cv. Isabel submetida a diferentes fontes e doses do bioprotetor (P) e fertilizantes minerais solúveis (F) aplicados em duas profundidades (0-20 e 20-40).

MATERIAL E MÉTODOS

Área experimental e sistema de produção em campo

O experimento foi conduzido em uma área experimental na Fazenda Milano, pertencente ao Grupo Botticelli, no município de Santa Maria da Boa Vista, Pernambuco, região do Sub médio do São Francisco, apresentando relevo plano, com uma vegetação de caatinga, com latitude de 09° 02' S, longitude de 39° 57' W, altitude em torno de 300 m e clima do tipo BSwH (climaticamente árido), de acordo com classificação de Köppen. O experimento com a cultura da uva (*Vitis labrusca* "cv. Isabel"), foi utilizando com porta-enxerto IAC 313 (Tropical), iniciado as

atividades em 19 de fevereiro de 2010, com a primeira colheita concluída em 12 de dezembro de 2011 e a 2ª colheita no dia 12 de maio de 2012.

Análise do solo

Foi selecionada uma área para instalação do experimento de campo, classificado pelo Sistema Brasileiro de Classificação como um PODZÓLICO AMARELO de textura Areia franca de acordo com Embrapa (2006), com textura Areia franca, baixa fertilidade natural com baixos teores de P e K disponível e com boas condições físicas e de drenagem interna, localizado em área plana, contatado na Tabela 1.

As amostras de solo foram coletadas nas profundidades de 0-20 cm e 20-40cm, separadamente em 15 locais da área experimental, formando uma amostra composta representativa, as análises seguiram a metodologia de Santos et al (2005). As amostras foram secadas ao ar, destorroadas, peneiradas em malha de 2 mm para uniformização granulométrica.

O Experimento foi realizado no conhecido por “latada” com uso de postes internos e externos, com espaçamento entre as fileiras de 3,0 m e entre as plantas de 2,5 m. O espaçamento entre linhas de 3,0 m foi determinado pela empresa Botticelli, visando facilitar as operações mecanizadas, perfazendo uma população total de 1333 plantas ha⁻¹ (área experimental total 0,89 ha).

Posteriormente foram realizadas as análises físicas no Laboratório de Física do Solo da UFRPE seguindo a metodologia da EMBRAPA (2009). E as análises dos atributos químicos, em seis repetições, com as recomendações especificadas a seguir: reação do solo (pH em H₂O 1,0: 2,5); P disponível (mg dm⁻³), utilizando o extrator Mehlich-1 e o K disponível (cmol_c dm⁻³) utilizando o extrator Mehlich-1, por método colorimétrico e fotometria de chama, respectivamente. As amostras do solo foram coletadas da área do experimento (Fazenda Milano), de acordo com a EMBRAPA (2009). A características física e química foi realizada em duas profundidades ao longo do perfil de 0 - 20 e 20 - 40cm, e forneceu os seguintes resultados (Tabela 1).

Tabela 1. Caracterização química e física do solo em duas profundidades

Determinações	Profundidade	
	0 – 20cm	20 – 40cm
Atributos químicos		
pH em água (1:2,5)	6,6	6,9
Cálcio (mmol _c /dm ³)	26,0	25,6
Magnésio (mmol _c /dm ³)	32,0	22,9
Potássio (mg dm ⁻³)	42,0	120,0
Fósforo (mg dm ⁻³)	16,0	18,0
Nitrogênio Total (g kg ⁻¹)	0,42	0,21
Atributos físicos		
Areia (g kg ⁻¹)	793	730
Silte (g kg ⁻¹)	77	103
Argila (g kg ⁻¹)	130	157
Classificação Textural	Areia franca Franco arenoso	

⁽¹⁾ Teores médios de seis amostras compostas, cujas determinações foram realizadas conforme a Embrapa (2009).

Condução do experimento

Inicialmente foi realizada a limpeza do terreno com aplicação de roçada, destoca, capina manual, visando facilitar a aplicação dos tratamentos e dos tratamentos culturais da videira e evitar a permanência de restos vegetais que podem servir de focos de contaminação de doenças de raízes. Foram efetivadas as operações básicas normalmente recomendadas no preparo do solo como: aração, gradagem, marcação do delineamento experimental.

Foi introduzido o manejo voltado para a formação da planta produtiva, com: podas de formação, poda mista de produção, desbrota, desponte, desfolha, eliminação das gavinhas, amarração dos ramos, conforme Souza Leão & Soares (2009). O Experimento foi conduzido no sistema latada, com uso de postes internos e externos, com espaçamento entre as fileiras de 3,0 m e entre as plantas de 2,5 m, perfazendo uma população total de 1333 plantas ha⁻¹ (área experimental total igual a 0,89 ha). O espaçamento de 3,0 m entre as fileiras foi determinado pela empresa (Vinícola Botticelli), com a finalidade de facilitar as operações mecanizadas.

As doses para o fertilizante mineral solúvel (F) foram calculadas com base na recomendação para a cultura da videira (cv. Isabel) irrigada, para o estado de Pernambuco (IPA, 2008). Os tratamentos foram aplicados nas doses de 100, 150 e 200% da recomendação. Na mistura (F) utilizou-se sulfato de amônio (20% de N), superfosfato simples (20% de P_2O_5) e sulfato de potássio (50% de K_2O). Os fertilizantes com K e com N foram aplicados de acordo com a análise química do solo, obedecendo a recomendação do IPA (2008).

Delineamento experimental

O experimento foi conduzido em um arranjo fatorial (7x2), no delineamento em parcelas subdivididas, que consistiu de sete tratamentos de fertilização, usando duas fontes (Fertilizante mineral solúvel – (F) e Bioprotetor – (P) mais o controle (composto de uva), com todos os tratamentos de fertilização aplicados em três doses, e como sub tratamentos foram usadas duas profundidades (0-20 e 20-40 cm), com quatro repetições.

As fertilizações de coberturas foram aplicadas com base na recomendação do IPA (2008) para a cultura da videira cv. Isabel irrigada, com doses equivalentes a 100, 150 e 200 % da recomendação.

Avaliação foliar e análise estatística

Na colheita, realizada por sub parcela, foram analisados os nutrientes nas folhas. Em 10 plantas marcadas com boa formação de copa. Para análise do estado nutricional da videira foram utilizadas as folhas, separando-se em limbo e Pecíolo. A amostragem das folhas foi realizada, de acordo com a EMBRAPA (2009) na fase de floração plena da uva.

Foram coletadas 20 folhas por tratamento, a folha oposta ao primeiro cacho, a partir da base do ramo, separando-se, posteriormente, os limbos foliares dos pecíolos no momento da amostragem, os quais foram ligeiramente lavados. Depois o material coletado foi acondicionado em sacos de papel com identificações de cada amostra correspondente, enviadas para o Laboratório de Biotecnologia Ambiental da UFRPE para análise foliar. As folhas foram submetidas a secagem em estufa de

circulação forçada em temperatura de 65°C, mantidas até atingirem peso constante, logo, foram trituradas e de acordo com a metodologia descrita por Malavolta (1989).

O Nitrogênio Total foi realizado por digestão sulfúrica, pelo método de Tedesco et al., (1995), e determinado conforme Malavolta et al. (1989), pelo método de Kjeldhal (semimicro), usando o analisador automático Kjeltec (modelo 1030). Os demais nutrientes foram analisados por digestão nitro perclórica e determinados de acordo com a metodologia da Embrapa (2009).

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância pelo programa estatístico SAS versão 9.2 (SAS Institute, 2011), com comparação de médias realizada pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

RESULTADOS

Absorção de nutrientes no limbo e pecíolo de folhas da uva (cv. Isabel)

Os resultados de N no limbo e pecíolo das folhas da uva (cv. Isabel) encontram-se na figura 1. O N total no limbo só mostrou diferença significativa quando comparados os diferentes tratamentos de fertilização com o tratamento controle (adubação com composto de uva), e também não houve efeito da profundidade de aplicação dos adubos.

Com relação ao N total no pecíolo houve efeito significativo da fertilização, apresentando valores mais elevados com aplicação do biofertilizante, especialmente nas doses mais elevadas. Na concentração de N total no pecíolo não foi observado efeito significativo das profundidades de aplicação dos adubos.

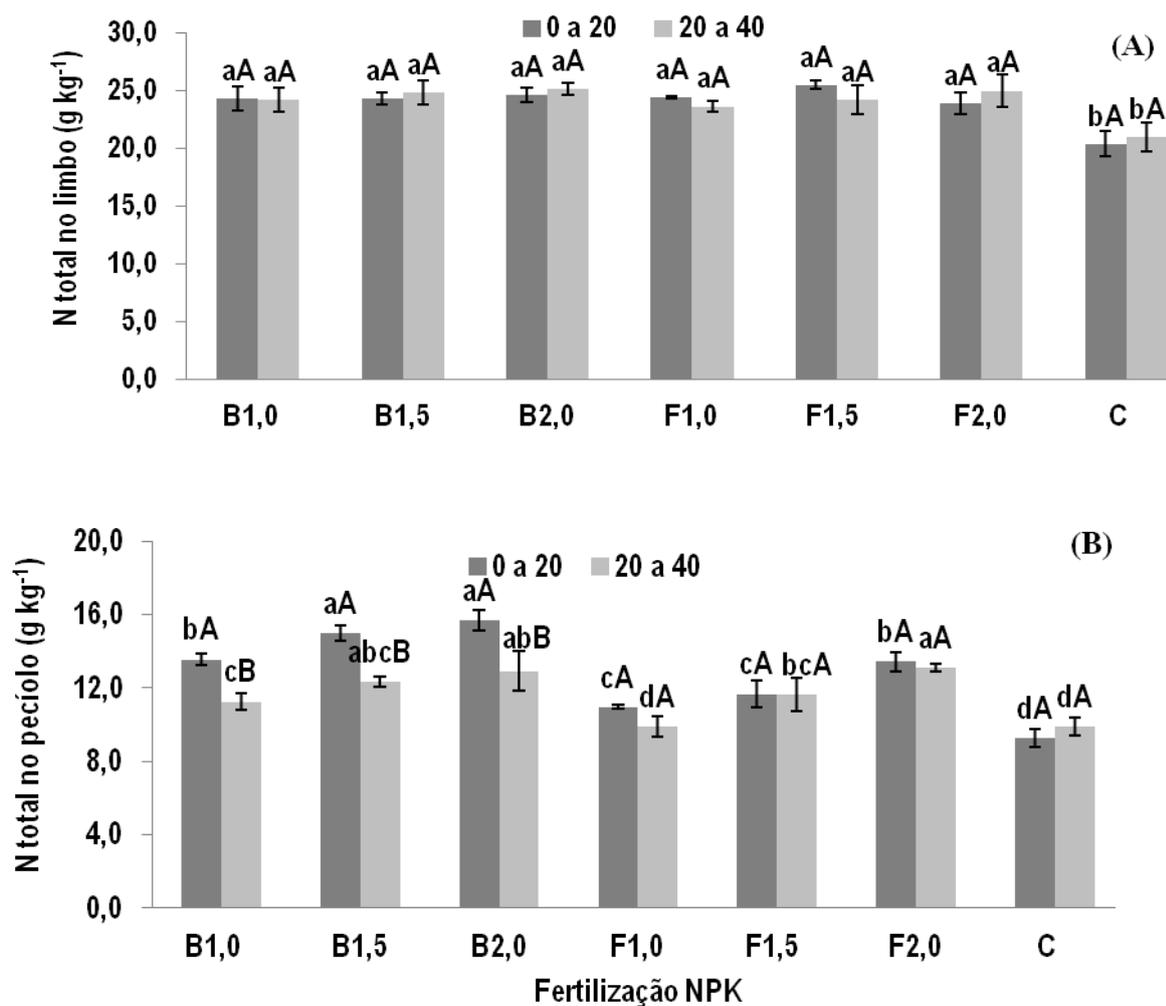


Figura 1. Concentração de N total no limbo (A) e no pecíolo (B) nas folhas da videira (cv. Isabel) em função da fertilização e da profundidade de aplicação dos fertilizantes (0-20 e 20-40 cm).

(*) Médias com letras minúsculas compara os diferentes fertilizantes para uma mesma profundidade de aplicação, enquanto as letras maiúsculas comparam as duas profundidades de aplicação do mesmo fertilizante.

Os resultados de P total no limbo e pecíolo das folhas da uva (cv. Isabel) encontram-se na figura 2. O P total no limbo mostrou diferença significativa com aplicação do biofertilizante nas doses utilizadas, comparados com os níveis de fertilizante convencional e com o tratamento controle (adubação com composto de uva). O fertilizante convencional e o controle não foram significativamente diferentes nem apresentaram efeito da profundidade de aplicação dos adubos. O P total no pecíolo não mostrou efeito significativo da fertilização, mesmo comparando com o controle (aplicação de composto de uva).

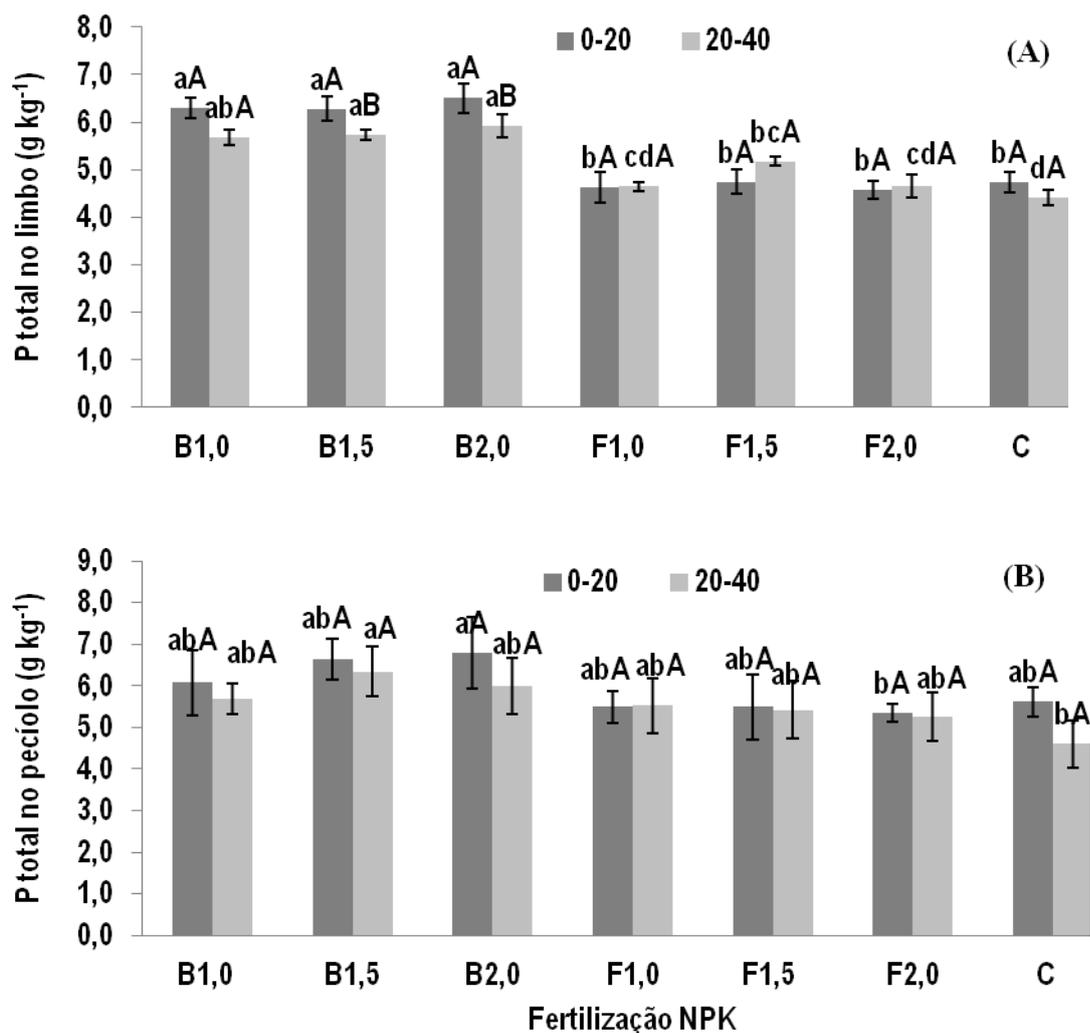
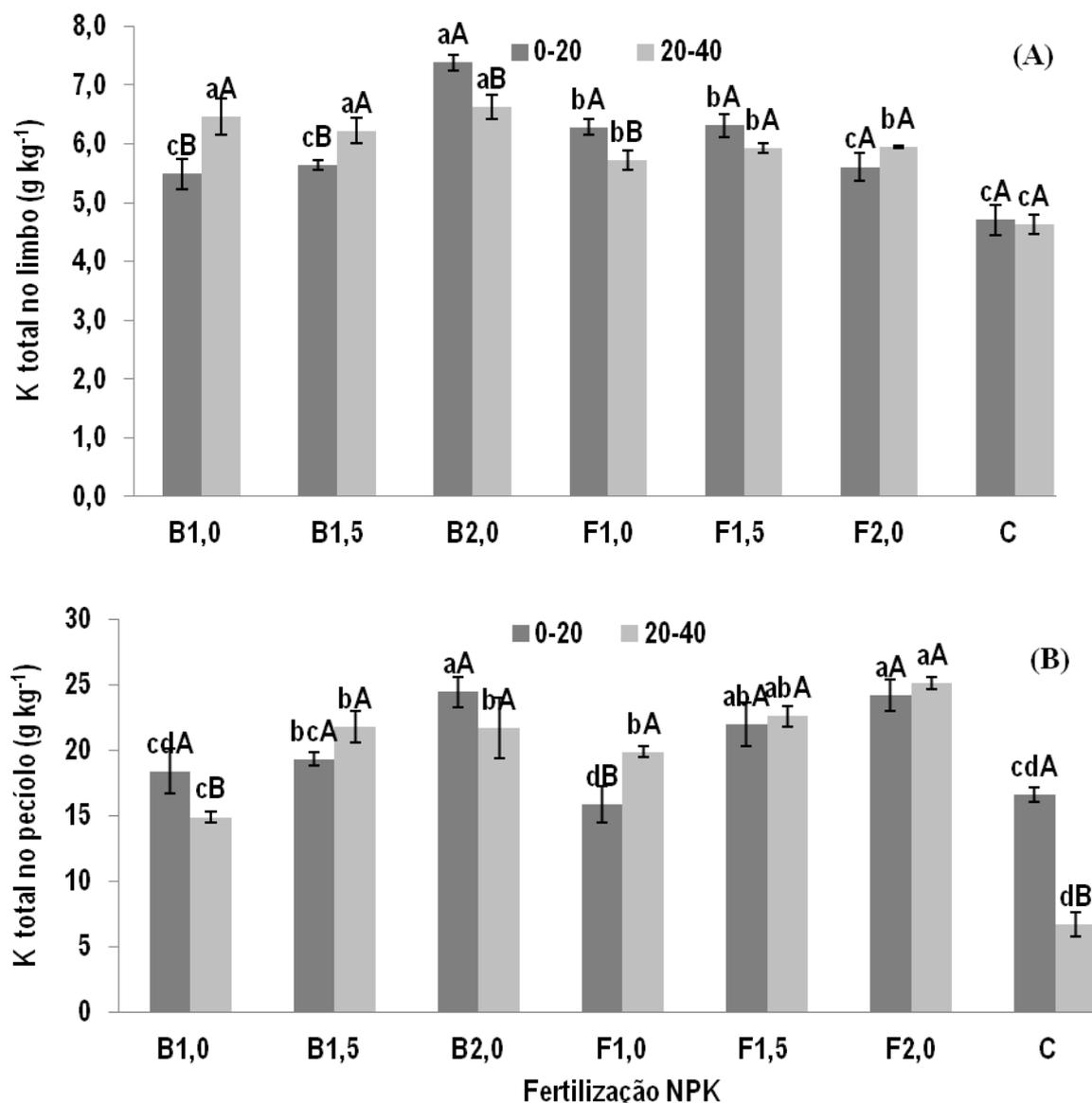


Figura 2. Concentração de P total no limbo (A) e no pecíolo (B) nas folhas da videira (cv. Isabel) em função da fertilização e da profundidade de aplicação dos fertilizantes (0-20 e 20-40 cm).

(*) Médias com letras minúsculas compara os diferentes fertilizantes para uma mesma profundidade de aplicação, enquanto as letras maiúsculas comparam as duas profundidades de aplicação do mesmo fertilizante.

Os resultados de K total no limbo e pecíolo das folhas da uva (cv. Isabel) encontram-se na figura 3. O K total no limbo só mostrou diferença significativa quando comparados os diferentes tratamentos de fertilização com o tratamento controle (adubação com composto de uva), sendo os melhores resultados obtidos com o biofertilizante aplicado na profundidade de 0-20 cm. Nos demais tratamentos de fertilização também não foram verificados efeitos da profundidade de aplicação dos adubos.



(*) Médias com letras minúsculas compara os diferentes fertilizantes para uma mesma profundidade de aplicação, enquanto as letras maiúsculas comparam as duas profundidades de aplicação do mesmo fertilizante.

Figura 3. Concentração de K total no limbo (A) e no pecíolo (B) nas folhas da videira (cv. Isabel) em função da fertilização e da profundidade de aplicação dos fertilizantes (0-20 e 20-40 cm).

Com relação ao K total no pecíolo houve efeito significativo da fertilização, comparando com o controle, sendo obtidos resultados mais elevados quando aplicado o biofertilizante na dose mais elevada e o fertilizante convencional, especialmente nas doses mais elevadas. Também não foi observado efeito significativo das profundidades de aplicação dos adubos na concentração de K total

no pecíolo, com exceção do tratamento controle que mostrou melhores resultados com aplicação a 0-20 cm.

Os resultados do Ca total em função da fertilização e da profundidade de aplicação dos fertilizantes (0-20 e 20-40 cm) no limbo (A) e no pecíolo (B) das folhas constam na figura 4.

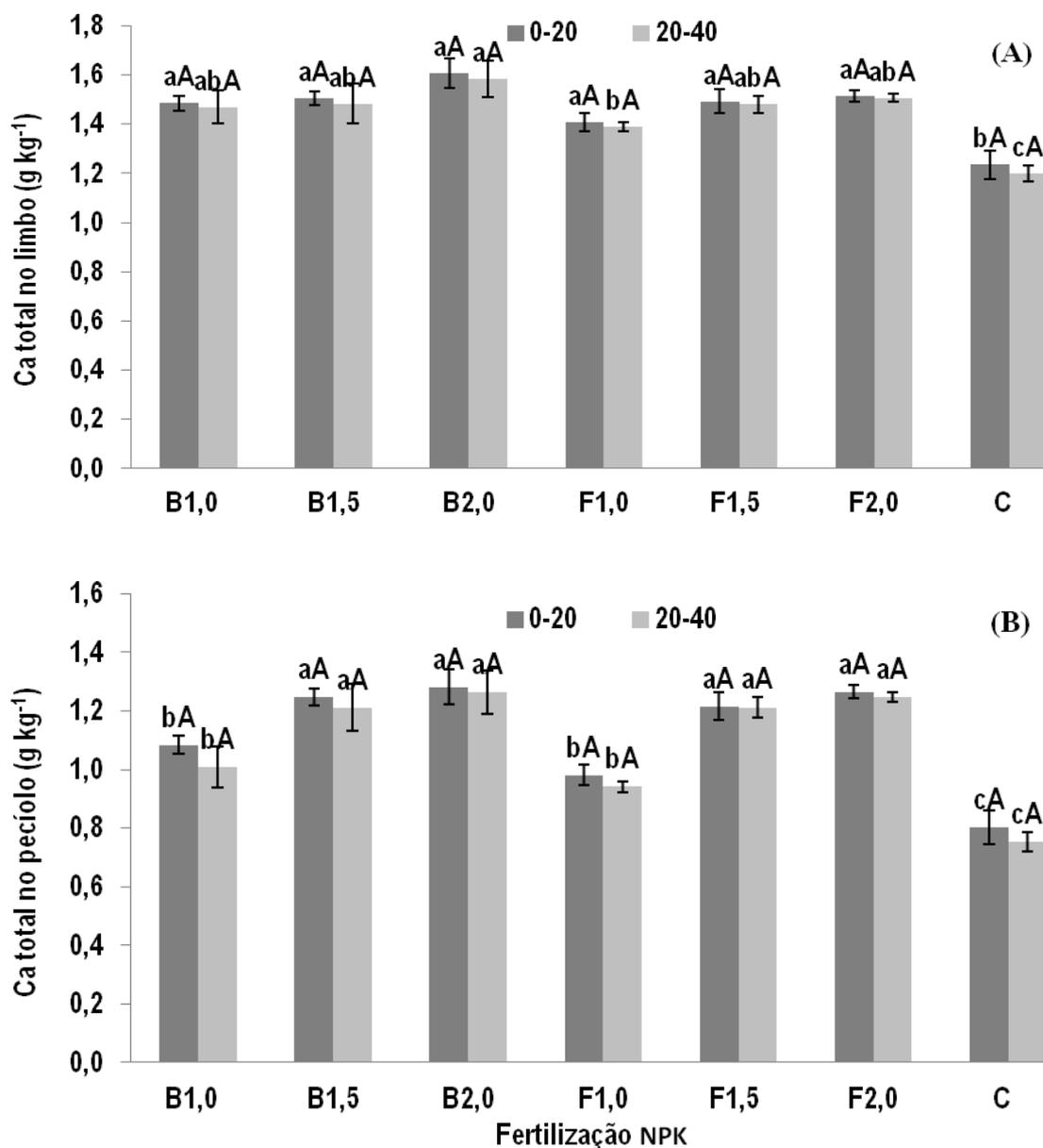


Figura 4. Concentração de Ca total no limbo (A) e no pecíolo (B) nas folhas da videira (cv. Isabel) em função da fertilização e da profundidade de aplicação dos fertilizantes (0-20 e 20-40 cm).

(*) Médias com letras minúsculas compara os diferentes fertilizantes para uma mesma profundidade de aplicação, enquanto as letras maiúsculas comparam as duas profundidades de aplicação do mesmo fertilizante.

Os resultados obtidos para teor de Ca total no limbo não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos de fertilização, só havendo diferença significativa quando comparados os tratamentos de fertilização e profundidades com o tratamento controle (composto de uva). O bioprotetor na maior dose (B2,0) aplicado na profundidade de 0-20cm apresentou o maior resultado $1,60 \text{ g kg}^{-1}$, enquanto que o tratamento controle apresentou o valores mais baixos com $1,23 \text{ g kg}^{-1}$ e $1,19 \text{ g kg}^{-1}$ quando aplicados nas profundidades 0-20 cm e 20-40 cm respectivamente. Não houve efeito da profundidade de aplicação dentro de cada tratamento de fertilização.

Com relação ao Ca total no pecíolo os dados obtidos apresentaram efeitos significativos da fertilização, comparando com o tratamento controle. O teor de Ca total no pecíolo aumentou significativamente com aplicação dos fertilizantes (bioprotetor e fertilizante mineral solúvel), com diferenças significativas quando comparando a menor dose de aplicação (B1,0 e F1,0) com as demais doses. Os maiores resultados mais elevados foram obtidos com aplicação do bioprotetor e fertilizante convencional na dose mais elevada de aplicação (2,0) com valores de $1,28 \text{ g kg}^{-1}$ e $1,26 \text{ g kg}^{-1}$, respectivamente. Também foi observado que a aplicação nas duas profundidades não mostrou efeito dentro de cada tratamento.

Os resultados do Mg total em função da fertilização e da profundidade de aplicação dos fertilizantes (0-20 e 20-40 cm) no limbo (A) e no pecíolo (B) das folhas constam na figura 5.

Na Figura 5, verifica-se que houve resposta positiva e significativa estatisticamente ($P < 0,05$) no acúmulo de Mg no limbo e pecíolo, em resposta às fertilizações e profundidades aplicadas, quando comparado com o tratamento controle (composto uva).

O Mg total no limbo só mostrou efeito acentuado com diferença significativa quando comparados os diferentes tratamentos de fertilização com o tratamento controle (composto de uva). Também não houve efeito da profundidade de aplicação dos fertilizantes dentro dos diferentes tratamentos de fertilização. O melhor resultado de teor de Mg ($1,5 \text{ g kg}^{-1}$) foi obtido com aplicação do bioprotetor na maior dose (dobro do recomendado).

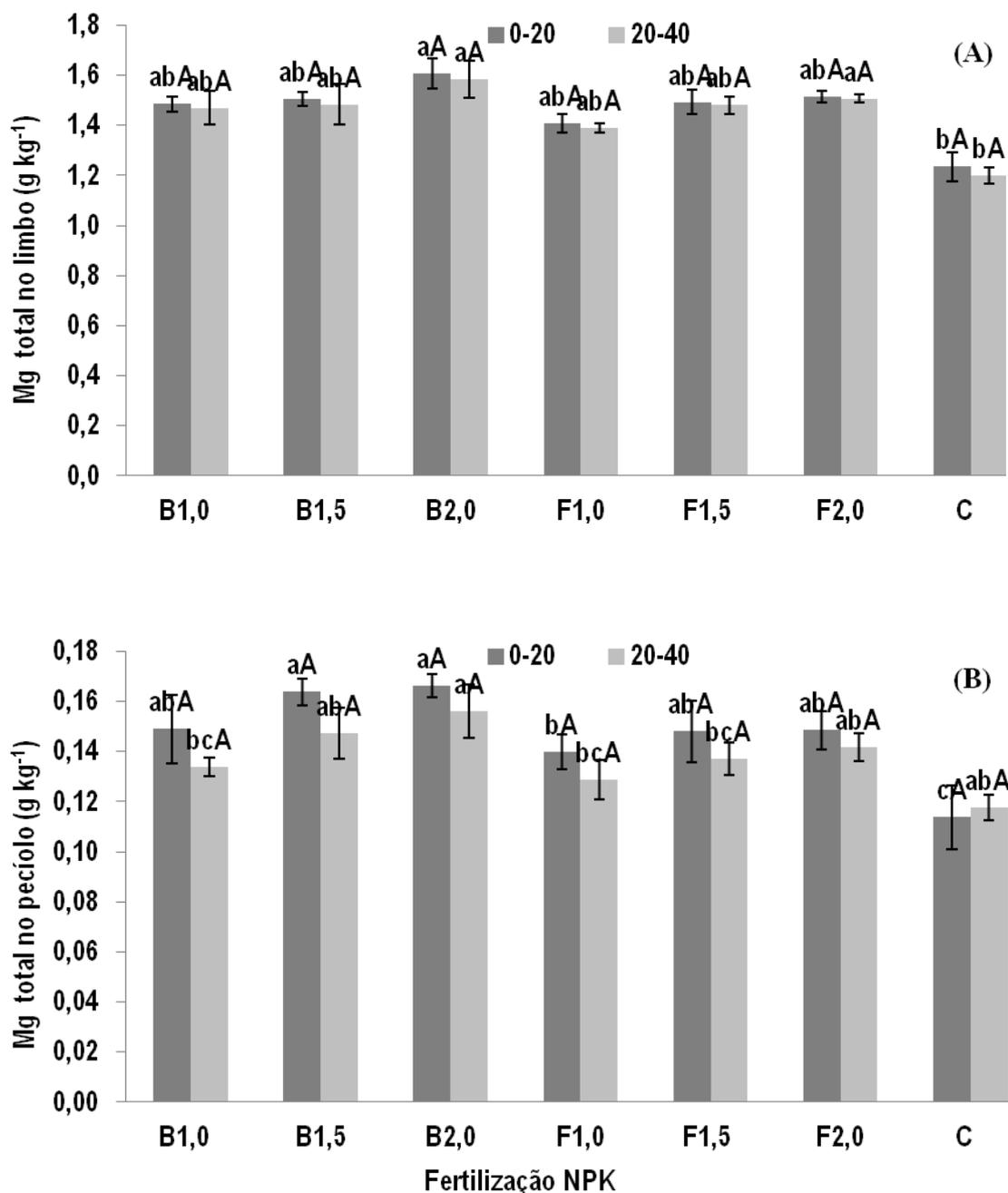


Figura 5. Concentração de Mg total no limbo (A) e no pecíolo (B) nas folhas da videira (cv. Isabel) em função da fertilização e da profundidade de aplicação dos fertilizantes (0-20 e 20-40 cm).

(*) Médias com letras minúsculas compara os diferentes fertilizantes para uma mesma profundidade de aplicação, enquanto as letras maiúsculas comparam as duas profundidades de aplicação do mesmo fertilizante.

Com relação ao teor de Mg no pecíolo houve efeito significativo da fertilização, pode-se evidenciar maior efeito no teor de Mg em função da aplicação do biofertilizante nas doses mais elevadas, quando comparado para o fertilizante

convencional aplicado na menor dose, e com o tratamento controle. O melhor resultado ($1,7 \text{ g kg}^{-1}$) foi obtido com aplicação do bioprotetor no maior nível (dobro do recomendado).

DISCUSSÃO

Os teores de N nas folhas da uva aumentaram com a aplicação das maiores doses de fertilização, embora só apresentando diferença significativa no pecíolo, pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade. O menor teor de N foi encontrado no tratamento controle e no (F) na dose mais baixa, e o maior teor com a aplicação do tratamento (P), na dose mais elevada. No tratamento de fertilização (F) usou-se fonte de N (sulfato de amônio) mais solúvel que é mais disponível para a planta o que pode ter promovido a maior absorção nos frutos. Nas folhas valores abaixo de $20,0 \text{ g kg}^{-1}$ é considerado nível crítico, segundo Fontes (2006).

O teor de P nos frutos não apresentou variação acentuada, com melhores resultados no limbo. O maior valor foi obtido com o tratamento de fertilização (P) na dose mais elevada e o menor valor com o tratamento de fertilização (F) na dose mais baixa. O tratamento controle ficou com os resultados mais baixos, seguido da fertilização com (F) na menor dose apresentou o segundo valor mais baixo. O maior valor foi com o tratamento de fertilização com (P) na dose mais elevada, o que mostra que a fertilização (P) e (F) é eficiente e, portanto, o (P) pode ser considerado como uma boa alternativa de adubação.

O (P) mesmo sendo oriundo de rocha fosfatada com baixa solubilidade, em mistura com S* inoculado com a bactéria *Acidithiobacillus* (Stamford *et al.*, 2008), são obtidos melhores resultados comparado com o tratamento F que usa como fonte de adubação (super fosfato simples) que é mais solúvel, e, portanto, mais disponível para as plantas.

Os teores de K nas folhas da uva foram variáveis, sendo os maiores teores encontrados no pecíolo. O tratamento de fertilização P na dose mais elevada mostra resultados similares ao fertilizante mineral solúvel (F), sendo todos os tratamentos de fertilização superiores ao tratamento controle com aplicação de composto de uva. O tratamento de fertilização P foi colocado com a finalidade principal de fornecer proteção a planta pela liberação da quitosana presente na parede micelial do fungo, no entanto, a quitosana também apresenta efeito de incremento de nutrientes de

acordo com Franco et al. (2005 e 2011), tendo em vista que tem alta produção de polifosfato inorgânico.

De acordo com Boonlertnirun *et al.* (2008), a quitosana serve como fonte de carbono para microrganismos do solo e ajuda a acelerar o processo de transformação da matéria orgânica para a forma inorgânica, passando os nutrientes para formas mais facilmente absorvidas pelas plantas. Assim, o sistema radicular das plantas assimila mais nutrientes do solo, o que pode explicar porque com esses tratamentos foram obtidos melhores resultados.

De uma maneira geral, ficou evidenciado que o bioprotetor com quitosana fúngica no maior nível de aplicação promove maior potencial de resposta, diferenciando do fertilizante mineral solúvel que mostrou menor resposta pelo teste de Tukey. O efeito favorável obtido com a aplicação dos tratamentos pode ter sido em função dos maiores teores de P e K disponível com adição de enxofre elementar inoculado com *Acidithiobacillus*, e pela fixação do N através da inoculação da matéria orgânica com a bactéria diazotrófica, que promoveu enriquecimento em N total, principalmente solubilizando esses nutrientes para formas disponíveis para as plantas.

Berger (2010) cultivando caupi com biofertilizante – bioprotetor obteve efeito positivo quanto a nutrição e mecanismo de defesa para a planta, em solo da região de Zona da Mata de Pernambuco com biofertilizante de rochas mais quitosana fúngica e de crustáceo. Resultados semelhantes também foram relatados por Silva Júnior (2008), que trabalhando em condições controladas verificou efeitos positivos de biofertilizante de rocha fosfática e potássica com adição de *Acidithiobacillus* e evidenciou uma tendência marcante para o incremento de nutrientes na cultura.

CONCLUSÕES

Com os dados obtidos podemos concluir que o bioprotetor mostrou potencial para ceder nutrientes para a cultura da uva (cv. Isabel), sendo comparada com a adubação com fertilizante mineral solúvel, e, portanto, pode ser alternativa viável para a fertilização da uva.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq e à FACEPE pelo apoio financeiro para a realização da pesquisa e pelas bolsas concedidas, a empresa Vinícola Botticelli pelo apoio integral durante toda a fase de realização dos trabalhos de campo, sem o que não teria sido possível a realização da pesquisa. À Universidade do Porto e à Universidade Católica Portuguesa – UCP pela possibilidade na realização da pesquisa de laboratório com a quitosana no combate ao fungo *Botrytis cinerea* causador da podridão cinzenta dos frutos da uva.

REFERÊNCIAS

- AGROSTAT (2012) – (**Banco de dados sobre comércio exterior**). (2012) Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.. www.agricultura.gov.br/internacional Acesso: 10 jan de 2012.
- ALBUQUERQUE, T. C. S.; ALBUQUERQUE NETO, A. A. R.; DEON, M. D. I. (2005) Exportação de nutrientes pelas videiras cvs. Italia e Benitaka cultivadas no vale do São Francisco. In Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal, 10.; Recife. **Anais.**
- ARSON, R. G.; GOHEEN, A. C. (1988) **Compendium of grape diseases**. Minnesota:APS,. 93p.
- AUGUSTINI, B. C. (2011) **Caracterização de vinhos de uvas Vitis labrusca por meio do seu conteúdo em aminoácidos e amins bioativas**. 2011. 105f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- BERGER, L.R.R.(2010) **Efeito da quitosana e do biofertilizante-bioprotetor na murcha-de-fusário em caupi (Vigna unguiculata L. Walp)**. Universidade Federal Rural de Pernambuco - Recife. 74p. (Dissertação de Mestrado).
- BOONLERTNIRUN S; BOONRAUNG C; SUVANASARA R. (2008). Application of chitosan in rice production. **Journal of Metals Materials and Minerals**. 18: 47-52.
- CAMARGO, U. A.; MAIA, J. D. G.; RITSCHER, P. S. (2010) **Novas cultivares brasileiras de uva**. Bento Gonçalves. Embrapa Uva e Vinho. 64.
- CAMARGO, U.A, MAIA, J.D.G. (2004) **BRS Cora: nova cultivar de uva para suco, adaptada a climas tropicais**. Embrapa Uva e Vinho, 4p. (Embrapa Uva e Vinho. Comunicado Técnico, 53)

- CHRISTENSEN, P.; KEARNEY. U. C. (2000) Use of tissue analysis in viticulture. **Cooperative Extension Work in Agriculture the University of California**. n. 10, p. 01-09, Dez.
- CRESWELL, K. J.; ESCHENBRUCH, R. (1981) The variation in magnesium levels of some experimental grapes, grape juices and wines. **Food Technology**, v. 16, n. 1, p. 37-43.
- CROSS, A.F. & SCHLENSIGER, H.A. (1995) A literature review and evaluation of the Hedley fractionation: Applications to the biochemical cycle of soil phosphorus in natural ecosystems. **Geoderma**, 64:197-214.
- DAL BÓ, M. A. (1992) Nutrição e adubação da videira. **Agropecuária Catarinense**, Florianópolis, v.5, n.4, p.32-35.
- DANNER, M. A.; CITADIN, I.; SASSO, S. A. Z.; ZARTH, N. A.; MAZARO, S. M. (2009) Fontes de cálcio aplicadas no solo e sua relação com a qualidade da uva 'Vênus'. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 31, n.3, p. 881-889.
- DÖBEREINER, J. (1961) **Enriquecimento do composto do lixo com bactérias fixadoras de nitrogênio atmosférico**. Rio de Janeiro. Instituto de Pesquisa Agropecuária, Comunicado Técnico. n. 11. 10p.
- DÖBEREINER, J.; ANDRADE, V. de O.; BALDANI, V.L.D. (1999) **Protocolos para Preparo de Meios de Cultura da Embrapa Agrobiologia**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, dez. 38p. (Embrapa-CNPAB. Documentos, 110).
- DONATI, G. L. (2002) **Effetto Del potássio e dell irrigazione sullo stato nutrizionale della vite (cv. Trebbiano Romagnolo) e sulla qualita delle uve**. 2002. 73 p. Tesi - Corso di Laurea in Scienze e Tecnologie Agrarie, Università degli Studi di Bologna.

- DUENHAS, L.H. **Cultivo orgânico de melão: Aplicação de esterco e de biofertilizantes e substâncias húmicas via fertirrigação**. 2004, 73p. Dissertação Mestrado. Escola Superior de Agricultura Luis de Queiroz, Piracicaba, 2004.
- EMBRAPA –Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. (2006) **Sistema Brasileiro de Classificação de Solos**. Centro Nacional de Pesquisa de Solos: Rio de Janeiro. 412p.
- EPSTEIN E; BLOOM AJ. (2006) **Nutrição mineral de plantas: princípios e perspectivas**. Londrina: Editora Planta. 403p.
- FILGUEIRA FAR. (2003) Solanáceas: agrotecnologia moderna na produção de tomate, batata, pimentão, pimenta, berinjela e jiló. Viçosa, MG: UFV.
- FONTES PCR. (2006) **Diagnóstico do estado nutricional das plantas**. Viçosa: UFV, 122p.
- FRANCO, L. O.; ALBUQUERQUE, C. D. C.; STAMFORD, N. P., LIMA, M. A. B., TAKAKI-CAMPOS, G. M. (2011) Avaliação da atividade ácida e alcalina e acúmulo de fosfato inorgânico em amostras de *Cunninghamella elegans*. **Analytica** (São Paulo), v. 54, p. 70-78.
- FRANCO, L. O.; STAMFORD, T. C. M.; STAMFORD, N. P.; TAKAKI, G. M. C. (2005) *Cunninghamella elegans* (IFM 46109) como fonte de quitina e quitosana. **Analytica**. 4: 40-44.
- IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA.(2011) Banco de dados. Disponível em: <[http:// www.sidra.ibge.gov.br/](http://www.sidra.ibge.gov.br/)>. Acesso em 31 dez. 2011.
- IPA – Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária. (2008) **Recomendação de adubação para o estado de Pernambuco**. Recife – PE. 181p.

- JONES, J.R. J.B.; WOLF, B.; MILLS, H.A. (1991) Plant analysis handbook: a practical sampling, preparation, analysis and interpretation guide. **Athens: Micro-Macro**, 213p.
- LEÃO, P.C.S. e SOARES, J.M. (2000) **A viticultura no semiárido brasileiro**. Petrolina: Embrapa Semi-Árido, 366 p.
- LIMA, F.S.; STAMFORD, N.P.; SOUSA, C.S.; LIRA, JÚNIOR M.A.; MALHEIROS, S.M.M.; VAN STRAATEN, P. (2010) Earthworm compound and rock biofertilizer enriched in Nitrogen by inoculation with free living diazotrophic bacteria. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**. 27: 1-7.
- MALAVOLTA, E. (1997) **Avaliação do estado nutricional das plantas: Princípios e aplicações**. 2.ed. Piracicaba: POTAFOS. 319p.
- MALAVOLTA, E. (2006) **Manual de nutrição de plantas**. São Paulo: Editora Agronômica Ceres. 638p.
- MALAVOLTA, E.; GOMES, F. P.; ALCARDE, J. C. (2002) **Aubos e adubações**. São Paulo: Nobel, p. 66-67.
- MALAVOLTA, E.; VITTI, G.C.; OLIVEIRA, A.S. (1989) **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações**. Piracicaba: Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato. 201p.
- MARCUSSI, F.F.N. (2005) Uso da fertirrigação e teores de macronutrientes em planta de pimentão. **Engenharia Agrícola**. 25: 642-650.
- MARCUSSI, F.F.N.; GODOY, L.J.G.; BÔAS, R.L.V. (2004) Fertirrigação nitrogenada e potássica na cultura do pimentão baseada no acúmulo de n e k pela planta. **Irriga** 9: 41- 51.

- MIELE, A, RIZZON, L. A., GIOVANNINI, E. (2009) Efeito do porta-enxerto no teor de nutrientes em tecidos da videira 'Cabernet sauvignon'. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 31, n. 4, p. 1141-1149.
- MOURA, M.S.B.; TEIXEIRA, A.H.C.; SOARES, J.M. (Eds.). (2009). **Exigências Climáticas**. In: SOARES, J.M.; SOUSA LEAO, P.C. A viticultura no semi-árido brasileiro. Petrolina: EMBRAPACPATSA, 2009. p. 257- 290.
- OLIVEIRA, A. E. S.; SÁ, J. R.; MEDEIROS, J. F.; NOGUEIRA, N. W.; SILVA, K. J. P. (2010) Interação da adubação organo-mineral no estado nutricional das plantas. **Revista Verde**. Mossoró – RN, v.5, n.3, p. 53 - 58 julho/setembro de 2010.
- PINTO, J. M.; GAVA, C. A. T.; LIMA, M. A. C.; SILVA, A. F.; RESENDE, G. M. (2008) Cultivo orgânico de meloeiro com aplicação de biofertilizantes e doses de substância húmica via fertirrigação. **Revista Ceres**. 55(4): 280- 286.
- RIBEIRO LG; LOPES, J.C.; MARTINS FILHO, S.; RAMALHO, S.S.(2000). Adubação orgânica na produção de pimentão. **Horticultura Brasileira**. 18: 134-137.
- RITSCHER, P. S.; SEBEN, S. DE S. (Ed.). **Embrapa Uva e Vinho: novas cultivares brasileiras de uva**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2010. 64 p.
- RIZZON, L. A.; MIELE, A.; MENEGUZZO, J. (2000) Avaliação da uva cv. *Isabel* para a elaboração de vinho tinto. **Ciência Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.20, n.1, p.115-121.
- ROCHA, M.C.; CAMARGO, M.G.F.; POLIDORO, J.C.; SILVA, D.A.G.; FERNANDES, M.C.A. (2006) Características de frutos de pimentão pulverizados com produtos de ação bactericida. **Horticultura Brasileira**. 24: 185-189.

ROE NE; STOFFELLA PJ; GRAETZ D.(1997) Composts from various municipal solid waste feedstocks affect vegetable crops. II. Growth, yields, and fruit quality. **Journal of American Society and Horticultural Science**. 122: 433-437.

SANTOS, R. D.; LEMOS, R. C.; SANTOS, H. G.; KER, J. C.; ANJOS, L. H. C. dos. (2005) **Manual de descrição e coleta de solo no campo**. 5. Ed. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo. Embrapa Solos, 100 p.

SAS INSTITUTE.(2011) **The SAS 9.2 software. System for Windows**. CD – ROM for Windows.

SAS. **Statistical Analysis System Institute**. SAS/STAT.(1996) User's guide, version 9.0. Cary. 842p.

SEDIYAMA, M.A.N.; VIDIGAL, S.M.; SANTOS, M.R.; SALGADO, L.T.(2009) Rendimento de pimentão em função da adubação orgânica e mineral. **Horticultura Brasileira**. 27: 294-299.

SILVA JÚNIOR, S. (2008) **Bradyrhizobium e biofertilizantes de rochas com Acidithiobacillus e gesso no feijão caupi em solos salinos-sódicos**. Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife. (Dissertação de Mestrado).

SOUZA LEÃO, P. C.; SOARES, J. M. (Eds.). (2009). Implantação do vilhedeo In: SOARES, J.M.; SOUSA LEO, P.C. **A viticultura no semi-árido brasileiro**. Petrolina:EMBRAPACPATSA , 2009. p. 257- 290.

SOUZA LEÃO, P. C.; SOARES, J. M. (Eds.). (2009). Implantação do vilhedeo In: SOARES, J.M.; SOUSA LEO, P.C. **A viticultura no semi-árido brasileiro**. Petrolina:EMBRAPACPATSA , 2009. p. 257- 290.

STAMFORD, N.P.; LIMA, R.A.; LIRA JUNIOR, M.A.; SANTOS, C.E.R.S. (2008) Effectiveness of phosphate and potash rocks with *Acidithiobacillus* on sugar cane yield and their effects in soil chemical attributes. **World Journal of Microbiology and Biotechnology** 24: 2061-2066.

STAMFORD, N.P.; SANTOS, P.R.; SANTOS, C.E.R.S.; FREITAS, A.D.S.; DIAS, S.H.L.; LIRA JUNIOR, M.A. (2007) Agronomic effectiveness of biofertilizers with phosphate rock, sulphur and *Acidithiobacillus* in a Brazilian tableland acidic soil grown with yam bean. **Bioresource Technology**. 98: 1311–1318.

TEDESCO, M.J. et al. **Análise de solo, plantas e outros materiais**. Porto Alegre : Departamento de Solos, UFRGS, 1995. 174p.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

De uma maneira geral, os resultados obtidos em experimento de campo com a cultura da uva, permitem concluir que o bioprotetor pode ser usado como alternativa em substituição a fertilizantes convencionais, proporcionando efeito positivo e satisfatório na nutrição, produtividade e qualidade dos frutos e seus derivados.

Também pode ser ressaltado que o biofertilizante de rochas inoculado com *Acidithiobacillus* pode acarretar redução do pH do solo, fato proveniente da indução e produção de ácido sulfúrico bioquímico, devendo em solos com pH levemente ácido, ser misturado com material orgânico para solucionar o efeito da acidez.

A inoculação da matéria orgânica com bactéria diazotrófica de vida livre é um recurso de grande importância para o enriquecimento de N, visando contribuir para diminuir a quantidade de fertilizantes nitrogenados.

O bioprotetor além de incrementar a nutrição e produtividade, apresenta efeito residual e potencial para proteção da planta contra fungos patogênicos, especialmente para o *Botrytis cinerea* causador da podridão cinzenta dos frutos da uva.

O trabalho mostra condições para ser iniciado o processo de patentiamento do bioprotetor produzido com rochas fosfatadas e potássicas com *Acidithiobacillus* em mistura com matéria orgânica enriquecido em N por inoculação com bactéria diazotrófica de vida livre e adição de fungo da Ordem Mucorales (*Cunninghamella elegans*), produtor de quitosana, biopolímero que possui ação antimicrobiana comprovada.

APÊNDICE



FIGURA 1. Preparo do bioprotetor.com revolvimento das rochas moídas e material orgânico.

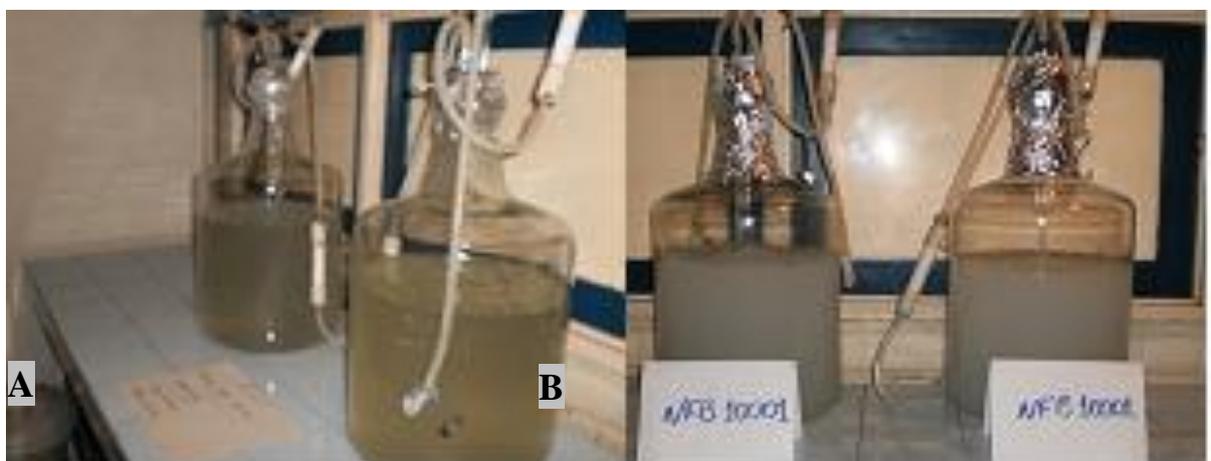


FIGURA 2. Crescimento da bactéria diazotrófica de vida livre NFB10.001. **A:** fase inicial de crescimento **B:** crescimento bacteriano após 5 dias.



FIGURA 3. Inoculação com a bactéria NFB10001 e biomassa do *Cunninghamella elegans* (UCP 542)



FIGURA 4. Monitoramento dos parâmetros das atividades em incubação por 35 dias.



FIGURA 5. Implantação do experimento de campo na área experimental.



FIGURA 6. Tratos culturais aplicados na videira da área experimental.



FIGURA 7. Atividade de manejo da fase de crescimento e condução da copa.



FIGURA 8. Tratamento controle (composto uva) 2ª colheita.



FIGURA 9. Produção com fertilizante convencionais (2ª colheita) nas doses **A:** 1,0; **B:** 1,5 e **C:** 2,0 vezes o recomendado.



FIGURA 10. Produção com Bioprotetor (2ª colheita) nas doses **A:** 1,0; **B:** 1,5 e **C:** 2,0 vezes o recomendado.