

**EMMANUELLA VILA NOVA DA SILVA**

**EFICIÊNCIA DE BIOFERTILIZANTE DE ROCHAS E MATÉRIA ORGÂNICA COM  
ADIÇÃO DE QUITOSANA FUNGICA NA CULTURA DA BANANA**

**RECIFE – PE  
FEVEREIRO DE 2016**

**EMMANUELLA VILA NOVA DA SILVA**

**EFICIÊNCIA DE BIOFERTILIZANTE DE ROCHAS E MATÉRIA ORGÂNICA COM  
ADIÇÃO DE QUITOSANA FUNGICA NA CULTURA DA BANANA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências do Solo, Agronomia, da Universidade Federal Rural de Pernambuco como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências do Solo.

**Orientador:** Dr. Newton Pereira Stamford

**Co-orientadora:** Dra. Rosimar dos Santos Musser

**RECIFE – PE  
FEVEREIRO DE 2016**

Ficha catalográfica

S586e Silva, Emmanuella Vila Nova da  
Eficiência de biofertilizante de rochas e matéria orgânica com  
adição de quitosana fungica na cultura da banana / Emmanuella  
Vila Nova da Silva. – Recife, 2016.  
149 f. : il.

Orientador: Newton Pereira Stamford.  
Tese (Doutorado em Ciências do Solo) – Universidade  
Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Agronomia,  
Recife, 2016.

Inclui referências, anexo(s) e apêndice(s).

1. Acidithiobacillus 2. Bioprotetor 3. Diazotrófica de vida livre  
4. Fertilizante solúvel 5. Mal-do-Panamá 6. Nanoquitosana  
I. Stamford Newton Pereira, orientador II. Título

CDD 631.4

**EFICIÊNCIA DE BIOFERTILIZANTE DE ROCHAS E MATÉRIA ORGÂNICA COM  
ADIÇÃO DE QUITOSANA FUNGICA NA CULTURA DA BANANA**

**EMMANUELLA VILA NOVA DA SILVA**

**Tese defendida e aprovada pela banca examinadora em 26 de fevereiro de 2016**

**ORIENTADOR:**

---

**Dr. Newton Pereira Stamford  
Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE**

**EXAMINADORES:**

---

**Dr<sup>a</sup>. Thayza Christina Montenegro Stamford  
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE**

---

**Dr<sup>o</sup>. Marcos Antônio Barbosa de Lima  
Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE**

---

**Dr<sup>a</sup>. Carolina Etienne de Rosália e Silva Santos  
Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE**

---

**Dr<sup>a</sup>. Maria do Carmo Catanho Pereira de Lyra  
Instituto Agronômico de Pernambuco - IPA**

## **OFEREÇO**

A minha querida mãe Célia (*in memoriam*) por todo amor, carinho e dedicação. Um exemplo de mãe e mulher!

A minha irmã Rafaella pelo amor, apoio e incentivo sempre dedicado.

Aos meus avôs João e Aldemir (*in memoriam*) e minhas avós Inácia (*in memoriam*) e Creuza, aos meus tios Mário, Alcélia e Márcia, aos meus primos Mário e Marcela, por todo incentivo e torcida.

## **DEDICO**

Ao meu grande amor Wagner Oliveira pelo companheirismo, pela dedicação, pelo amor, pelos conselhos e por toda a paciência. Você foi e é meu braço direito!

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Deus**, acima de qualquer coisa, por me manter firme nas dificuldades, dando-me o conforto e a sabedoria para enfrentar meus obstáculos.

A minha querida mãe Célia Vila Nova da Silva, *in memoriam*, que me deu toda base de ensinamentos, muito amor e carinho sempre! E a minha irmã Rafaella Vila Nova da Silva, que sempre me incentivou e me deu forças para concluir meus estudos.

Ao meu noivo Wagner Oliveira pelo amor, por toda paciência, toda força e apoio tanto nos momentos que ficamos longe quanto nos momentos que ficamos juntos e trabalhando em uma jornada intensa e produtiva de análises.

A Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), ao Programa de Pós-graduação em Ciências do Solo pela oportunidade de realização do curso de doutorado.

A FACEPE e a CAPES pelo apoio financeiro durante o curso.

Ao meu orientador, Dr. Newton Pereira Stamford, pelo apoio científico, pelos conselhos e ensinamentos, nesta longa jornada. Pelo apoio incondicional nos momentos decisivos.

A minha co-orientadora, Dra. Rosimar dos Santos Musser, pela amizade, pelas dúvidas tiradas, pelo carinho e pela atenção a mim dedicada.

A Dra. Ana Dolores, Dra. Carolina Etienne, Dr. Marcos Lima, Dra. Thayza Stamford e Dra. Thatiana Stamford, pelos ensinamentos e conselhos, pelas dúvidas tiradas, por todo apoio dedicado no momento necessário.

Aos Professores do Programa no período do curso, Caroline Miranda Biondi, Edivan Rodrigues de Souza, Flávio Adriano Marques, Júlia Kuklinsky Sobral, Mateus Rosas Ribeiro (*in memoriam*) e Mateus Rosas Ribeiro Filho pelos ensinamentos transmitidos.

Aos pesquisadores do IPA: Dra. Adália Mergulhão, Dr[a. Maria do Carmo dos Santos, Dra. Luiza Bastos, Dra. Márcia Figueiredo, Dra. Maria do Carmo Catanho (Cacau), Dra. Tereza Cristina e em especial ao Diretor Dr. José de Paula, pelos excelentes conselhos científicos e por nunca terem medido esforços para ajudar na realização deste trabalho.

Ao Sr. Fernando Teixeira da Empresa Campo Biotecnologia Vegetal, na Embrapa Mandioca e Fruticultura pela atenção e por todo apoio prestado.

Ao Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA), e em especial aos Laboratórios de Biologia do Solo e de Fitopatologia por todo apoio técnico.

A Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), em particular ao Laboratório de Nutrição e ao Departamento de Química Fundamental em conjunto com Miguel, pelo suporte técnico.

A Estação Experimental de Cana de Açúcar do Carpina (EECAC) da UFRPE, ao Dr. Djalma Neto, ao Sr. Geraldo e ao Sr. Ivanilson pelo apoio prestado.

Aos Laboratórios de Microbiologia, Mineralogia – em especial a Elis, Química e Química Ambiental de Solos da UFRPE, pelo suporte técnico e pela ajuda prestada.

A minha família, em particular minha irmã, vó, tios, primos e meu cunhado André pelo total apoio que recebi durante o curso. Pela educação, amor e credibilidade que sempre me proporcionaram.

Aos meus amigos e amigas do Laboratório de Biotecnologia Ambiental: Cíntia, Lusiene, Marllon, Marta, Vinícius, pelo convívio, carinho e todo apoio.

A todos os meus colegas de Tuma pelos bons momentos de estudo e descontração, pelo apoio nos momentos difíceis, em especial as minhas amigas Adelazil, Andresa, Danúbia, Monalisa e Ruthana.

Aos funcionários da UFRPE Maria do Socorro, Eliane, Josué, José Fernando (Zeca) pela atenção e ajuda indispensável.

As minhas amigas da graduação Alexandra de Andrade, Patrícia Karla e Suzana Oliveira pela eterna amizade.

Enfim, a todos envolvidos direta e indiretamente neste trabalho, obrigada!

Estejam vigilantes, mantenham-se  
firmes na fé, sejam homens de coragem,  
sejam fortes!

**1 Coríntios 16:13**



<b>SUMÁRIO.....</b>	<b>Pág.</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>xi</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>xiii</b>
<b>LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACÕES.....</b>	<b>xvii</b>
RESUMO GERAL.....	xix
GENERAL ABSTRACT.....	xxi
INTRODUÇÃO GERAL.....	23
FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	26
Bioprotetor.....	26
Quitosana.....	28
Nanopartículas de quitosana (Nanoquitosana).....	32
Banana ( <i>Musa</i> spp.).....	34
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	38
<b>CAPÍTULO I. CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E MINERALÓGICA DE ROCHAS FOSFATADA E POTÁSSICA INOCULADAS COM <i>Acidithiobacillus thiooxidans</i> (FG01).....</b>	<b>52</b>
RESUMO.....	53
ABSTRACT.....	54
INTRODUÇÃO.....	55
MATERIAL E MÉTODOS.....	57
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	61
CONCLUSÕES.....	77
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	77
<b>CAPÍTULO II - ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA QUITOSANA FÚNGICA E DE NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA NO CONTROLE DO FUNGO <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>cubense</i> .....</b>	<b>83</b>
RESUMO.....	84
ABSTRACT.....	85
INTRODUÇÃO.....	86

MATERIAL E MÉTODOS.....	87
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	96
CONCLUSÕES.....	109
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	110
<b>CAPÍTULO III - EFEITO DO BIOPROTETOR E DA QUITOSANA FÚNGICA NO CONTROLE DO MAL-DO-PANAMÁ EM BANANEIRA.....</b>	<b>117</b>
RESUMO.....	118
ABSTRACT.....	119
INTRODUÇÃO.....	120
MATERIAL E MÉTODOS.....	121
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	127
CONCLUSÕES.....	138
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	138
CONCLUSÕES GERAIS.....	144
APÊNDICE.....	145
ANEXOS.....	147

## LISTA DE TABELAS

<b>CAPÍTULO II - ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA QUITOSANA FÚNGICA E DE NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA NO CONTROLE DO FUNGO <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>cubense</i></b>		Pág.
<b>Tabela 1.</b>	Atribuição das bandas do infravermelho da quitosana fúngica.	96
<b>Tabela 2.</b>	Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) da quitosana fúngica e da nanopartícula de quitosana (nanoquitosana) para a estirpe do fungo <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>cubense</i> (AM M) <i>in vitro</i> .	100
<b>Tabela 3.</b>	Crescimento radial (mm) de <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>cubense</i> (AM M) durante 144 h de cultivo em meio BDA (controle) sob diferentes tratamentos de nanopartículas de quitosana (nanoquitosana) e de quitosana nas concentrações de 0,1; 0,25 e 0,5 mg mL <sup>-1</sup> .	103
<b>Tabela 4.</b>	Esporulação de <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>cubense</i> (AM M) cultivado em meio BD (controle) sob diferentes tratamentos de nanopartículas de quitosana (nanoquitosana) e de quitosana nas concentrações de 0,1; 0,25 e 0,5 mg mL <sup>-1</sup> .	107
<b>CAPÍTULO III - EFEITO DO BIOPROTETOR E DA QUITOSANA FÚNGICA NO CONTROLE DO MAL-DO-PANAMÁ EM BANANEIRA</b>		
<b>Tabela 1.</b>	Características químicas e físicas do Argissolo Vermelho Amarelo da Estação Experimental de Cana-de-açúcar do Carpina (EECAC), no município de Carpina, PE.	122
<b>Tabela 2.</b>	Caracterização química do bioprotetor (PNPK).	122
<b>Tabela 3.</b>	Índice de severidade da doença mal-do-Panamá (%) em mudas de banana altamente suscetível (variedade Maçã) e resistente (variedade Williams) inoculadas com <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>cubense</i> (isolado AM M) coletadas 40 dias após a inoculação.	128
<b>Tabela 4.</b>	Nitrogênio, fósforo e potássio total na parte aérea da banana (variedade Maçã e Williams) em função da aplicação dos tratamentos de fertilizante mineral (FNPK na dose recomendada (DR)), bioprotetor (PNPK1=bioprotetor na DR; PNPk2=150% da DR), acrescido de quitosana fúngica (Q), com e sem inoculação do patógeno <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>cubense</i> .	133

**Tabela 5.** pH, P e K disponível, Ca e Mg trocável determinados no solo, em função da aplicação dos tratamentos de fertilizante mineral (FNPk na dose recomendada (DR)), bioprotetor (PNPK1=bioprotetor na DR; PNPk2=150% da DR), acrescido de quitosana fúngica (Q), com e sem inoculação do patógeno *Fusarium oxysporum* f.sp. *ubense*, ao final do experimento com mudas de banana. 136

## LISTA DE FIGURAS

<b>CAPÍTULO I. CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E MINERALÓGICA DE</b>	Pág.
<b>ROCHAS FOSFATADA E POTÁSSICA INOCULADAS COM</b>	
<b><i>Acidithiobacillus thiooxidans</i> (FG01)</b>	
<b>Figura 1-</b> Placas de Petri com rocha fosfatada (RP) no tempo 0 sem <i>Acidithiobacillus thiooxidans</i> ; e biofertilizante de rocha fosfatada (BP) nos tempos 30; 60; 90; 120; 150 e 180 dias, acrescida de enxofre (S10% e S20%) inoculado com <i>A. thiooxidans</i> (FG01).	58
<b>Figura 2-</b> Placas de Petri com rocha potássica (RK) no tempo 0 sem <i>Acidithiobacillus thiooxidans</i> ; e biofertilizante de rocha potássica (BK) nos tempos 30; 60; 90; 120; 150 e 180 dias, acrescida de enxofre (S10% e S20%) inoculado com <i>A. thiooxidans</i> (FG01).	59
<b>Figura 3-</b> Efeito no pH (H <sub>2</sub> O – 1,0:2,5) na rocha fosfatada (RP) com enxofre (S10% e S20%) inoculado com <i>Acidithiobacillus thiooxidans</i> (FG01), após 180 dias de incubação, no tempo 0 para a RP sem <i>A. thiooxidans</i> ; e nos tempos 30; 60; 90; 120; 150 e 180 dias para o tratamento RP+S inoculado com <i>A. thiooxidans</i> . *Médias com a mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. C.V. (%) = 2,20.	61
<b>Figura 4-</b> Fósforo disponível na rocha fosfatada (RP) com enxofre (S10% e S20%) inoculado com <i>Acidithiobacillus thiooxidans</i> (FG01), após 180 dias de incubação, no tempo 0 para a RP sem <i>A. thiooxidans</i> ; e nos tempos 30; 60; 90; 120; 150 e 180 dias para o tratamento RP+S inoculado com <i>A. thiooxidans</i> . *Médias com a mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. C.V. (%) = 26,29.	63
<b>Figura 5-</b> Cálcio trocável na rocha fosfatada (RP) com enxofre (S10% e S20%) inoculado com <i>Acidithiobacillus thiooxidans</i> (FG01), após 180 dias de incubação, no tempo 0 para a RP sem <i>A. thiooxidans</i> ; e nos tempos 30; 60; 90; 120; 150 e 180 dias para o tratamento RP+S inoculado com <i>A. thiooxidans</i> . *Médias com a mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. C. V. = 11,39.	65

**Figura 6-** Magnésio trocável na rocha fosfatada (RP) com enxofre (S10% e S20%) inoculado com *Acidithiobacillus thiooxidans* (FG01), após 180 dias de incubação; no tempo 0 para a RP sem *A. thiooxidans*; e nos tempos 30; 60; 90; 120; 150 e 180 dias para o tratamento RP+S inoculado com *A. thiooxidans*. \*Médias com a mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. C. V. = 22,09. 66

**Figura 7-** Difrátograma da rocha fosfatada (RP) no tempo 0, sem enxofre (S) e sem *Acidithiobacillus thiooxidans* (FG01) e do biofertilizante da RP (BP), com enxofre (S20%) inoculado com *A. thiooxidans*, após 180 dias de incubação. Gp= gipsita; Hx= hidroxiapatita. 68

**Figura 8-** Efeito no pH (H<sub>2</sub>O – 1,0 :2,5) na rocha potássica (RK) com enxofre (S10% e S20%) inoculado com *Acidithiobacillus thiooxidans* (FG01), após 180 dias de incubação, no tempo 0 para a RK sem *A. thiooxidans*; e nos tempos 30; 60; 90; 120; 150 e 180 dias para o tratamento RK+S inoculado com *A. thiooxidans*. \*Médias com a mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. C. V. = 1,81. 69

**Figura 9-** Potássio disponível na rocha potássica (RK) com enxofre (S10% e S20%) inoculado com *Acidithiobacillus thiooxidans* (FG01), após 180 dias de incubação, no tempo 0 para a RK sem *A. thiooxidans*; e nos tempos 30; 60; 90; 120; 150 e 180 dias para o tratamento RK+S inoculado com *A. thiooxidans*. \*Médias com a mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. C. V. = 6,57. 71

**Figura 10-** Cálcio trocável na rocha potássica (RK) com enxofre (S10% e S20%) inoculado com *Acidithiobacillus thiooxidans* (FG01), após 180 dias de incubação, no tempo 0 para a RK sem *A. thiooxidans*; e nos tempos 30; 60; 90; 120; 150 e 180 dias para o tratamento RK+S inoculado com *A. thiooxidans*. \*Médias com a mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. C. V. = 13,25. 72

**Figura 11-** Magnésio trocável na rocha potássica (RK) com enxofre (S10% e S20%) inoculado com *Acidithiobacillus thiooxidans* (FG01), após 180 dias de incubação, no tempo 0 para a RK sem *A. thiooxidans*; e nos tempos 30; 60; 90; 120; 150 e 180 dias para o tratamento RK+S inoculado com *A. thiooxidans*. \*Médias com a mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. C. V. = 25,67. 73

**Figura 12-** Difratoograma da rocha potássica (RK) no tempo 0, sem enxofre (S) e sem *Acidithiobacillus thiooxidans* (FG01) e do biofertilizante da RK (BK), com enxofre (S20%) inoculado com *A. thiooxidans*, após 180 dias de incubação. B= biotita; Gp= gipsita; Gh=goethita. 74

## **CAPÍTULO II - ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA QUITOSANA FÚNGICA E DE NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA NO CONTROLE DO FUNGO *Fusarium oxysporum* f.sp. *ubense***

**Figura 1-** Imagem de microscopia eletrônica de varredura (MEV) das nanopartículas de quitosana antes (A) e depois (B) do tratamento térmico. Barras de escala = 10  $\mu$ m. 99

**Figura 2-** Macromorfologia de *Fusarium oxysporum* f.sp. *ubense* (AM M), em meio BDA sob diferentes tratamentos de quitosana e de nanopartículas de quitosana (nanoquitosana). A: Cultura controle (apenas meio); B: 0,1 mg mL<sup>-1</sup> quitosana; C: 0,25 mg mL<sup>-1</sup> quitosana; D: 0,5 mg mL<sup>-1</sup> quitosana; E: 0,1 mg mL<sup>-1</sup> nanoquitosana; F: 0,25 mg mL<sup>-1</sup> nanoquitosana e G: 0,5 mg mL<sup>-1</sup> nanoquitosana. 105

**Figura 3-** Efeito de quitosana sobre a germinação de esporos de *Fusarium oxysporum* f.sp. *ubense* (AM M) cultivado em meio BD (controle) sob diferentes tratamentos de quitosana nas concentrações de 0,1; 0,25; 0,5 e 1,0 mg mL<sup>-1</sup>. 108

## **CAPÍTULO III - EFEITO DO BIOPROTETOR E DA QUITOSANA FÚNGICA NO CONTROLE DO MAL-DO-PANAMÁ EM BANANEIRA**

**Figura 1-** Efeito dos tratamentos de fertilizante mineral (FNPK na dose recomendada (DR)) e bioprotetor (PNPK1=bioprotetor na DR; PNPK2=150% da DR), acrescido de quitosana fúngica. A: FNPK+FOC\* (Maçã=M); B: PNPK2+Q+FOC (M); C: PNPK2+FOC (M); D: PNPK1+FOC (M); E: FNPK+FOC (Williams=W); F: PNPK2+Q+FOC (W); G: PNPK2+FOC (W) e H: PNPK1+FOC (W). \**Fusarium oxysporum* f.sp. *ubense* (FOC). 127

**Figura 2-** Efeito dos tratamentos de fertilizante mineral (FNPK na dose recomendada (DR)), bioprotetor (PNPK1=bioprotetor na DR; PNPk2=150% da DR), acrescido de quitosana fúngica (Q), com e sem inoculação do patógeno *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*, na biomassa seca da parte aérea da banana (variedade Maçã). \*Médias com a mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. C.V. (%) = 7,65. 130

**Figura 3-** Efeito dos tratamentos de fertilizante mineral (FNPK na dose recomendada (DR)), bioprotetor (PNPK1=bioprotetor na DR; PNPk2=150% da DR), acrescido de quitosana fúngica (Q), com e sem inoculação do patógeno *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*, na biomassa seca da parte aérea da banana (variedade Williams). \*Médias com a mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. C.V. (%) = 4,03. 131



## LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIações

<b>-NHCOCH<sub>3</sub></b>	Grupamento acetamido
<b>-NH<sub>2</sub></b>	Grupamento amino
<b>A</b>	<i>Acidithiobacillus thiooxidans</i>
<b>BD</b>	Batata-dextrose
<b>BDA</b>	Batata, dextrose e ágar
<b>BK</b>	Biofertilizante potássico
<b>Bo</b>	Boro
<b>BNPK</b>	Biofertilizante misto
<b>BP</b>	Biofertilizante fosfatado
<b>Ca</b>	Cálcio
<b>CFM</b>	Concentração fungicida mínima
<b>CIM</b>	Concentração inibitória mínima
<b>Cl</b>	Cloro
<b>Cu</b>	Cobre
<b>D<sub>2</sub>O</b>	Água deuterada
<b>Fe</b>	Ferro
<b>FNPK</b>	Fertilizante solúvel comercial
<b>FOC</b>	<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i> cubense</i>
<b>GD</b>	Grau de desacetilação
<b>H<sub>2</sub>O</b>	Água
<b>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	Ácido sulfúrico
<b>HCl</b>	Ácido clorídrico
<b>IV</b>	Infravermelho
<b>K</b>	Potássio
<b>KCl</b>	Cloreto de potássio
<b>K<sub>2</sub>O</b>	Óxido de potássio
<b>MEV</b>	Microscopia eletrônica de varredura
<b>Mg</b>	Magnésio
<b>Mn</b>	Manganês
<b>N</b>	Nitrogênio
<b>NaOH</b>	Hidróxido de sódio
<b>O<sub>2</sub></b>	Oxigênio

<b>P</b>	Fósforo
<b>pH</b>	Potencial hidrogeniônico
<b>PNPK</b>	Bioprotetor
<b>P<sub>2</sub>O<sub>5</sub></b>	Pentóxido de fósforo
<b>RK</b>	Rocha potássica
<b>RMN <sup>1</sup>H</b>	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
<b>RP</b>	Rocha fosfatada
<b>S<sup>0</sup></b>	Enxofre elementar
<b>S</b>	Enxofre
<b>SO<sub>4</sub><sup>2-</sup></b>	Sulfato
<b>TPP</b>	Tripolifosfato de sódio
<b>Zn</b>	Zinco

# EFICIÊNCIA DE BIOFERTILIZANTE DE ROCHAS E MATÉRIA ORGÂNICA COM ADIÇÃO DE QUITOSANA FUNGICA NA CULTURA DA BANANA

## RESUMO GERAL

Na agricultura moderna, a exigência do uso de fertilizantes e corretivos tem a finalidade de proporcionar incremento na produção de alimentos, atender os critérios econômicos, e também conservar a fertilidade e a biodiversidade do solo, procurando minimizar danos ao ambiente. Uma alternativa viável é a utilização de rochas fosfatadas (RP) e potássicas (RK) para produzir biofertilizantes, sendo misturados com enxofre elementar e inoculados com bactérias do gênero *Acidithiobacillus*. Os biofertilizantes de rocha (RP e RK) são misturados com matéria orgânica e inoculados com bactérias diazotróficas de vida livre, para incremento em N, nutriente tão exigido para o crescimento das plantas. Quando acrescido da biomassa do fungo *Cunninghamella elegans*, que possui quitina e quitosana em sua parede celular pode acrescentar ao material, propriedades antifúngicas e fungicidas (bioprotetor). O trabalho teve o objetivo de avaliar a eficiência do biofertilizante produzido em laboratório, a partir de RP e RK; verificar a atividade antifúngica da quitosana e da nanoquitosana, em experimentos *in vitro* em relação ao fungo patógeno *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* (FOC) causador do mal-do-Panamá na cultura da banana; assim como avaliar o efeito da quitosana e do bioprotetor (PNPK) no controle de fitopatógeno e observar o status nutricional de mudas de banana (resistente e altamente susceptível). O trabalho também objetiva avaliar os efeitos do PNPk em atributos químicos do solo. Na produção do biofertilizante (fosfatado/potássico (BP/BK)), no laboratório, foram adicionadas duas doses (10 e 20%) de enxofre elementar inoculado com a bactéria acidificante *Acidithiobacillus thiooxidans* estirpe FG01, em concentração de células viáveis  $10^6$  mL<sup>-1</sup>. A inoculação com a bactéria foi efetuada já uma proporção de 1mL por 1g de enxofre. No experimento *in vitro*, a atividade antimicrobiana da quitosana fúngica foi avaliada contra o FOC pela técnica de macrodiluição em caldo Batata-Dextrose (BD) com a inoculação de 0,2 mL de suspensão esporica, com  $3,5 \times 10^6$  esporos mL<sup>-1</sup>, e posterior incubação em meio Batata-Dextrose-Ágar (BDA) sem substância teste, para determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a Concentração Fungicida Mínima (CFM), respectivamente. Os fungos foram incubados a 28 °C durante 7 dias. E a concentração da quitosana variou de 12; 10; 8; 6; 4; 2; 1 a 0 mg mL<sup>-1</sup>. A concentração de 1,0 mg mL<sup>-1</sup> de quitosana foi capaz de inibir o crescimento do patógeno FOC, e este mesmo valor foi encontrado para a determinação da CFM. O experimento em casa de vegetação foi realizado em vasos com solo Argissolo Vermelho Amarelo (1,5 kg vaso<sup>-1</sup>). No plantio foi utilizada uma planta por vaso, sendo aplicados os tratamentos de adubação 30 dias

antes da inoculação do patógeno. As mudas de banana foram coletadas 40 dias após a inoculação do patógeno e avaliadas as seguintes variáveis: índice de severidade da doença, biomassa seca da parte aérea, análise de N, P e K das plantas e análise dos atributos químicos do solo. Os resultados dos experimentos mostram que os adubos produzidos no laboratório podem ser utilizados em substituição aos fertilizantes minerais solúveis, e também podem ser produzidos por pequenas e médias empresas, criando oportunidades para os agricultores de baixa renda; os resultados do experimento *in vitro* demonstraram o potencial antimicrobiano da quitosana fúngica em relação ao fungo fitopatogênico FOC da cultura da banana demonstrando uma alternativa para o controle do mal-do Panamá. O experimento em casa-de-vegetação confirmou que, de um modo geral, o bioprotetor PNPk2 (150% da dose recomendada) e PNPk2+Q (150% da DR acrescido de quitosana) resultaram no menor índice de severidade da doença, e independente da variedade apresentaram os melhores resultados da parte aérea, assim como os melhores resultados de atributos químicos do solo, reforçando o uso de novas fontes de nutrientes, que não agriam o solo e seja uma alternativa aos fertilizantes minerais solúveis.

**Palavras-chave:** *Acidithiobacillus*; bioprotetor; diazotrófica de vida livre; fertilizante solúvel; mal-do-Panamá; nanoquitosana.

# EFFECTIVENESS OF ROCK BIOFERTILIZERS WITH ORGANIC MATTER ADDING FUNGI CHITOSAN ON BANANA CROP

## GENERAL ABSTRACT

In a modern agriculture the use of fertilizers and correctives aim to promote increment in food production, attending economic criterious and also to maintain the biota diversity and soil fertility, reducing environmental problems. One viable alternative is the use of phosphate and potassic rocks plus sulfur inoculated with the oxidative bacteria *Acidithiobacillus*. The rock biofertilizers (BPK) may produce a complete biofertilizer (BNPK) mixing with organic matter inoculated with free living diazotrophic bacteria to enrich the substrate in N by the process of biological nitrogen fixation and produce a bioprotector (PNPK) introducing the fungi *Cunninghamella elegans*, that contain chitin and chitosan in their cellular wall which protect plants against pathogens. In this way the aim of the study is to evaluate the effectiveness of the biofertilizer and bioprotector to observe *in vitro* the antifungic activity of the pathogenic fungi *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* (FOC) that promote the Panama disease on banana crop; and moreover to evaluate the effects of chitosan and of the bioprotector (PNPK) to control the phitopatogen and the nutritional status of banana seedlings in cultivar resistant and sensible to the disease. Also, the objective of the study is to evaluate the effects of different fertilization treatments in some soil attributes. In the rock biofertilizer production were used two rates of elemental sulfur (10 and 20 %) inoculated with the oxidative bacteria *Acidithiobacillus thiooxidans* strain FG01, applying viable cells in concentration  $10^6$  mL<sup>-1</sup>. The bacterium was added in proportion equivalent to 1mL per g of elemental sulfur. In the *in vitro* assay the antimicrobial activity was evaluated against the FOC using the macrodilution technique with Potato - Dextrose (PD) and inoculating 0.2 mL of the spore suspension with concentration  $3.5 \times 10^6$  spores mL<sup>-1</sup>, and incubated in Potato-Dextrose-Agar (BDA) without test substrate to determine the MIC (Minimum Inhibitory Concentration) and the MFC (Minimal Fungicidic Concentration), respectively. The fungi were incubated at 28 °C for 7 days. The chitosan were applied in different rates (12; 10; 8; 6; 4; 2; 1 a 0 mg mL<sup>-1</sup>). The rate of chitosan equivalent to 1.0 mg mL<sup>-1</sup> inhibits the FOC growth, and the same value was found when determined the MFC. The greenhouse experiment (pots of 2 L) used a Red Yellow Argisoil (1.5 kg vaso<sup>-1</sup>) with one seedling per pot and applying the treatments 30 days before the FOC inoculation. The banana seedlings were harvested 40 days after the pathogen inoculation and evaluated: Index of disease severity, dry shoot biomass, analyses of total N, P and K in shoots, and the soil chemical analyzes. The results showed that the biofertilizes produced in laboratory may be used to replacement of

soluble fertilizers, and manufactured by low and medium producers to promote opportunities for low farmers. The results in the *in vitro* assays showed the antimicrobial potential of the fungi chitosan against the phytopathogenic fungi (FOC) in the banana crop and may be alternative to control the Panamá disease. The greenhouse experiment confirmed that in a general the bioprotector applied in great rates PNPk2 (150% recommended rate) and PNPk2+Q (150% recommended rate plus fungi chitosan) resulted in reduction in the index of disease severity, and independent of the cultivar, showed the best results of shoot dry biomass. The best results of the chemical analyzes turn evident the use of new fertilizer sources for reduction of the soil problems.

**Keywords:** *Acidithiobacillus*; bioprotector; free living diazotrophic bacteria; soluble fertilizer; Panama disease; nanochitosan.

## INTRODUÇÃO GERAL

Na agricultura moderna, a exigência do uso de fertilizantes e corretivos tem a finalidade de proporcionar incremento na produção de alimentos, atender os critérios econômicos, e também conservar a fertilidade e a biodiversidade do solo, procurando minimizar danos ao ambiente (RAIJ, 1986; STAMFORD et al., 2008a).

Os fertilizantes solúveis são de suma importância para aumentar o rendimento das plantas, porém a sua utilização pelos agricultores de baixa renda se torna difícil em virtude dos seus preços elevados, além de serem bastante agressivos aos solos (SANCHEZ, 2002; van STRAATEN, 2007). Sendo assim o uso de pó de rocha que é um insumo acessível tanto para o grande quanto para o pequeno produtor rural é de grande interesse para a agricultura (D'ANDRÉA, 2003; MELAMED et al., 2009).

Uma alternativa viável é a utilização de rochas fosfatadas (RP) e potássicas (RK) para produzir biofertilizantes, sendo misturados com enxofre elementar e inoculados com bactérias do gênero *Acidithiobacillus* (STAMFORD et al., 2016). De acordo com van Straaten (2007) & Stamford et al. (2008b) as bactérias oxidantes de enxofre são importantes na reciclagem de nutrientes no solo e algumas espécies têm importância relevante para liberar elementos de rochas.

No entanto, as rochas não disponibilizam nitrogênio para as plantas, e os biofertilizantes de rocha (RP e RK) devem ser misturados com matéria orgânica e inoculados com bactéria diazotrófica de vida livre, para introduzir o N tão exigido para o crescimento das plantas, sendo o enriquecimento do produto em N, promovido através do processo de fixação biológica de N<sub>2</sub> (LIMA et al., 2010).

O biofertilizante misto produzido desta forma, além de ser uma fonte alternativa de fornecimento de nutrientes para as plantas, quando acrescido da biomassa do fungo *Cunninghamella elegans*, que possui quitina e quitosana em sua parede celular (FRANCO et al., 2011), pode acrescentar propriedades antifúngicas e fungicidas (BERGER et al., 2011).

A quitosana é derivada da quitina, que é extraída do exoesqueleto de crustáceos; de insetos, e da parede celular de fungos (SILVA et al., 2006; DIAS

et al., 2013; DEEPMALA et al., 2014). A quitosana apresenta propriedades antivirais, antibacterianas e antifúngicas, que vêm sendo avaliadas quanto ao uso agrícola (EL HADRAMI et al., 2010; DIAS et al., 2013).

Plantas bem nutridas apresentam redução na incidência, severidade e danos causados por pragas e doenças (MALAVOLTA, 2006). Assim sendo, além do controle de doenças e pragas através do uso de biopolímeros como a quitosana, a aplicação de nutrientes, também, é importante para o desenvolvimento e produção das culturas, uma vez que as fontes minerais, como o fósforo e o potássio nem sempre se encontram na forma disponível para absorção pelas plantas (BERGER, 2010).

A bananeira (*Musa* spp.) é cultivada em todos os estados do Brasil, e está entre as culturas agrícolas mais importantes nas regiões tropicais e subtropicais do mundo, sendo uma cultura relativamente exigente quanto à fertilidade do solo (MARTINS & FURLANETO, 2008; SILVA NETO & GUIMARÃES, 2011; IBGE, 2015).

Além de fornecer alimento básico para milhões de pessoas, e ser fonte contínua de alimento, pois a fruta pode ser produzida durante todo o ano, as bananas têm um excelente valor nutricional, sendo um dos alimentos mais facilmente digeríveis (SILVA JUNIOR et al., 2010; SILVA NETO & GUIMARÃES, 2011).

No entanto, o cultivo da bananeira é afetado por um grande número de doenças, prejudicando a produção e a qualidade dos frutos. Dentre as doenças merece destaque o mal-do-Panamá, causada pelo fungo *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* (FOC), que é uma doença endêmica distribuída por todas as regiões produtoras do mundo, e que provoca perdas elevadas no campo (CORDEIRO et al., 2004; GURGEL et al., 2010).

O FOC é um fungo de solo, que apresenta alta capacidade de sobrevivência na ausência do hospedeiro, fato que se deve à formação de estruturas de resistência denominadas de clamidósporos (CORDEIRO et al., 2004).

Devido à inexistência de medidas eficazes de controle do mal-do-Panamá, algumas medidas preventivas são recomendadas, dentre elas, manter as plantas bem nutridas, guardando sempre uma boa relação entre potássio, cálcio e magnésio (CORDEIRO, 1997; CORDEIRO et al., 2004).



Deste modo, os objetivos deste trabalho foram avaliar a eficiência do biofertilizante produzido em laboratório, a partir de rocha fosfatada e potássica; verificar a atividade antifúngica da quitosana e da nanoquitosana, em experimentos *in vitro* em relação ao patógeno *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* (FOC) causador do mal-do-Panamá na cultura da banana; assim como avaliar o efeito da quitosana e do bioprotetor (PNPK) no controle de fitopatógeno e observar o status nutricional de mudas de banana (resistente e altamente susceptível). Também foram avaliados os efeitos do referido insumo em atributos químicos do solo.

## FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### Bioprotetor

Para aumentar o rendimento das culturas é muito importante a aplicação de fertilizantes, especialmente para o fornecimento de nitrogênio, fósforo e potássio (OLIVEIRA et al., 2014). Por outro lado, os fertilizantes minerais solúveis podem ser nocivos aos solos, e o seu alto custo faz com que os agricultores de baixa renda reduzam o seu uso (SANCHEZ, 2002; OLIVEIRA et al., 2014).

De acordo com Abreu et al. (2005), a fertilização adequada e bem equilibrada beneficia as plantas quanto ao seu estado fitossanitário e vigor das plantas, em termos de qualidade dos produtos obtidos, assim como a produtividade.

As fontes minerais não ocorrem na natureza em forma diretamente disponível para as plantas, sendo modificadas por processos físicos, químicos ou biológicos, para se tornarem disponíveis e eficientes no fornecimento de nutrientes para as plantas (van STRAATEN, 2002).

Na agricultura moderna e sustentável torna-se indispensável o uso de produtos alternativos visando aumentar a produção de alimentos, a fertilidade do solo e a conservação da biodiversidade, e também para reduzir os danos no ambiente (STAMFORD et al., 2008a; 2014).

As rochas fosfatadas e potássicas moídas podem ser utilizadas como fonte de nutrientes, entretanto, seu uso é restrito tendo em vista a sua baixa solubilidade, e em geral são utilizadas para culturas de ciclo longo e como fonte suplementar. Entretanto, a adição de micro-organismos com o objetivo de melhorar a disponibilidade de nutrientes para as plantas vem sendo uma prática importante e necessária na agricultura orgânica e sustentável (FREITAS, 2007; PRIYADHARSINI & MUTHUKUMAR, 2015).

Por reação metabólica as bactérias oxidantes do enxofre produzem ácido sulfúrico, através da reação  $S^0 + H_2O + 1,5 O_2 \rightarrow H_2SO_4$ , e promovem a solubilização dos elementos contidos nos minerais, especialmente fósforo e potássio, como descrito por Stamford (2011).

Além de serem práticos e econômicos, os biofertilizantes de rochas podem ser produzidos por grandes, médios e pequenos agricultores, sem

emprego de técnicas especiais, e não promovem a adição de produtos tóxicos e corrosivos, como ocorre com os fertilizantes solúveis convencionais (STAMFORD et al., 2008c).

Portanto, a aplicação de S elementar inoculado com bactérias do gênero *Acidithiobacillus* tem grande significado agrônomo, primeiro, pela produção de enxofre na forma solúvel ( $S-SO_4^{2-}$ ), que também é requerido em grandes quantidades pelas plantas, e bem como pela ação direta e indireta do  $H_2SO_4$  sobre o pH do solo, especialmente para aplicação em solos de pH elevado (STAMFORD et al., 2008b,c).

Os solos brasileiros são deficientes em P disponível e os fosfatos são recursos naturais não renováveis (LEÃO et al., 2007; ARAÚJO et al., 2008), e torna-se de grande importância a utilização de fertilizantes de forma eficiente (OLIVEIRA, 2011). A aplicação de fertilizantes com K é reconhecida e sua importância é de caráter fundamental para o Brasil, tendo em vista que a produção brasileira é de apenas 9% da demanda interna, e a diferença, 91%, vem da importação (ROBERTS, 2004; INSTITUTO BRASILEIRO DE MINERAÇÃO, 2011).

Todavia, os biofertilizantes de rochas fosfatadas e potássicas, não fornecem nitrogênio para as plantas (OLIVEIRA, 2011), e é reconhecido que a disponibilidade deste nutriente no solo limita a produtividade e o rendimento na maioria das culturas (CARVALHO & ZABOT, 2012), inclusive o nitrogênio é o elemento que normalmente é exigido em maior quantidade pela maioria das plantas (BISSANI et al., 2008).

Por outro lado, resíduos orgânicos podem servir como alternativa para o fornecimento de N para as culturas, e também por seu efeito na reação do solo (OLIVEIRA, 2011). Esses materiais, embora apresentem baixa concentração de N, são normalmente utilizados na agricultura orgânica (CHEPOTE, 2003).

As bactérias diazotróficas de vida livre, que não necessitam de planta hospedeira, apresentam um maior potencial para serem utilizadas como alternativa para o enriquecimento dos resíduos orgânicos em N, e representa uma nova estratégia para a produção de material orgânico de melhor qualidade (LIMA et al., 2010; OLIVEIRA, 2011).

Stamford et al. (2016) mostraram a eficiência agrônoma dos biofertilizantes produzido a partir de rochas fosfatada e potássica (PK) com enxofre elementar inoculado com a bactéria *Acidithiobacillus thiooxidans*,

acrescido com húmus de minhoca em cana de açúcar. Estes pesquisadores verificaram que o biofertilizante de rocha PK com adição de matéria orgânica pode melhorar a condição de acidez promovida pelos biofertilizantes de rochas e fornecer N para as plantas, podendo ser uma alternativa viável para substituição aos fertilizantes solúveis em solos com baixo P e K disponíveis.

Além de ser uma fonte alternativa para adição de nutrientes para as culturas, o biofertilizante misto (BNPK) quando inoculado com fungos da Ordem Mucorales como *Cunninghamella elegans* (PNPK) que contem em sua parede celular considerável quantidade de quitina e quitosana (FRANCO et al., 2004; 2005) podem apresentar características muito interessantes, atuando como um bioprotetor, protegendo as plantas contra ataque de patógenos, favorecer a disponibilidade de nutrientes para as plantas, e, portanto, aumentar a produção vegetal (STAMFORD et al., 2007; BOONLERTNIRUM et al., 2008; HERNANDÉZ-LAUZARDO et al., 2008; BERGER et al., 2013).

### **Quitosana**

A quitina é extensamente encontrada na natureza e sua abundancia fica apenas atrás da celulose. Ela é formada por unidades monoméricas de  $\beta$ -1,4 *N*-acetilglucosamina do mesmo tipo, sendo um polissacarídeo (biopolímero) encontrado no exoesqueleto de crustáceos (camarão, lagosta, caranguejo), em insetos (escorpião, besouro) e na parede celular de fungos, especialmente da ordem Mucorales, da classe dos Zygomycetes (CANELLA & GARCIA, 2001; STAMFORD et al., 2008d; KATIYAR et al., 2014; YOUNES & RINAUDO, 2015).

A quitina é um polímero insolúvel em meio aquoso e na maioria dos solventes orgânicos, além de ter baixa reatividade química, justamente por apresentar uma estrutura cristalina extremamente organizada (LARANJEIRA & FÁVERE, 2009). Consequentemente, a insolubilidade da quitina torna-se o maior fator limitante da sua utilização (MUZZARELLI, 1973; PIRES et al., 2014).

A quitosana também é um polissacarídeo (biopolímero) composto de D-glucosamina, derivada da desacetilação da quitina. Quando comparada com a quitina e a celulose, não é muito encontrada na natureza, no entanto, pode ser

encontrada na parede celular de alguns fungos, particularmente da Classe Zygomycetes e em alguns moluscos (SILVA et al., 2006; DIAS et al., 2013).

A quitosana é solúvel em soluções aquosas diluídas de ácidos orgânicos e inorgânicos, e é facilmente dissolvida em soluções de ácidos fracos diluídos, em consequência da protonação de seus grupos amino, sendo o ácido acético o solvente mais utilizado (SINGH et al., 2008)

Para se distinguir um biopolímero como quitina ou quitosana é importante e necessário caracterizar suas propriedades físico-químicas, e o grau de desacetilação (GD) é uma propriedade fundamental para essa diferenciação (ARNAUD, 2012). Quando a desacetilação é maior que 50%, a quitina se torna solúvel em solução aquosa ácida e passa a ser quitosana, que apresenta um GD entre 66 e 95% (TOLAIMATEA et al., 2003; AGNIHOTRI et al., 2004; RINAUDO, 2006; MILIOLI, 2011).

Assim, à proporção que aumenta o GD, aumenta também a solubilidade da quitosana em meio aquoso, atribuindo carga positiva a quitosana, que se comporta como um polieletrólito catiônico, devido à protonação dos grupos amino em presença de íons  $H^+$ , favorecendo as reações com polímeros aniônicos e em superfícies com carga negativa (TOLAIMATEA et al., 2003; TORRES, 2009).

A quitina e a quitosana, são atóxicos, biodegradáveis, biocompatíveis e produzidos por fontes naturais renováveis (EL HADRAMI et al., 2010; DIAS et al., 2013). Estes biopolímeros têm apresentado propriedades antivirais, antibacterianas e antifúngicas, e vêm sendo avaliados quanto ao uso agrícola (EL HADRAMI et al., 2010; BERGER et al., 2013; DIAS et al., 2013).

Com a finalidade de promover funções de suporte, além de proteção, a parede celular dos fungos da classe dos Zygomycetes é composta de quitina e quitosana (ARANAZ et al., 2010; DIAS et al., 2013). A quitosana obtida a partir da biomassa micelial de fungos pode ser uma alternativa sustentável, sendo considerado como o polímero do futuro, por apresentar uma vasta possibilidade de aplicações (ARANAZ et al., 2010; DIAS et al., 2013).

A fonte mais comum de obtenção da quitosana é a desacetilação da quitina proveniente do exoesqueleto de crustáceos (STREIT, 2004; SILVA, 2007). Entretanto, apesar de ser a fonte tradicional e da grande quantidade nos crustáceos, a quitina apresenta algumas restrições, como problemas sazonais, promovendo poluição causada pelo descarte de seus resíduos e custos

elevados de produção, além de ser um processo que agride e degrada a cadeia polimérica de quitosana (STREIT, 2004; SILVA, 2007).

Na quitosana obtida de modo tradicional, os grupamentos acetamido (-NHCOCH<sub>3</sub>) são transformados em grupamentos amino (-NH<sub>2</sub>), na desacetilação da quitina (OLIVEIRA, 2006). Quando ocorre a retirada dos grupos acetamido, os grupos amino liberados contribuem na natureza catiônica da quitosana obtida, que se apresenta como uma mistura de polímeros de tamanhos diversificados (OLIVEIRA, 2006).

Na quitosana fúngica, em virtude de haver contato com pH alcalino, há retirada de componentes celulares, inclusive proteínas, e posterior separação da quitosana de outros componentes estruturais, quitina e β-glucana (STREIT, 2004). Na extração de quitosana de fungos que contem grandes quantidades deste polímero em sua parede celular, também é obtida a quitina com produção intensiva e em larga escala, independentemente de fatores sazonais (STREIT, 2004; FAI et al., 2008).

De acordo com Franco et al. (2005, 2011) a massa micelial de *Cunninghamella elegans* (IFM 46109) é uma fonte alternativa para obtenção de quitina e quitosana. Trabalhos com *Rhizopus arrhizus* (SILVA, 2007), *Mucor rouxii*, *Gongronella butleri* e *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus* (STREIT, 2004) também apresentaram resultados satisfatórios. Andrade et al. (2003) e Amorim et al. (2005) relataram rendimentos iguais ou superiores, de quitina e de quitosana utilizando fungos como fonte alternativa em comparação com a fonte tradicional (exoesqueletos de crustáceos).

A quitosana é capaz de atuar em diferentes áreas, com diferentes finalidades, sua natureza policatiônica e sua capacidade de se modificar fisicamente, atuando em distintas formas, tais como na forma de pó, microesferas, nanopartículas, membranas, fibras, filmes, géis, e mostram suas principais características (LAUS et al., 2006; SHI et al., 2006; SANTOS et al., 2011; SILVA et al., 2015).

Aplicada em distintos âmbitos, a quitosana vem atuando na área de cosméticos, como coadjuvante da higiene oral (SANO et al., 2002; SANO et al., 2003), aumentando a absorção de flúor e promovendo proteção contra as cáries (KEEGAN et al., 2012); na indústria farmacêutica com propriedades cicatrizantes (SANTANA et al., 2014; FRÁGUAS et al., 2015); na indústria de alimentos (BARBOSA et al., 2015), na absorção de gordura e redução do

colesterol sérico (GADES & STERN, 2005); como agente de floculação no tratamento de efluentes aquosos (DÍAZ et al., 2007); na biorremediação através da bioadsorção de metais pesados (FRANCO et al., 2004).

Na agricultura, tem sido utilizada na biotransformação e detecção de pesticidas (DU et al., 2007); no revestimento de sementes (VELÁSQUEZ, 2003); como propriedade antifúngica (DI PIERO & GARDA, 2008); regulador da transcrição de genes envolvidos com a produção de enzimas relacionadas à resistência da planta às doenças e aos insetos (BOONLERTNIRUN et al., 2008); em leguminosas, favorecendo a nodulação das plantas (BERGER et al., 2013). A quitosana, também pode ser utilizada como fonte de carbono para os micro-organismos do solo, acelerando o processo de mineralização da matéria orgânica e a disponibilização de nutrientes (BOONLERTNIRUN et al., 2008).

Berger et al. (2011) relatam que a quitosana pode afetar diretamente o crescimento de vários fungos e bactérias fitopatogênicas, apresentando efeito fungistático e/ou fungicida, e bacteriostático e/ou bactericida.

Liu et al. (2007) com tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) também confirmaram a atividade antifúngica da quitosana, *in vitro*, com inibição do crescimento micelial e da germinação de esporos de *Botrytis cinerea* e *Penicillium expansum*, além de potencialmente induzir reações de defesa. No trabalho os autores sugerem que a quitosana melhora a resistência de frutos do tomateiro contra mofo cinzento e mofo azul sendo promissora como um fungicida natural para substituir parcialmente o uso de fungicidas sintéticos em frutas e legumes (LIU et al., 2007).

Rapussi et al. (2009) também constataram a indução de resistência em frutos de laranja “Valência” inoculados com o patógeno *Guignardia citricarpa*, e observaram a inibição do crescimento de novas lesões nas laranjas, e também o aumento da atividade da quitinase,  $\beta$ -glucanase, peroxidase e polifenoloxidase. A quitinase e a glucanase tem capacidade de degradar parcialmente os polissacarídeos da parede celular dos fungos fitopatógenos, e conferem ao hospedeiro a vantagem adaptativa de se tornar mais resistente.

Por outro lado, Lee et al. (1999) verificaram que a abertura estomática de tomate e de *Commelina communis* foi reduzida quando a epiderme foi tratada com quitosana. Com a redução da abertura estomática a adição de quitosana torna-se vantajosa para defesa da planta, tendo em vista que a abertura dos estômatos fornece ao patógeno maior acesso ao tecido foliar

interno (DEEPMALA et al., 2014). A quitosana além de induzir o fechamento dos estômatos, através da diminuição do K nas células guarda, que é o principal regulador do potencial osmótico nessas células, diminuiu o consumo de água sem afetar a produção de biomassa das plantas de *Capsicum* sp. (BITTELLI et al. 2001).

### **Nanopartículas de Quitosana (Nanoquitosana)**

A nanotecnologia está associada ao estudo de materiais em uma escala muito pequena, essa tecnologia está rapidamente convergindo com a biotecnologia e tecnologia da informação para alterar radicalmente os sistemas na alimentação e na agricultura (AOUADA, 2009; BLANCO, 2011).

Nanopartículas é um termo utilizado de acordo com o tamanho da partícula referida, ou seja, partículas com tamanho inferior a 1µm são consideradas nanopartículas, enquanto que as partículas maiores são intituladas micropartículas (ARNAUD, 2012; AZEVEDO, 2002).

SHAFFAZICK & GUTERRES (2003) classificaram a relação de tamanho das partículas em: micropartículas e sistemas coloidais (lipossoma e nanopartículas). Sendo assim, as nanopartículas são sistemas coloidais ou carreadores sólidos, que são aptos a carrear drogas, podendo ou não ser biodegradáveis, compreendo as nanoesferas e nanocápsulas (diferindo entre si segundo a composição e organização estrutural) (SHAFFAZICK & GUTERRES, 2003; REIS et al., 2006).

As nanopartículas são constituídas por, no máximo, algumas centenas de átomos, onde as propriedades dos materiais se diferem dos objetos em escalas maiores (BLANCO, 2011). Desse modo, um material quando produzido em escala nanométrica, pode ter suas propriedades melhoradas, obtendo-se um material mais leve, resistente e/ou funcional (BLANCO, 2011).

Segundo REIS et al. (2006), a ciência vem buscando métodos para produção de nanopartículas que além de garantir a estabilidade da molécula e manutenção da atividade biológica, possa formar estruturas estáveis, solúveis, com tamanho e carga favorável à aplicação desejada. As nanopartículas podem ser preparadas a partir de diferentes tipos de materiais, tais como: proteínas e polímeros. E as nanopartículas oriundas de materiais poliméricos,



podem ser compostas de polímero natural, sintético ou semi-sintético, com o tamanho variando entre 1 nm até 100 nm. (BLANCO, 2011; ARNAUD, 2012).

A quitosana tem capacidade de gelatinizar em contato com poliânions específicos, desse modo um dos métodos que mais vem sendo utilizado para obtenção de nanopartículas, é o método de gelificação iônica, que é um processo não tóxico (AGNIHOTRI et al., 2004; QI et al., 2004). De acordo com BLANCO, 2011 as nanopartículas sobressaem entre pó com atividade antimicrobiana que demonstra um elevado potencial antimicrobiano. Devido a maior área superficial e a densidade de cargas, as nanopartículas possuem um maior contato com a superfície de carga negativa das células bacterianas (SHI et al., 2006).

As nanopartículas têm sido empregadas na conservação de alimentos (PROMBUTARA et al., 2012); em cosméticos (KOKURA et al., 2010); no tratamento de água (PANT et al., 2012); além de apresentar atividade antibacteriana (QI et al., 2004). Na área farmacêutica, as nanopartículas, constituídas por polímeros biodegradáveis, como é o caso da quitosana, tem chamado a atenção quanto às suas potencialidades terapêuticas, dentre elas como vetor de fármacos anticancerígenos e de antibióticos (PINTO-ALPHANDARY et al., 2000; YOO et al., 2000; ARNAUD, 2012).

Conforme KASHYAP et al. (2015), a aplicação de nanopartículas de quitosana com base na solução de problemas na agricultura ainda está em estágio inicial. No entanto, alguns estudos têm sido realizados utilizando nanopartículas de quitosana com resultados promissores, alcançados na distribuição de agrotóxicos e na transformação de genes de plantas (KASHYAP et al., 2015).

O intuito de aplicar nanopartículas (nanomateriais) na distribuição de pesticidas e de fertilizantes visa melhorar a eficiência dos insumos e garantir uma distribuição controlada e mais uniforme, e conseqüentemente assegurar plantas nutridas de modo equilibrado e sustentável (KASHYAP et al., 2015).

Com relação às interações entre planta (hospedeiro) e organismo patogênico, a aplicação da tecnologia de nanopartículas está relacionada ao transporte eficiente de substâncias, tais como os ativadores de defesa da planta, como o ácido salicílico e o ácido jasmônico, para sítios alvos específicos visando proporcionar melhores condições e diminuir o estresse das culturas (KASHYAP et al., 2015). De acordo com LINARES et al. (2010), o

ácido jasmônico e seus derivados são reguladores vegetais endógenos produzidos por várias espécies vegetais, que atuam no mecanismo de defesa das plantas e agem como sinalizadores de estresse. E o ácido salicílico, tem a habilidade em induzir efeitos de proteção (adaptação e resistência) em plantas submetidas a estresse (VIEIRA, 2011).

### **Banana (*Musa spp.*)**

No Brasil, a região Sudeste é a considerada como a maior produtora de banana com 2.420.394 t, seguida da região Nordeste com 2.416.383 t, ambas, individualmente, produzindo mais que as regiões Norte, Sul e Centro-oeste juntas (IBGE, 2015). No Nordeste os cinco maiores estados produtores de banana são Bahia (1.070.830 t), Ceará (449.783 t), Pernambuco (368.708 t), Rio Grande do Norte (165.416 t) e Paraíba (145.028 t) (IBGE, 2015).

A banana (*Musa spp.*) é uma das mais importantes espécies frutíferas cultivadas em Pernambuco e tem expressiva importância econômica e social para a Zona da Mata do estado (SILVA JUNIOR et al., 2010). Sua cadeia produtiva estabelece a base econômica de diversos municípios da região, sendo este fruto relevante fonte de renda e de alimento para sua população. Pois, é uma fonte ininterrupta de alimento, uma vez que a banana é produzida durante todo o ano (SILVA JUNIOR et al., 2010). A produção de banana no estado de Pernambuco em 2015 alcançou 368.708 t, com rendimento médio de 9,7 t ha<sup>-1</sup> (IBGE, 2015).

A bananeira é uma monocotiledônea herbácea, com caule subterrâneo (rizoma) de onde saem às raízes. O pseudocaule é formado por bainhas foliares, com uma copa de folhas compridas e largas, nervura central desenvolvida e uma inflorescência saindo do centro da copa (brácteas ovaladas de cor roxo-avermelhada), de onde nascem as flores, e as pencas com os frutos a partir dos conjuntos de flores (BORGES & SOUZA, 2004; 2009).

A cultura da banana é relativamente exigente, e necessitam de solo com fertilidade elevada, com quantidade equilibrada de nutrientes, bem estruturado e aerado, condições que são fundamentais para o desenvolvimento satisfatório da cultura (MARTINS & FURLANETO, 2008).

Os Grupos Varietais, que agrupam cultivares de características semelhantes, são estabelecidos a partir da nomenclatura do genoma (PBMH & PIF, 2006), considerando-se como principais: Grupo Genômico AA, (Cultivar: Ouro); Grupo Genômico AAA, subgrupo Cavendish (Cultivares: Nanica, Nanicão, Grand Naine, Williams); Grupo Genômico AAB, (Cultivares: Maçã, Mysore, Thap Maeo); Grupo Genômico AAB, subgrupo Prata (Cultivares: Prata, Prata Anã ou Enxerto, Pacovan, Branca) (PBMH & PIF, 2006; SILVA, s. d.).

O porte das plantas é uma das variações mais importantes na classificação dos subgrupos. No subgrupo Cavendish, a Williams Hybrid, apresenta porte baixo, intermediário entre Nanica e Nanicão, suportando plantios mais adensados, são mais precoces, e suas folhas são mais eretas que as da Nanicão, com coloração verde-escura na parte superior e verde mais claro na inferior, em função da cerosidade (SILVA et al., 1997; SILVA, s. d.). O pseudocaule apresenta manchas de cor castanha à preta em fundo verde-oliva, os seus frutos são delgados, longos e encurvados, com paladar muito doce quando maduros, e os seus cachos podem atingir 25 kg a 50 kg tendo 7 a 14 pencas, com 100 a 300 dedos por cacho (SILVA et al., 1997; SILVA, s. d.). A banana “Williams” é uma das cultivares do seu subgrupo que produzem frutos com as necessárias características para exportação, por isso até hoje, são as mais usadas neste sentido (SILVA, s. d.).

A banana “Maçã”, conceituada como a mais nobre entre as bananas brasileiras, obtém excelentes preços no mercado, sendo considerada extremamente saborosa, apresentando frutos com casca fina e polpa suave, que lembra a maçã, sendo utilizada unicamente para o mercado interno (SILVA et al., 2004; SILVA JUNIOR et al., 2010). Internacionalmente conhecida como “Silk”, a banana “Maçã”, apresenta ótimo perfilhamento, exibe um porte que varia de 3,0 a 3,5 m, suas folhas apresentam cerosidade na parte inferior, com coloração escura e um pouco caída, já as bainhas, os pecíolos e as nervuras são de coloração verde-clara (SILVA et al., 1997; SILVA JUNIOR et al., 2010). Os cachos podem atingir 15 kg e produzir de 7 a 10 pencas, e possuir de 50 a 150 frutos, com 10-16 cm de comprimento, seus frutos são um pouco curvos, de cor amarelo-pálido e endocarpo de cor branca, suas primeiras pencas são voltadas para o alto e as últimas, quase na horizontal, sendo bem distantes uma das outras (SILVA et al., 1997).

O cultivo da bananeira é afetado por um grande número de doenças, causadas por fungos, bactérias, vírus ou nematoides, que acarretam grandes perdas na produção e na qualidade dos frutos (GURGEL et al., 2010). Sendo consideradas como as principais doenças da cultura da banana, o moko da bananeira, a sigatoka-negra, a sigatoka-amarela e a fusariose (CORDEIRO et al., 2004; CORDEIRO et al., 2005).

No que se refere a enfermidades, a banana “Williams” é resistente enquanto a banana “Maçã” é altamente suscetível, ao mal-do-Panamá ou murcha-de-fusário ou murcha vascular, que é uma doença endêmica distribuída por todas as regiões produtoras do mundo, e provoca perdas elevadas no campo, causada pelo fungo de solo *Fusarium oxysporum* Schlechtend: Fr. f.sp. *cubense* (E.F. Smith) W. C. Snyder & H. N. Hansen (CORDEIRO et al., 2004; BORGES et al., 2007; GURGEL et al., 2010). Cordeiro et al. (2004) relata que essa doença, quando ocorre em variedades altamente suscetíveis como a banana “Maçã” pode provocar perdas de 100% na produção.

As primeiras descrições desta doença foram por volta de 1876 na Austrália, no entanto ela só tomou destaque em 1904, no Panamá, quando os danos foram relevantes, ganhando essa doença o nome de mal do Panamá (PLOETZ & PEGG, 1997).

O *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* (FOC) é um fungo de solo, que apresenta alta capacidade de sobrevivência na ausência do hospedeiro, fato que se deve à formação de estruturas de resistência denominadas de clamidósporos (CORDEIRO et al., 2004). São conhecidas quatro raças fisiológicas do patógeno, dentre elas há três de importância para a bananeira, as raças 1, 2 e 4 que são patogênicas na cultura e que sobrevivem no solo por mais de 20 anos, e que qualquer variação nesse ambiente poderá influenciar positiva ou negativamente no desenvolvimento da doença, Por outro lado, a raça 3 é patogênica apenas em *Heliconia* sp. (CORDEIRO, 1997; CORDEIRO et al., 2004). De acordo com Silva Junior et al. (2010) a banana “Maçã” devido a não resistência a essa doença não é recomendada para plantios em grandes áreas.

As plantas infectadas pelo FOC apresentam externamente um amarelecimento crescente das folhas mais velhas para as mais novas, iniciando pelos bordos e progredindo para a nervura central. Com o avanço da

doença as folhas murcham, secam e quebram junto ao pseudocaule, ficando pendentes, dando à planta o aspecto de um guarda-chuva fechado (GURGEL et al., 2010; CORDEIRO et al., 2004). Podendo ser observado ainda, estreitamento do limbo das folhas mais novas, engrossamento de nervuras secundárias, necrose do cartucho, podendo aparecer rachaduras na base do pseudocaule (GURGEL et al., 2010; CORDEIRO et al., 2004).

Já os sintomas internos, podem ser observados através de cortes longitudinais e transversais do pseudocaule, no qual é constatada descoloração vascular pardo-avermelhada periférica, com a região central clara (sem sintomas), no rizoma, a descoloração é verificada na área de maior vascularização, no qual o cilindro central se junta ao córtex (GURGEL et al., 2010).

Devido à inexistência de medidas eficazes de controle do mal-do-Panamá, algumas medidas preventivas são recomendadas, dentre elas, manter as plantas bem nutridas, guardando sempre uma boa relação entre potássio, cálcio e magnésio (CORDEIRO, 1997; CORDEIRO et al., 2004).

Para manter um bom desenvolvimento e produtividade da bananeira é altamente necessário grande aporte de nutrientes (BORGES & SILVA JUNIOR, 2010), não só por produzir grande massa vegetativa, mas também por apresentar elevadas quantidades de nutrientes absorvidos pela planta e que são exportados pelos frutos (SILVA et al., 1999).

O potássio (K) e o nitrogênio (N) são os nutrientes mais exigidos pela cultura, seguidos do cálcio (Ca), magnésio (Mg), enxofre (S) e fósforo (P) (BORGES & SILVA JUNIOR, 2010). Com relação aos micronutrientes, em geral não são encontradas deficiências, entretanto, a bananeira absorve grandes quantidades, sendo em ordem decrescente: cloro (Cl), manganês (Mn), ferro (Fe), zinco (Zn), boro (B) e cobre (Cu) (BORGES & SILVA JUNIOR, 2010).

Para o crescimento vegetativo da bananeira o N é um nutriente muito importante, mas por outro lado para a produção de frutos de qualidade superior o K é considerado como o nutriente mais importante (BORGES & SILVA JUNIOR, 2010). Em relação ao P, embora necessite pequenas quantidades, a deficiência de P prejudica o desenvolvimento das raízes e, por conseguinte, mostra grande efeito na produtividade (BORGES & SILVA JUNIOR, 2010).

O K é o cátion mais abundante na planta, sendo absorvido em grandes quantidades pelas raízes como íon  $K^+$ , e tem importante função na manutenção de água nos tecidos vegetais e na translocação e armazenamento de fotoassimilados (SILVA et al., 2011). A bananeira cultivada em solos com deficiência de K produz cachos pequenos, frutos finos com baixo peso, maturação irregular e polpa pouco saborosa (BORGES & SILVA JUNIOR, 2010; SILVA et al., 2011).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, N.A.A.; MENDONÇA, V.; FERREIRA, B.G.; TEIXEIRA, G.A.; SOUZA, H.A.; RAMOS, J.D. Crescimento de mudas de pitangueira (*Eugenia uniflora* L.) em substratos com utilização de superfosfato simples. **Ciência e Agrotecnologia**, v.29, n.6, p.1117-1124, 2005.

AGNIHOTRI, S. S.; MALLIKARJUNA, N.N.; AMINABHAVI, T. M. Recent advances on chitosan based micro and nanoparticles in drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 10, p. 5-28, 2004.

AMORIN, R. V. S.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. & LEDINGHAM, W. M. Screening of chitin deacetylase from Mucoralean strains (Zygomycetes) and its relationship to cell growth rate deacetylase from Mucoralean strains (Zygomycetes) and its relationship to cell growth rate. **J. Indust. Microb. Biotech.**, v. 31, p. 19-23, 2005.

ANDRADE, V. S.; NETO, B. B.; FUKUSHIMA, K; CAMPOS-TAKAKI, G. M. Effect of médium components and time of cultivation on chitin production by *Mucor circinelloides* (*Mucor javanicus* IFO 4570) – A factorial study. **Rev. Iberoam. Micol.**, v. 20, p. 149-153, 2003.

AOUADA, M. R. M. **Aplicação de nanopartículas em filmes utilizados em embalagens para alimentos**. 2009. 119 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade Federal de São Carlos, São Paulo. 2009.

ARANAZ, I.; HARRIS, R. AND HERAS, A. Chitosan Amphiphilic Derivatives. Chemistry and Applications. **Current Organic Chemistry**, v. 14, p. 308-330, 2010.

ARAÚJO, F. F.; TIRITAN, C. S.; PEREIRA, H. M.; CAETANO JÚNIOR, O. Desenvolvimento do milho e fertilidade do solo após aplicação de lodo de curtume e fosforita. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 12, n. 05, p. 507-511, 2008.

ARNOUD, T. M. S. **Preparação, caracterização e aplicações de nanocompósitos de Quitosana/Quantum Dots fluorescentes**. 2012. 183 f. Tese (Doutorado em Ciências de Materiais) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife. 2012.

BARBOSA, I. C.; STAMFORD, T. C. M.; BERGER, L. R. R.; MELO, N. F. C. B.; PINTADO, M. E.; STAMFORD, T. L. M. Potential of chitosan as na Acerola (*Malpighia glabra* L.) juice natural preservative. **International Journal of Current Microbiology and Applied Science**, v. 4 p. 929-942, 2015.

BERGER, L.R.; STAMFORD, N.P.; SANTOS, C.E.R.S.; FREITAS, A.D.S.; FRANCO, L.O.; STAMFORD, T.C.M. Plant and soil characteristics affected by biofertilizers from rocks and organic matter inoculated with diazotrophic bacteria and fungi that produce chitosan. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**. v.13, p. 592-603, 2013.

BERGER, L. R. R.; STAMFORD, T. C. M.; STAMFORD, N. P. Perspectivas para o uso da quitosana na agricultura. **Revista Iberoamericana de Polímeros**, v. 12, n. 4, p. 1-21, 2011.

BERGER, L. R. R. **Efeito da quitosana e do biofertilizante-bioprotetor na murcha-de-fusário em caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp)**. 2010. 75 f. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife. 2010.

BISSANI, C. A.; GIANELLO, C.; CAMARGO, F. A. O.; TEDESCO, M. J. **Fertilidade dos solos e manejo da adubação das culturas**. 2ª Ed. Porto Alegre, Metrópole, 2008, 344 p.

BITTELLI, M.; FLURY, M.; CAMPBELL, G. S.; NICHOLS, E. J. Reduction of transpiration through foliar application of chitosan. **Agricultural and Forest Meteorology**, v. 107, p. 167–175, 2001.

BLANCO, M. A. **Avaliação da incorporação de nanopartículas de quitosana ao cimento endodôntico AH PLUS™**. 2011. 66 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Metalúrgica e de Materiais) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 2011.

BOONLERTNIRUN, S.; BOONRAUNG, C. and SUVANASARA, R. Application of Chitosan in Rice Production. **Journal of Metals, Materials and Minerals**, v.18, n.2, p. 47-52, 2008.

BORGES, A. L. & SILVA JUNIOR, J. F. da S. Nutrição, Calagem e Adubação. In: SILVA JUNIOR, J. F. da. **Sistema de Produção de Banana para a Zona da Mata de Pernambuco**. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, Recife: IPA, 2010. p. 25-34.

BORGES, A. L. & SOUZA, L. da S. Recomendações de Calagem para Bananeira em Solos de Tabuleiros Costeiros. **Banana em Foco**. Cruz das Almas:Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, n.59, 2009.

BORGES, A. J. S.; TRINDADE, A. V.; MATOS, A. P. E PEIXOTO, M. F. S. Redução do mal-do-panamá em bananeira-maçã por inoculação de fungo micorrízico arbuscular. **Pesq. agropec. bras.**, v.42, n.1, p.35-41, 2007.

BORGES, A. L. & SOUZA, L. da S. Exigências Edafoclimáticas. In: BORGES, A. L. & SOUZA, L. da S. **O cultivo da bananeira**. Cruz das Almas :Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2004. p. 15-23.

CANELA, K. M. N. C. e GARCIA, R. B. Caracterização de quitosana por cromatografia de permeação em gel – influência do método de preparação e do solvente. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 13-17, 2001.

CARVALHO, N. L. de & ZABOT, V. Nitrogênio: Nutriente ou Poluente? **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**. v 6, nº 6, p. 960-974, 2012.

CHEPOTE, R. E. Efeito do composto da casca do fruto de cacau no crescimento e produção do cacauzeiro. **Agrotrópica**, v.15, n. 1, p. 1- 8, 2003.

CORDEIRO, Z. J. M.; MATOS, A. P.; KIMATI, H. Doenças da bananeira (*Musa* spp.). In: KIMATI, J.; AMORIN, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.;



CAMARGO, L. E. A. **Manual de Fitopatologia: Doenças das plantas cultivadas**. São Paulo, SP: Agronômica Ceres, 2005, p. 99-117.

CORDEIRO, Z. J. M.; MATOS, A. P.; MEISSNER FILHO, P. E. Doenças e Métodos de Controle. *In*: BORGES, A. L.; SOUZA, L. S., editores. **O Cultivo da Banana**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2004, p. 146-182.

CORDEIRO, Z. J. M. Doenças. *In*: ALVES, E. J., org. **A cultura da banana: aspectos técnicos, socioeconômicos e agroindustriais**. Brasília: Embrapa-SPI/Cruz das Almas: Embrapa-CNPMF, 1997, p. 353-408.

D'ANDRÉA, P. A. **ROCHAGEM NO BRASIL: REGULAMENTAÇÃO**. 2003. Disponível em: <<http://www.uoguelph.ca/rocks/news/abstracts/abs06.htm>>. Acesso em: 30 jan. 2016.

DIAS, K. B.; SILVA, D. P.; FERREIRA, L. A.; FIDELIS, R. R.; COSTA, J. L.; SILVA, A. L. L.; SCHEIDT, G. N. Chitin and chitosan: Characteristics, uses and production current perspectives. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 4, n.3, p. 184-191, 2013.

DÍAZ, E. D. A.; VELASCO, M. C. V.; PÉREZ, F. R.; LÓPEZ, C. A. R.; IBARRETA, L. L. UTILIZACIÓN DE ADSORBENTES BASADOS EN QUITOSANO y ALGINATO SÓDICO PARA LA ELIMINACIÓN DE IONES METÁLICOS:  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Cr}^{3+}$  y  $\text{Co}^{2+}$ . **Revista Iberoamericana de Polímeros**, v.8, p.20-37, 2007.

DI PIERO, R. M. E GARDA, M. V. Quitosana reduz a severidade da antracnose e aumenta a atividade de glucanase em feijoeiro-comum. **Pesq. agropec. bras.**, v.43, n.9, p.1121-1128, 2008.

DEEPMALA, K.; HEMANTARANJAN, A.; BHARTI, S.; NISHANT BHANU, A. A Future Perspective in Crop Protection: Chitosan and its Oligosaccharides. **Advances in Plants & Agriculture Research**, v. 1, p. 1-8, 2014.

DU, D.; DING, J.; CAI, J.; ZHANG, A. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. V. 58, 2007. 145 p.

EL HADRAMI, A.; ADAM, L. R.; EL HADRAMI, I. AND DAAYF, F. Chitosan in Plant Protection. **Marine Drugs**, v. 8, p. 968-987, 2010.

FAI, A. E. C.; STAMFORD, T. C. M.; STAMFORD, T. L. M. Potencial biotecnológico de quitosana em sistemas de conservação de alimentos. Quitosanos em alimentação. **Revista Iberoamericana de Polímeros**, v. 9, n. 5, p.435-451, 2008.

FRANCO, L. de O.; ALBUQUERQUE, C. D. C.; STAMFORD, N. P.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. de. Avaliação da atividade ácida e alcalina e acúmulo de fosfato inorgânico em amostras de *Cunninghamella elegans*. **Revista Analytica**, v. 54, p. 70-78, 2011.

FRANCO, L. de O.; STAMFORD, T. C. M.; STAMFORD, N. P.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. de. *Cunninghamella elegans* (IFM 46109) como fonte de quitina e quitosana. **Revista Analytica**, n. 14, 40-44, 2005.

FRANCO, L. de O.; MAIA, R. de C. C.; PORTO, A. L. F.; MESSIAS, A. S.; FUKUSHIMA, K.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. de. Heavy metal biosorption by chitin and chitosan isolated from *Cunninghamella elegans* (IFM 46109). **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, 243-247, 2004.

FRÁGUAS, R. M.; ROCHA, D. A.; QUEIROZ, E. R.; ABREU, C. M. P.; SOUSA, R. V. & OLIVEIRA, Ê. N. Jr. Caracterização química e efeito cicatrizante de quitosana, com baixos valores de massa molar e grau de acetilação, em lesões cutâneas. **Polímeros**, v. 25, n. 2, p. 205-211, 2015.

FREITAS, S. S. Rizobactérias Promotoras do Crescimento de Plantas. *In*: **Microbiota do solo e qualidade ambiental**. (Ed.) Adriana Parada Dias da Silveira; Sueli dos Santos Freitas. Campinas: Instituto Agronômico, 2007, p. 10-27.

GADES, M. D.; STERN, J. S. Chitosan supplementation and fat absorption in men and women. **Journal of the American Dietetic Association**, v.105, p.72-77, 2005.

GURGEL, L. M. S.; ROSA, R. C. T.; COELHO, R. S. B. Doenças. *In*: SILVA JUNIOR, J. F.; LOPES, G. B. M.; FERRAZ, L. G. B., editores. **Sistema de Produção de Banana para a Zona da Mata de Pernambuco**. Aracajú: Embrapa Tabuleiros Costeiros, Recife: IPA, 2010, p. 75-94.

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

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola**. Rio de Janeiro, v.29, n.4, p.1-81, 2015.

INSTITUTO BRASILEIRO DE MINERAÇÃO. Fosfato, Potássio, Fertilizantes. **Informações e Análises da Economia Mineral Brasileira**. 6ª edição, 2011.

KASHYAP, P. L.; XIANG, X.; HEIDEN, P. Chitosan nanoparticle based delivery systems for sustainable agriculture. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 77, p. 36-51, 2015.

KEEGAN, G. M.; SMART, J. D.; INGRAM, M. J.; BARNES, L. M.; BURNETT, G. R.; REES, G. D. Chitosan microparticles for the controlled delivery of fluoride. **Journal of Dentistry**, v. 40, p.229-40. 2012.

KOKURA, S.; HANDA, O.; TAKAGI, T.; ISHIKAWA, T.; NAITO, Y.; YOSHIKAWA, T. Silver nanoparticles as a safe preservative for use in cosmetics. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 6, p. 570-574, 2010.

LARANJEIRA, M. C. M. e FÁVERE, V. T. Quitosana: biopolímero funcional com potencial industrial biomédico. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 672-678, 2009.

LAUS, R.; LARANJEIRA, M. C. M.; MARTINS, A. O. e FÁVERE, V. T. Microesferas de Quitosana Reticuladas com Tripolifosfato Utilizadas para Remoção da Acidez, Ferro (III) e Manganês (II) de água contaminadas pela Mineração de Carvão. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 34-39, 2006.

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

LEE, S.; CHOI, H.; SUH, S.; DOO, IN-SUK; OH, KI-YOUNG; CHOI, E. J.; TAYLOR, A. T. S.; LOW, P. S. AND LEE, Y. Oligogalacturonic Acid and Chitosan Reduce Stomatal Aperture by Inducing the Evolution of Reactive Oxygen Species from Guard Cells of Tomato and *Commelina communis*. **Plant Physiology**, v. 121, p. 147–152, 1999.

LIMA, F. S.; STAMFORD, N. P.; SOUSA, C. S.; LIRA JUNIOR, M. A.; MALHEIROS, S. M. M.; van STRAATEN, P. Earthworm compound and rock biofertilizer enriched in nitrogen by inoculation with free living diazotrophic bacteria. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 27, p. 1769-1777, 2010.

LINHARES, A. M. P.; HERNANDES, C.; FRANÇA, S. de C.; LOURENÇO, M. V. Atividade fitoreguladora de jasmonatos produzidos por *Botryosphaeria rhodina*. **Horticultura Brasileira**, v. 28, p. 430-434, 2010.

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

MALAVOLTA, E. **Manual de nutrição mineral de plantas**. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, 2006. 638p.

MARTINS, A. N. & FURLANETO, F de P. B. Bananicultura: Pesquisas voltadas para a agricultura familiar. **Revista Tecnologia & Inovação Agropecupária**. p. 77-86, 2008.

MELAMED, R.; GASPAR, J. C.; MIEKELEY, N. Pó de rocha como Fertilizante Alternativo para Sistemas de Produção Sustentáveis em Solos Tropicais. *In*: LAPIDO-LOUREIRO, F. E. V.; MELAMED, R.; NETO, J. F. (Ed.). **Fertilizantes: agroindústria e sustentabilidade**. Rio de Janeiro, RJ: CETEM, p. 385-395, 2009.

MILIOLI, C. C. **Avaliação da atividade antimicrobiana da Quitosana em pó dopada com prata**. 2011. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2011.

MUZZARELLI, R. A. A.; **Natural Chelating Polymers**, Pergamon: Oxford, 1973, p. 1-254.

OLIVEIRA, J. L. **Fotodegradação de corantes têxteis e aplicação da quitosana como tratamento terciário destes efluentes**. 2006. 70 f. Dissertação (Mestrado em Química). Centro de Ciências Exatas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá. 2006.

OLIVEIRA, W. S.; STAMFORD, N. P.; SILVA, E. V. N.; SANTOS, C. E. de R. e S.; FREITAS, A. D. S.; ARNOUD, T. M. S.; SARMENTO, B. F. Biofertilizer produced by interactive microbial processes affects melon yield and nutrients availability in a Brazilian semiarid soil. **Australian Journal of Crop Science**, v. 8, n. 7, p. 1124-1131, 2014.

OLIVEIRA, W. da S. **Eficiência agrônômica de biofertilizante – bioprotetor na produtividade e qualidade do melão em argissolo vermelho amarelo no sudoeste da Bahia**. 2011. 57 f. Dissertação (Mestrado em Ciências do Solo) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife. 2011.

PANT, H. R.; PANDEYA, D. R.; NAM, K. T.; BAEK, WOO-IL; HONG, S. T.; KIM, H. Y. Photocatalytic and antibacterial properties of a TiO<sub>2</sub>/nylon-6 electrospun nanocomposite mat containing silver nanoparticles. **Journal of Hazardous Materials**, v. 189, p. 465-471, 2011.

PBMH & PIF - PROGRAMA BRASILEIRO PARA A MODERNIZAÇÃO DA HORTICULTURA & PRODUÇÃO INTEGRADA DE FRUTAS. **Normas de Classificação de Banana**. São Paulo: CEAGESP, 2006. (Documentos, 29).

PINTO-ALPHANDARY, H.; ANDREMONT, A.; COUVREUR, P. Review: Targeted delivery of antibiotics using liposomes and nanoparticles: research and applications. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 13, p. 155-168, 2000.

PIRES, C. T. G. V. M. T.; VILELA, J. A. P.; AIROLDI, C. The effect of Chitin Alkaline Deacetylation at Different Condition on Particle Properties. **Procedia Chemistry**, v. 9, p. 220-225, 2014.

PLOETZ, R. C. & PEGG, K. G. Fusarium wilt of banana and Wallace's line: Was the disease originally restricted to his Indo-Malayan region? *Australasian Plant Pathology*, Oxford, v. 26, p.239-249', 1997.

PRIYADHARSINI, P. & MUTHUKUMAR, T. Insight into the Role of Arbuscular Mycorrhizal Fungi in Sustainable Agriculture. In: THANGAVEL, P. & SRIDEVI, G. **Environmental Sustainability: Role of Green Technologies**, Springer India. p. 3-37, 2015.

PROMBUTARA, P.; KULWATTHANASAL, Y.; SUPAKA, N.; SRAMALA, I.; CHAREONPORNPOORNWATTANA, S. Production of nisin-loaded solid lipid nanoparticles for sustained antimicrobial activity. **Food Control**, v. 24, p. 184-190, 2012.

QI, L.; XU, Z.; JIANG, X.; HU, C.; ZOU, X. Preparation and antibacterial activity of chitosan nanoparticles, **Carbohydrate research**, v. 339, p. 2693-2700, 2004.

RAIJ, B. van. Condições mínimas de eficiência para fosfatos alternativos ao superfosfato. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.10, p.235-239, 1986.

RAPPUSSI, M. C. C.; PASCHOLATI, S. F.; BENATO, E. A. AND CIA, P. Chitosan Reduces Infection by *Guignardia citricarpa* in Postharvest 'Valencia' Oranges. **Braz. Arch. Biol. Technol.** v.52, n.3, p. 513-521, 2009.

REIS, C. P.; NEUFELD, R. J.; RIBEIRO, P. A. J.; VEIGA, F. Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded Polymeric nanoparticles. **Nanomedicine**, v. 2, n. 1, p. 8-21, 2006.

RINAUDO, M. Chitin and chitosan: properties and applications. **Progress in Polymer Science**, v. 31, p. 603-632, 2006.

ROBERTS, T. Reservas de minerais potássios e a produção de fertilizantes potássicos no mundo. **Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato, Piracicaba. (Informações Agrônomicas)**, v. 107, p. 2-3, 2004.

SANCHEZ, P. A. Soil fertility and hunger in Africa. **Science**, v. 295, p. 2019 - 2020, 2002.

SANO, H.; SHIBASAKI, K.; MATSUKUBO, T. Effect of molecular mass and degree of deacetylation of chitosan on adsorption of *Streptococcus sobrinus* 6715 to saliva treated hydroxyapatite. **The Bulletin of Tokyo dental College**, v. 43, p. 75-82, 2002.

SANO, H.; SHIBASAKI, R.; MATSUKUBO, T.; TAKAESU, Y. Effect of chitosan rinsing on reduction of dental plaque formation. **Bulletin Tokyo Dental College**, v. 44, p. 9-16, 2003.

SANTANA, C. C.; NÓBREGA NETO, P. I.; SÁ, M. J. C.; OLIVEIRA, L. M.; FOOK, M. V. L.; AZEVEDO, A. S.; SOUSA, O. B. Utilização do filme de quitosana na reparação de tendão em coelhos. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.66, n.4, p.995-1002, 2014.

SANTOS, M. C.; CIRILO, A. T. de O.; NUNES, M. L. Determinação de grau de desacetilação de quitosana obtida de camarão "Saburica" (*Macrobrachium jelskii*, Miers, 1877). **Scientia Plena**, v. 7, n. 9, p. 1-3, 2011.

SCHAFFAZICK, S. R.; GUTERRES, S. S.; FREITAS, L. L.; POHLMANN, A. R. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v.26, p. 726-737, 2003.

SHI, Z.; NEOH, K. G.; KANG, E. T.; WANG, W. Antibacterial and mechanical properties of bone cement impregnated with chitosan nanoparticles. **Biomaterials**, v. 27, p. 2440-2449, 2006.

SILVA, J. F. M.; PRADO, G.; MADEIRA, J. E. G. C.; OLIVEIRA, M. S.; FARACO, A. A. G.; MALTA, C. M.; NICOLI, J. R.; PIMENTA, R. S. Utilização de filme de quitosana para o controle de aflatoxinas em amendoim. **Bragantia**, Campinas, 2015.

SILVA, J. T. A. da.; PEREIRA, R. D. ; SILVA, I. P. ; OLIVEIRA, P. M. de. Produção da bananeira "Prata anã"(AAB) em função de diferentes doses e fontes de potássio. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 58, n. 6, p. 817-822, 2011.

SILVA, A. C. **Produção de quitina e quitosana em culturas submersas de *Rhizopus arrhizus* nos meios milho e sintético para Mucorales**. 2007.

97 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Católica de Pernambuco, Recife. 2007.

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

SILVA, S. O.; SANTOS-SEREJO, J. A.; CORDEIRO, Z. J. M. Variedade. *In*: BORGES, A. L.; SOUZA, L. S., editores. **O Cultivo da Banana**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2004. p.45-58.

SILVA, J. T. A. da; BORGES, A. L., MALBURG, J. L. **Solos, adubação e nutrição da bananeira**. Informe Agropecuário, v.20, p.21- 36, 1999.

SILVA, S. O.; ALVES, E. J.; SHEPHERD, K.; DANTAS, J. L. L. Cultivares. *In*: ALVES, E. J., org. **A cultura da banana: aspectos técnicos, socioeconômicos e agroindustriais**. Brasília: Embrapa-SPI/Cruz das Almas: Embrapa-CNPMPF, 1997. p. 85-106.

SILVA; S. de O. e. **Cultivares de Banana para Exportação**. Frutas do Brasil, Banana – Produção, s. d.

SILVA JUNIOR, J. F. da; LOPES, G. M. B.; FERRAZ, L. G. B. **Sistema de Produção de Banana para a Zona da Mata de Pernambuco**. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, Recife: IPA, 2010. p. 11-13.

SILVA NETO, S. P. da & GUIMARÃES, T. G. Evolução da cultura da banana no Brasil e no mundo. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2011. Disponível em: <<http://www.cpac.embrapa.br/noticias/artigosmidia/publicados/287/>>. Acesso em: 30 jan. 2016.

SINGH, T.; VESENTINI, D.; SINGH, A. P.; DANIEL, G. Effect of chitosan on physiological, morphological, and ultrastructural characteristics of wood-degrading fungi. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 62, p. 116–124, 2008.

STAMFORD, N. P.; NETO, D. E. S.; FREITAS, A. D. S.; OLIVEIRA, E. C. A.; OLIVEIRA, W. S.; CRUZ, L. Rock biofertilizer and earthworm compost on



sugarcane performance and soil attributes in two consecutive years. **Scientia Agricola**, v.73, n.1, p.29-33, 2016.

STAMFORD, N. P.; SILVA JUNIOR, S.; SANTOS, C. E. R. S.; FREITAS, A. D. S.; SANTOS, C. M. A.; ARNAUD, T. M. S.; SOARES, H. R. Yield of grape (*Vitis Labrusca* cv. Isabel) and soil nutrients availability affected by biofertilizers with diazotrophic bacteria and fungi chitosan. **Aust J Crop Sci**, v. 8, p. 301-306, 2014.

STAMFORD, N. P.; SANTOS, C. E. de R. e S.; FELIX, F. F.; OLIVEIRA, F. L. N. de. Biofertilizers From Phosphate and Potash Rocks with *Acidithiobacillus* and Organic Matter Enriched by Free Living Diazotrophic Bacteria. In: ARAÚJO, A. S. F. de; FIGUEIREDO, M. do V. B. **Microbial Ecology of Tropical Soils**. Nova Science Publishers. p. 149-157, 2011.

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

STAMFORD, N. P.; LIMA, R. A.; LIRA JUNIOR, M. A. ; SANTOS, C. E. R. S. 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**, v. 24, p. 2061-2066, 2008b.

STAMFORD, N. P.; IZQUIERDO, C. G.; FERNÁNDEZ, M. T. H.; MORENO, M. del C. M. Biofertilizante de rochas fosfatadas e potássicas com enxofre e *Acidithiobacillus*. In: FIGUEIREDO, M. do V. B.; BURITY, H. A.; STAMFORD, N. P.; SANTOS, C. E. de R. e S. **Microrganismos e Agrobiodiversidade: o novo desafio para a agricultura**. Guaíba: Agrolivros, 2008c. p. 401-421.

STAMFORD, T. C. M; STAMFORD, T. L. M.; FRANCO, L. O. 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. (editores). **Microrganismos e Agrobiodiversidade: o novo desafio para a agricultura**. 1ª edição, Guaíba: Agrolivros, 2008d. p. 487-506.

STAMFORD, T. C. M.; STAMFORD, T. L. M.; STAMFORD, N. P.; BARROS NETO, B. de.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. de. Growth of *Cunninghamella elegans* UCP 542 and production of chitin and chitosan using yam bean medium, **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 01, p. 61-68, 2007.

STREIT, F. **Estudo do aproveitamento do bagaço de maçã para produção de quitosana fúngica**. 2004. 101 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2004.

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.

TORRES, A. A. F. N.; SOUZA, J. M. O.; AMORIM, A. F. V.; LIMA, M. L. M.; ARAÚJO, R. S. Microesferas de quitosana para utilização como sistemas de liberação controlada de fitoterápicos. **IV CONNEPI - Congresso de Pesquisa e Inovação da Rede Norte e Nordeste de Educação Tecnológica**. Belém-PA, 2009.

van STRAATEN, P. **Agrogeology - the use of rocks for crops**. Enviroquest, Cambridge, Ontario, Canada, 2007. 440p.

van STRAATEN, P. **Rocks for crops – Agrominerals of sub - Saharan Africa**. (ICRAF: International Center for Research in Agroforestry). Nairobi, Kenya. University of Guelph, Ontario. 2002. 338 p.

VELÁSQUEZ, C. L. Algunos usos Del quitosano em sistemas acuosos. **Revista Iberoamericana de Polímeros**, v.4, p. 91, 2003.

VIEIRA, J. G. **Aplicação exógena de ácido salicílico no feijoeiro**. 2011. 48 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade do Oeste Paulista, Presidente Prudente. 2011.

YOO, H. S.; LEE, K. H.; OH, J. E.; PARK, T. G. In vitro and in vivo anti-tumor activities of nanoparticles based on doxorubicin–PLGA conjugates. **Journal of Controlled Release**, v. 68, p. 419-431, 2000.

YOUNES, I. and RINAUDO, M. Chitin and Chitosan Preparation from Marine Sources. Structure, Properties and Applications. **Marine Drugs**, v. 13, p. 1133-1174, 2015.

## CAPÍTULO I

### **CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E MINERALÓGICA DE ROCHAS FOSFATADA E POTÁSSICA INOCULADAS COM *Acidithiobacillus thiooxidans* (FG01)**

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E MINERALÓGICA EM ROCHAS  
FOSFATADA E POTÁSSICA INOCULADAS COM *Acidithiobacillus*  
*thiooxidans* (FG01)**

**RESUMO**

A utilização de pó de rocha faz com que haja uma redução no uso dos fertilizantes minerais que requerem um elevado consumo de energia para a sua produção, tornando o insumo acessível tanto para o grande quanto para o pequeno produtor rural. Para fornecerem nutrientes para as culturas, as fontes minerais solúveis precisam ser modificadas através de processos físicos, químicos ou biológicos, já que as mesmas não ocorrem na natureza em forma prontamente disponível para as plantas. Por outro lado, a utilização de microorganismos com habilidade de solubilizar rochas fosfatadas e potássicas acrescidas de enxofre é de suma importância para a agricultura. As bactérias do gênero *Acidithiobacillus*, são capazes de produzir ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) e atuar nas rochas e com a redução do pH liberar alguns nutrientes contidos nos minerais das rochas. Deste modo o objetivo do trabalho foi avaliar a eficiência dos biofertilizantes produzido em laboratório, a partir de rocha fosfatada e potássica, com adição de enxofre elementar, inoculados com a bactéria *Acidithiobacillus thiooxidans*, no estudo de determinadas características químicas e mineralógicas. Os experimentos foram realizados em placas de Petri com adição de 30 g de pó de rocha (fosfatada/potássica (RP/RK)) em delineamento inteiramente casualizados com quatro repetições. Na produção do biofertilizante (fosfatado/potássico - BP/BK) foram adicionadas duas doses de enxofre elementar ( $S^0$ ), 10 e 20%, e inoculado com a bactéria acidificante *Acidithiobacillus thiooxidans* (A) estirpe FG01, em concentrações de células viáveis ( $10^6 mL^{-1}$ ). A inoculação com a bactéria foi efetuada na proporção de 1mL por 1g de enxofre. Em ambas as rochas o ácido sulfúrico produzido pela bactéria atuou, principalmente, na disponibilidade de fósforo e de potássio bem como na redução do pH de ambos biofertilizantes após os 180 dias de incubação. Os biofertilizantes em questão podem ser utilizados no lugar dos fertilizantes minerais solúveis, e também podem ser manufacturados, por pequenos e médios produtores, criando oportunidades para os agricultores de baixa renda.

**Palavras-chave:** Biofertilizantes; bactéria oxidante; enxofre elementar; minerais de rochas; pó de rocha.

**CHEMICAL AND MINERALOGICAL CHARACTERIZATION IN PHOSPHATE AND POTASSIC ROCKS INOCULATED WITH *Acidithiobacillus thiooxidans* (FG01)**

**ABSTRACT**

The use of powdered rocks reduces the needs for mineral soluble fertilizers and requires wider energy consumption for the production of biofertilizers, and making the product from rocks available for both large and small farmers. To provide nutrients for plants, the minerals contained in rocks need to be modified through physical, chemical or biological processes because these do not occur in nature in form readily available to plants. Thus, the processes using microorganisms to solubilize phosphate and potassic rocks in mixture with elemental sulfur are of great importance in agriculture. The oxidative bacteria *Acidithiobacillus* can produce sulfuric acid ( $H_2SO_4$ ) which promotes reduction in the pH that release some minerals contained in the rocks. Thus, this study aim to evaluate the effectiveness of biofertilizers produced in laboratory, using phosphate and potassium rocks with addition of sulfur in, inoculated with the bacteria *Acidithiobacillus* to determine some chemical and mineralogical characteristics. The assays were conducted in Petri dishes adding 30 g of each rock (phosphate rock - PR and potassic rock - KR), in a completely randomized design, with four replications. In the production of phosphate and potassic biofertilizers two doses of elemental sulfur (10 and 20%), were applied 1 mL per g elemental sulfur for inoculation with the *Acidithiobacillus thiooxidans* (strain FG 01) in viable cell concentration  $10^6$  mL<sup>-1</sup>. In both doses the sulfuric acid produced by the bacteria act and release especially phosphorus and potassium by effect of the pH reduction in both biofertilizers analyzed in the incubation period of 180 days. The two biofertilizers produced may be applied in replacement of mineral soluble PK fertilizer, and can be manufactured by small and medium farmers, creating opportunities for low-income farmers.

**Keywords:** Biofertilizers; oxidative bacteria; elemental sulfur; minerals from rocks; powdered rocks.

## INTRODUÇÃO

A utilização de pó de rocha faz com que haja uma redução no uso dos fertilizantes minerais que requerem um elevado consumo de energia para a sua produção, tornando o pó de rocha um insumo acessível tanto para o grande quanto para o pequeno produtor rural (D'ANDRÉA, 2003; MELAMED et al., 2009).

De acordo com van Straaten. (2002), para serem fontes efetivas de nutrientes para as culturas, as fontes minerais, como as rochas fosfatadas e potássicas, precisam ser modificadas através de processos físicos, químicos ou biológicos, já que as mesmas não ocorrem na natureza em forma prontamente disponível para as plantas.

Sendo assim, a utilização de micro-organismos com habilidade de solubilizar rochas fosfatadas e potássicas com adição de enxofre é de suma importância para a agricultura. As bactérias do gênero *Acidithiobacillus*, são capazes de produzir ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) e atuar nas rochas com redução do pH e liberando alguns minerais (GARCIA JÚNIOR, 1992; STAMFORD et al., 2004; 2006; 2007; 2008a,b; 2009).

Os fosfatos naturais podem ser de origem ígnea (vulcânica) ou metamórfica, os quais são pouco reativos, são de baixíssima solubilidade tanto em água como em ácido, ou podem ser de origem sedimentar, os quais são de alta reatividade, possuem maior substituição isomórfica em sua estrutura o que a torna mais frágil e, portanto, mais reativa (SOARES et al., 2000).

Estes fosfatos são concentrados apatíticos, que recebem a denominação de fosfato natural, rocha fosfatada ou mesmo concentrado fosfático, cuja formação provém de minérios fosfáticos, ocorrentes em jazidas, caso sejam passíveis de serem utilizados quer diretamente como material fertilizante, quer como insumo básico da Indústria de Fósforo ou de seus compostos (NASCIMENTO & LAPIDO-LOUREIRO, 2004; SOUZA & FONSECA, 2009).

Os solos brasileiros são escassos de P, e sua concentração na solução do solo geralmente é baixa, uma vez que possuem alta capacidade de fixação de fosfato (adsorção e precipitação), e desta forma o fósforo é rapidamente adsorvido nas superfícies dos colóides do solo ou é precipitado como fosfatos

de cálcio, magnésio, ferro e alumínio (RAIJ, 1991; GRANT et al., 2001; FAQUIN, 2005).

Por outro lado a biotita é um mineral do grupo das micas que são os minerais com potássio mais comuns nos solos, sendo as rochas ígneas a fonte original das micas na superfície terrestre (KAMPF et al., 2009).

Em torno de 91% do potássio no Brasil, empregado na agropecuária na forma de KCl é importado, principalmente do Canadá e da Rússia, pelo fato da produção interna não satisfazer a grande demanda (ROBERTS, 2004; BARBOSA FILHO et al., 2007; INSTITUTO BRASILEIRO DE MINERAÇÃO, 2011). No decorrer dos anos, a elevada dependência de importações (DUARTE et al., 2012), torna importante a utilização de novas fontes de potássio disponível para as plantas.

O fósforo (P) desempenha papel importante no armazenamento e na transferência de energia da célula, na respiração e na fotossíntese, sendo fundamental para o metabolismo das plantas (GRANT et al., 2001; MALAVOLTA, 2006). Além de ser constituinte da adenosina trifosfato (ATP), é componente estrutural dos ácidos nucléicos, bem como de muitas coenzimas, fosfoproteínas e fosfolípidos, e a limitação da sua disponibilidade pode ocasionar restrição no desenvolvimento da planta e na produção de grãos, que sob deficiência mais severa as plantas apresentam coloração variando de verde-escura ou azul-esverdeada a púrpura (GRANT et al., 2001; EPSTEIN & BLOOM, 2004; MALAVOLTA, 2006; TAIZ & ZEIGER, 2009).

O potássio (K) não desempenha função estrutural na planta, por não fazer parte de nenhum composto orgânico, sendo o seu papel nos vegetais, atuar na regulação osmótica das células; participar nos processos de translocação de açúcares; intervir na síntese de proteínas; além de estar envolvido na fotossíntese (MALAVOLTA, 2006). A limitação da disponibilidade do K pode ocasionar clorose em manchas ou marginal, seguida de necrose nos ápices foliares, nas margens e entre nervuras, primeiramente nas folhas mais velhas (EPSTEIN & BLOOM, 2004; MALAVOLTA, 2006; TAIZ & ZEIGER, 2009).

Deste modo o objetivo do trabalho foi avaliar a eficiência do biofertilizante produzido em laboratório, a partir de rochas (fosfatada e potássica), com adição de enxofre elementar nas concentrações de 10 e 20%,



inoculados com a bactéria *Acidithiobacillus thiooxidans*, através do estudo de determinadas características químicas e mineralógicas.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Biotecnologia Ambiental da Universidade Federal Rural de Pernambuco, UFRPE, em Recife-PE, durante o período de abril a outubro de 2015. A rocha utilizada na produção do biofertilizante fosfatado foi o fosfato natural (Irecê – BA), com 24 % de  $P_2O_5$  total e do biofertilizante potássico a rocha potássica denominada de biotita xisto (Santa Luzia – PB), com 8-10 % de  $K_2O$  total.

### **Obtenção e cultivo da bactéria**

A bactéria utilizada nos experimentos foi a bactéria acidificante *Acidithiobacillus thiooxidans*, isolado FG01, que foi cedida pelo Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química, do Instituto de Química de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP.

O cultivo do *A. thiooxidans* FG01 foi realizado em meio específico 9K (SILVERMAN & LUNDGREN, 1959), esterilizado a 120°C a uma pressão de 101 KPa, por 20 minutos em autoclave vertical. Em Erlenmeyers de 125 mL, contendo 50 mL de meio no qual foi inoculada a bactéria, sendo os Erlenmeyers colocados em agitação a 150 rpm, por 20 dias a 28-30°C.

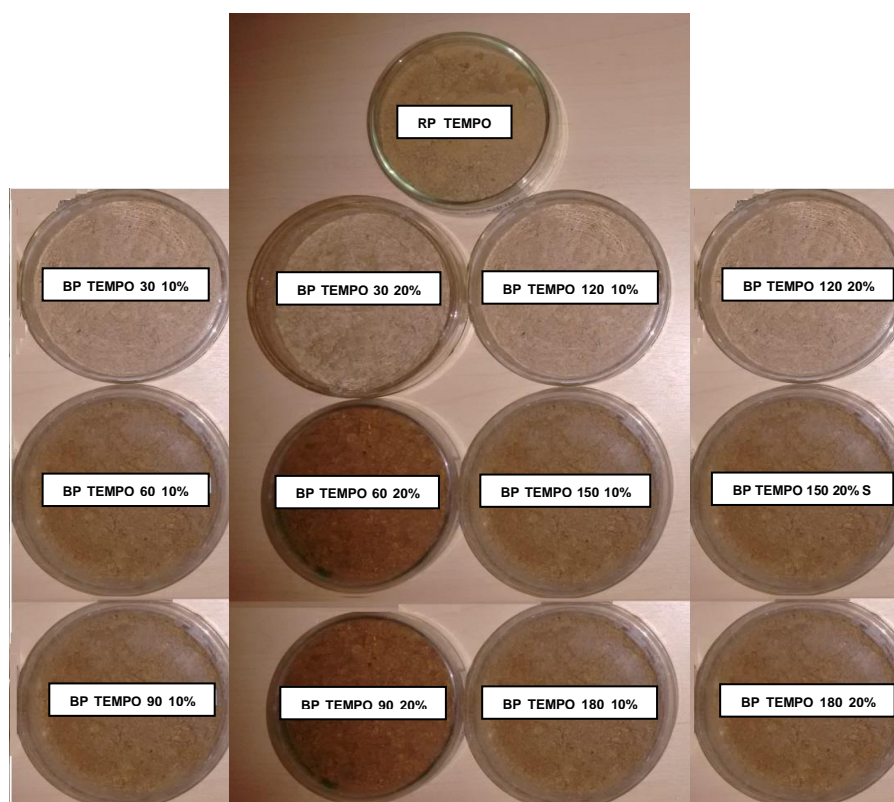
### **Condução dos experimentos**

Os experimentos foram realizados em placas de Petri com adição de 30g de pó de rocha (fosfatada/potássica) por placa, em delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições. Na produção do biofertilizante (fosfatada/potássica) foram adicionadas duas doses de enxofre elementar ( $S^0$ ), 10 e 20%, e inoculado a bactéria acidificante *Acidithiobacillus thiooxidans* (A) estirpe FG01, em concentrações de células viáveis ( $10^6$  mL<sup>-1</sup>). A inoculação da bactéria foi efetuada a uma proporção de 1 mL g<sup>-1</sup> enxofre (STAMFORD et al., 2003).

Para ambos biofertilizantes foi feita adição de água destilada diariamente, para a manutenção da umidade em torno de 80% da retenção máxima de umidade, durante os períodos de incubação (30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias). No fim de cada período de incubação, os biofertilizantes eram colocados para secar em temperatura ambiente, passados em peneira de malha de 2 mm e armazenados em tubos tipo Falcon para posteriores análises químicas e mineralógicas.

### Experimento I- Biofertilizante Fosfatado

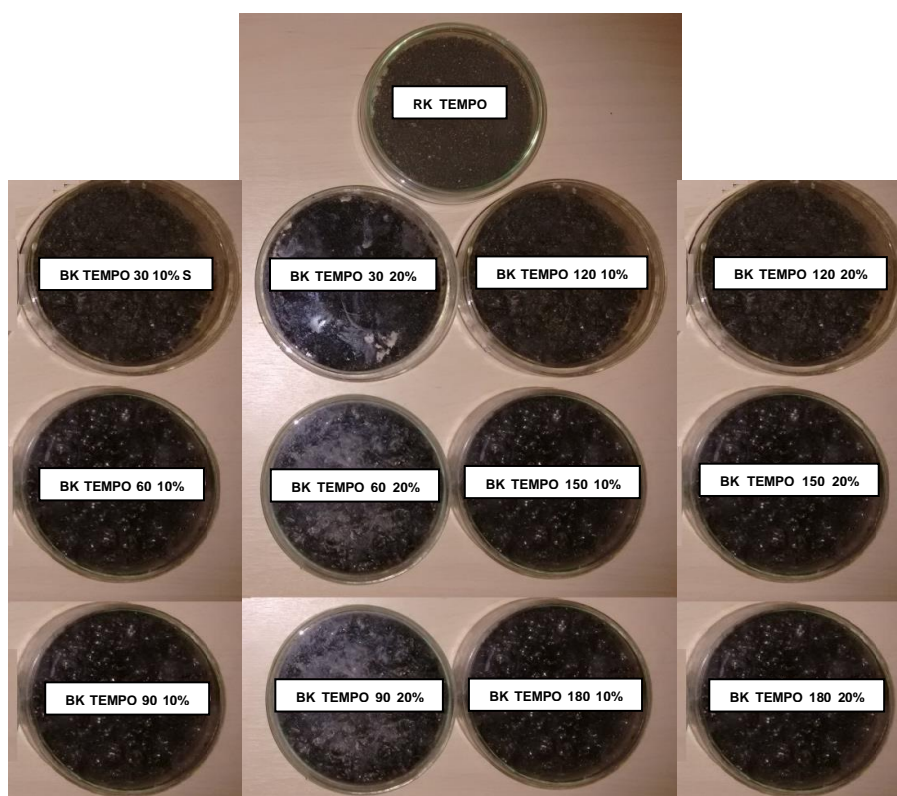
Para o experimento com rocha fosfatada foram estabelecidas as seguintes proporções: P0 (controle): 30 g de pó de rocha fosfatada (RP) - enxofre (S) - bactéria acidificante *Acidithiobacillus thiooxidans* (A) = (RP-S-A); P1: 30 g de pó de rocha fosfatada + 10% de S (3 g de S<sup>0</sup>) + 3 mL de inóculo = (RP+ 10% S+A=BP); P2: 30 g de pó de rocha fosfatada + 20% de S (6 g de S<sup>0</sup>) + 6 mL de inóculo = (RP+ 20% S+A=BP) (Figura 1). Os tratamentos P1 e P2 foram usados nos tempos 30; 60; 90; 120; 150 e 180 dias de incubação.



**Figura 1** – Placas de Petri com rocha fosfatada (RP) no tempo 0 sem *Acidithiobacillus thiooxidans*; e biofertilizante de rocha fosfatada (BP) nos tempos 30; 60; 90; 120; 150 e 180 dias, acrescida de enxofre (S10% e S20%) inoculado com *A. thiooxidans* (FG01).

## Experimento II- Biofertilizante Potássico

Para o experimento com rocha potássica foram estabelecidas as seguintes proporções: K0 (controle): 30 g de pó de rocha potássica (RK) - enxofre (S) - bactéria acidificante *Acidithiobacillus thiooxidans* (A) = (RK-S-A); K1: 30 g de pó de rocha fosfatada + 10% de S (3 g de S<sup>0</sup>) + 3 mL de inóculo = (RK+ 10% S+A=BK); K2: 30 g de pó de rocha potássica + 20% de S (6 g de S<sup>0</sup>) + 6 mL de inóculo = (RK+ 20% S+A=BK) (Figura 2). Os tratamentos K1 e K2 foram usados nos tempos 30; 60; 90; 120; 150 e 180 dias de incubação.



**Figura 2** – Placas de Petri com rocha potássica (RK) no tempo 0 sem *Acidithiobacillus thiooxidans*; e biofertilizante de rocha potássica (BK) nos tempos 30; 60; 90; 120; 150 e 180 dias, acrescida de enxofre (S10% e S20%) inoculado com *A. thiooxidans* (FG01).

### Análises químicas

Os biofertilizantes de rocha fosfatada (BP) e potássica (BK) foram submetidos às seguintes análises químicas: pH em água (H<sub>2</sub>O 1:2,5) determinado por potenciometria, utilizando o pHmetro (modelo mPA-210); o P e o K disponíveis foram extraídos pela solução extratora (Mehlich 1), sendo o K

determinado por fotometria de chama e o P por colorimetria; Ca e Mg trocáveis foram extraídos com solução extratora de KCl 1 mol L<sup>-1</sup> e determinados por espectrofotometria de absorção atômica (EMBRAPA, 2009).

### **Análises mineralógicas**

A identificação mineralógica do pó de rocha potássica (RK), e do biofertilizante potássico (BK) foram realizadas por difratometria de Raios-X, no Laboratório de Mineralogia da UFRPE, sendo utilizado um difratômetro Shimadzu XRD 6000, com radiação de Cu K $\alpha$  operando com tensão de 40 kv, com corrente de 30 mA e com monocromador de grafite.

A composição mineralógica do RK e do BK analisadas na forma de pó não orientado com velocidade de 1° min 2 $\theta$  registrando amplitude de 3 a 60° (2 $\theta$ ).

A difratometria de Raios-X foi realizada nas amostras do tempo 0 (apenas RK) até o tempo 180 dias (RK acrescido de enxofre elementar, inoculado com bactéria acidificante *A. thiooxidans* = BK) com 10 e 20% de enxofre. As amostras foram previamente maceradas em almofariz de ágata, sendo em seguida passadas em peneira de 48 mesh para posterior análise.

### **Análises estatísticas**

Os dados obtidos nas análises químicas foram analisados pelo programa estatístico SAS versão 9.2 (SAS Institute 2011), sendo realizada a ANOVA, e o teste comparativo de médias tomou como base o Tukey ( $p < 0,05$ ).

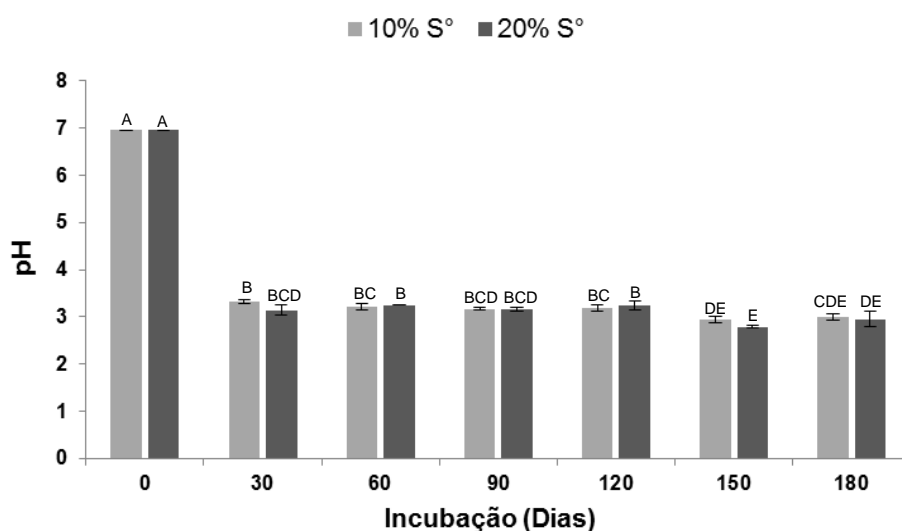
## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Experimento I- Biofertilizante Fosfatado

#### Análises Químicas

##### Análise de pH

O efeito da bactéria oxidante do enxofre, *Acidithiobacillus thiooxidans* (A) estirpe FG01, sobre o pH da rocha fosfatada, a cada trinta dias de incubação durante 180 dias são apresentados na Figura 3. Observa-se diferença significativa comparado o pH do tempo inicial (tempo 0), apenas com rocha fosfatada (RP) com os demais tempos, contendo rocha fosfatada, enxofre elementar (S<sup>0</sup>) e bactéria acidificante (RP+S+A), que dá origem ao biofertilizante fosfatado (BP). O biofertilizante fosfatado mostrou um pH com variação de 3,32 a 2,99 (tempo 30 e 180, respectivamente) com 10% de enxofre, e pH de 3,14 (tempo 30) a 2,79 (tempo 150) com 20% de enxofre.



**Figura 3** – Efeito no pH (H<sub>2</sub>O – 1,0:2,5) na rocha fosfatada (RP) com enxofre (S10% e S20%) inoculado com *Acidithiobacillus thiooxidans* (FG01), após 180 dias de incubação, no tempo 0 para a RP sem *A. thiooxidans*; e nos tempos 30; 60; 90; 120; 150 e 180 dias para o tratamento RP+S inoculado com *A. thiooxidans*. \*Médias com a mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. C.V. (%) = 2,20.

Os resultados mostram que os tratamentos apresentaram pH mais baixo que no tempo 0 (pH=6,96), o que configura a produção de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) pela ação da bactéria oxidante do enxofre (*Acidithiobacillus thiooxidans*). A adição de enxofre elementar nas concentrações usadas (10 % e 20 %) não mostrou efeito significativo no pH, nos diferentes tratamentos.

Quando comparado a rocha fosfatada (RP) inoculada com 10 e 20% de enxofre, no presente estudo, obteve-se uma redução de pH de 52 e 55%, nesta ordem, durante 30 dias de incubação. Essa redução pode ter sido em função da maior eficiência da estirpe de *Acidithiobacillus* (FG01) usada na atual pesquisa.

Stamford et al. (2004), em pesquisa com rocha fosfatada (RF) de Gafsa (em bandejas) com adição de enxofre elementar nas concentrações de 5; 10; 15 e 20% de enxofre, obtiveram redução significativa do pH, usando RF sem inoculação e RF inoculada com *Acidithiobacillus*. Entretanto, foi observada redução de 24% no pH quando comparada a rocha sem enxofre com o tratamento com a adição da concentração mais elevada de S (20 % de S).

Também foi verificado por Stamford et al. (2007) redução do pH 6,4 para pH 5,3 comparando o tratamento apenas com adição de rocha (RF) com o tratamento S:RF, na proporção correspondente a 2:10, com adição de S inoculado com *Acidithiobacillus*. Entretanto, houve redução correspondente a 17%, um percentual de redução menor que o obtido no presente trabalho.

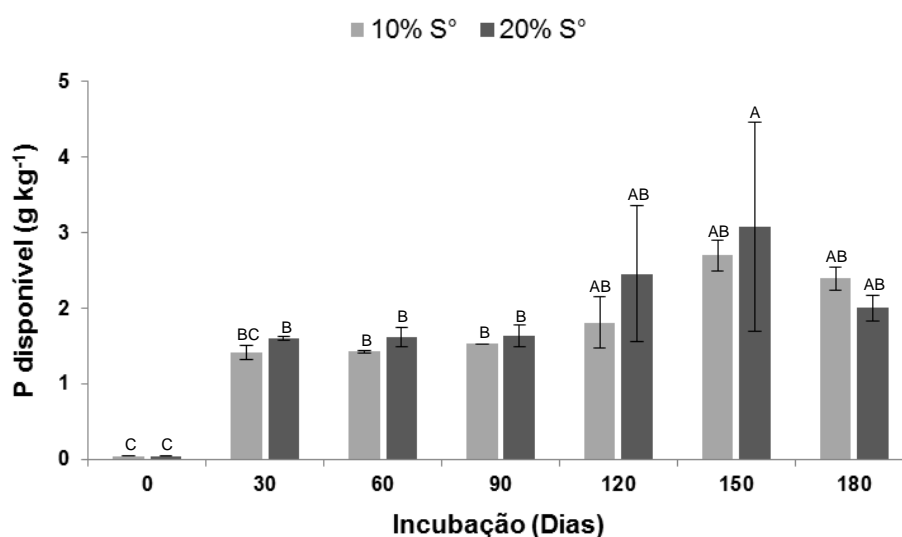
Em solo de tabuleiro costeiro do Brasil, com baixo P e K disponíveis cultivado com cana de açúcar, Stamford et al. (2008b), verificaram efeito no pH do solo após a colheita. Os autores verificaram redução no pH do solo (pH= 5,6) com a utilização de biofertilizante produzido com rocha fosfatada e potássica, sendo os efeitos mais pronunciados quando usadas doses mais elevadas dos biofertilizantes de rochas (BP<sub>180</sub>BK<sub>120</sub>) com pH= 4,16 e (BP<sub>240</sub>BK<sub>160</sub>) com pH= 4,22. Provavelmente a redução no pH foi em função da produção de ácido sulfúrico quando produzidos o biofertilizante de rochas com P e com K, inoculadas com *Acidithiobacillus*.

## P disponível

Nos ensaios com o biofertilizante de rocha fosfatada (BP) os dados obtidos para o P disponível demonstraram o potencial da rocha fosfatada (RP) em mistura com enxofre (S) em função da inoculação com a bactéria oxidante do enxofre elementar *Acidithiobacillus* (A), como confirmado na Figura 4.

Ao longo do tempo, o teor de P disponível na RP foi aumentando, com valores significativos no tempo 150 dias, com 20% de enxofre (3,08 g kg<sup>-1</sup>), diferindo estatisticamente dos resultados obtidos com 90 dias, inclusive do tempo 0 (RP) que apresentou P disponível equivalente a 0,04 g kg<sup>-1</sup>. No tempo 150 dias com 10% de enxofre o P disponível (2,70 g kg<sup>-1</sup>), também apresentou valor elevado, inclusive quando comparado com o tempo 180 com 10% e com 20% de enxofre, com P disponível no produto correspondente a 2,40 e 2,00 g kg<sup>-1</sup>, respectivamente.

No tratamento (RP+S+A), certamente a bactéria *A. thiooxidans* promoveu produção de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> suficiente para solubilizar o fósforo da rocha fosfatada, sendo desse modo altamente eficiente na disponibilidade de P contido nos minerais da rocha.



**Figura 4** – Fósforo disponível na rocha fosfatada (RP) com enxofre (S10% e S20%) inoculado com *Acidithiobacillus thiooxidans* (FG01), após 180 dias de incubação, no tempo 0 para a RP sem *A. thiooxidans*; e nos tempos 30; 60; 90; 120; 150 e 180 dias para o tratamento RP+S inoculado com *A. thiooxidans*. \*Médias com a mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. C.V. (%) = 26,29.

Stamford et al. (2004), ao avaliar a atuação de biofertilizante obtido a partir de rocha fosfatada, com adição de diferentes níveis de enxofre elementar inoculado com *Acidithiobacillus*, em um solo com baixo P disponível, comparado com fertilizante solúvel e com a rocha fosfatada comercial, observaram que o ácido sulfúrico produzido atuou na disponibilidade de P disponível, após diferentes períodos de incubação.

Resultados semelhantes foram relatados por Stamford et al. (2007), quando avaliaram o efeito do biofertilizante, produzido através da mistura de rocha fosfatada e S elementar previamente inoculado com *Acidithiobacillus*, em um solo ácido com baixo nível de fósforo disponível. Os autores verificaram maiores quantidades de P disponível no solo quando aplicados os tratamentos com biofertilizantes nas doses correspondentes a B150 e B200.

Lima et al. (2007a), em trabalho com biofertilizante produzido com rocha fosfatada (apatita) e com rocha potássica (biotita xisto), mais enxofre inoculado com *Acidithiobacillus*, aplicado em mistura com húmus de minhoca, verificaram efeito da fertilização com P e K, no P disponível no solo, com maior aumento quando aplicados nas doses BP1050 kg ha<sup>-1</sup> e superfosfato simples (SFS )700 kg ha<sup>-1</sup>.

Berger et al. (2013), verificaram que a maior quantidade de P disponível no solo foi encontrada no tratamento com fertilizante mineral (NPKF), no entanto, não houve diferença significativa em relação ao P disponível pela aplicação dos diferentes tratamentos com biofertilizante de rocha fosfatada e potássica enriquecida em N por adição de bactéria diazotrófica de vida livre (NPKB). Foi observado que tanto os tratamentos com fertilizantes solúveis, quanto NPKB apresentaram diferença significativa em comparação ao controle (com adição de húmus de minhoca).

Stamford et al. (2008b), concluíram que os biofertilizantes produzidos a partir de rocha fosfatada misturado com enxofre e inoculado com *Acidithiobacillus* pode ser usado como uma alternativa aos fertilizantes solúveis para a fertilização de cana de açúcar cultivada em solos com teores baixo de P disponível no solo.

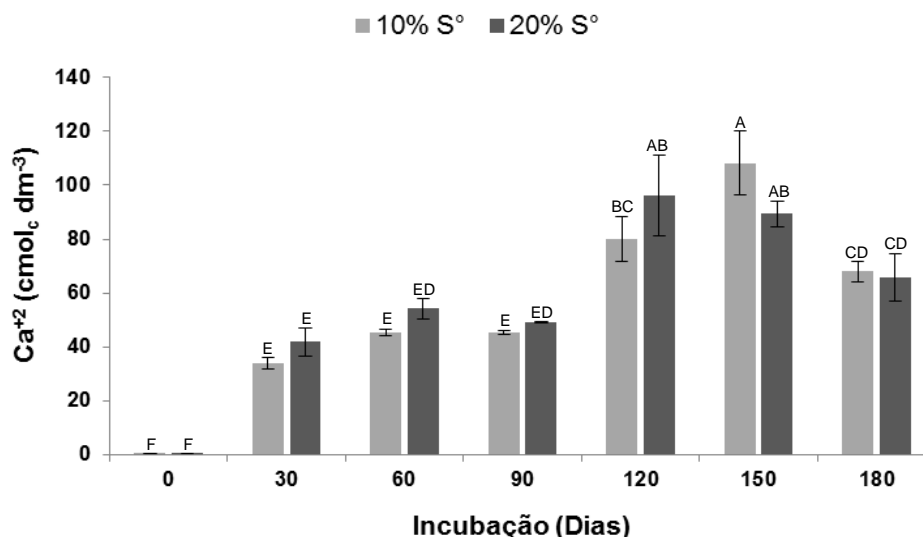


## Ca e Mg trocáveis

O biofertilizante de rocha fosfatada (BP) além de promover aumento no P disponível, aumentou a concentração de cálcio, demonstrando maior potencial da rocha fosfatada (RP) em mistura com enxofre (S) inoculado com a bactéria *Acidithiobacillus thiooxidans* (A) como constatado na Figura 5.

Os valores de  $\text{Ca}^{2+}$  aumentaram no decorrer do tempo, chegando ao valor máximo ( $108,29 \text{ cmol}_c \text{ dm}^{-3}$ ), com 150 dias no tratamento com 10% de enxofre, apresentando diferença significativa para todos os demais tempos com 10% de S, inclusive o tempo 0 ( $0,20 \text{ cmol}_c \text{ dm}^{-3}$ ) e para 180 dias ( $68,03 \text{ cmol}_c \text{ dm}^{-3}$ ) que apresentou um decréscimo no final do experimento. Por outro lado, com 20% de S nos tempos 150 dias ( $89,43 \text{ cmol}_c \text{ dm}^{-3}$ ) e 120 dias ( $96,28 \text{ cmol}_c \text{ dm}^{-3}$ ), não houve diferença significativa para 150 dias com 10% de enxofre.

Andrade (2007), ao avaliar os efeitos da aplicação de biofertilizante de rocha fosfatada e rocha potássica na produtividade e absorção de nutrientes pela cultura da uva de mesa (cv. Itália), comparando com fertilizantes minerais solúveis e com rocha moída, também verificou atuação da bactéria *Acidithiobacillus* na disponibilização do cálcio contido na rocha fosfatada.

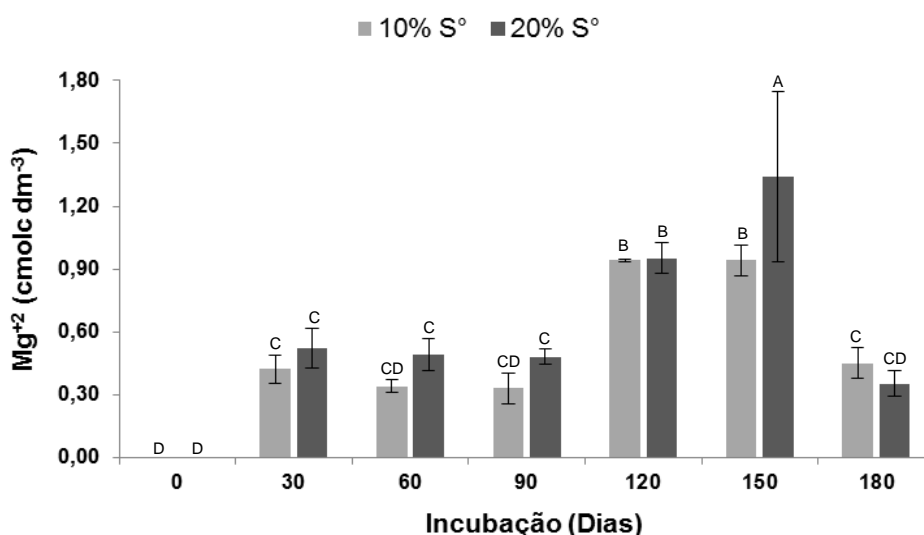


**Figura 5** - Cálcio trocável na rocha fosfatada (RP) com enxofre (S10% e S20%) inoculado com *Acidithiobacillus thiooxidans* (FG01), após 180 dias de incubação, no tempo 0 para a RP sem *A. thiooxidans*; e nos tempos 30; 60; 90; 120; 150 e 180 dias para o tratamento RP+S inoculado com *A. thiooxidans*. \*Médias com a mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. C. V. = 11,39.

Stamford et al. (2009) também avaliaram os efeitos de biofertilizante produzido com rocha fosfatada e potássica em mistura com enxofre inoculado com *Acidithiobacillus*, comparando com fertilizantes NPK solúveis, em atributos químicos de um Argissolo do Vale do São Francisco, após cultivo com melão, e obtiveram resultados semelhantes ao do presente trabalho. Houve efeito positivo sobre o cálcio trocável que aumentou consideravelmente comparando com o solo analisado antes do experimento.

Resultados similares foram observados e relatados por Stamford et al. (2014), que verificaram efeito significativo no cálcio trocável no biofertilizante NPKB e no protetor NPKP, aplicados em duas profundidades (0-20 e 20-40 cm) em um solo do Vale do São Francisco cultivado com uva (*Vitis labrusca*).

Com referência ao magnésio trocável na RP (Figura 6) verificou-se diferença significativa no tempo 150 dias com 20% de enxofre ( $1,34 \text{ cmol}_c \text{ dm}^{-3}$ ) em comparação a todos os demais tempos analisados usando a mesma concentração. Também houve diferença estatisticamente significativa nos tratamentos com 10% e 20% de enxofre inoculado com *A. thiooxidans*, comparando com o tratamento RF no tempo 0.



**Figura 6** – Magnésio trocável na rocha fosfatada (RP) com enxofre (S10% e S20%) inoculado com *Acidithiobacillus thiooxidans* (FG01), após 180 dias de incubação; no tempo 0 para a RP sem *A. thiooxidans*; e nos tempos 30; 60; 90; 120; 150 e 180 dias para o tratamento RP+S inoculado com *A. thiooxidans*. \*Médias com a mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. C. V. = 22,09.

Apesar da RP não ser uma fonte principal de magnésio trocável, já que a mesma é fonte direta de fósforo e indireta de cálcio, o recente estudo demonstrou o quanto é importante à utilização da bactéria acidificante na disponibilização dos elementos nessas rochas. O magnésio trocável mesmo em uma menor quantidade no material de origem, contudo pode ser liberado, tornando disponível determinadas quantidades do elemento.

Stamford et al. (2014) verificaram efeito significativo na disponibilidade de  $Mg^{+2}$  ao aplicar biofertilizante de rocha fosfatada e potássica, acrescido de matéria orgânica e bactéria diazotrófica de vida livre (NPKB) e NPKP (NPKB acrescido do fungo *C. elegans*) em duas profundidades (0-20 e 20-40 cm), em um solo do Vale do São Francisco cultivado com uva (*Vitis labrusca*).

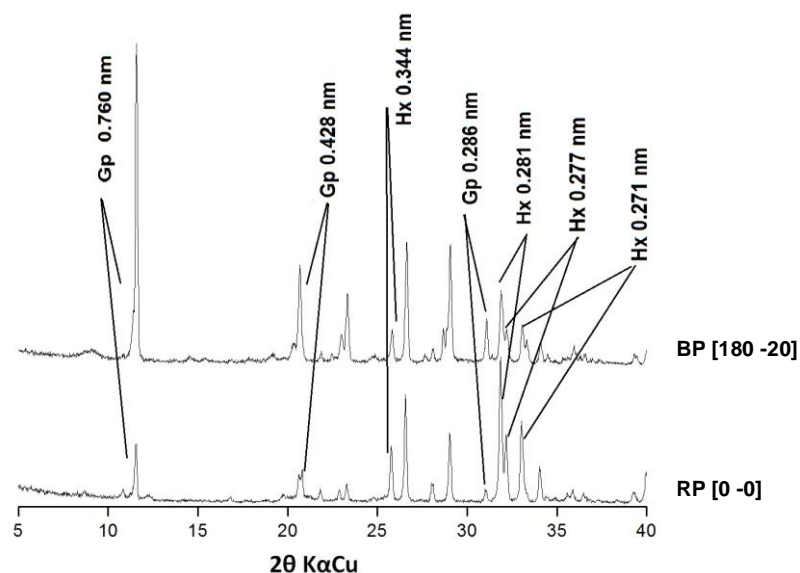
### **Análise mineralógica**

Foram realizados os difratogramas de raios X de todas as amostras, desde o tempo 0 (rocha fosfatada) até os 180 dias (biofertilizante de rocha fosfatada), no entanto, são apresentados neste trabalho apenas dados referentes às amostras no tempo 0 e 180. Pois, foram os tempos que apresentaram uma maior disparidade.

Nos difratogramas de raios X da rocha fosfatada (RP), tempo 0, e do biofertilizante de rocha fosfatada (BP) aos 180 dias o principal mineral identificado foi a hidroxiapatita (Figura 7).

O BP é composto de pó de rocha fosfatada (RP) acrescido de enxofre elementar ( $S^0$ ) e inoculado com a bactéria acidificante (*Acidithiobacillus thiooxidans*), no tempo 180 dias com 20% de enxofre.

A apatita é um dos minerais não silicatados mais abundantes na crosta terrestre e um fosfato de grande importância, apresentando como fórmula geral  $Ca_5(PO_4)_3(OH,F,Cl)$ , com substituição (solução sólida) dos ânions  $F^-$ ,  $Cl^-$  e  $OH^-$ , conforme o predomínio do ânion acompanhante, ocorrem a fluorapatita ( $Ca_{10}(PO_4)_6F_2$ ), a cloroapatita ( $Ca_{10}(PO_4)_6Cl_2$ ), a hidroxiapatita ( $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ ), dentre outros (TOLEDO & PEREIRA, 2001; MELO et al., 2009).



**Figura 7-** Difratoograma da rocha fosfatada (RP) no tempo 0, sem enxofre (S) e sem *Acidithiobacillus thiooxidans* (FG01) e do biofertilizante da RP (BP), com enxofre (S20%) inoculado com *A. thiooxidans*, após 180 dias de incubação. Gp= gipsita; Hx= hidroxiapatita.

No presente estudo a hidroxiapatita foi identificada nos picos de difração 0,344; 0,281; 0,277 e 0,271 nm, os quais diminuem expressivamente suas intensidades após o período de 180 dias de tratamento, indicando uma forte alteração do mineral neste período, disponibilizando o fósforo para a solução ou para o complexo de troca do meio.

A hidroxiapatita é um fosfato de cálcio, que além da liberação de fósforo, há uma expressiva liberação de cálcio, o qual irá para complexo de troca, formando sulfato de cálcio (gipsita), sendo este mineral identificado pelos picos de difração em 0,760; 0,428 e 0,286 nm, os quais aumentaram significativamente após os 180 dias do tratamento.

Possivelmente, a formação da gipsita ( $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) no presente estudo ocorreu devido à presença do enxofre utilizado no experimento, e um dos fatores que afetam a solubilidade da hidroxiapatita é o pH do meio, que de acordo com Santos (2013) geralmente em soluções ácidas é solúvel, em soluções alcalinas é insolúvel e em água é pouco solúvel. Klein et al. (1990) analisando amostras de fosfatos de cálcio, entre elas a hidroxiapatita, obtiveram resultados que mostraram que a solubilidade diminuía com o aumento do pH do meio.

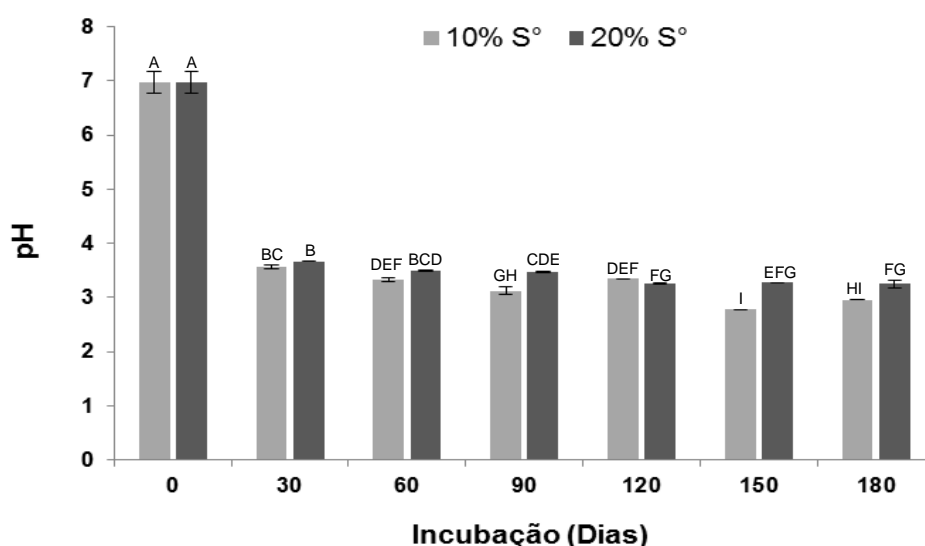
## Experimento II- Biofertilizante Potássico

### Análises Químicas

#### Análise de pH

Os valores de pH da rocha potássica (RK) a cada trinta dias de incubação durante 180 dias sob inoculação da bactéria *Acidithiobacillus thiooxidans* (A) estirpe FG01 são apresentados na Figura 8.

Houve diferença estatística significativa ao comparar o pH do tempo 0 (apenas RK) com o dos demais tempos, compostos por RK, enxofre elementar - S<sup>o</sup> - (S) e bactéria acidificante (RP+S+A), que dá origem ao biofertilizante potássico (BK). O BK revelou um pH que diminuiu ao longo do tempo, variando de 3,56 a 2,78 (tempo 30 e 150, respectivamente) com 10% de enxofre, com exceção do tempo 180 (pH= 2,95), e um pH de 3,67 (tempo 30) a 3,25 (tempo 180) com 20% de enxofre. Desta maneira, o BK mostrou pH inferior comparado com o tempo 0 (pH=6,96), o que comprova o efeito do ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) produzido metabolicamente pelo *Acidithiobacillus* na presença do enxofre.



**Figura 8** – Efeito no pH (H<sub>2</sub>O – 1,0 :2,5) na rocha potássica (RK) com enxofre (S10% e S20%) inoculado com *Acidithiobacillus thiooxidans* (FG01), após 180 dias de incubação, no tempo 0 para a RK sem *A. thiooxidans*; e nos tempos 30; 60; 90; 120; 150 e 180 dias para o tratamento RK+S inoculado com *A. thiooxidans*. \*Médias com a mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. C. V. = 1,81.

O biofertilizante potássico com 10% de enxofre proporcionou redução de pH em torno de 49% com 30 dias de inoculação e de 60% durante 150 dias de incubação. Com 20% de enxofre houve redução de 47% no pH com o tempo 30 e 53% aos 180 dias. Mesmo com esses valores, aos 30 dias as concentrações de 10 e 20% de enxofre não apresentaram diferença significativa entre si, diferentemente dos tempos 150 e 180.

O efeito de biofertilizante de rochas fosfatadas (BP) e potássicas (BK) com adição de enxofre elementar inoculado com *Acidithiobacillus*, foi observado no pH de um solo do Vale do São Francisco (STAMFORD et al., 2009). Os autores observaram valores de pH mais baixos com a aplicação de BK na dose BK240 (240 kg ha<sup>-1</sup>).

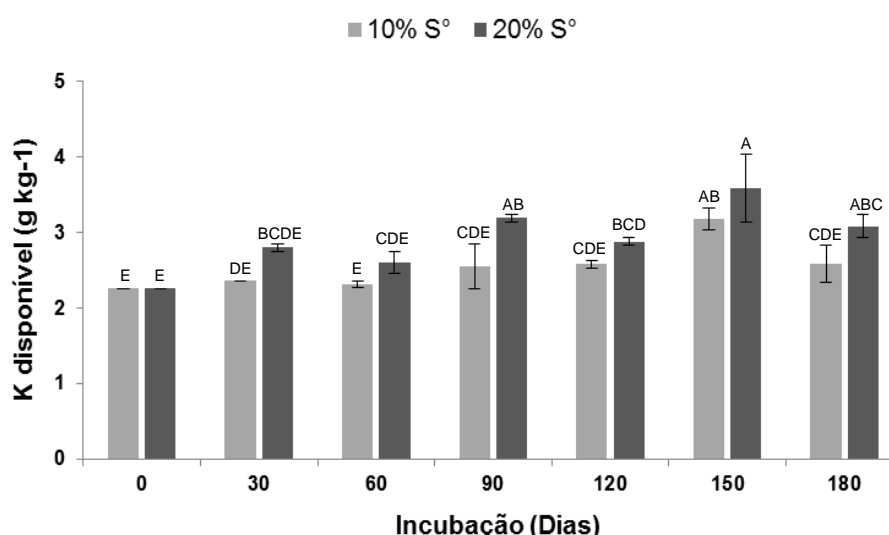
Villar & Garcia (2006), relatam que a presença da espécie *Acidithiobacillus thiooxidans* (FG01) é o principal fator responsável para o processo de acidificação do pH em lodos, observando maiores reduções, e com valores inferiores a pH 4,0.

### **K disponível**

O biofertilizante de rocha potássica (BK) resultou em acréscimo de K disponível mostrando efeito significativo no ensaio aos 150 dias com 10 e 20% de enxofre em comparação com a rocha potássica (RK), tempo zero (Figura 9).

As doses de 10 e 20% S<sup>0</sup>, embora não tenham apresentando diferença significativa entre si apontaram aumentos de 41 e 58%, respectivamente no K disponível quando comparado com o tempo zero. Estes resultados evidenciam o potencial da rocha potássica (RK) em mistura com enxofre (S) em inoculação com a bactéria acidificante no incremento na liberação de K disponível.

Os valores encontrados para o teor de potássio disponível podem ser explicados pela solubilização do potássio contido no mineral (biotita) utilizado para produzir o biofertilizante de rocha potássica. Este efeito é provavelmente devido ao H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> produzido metabolicamente pela bactéria *A. thiooxidans* na presença de enxofre elementar.



**Figura 9** – Potássio disponível na rocha potássica (RK) com enxofre (S10% e S20%) inoculado com *Acidithiobacillus thiooxidans* (FG01), após 180 dias de incubação, no tempo 0 para a RK sem *A. thiooxidans*; e nos tempos 30; 60; 90; 120; 150 e 180 dias para o tratamento RK+S inoculado com *A. thiooxidans*. \*Médias com a mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. C. V. = 6,57.

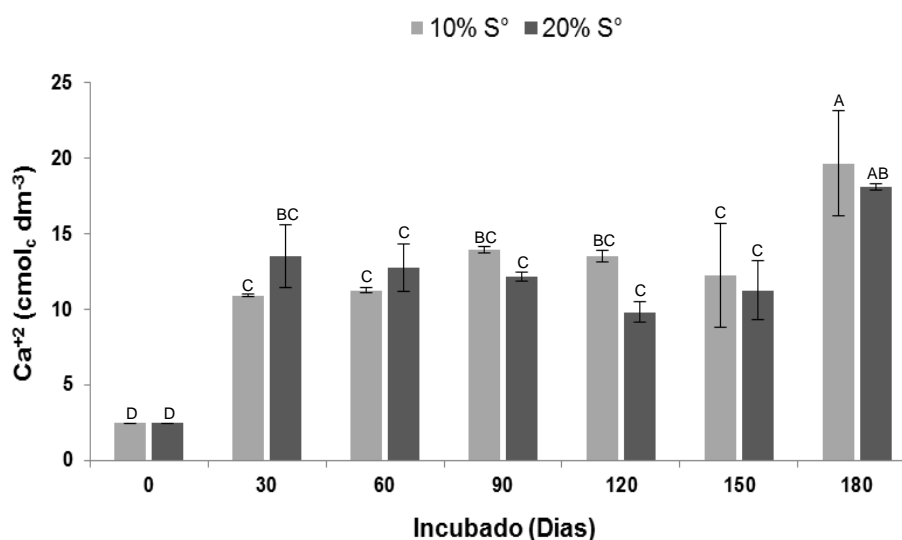
Stamford et al. (2006), constataram aumento da disponibilidade de K no solo quando foi aplicado biofertilizante de rocha potássica mais S elementar inoculado com *Acidithiobacillus*.

Berger et al. (2013), verificaram que diferenças significativas foram observadas no K disponível comparando os tratamentos com biofertilizante de rochas e o controle. Contudo, o K disponível avaliado no solo foi mais elevado após aplicação do tratamento com biofertilizante – NPKB, com Quitosana de Crustáceo ( $6 \text{ mg mL}^{-1}$ ) e com Quitosana de Fungo ( $2 \text{ mg mL}^{-1}$ ), e também no tratamento com a adição de *C. elegans*.

Resultados equivalentes foram observados por Stamford et al. (2016), que verificaram efeito positivo quando aplicado biofertilizante (BPK) em cana de açúcar. Com biofertilizante (BPK) foram obtidos os melhores níveis de P e K disponível no solo. O biofertilizante (BPK) e o fertilizante solúvel (FNPK) sem húmus de minhoca mostraram efeito residual superior quando comparados com o tratamento com aplicação de rocha fosfatada (RP) e de rocha potássica (RK).

## Ca e Mg trocáveis

O teor de cálcio trocável no BK (Figura 10) não apresentou diferença significativa entre os percentuais de enxofre (10 e 20%) ao longo do tempo. Entretanto, houve efeito significativo com 10% de enxofre aos 180 dias, em comparação com o tempo 0 (RK), que mostraram 19,66  $\text{cmol}_c \text{ dm}^{-3}$  e 2,45  $\text{cmol}_c \text{ dm}^{-3}$ , respectivamente.



**Figura 10** – Cálcio trocável na rocha potássica (RK) com enxofre (S10% e S20%) inoculado com *Acidithiobacillus thiooxidans* (FG01), após 180 dias de incubação, no tempo 0 para a RK sem *A. thiooxidans*; e nos tempos 30; 60; 90; 120; 150 e 180 dias para o tratamento RK+S inoculado com *A. thiooxidans*. \*Médias com a mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. C. V. = 13,25.

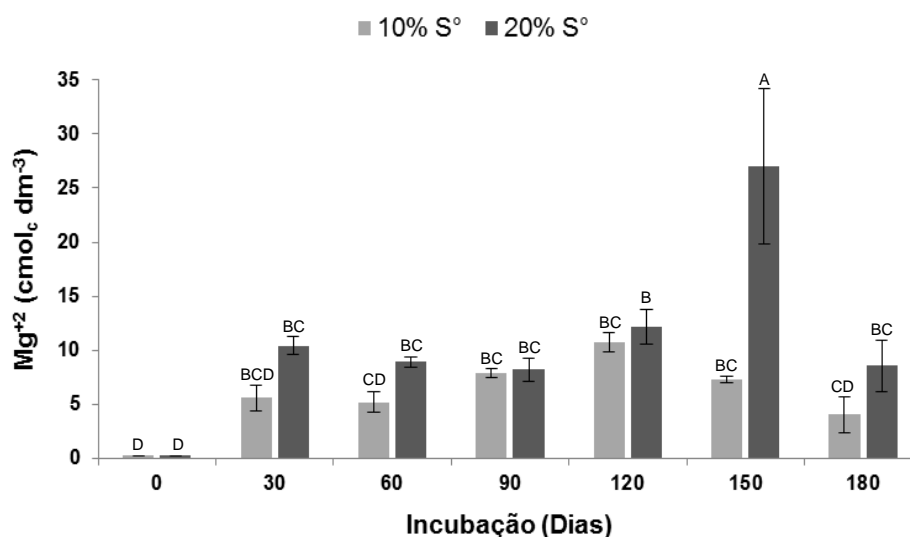
O BK com 20% de enxofre mostrou variações ao longo do tempo, mas sem diferença significativa entre os tempos, com exceção para o tempo 0, que representa apenas a rocha potássica (RK) sem inoculação. Assim, o material que não recebeu a inoculação da bactéria *A. thiooxidans* nem adição do enxofre não favoreceu a liberação dos nutrientes.

Oliveira et al., (2014), relataram o efeito da inoculação com *A. thiooxidans* sobre o  $\text{Ca}^{+2}$  trocável que foi evidenciado quando comparado com os valores observados no solo antes da realização do experimento, particularmente quando aplicado o biofertilizante (NPKP) nas doses mais elevadas, em função da solubilização de  $\text{Ca}^{+2}$  contido na rocha fosfatada.

Para o teor de magnésio trocável (Figura 11) verificou-se efeito significativo do BK, em particular para o tempo 150 com 20% de enxofre, que



apresentou diferença significativa comparado com a dose com 10% de S. Também houve diferença significativa em relação aos demais tempos, inclusive para o tempo 0, que representa a rocha potássica (BK) sem enxofre e sem inoculação.



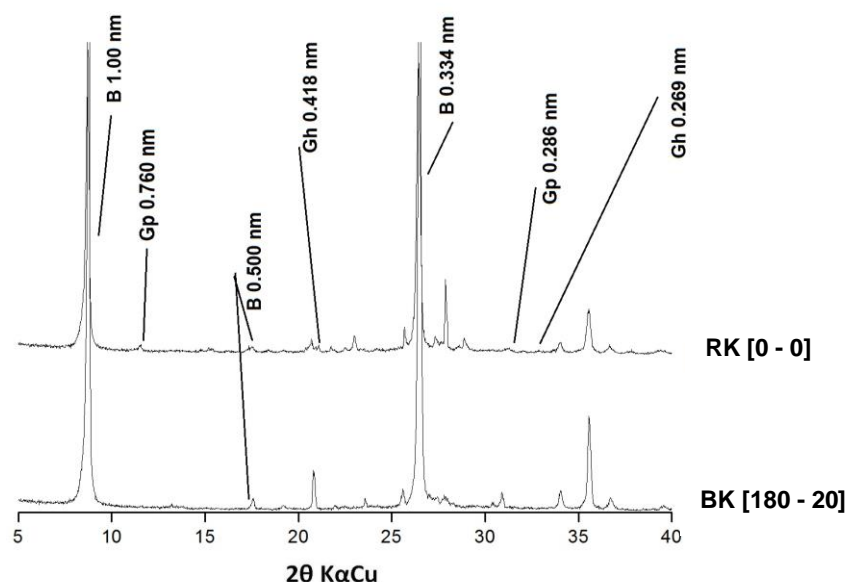
**Figura 11** – Magnésio trocável na rocha potássica (RK) com enxofre (S10% e S20%) inoculado com *Acidithiobacillus thiooxidans* (FG01), após 180 dias de incubação, no tempo 0 para a RK sem *A. thiooxidans*; e nos tempos 30; 60; 90; 120; 150 e 180 dias para o tratamento RK+S inoculado com *A. thiooxidans*. \*Médias com a mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. C. V. = 25,67.

Em pesquisa conduzida por Stamford et al. (2009) foi observado efeito positivo e significativo para magnésio trocável no solo (Argissolo do Vale do São Francisco), quando aplicados biofertilizantes com P e K. Os melhores resultados foram obtidos com a aplicação do biofertilizante potássico, especialmente com aplicação das doses mais elevadas.

### Análise mineralógica

A composição da assembléia mineralógica da rocha potássica (RK), tempo 0, os minerais identificados foram: biotita, gipsita, goethita (Figura 12).

O principal mineral, a biotita, foi identificado através dos picos de 1,00; 0,50 e 0,334 nm; sendo a intensidade do pico em 0,50 nm menor que a metade da intensidade do pico de difração em 1,00 nm, o que caracteriza uma mica trioctaedral (biotita)



**Figura 12** – Difratoograma da rocha potássica (RK) no tempo 0, sem enxofre (S) e sem *Acidithiobacillus thiooxidans* (FG01) e do biofertilizante da RK (BK), com enxofre (S20%) inoculado com *A. thiooxidans*, após 180 dias de incubação. B= biotita; Gp= gipsita; Gh=goethita.

Em relação à análise mineralógica do biofertilizante potássico (BK), que é composto de pó de rocha potássica (RK) acrescido de enxofre elementar (S<sup>0</sup>) e inoculado com a bactéria acidificante (*Acidithiobacillus thiooxidans*), no tempo 180 dias com 20% de enxofre, também foram identificados os minerais: biotita, gipsita, goethita (Figura 12).

A biotita no BK foi identificada através dos picos das regiões 1,00; 0,50 e 0,334 nm e a identificação da goethita foram realizadas pelos picos de 0,418 e 0,269 nm. A formação deste mineral nesta condição é um dos produtos da alteração da biotita, que ao liberar o Fe<sup>2+</sup> de sua estrutura, o mesmo é oxidado formando a goethita.

A presença de gipsita (sulfato de cálcio), identificada pelos picos de difração em 0,760 e 0,286 nm, certamente é resultante do produto da reação do sulfato (liberado da oxidação do enxofre) e do cálcio em solução.

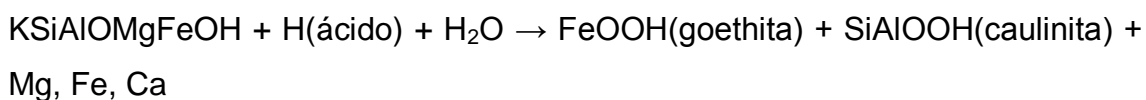
É notada que a amostra após 180 dias de experimento ainda apresenta a biotita bem cristalizada e provavelmente em quantidade elevada, visto que o pico 1,00 e o pico 0,334 nm característico da biotita na RK, também foram observados, no BK (aos 180 dias), em um nível muito elevado, demonstrando que há uma alteração desse mineral, embora muito pouco.

Aos 180 dias no BK, o surgimento de goethita (FeO(OH)), pode gerar óxidos de ferro, liberando Mg, Fe, Ca, entre outros elementos.

A biotita, originária das rochas ígneas, é um mineral do grupo das micas que são os minerais com potássio mais comuns nos solos (KAMPF et al., 2009). O filossilicato é a estrutura característica das micas, no qual as camadas do cristal apresentam estrutura em lâminas (MELO et al., 2009).

Chamadas de silicatos laminares 2:1, a biotita é um silicato ferromagnésico de potássio:  $\text{KSi}_3\text{Al}((\text{Mg}, \text{Fe})_3)_{10}(\text{OH})_2$ , apresentando coloração preta (chamada de mica preta), no qual a lâmina mediana (octaédrica) apresenta como íon central  $\text{Mg}^{2+}$  ou  $\text{Fe}^{2+}$  em todas as posições possíveis para o equilíbrio da estrutura.

Provavelmente, o K liberado pela biotita no presente estudo é o potássio presente nas entrecamadas que formam o cristal. E o K é liberado a partir da reação de acidólise:



Reação que ocorre quando a solução do solo é suficientemente ácida com  $\text{pH} < 5,5$ . E como no biofertilizante de rocha potássica as condições são de acidez, devido à reação metabólica da bactéria oxidante do enxofre (*A. thiooxidans*) ao produzirem ácido sulfúrico biológico, através da reação  $\text{S}^0 + \text{H}_2\text{O} + 1,5 \text{O}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{SO}_4$ , promove a solubilização dos elementos contidos nos minerais (STAMFORD, 2011). O pH ao longo dos 180 dias, ficou em uma faixa entre 3,0 e 3,5, ou seja, em condições de acidez, e embora a reação seja relativamente ácida, ainda há muita biotita a ser alterada.

A presença de goethita aos 180 dias, possivelmente se deve, também, ao fato da biotita ser uma mica trioctaedral, ou seja, os centros dos octaédricos são ocupados por cátions divalentes e as três posições possíveis da lâmina octaedral são ocupadas com  $\text{Mg}^{2+}$  ou  $\text{Fe}^{2+}$ .

No processo de intemperismo das micas o  $\text{K}^+$  é liberado, sendo esta liberação maior nas micas trioctaedrais (biotita) e menor nas dioctaedrais (muscovita), visto que, o comprimento da ligação K-O é maior fazendo com que esta ligação das micas trioctaedrais seja mais fraca (KAMPF et al., 2009).

No entanto a capacidade de troca de cátions (CTC) não dá para aumentar muito nesta etapa, por que o que está sendo formado é a goethita, na qual dentre outras, a formação da goethita é favorecida pelas condições de pH ácido (tendo este mineral carga dependente de pH e que é positiva em pH ácido, devido ao ponto de carga zero (PCZ) que neste mineral é 8,5 ).

Conforme dito anteriormente, no BK o pico 1,00 e o pico 0,334 nm representam uma intensidade elevada de biotita, deixando claro que há um enorme potencial de constante liberação de potássio por períodos bem superior a 180 dias. Visto que, o principal mineral (biotita) está sendo alterado lentamente, fato bastante positivo, pois se ocorresse uma acidólise total e o K da biotita fossem totalmente disponibilizados, poderia ser perder grande parte do nutriente por lixiviação, em época chuvosa, sem que as plantas pudessem absorver.

Como a biotita é fonte de K, só tem elemento disponível se este mineral for alterado. Caso contrário, o mineral sem ser alterado, não tem como as plantas absorverem, pois as mesmas não conseguem deslocar o elemento K que se encontra nas entrecamadas do cristal.

Sendo assim, o BK é um adubo com elevado potencial, uma vez que além de disponibilizar o elemento, havendo condições de acidez ele poderá apresentar um efeito residual em longo prazo, desde que haja mineral a ser liberado e condições da bactéria acidificante continuar atuando.

Além disto, o biofertilizante em questão pode ser utilizado no lugar dos fertilizantes minerais solúveis, e também ser produzido, por pequenos e médios produtores, criando oportunidades para os agricultores de baixa renda, que em sua maioria não tem condições utilizar o fertilizante comercial que é de elevado custo.

De acordo com Stamford et al. (2008a; 2014), para uma agricultura moderna e sustentável torna-se indispensável o uso de produtos alternativos visando aumentar a produção de alimentos, a fertilidade do solo e a conservação da biodiversidade, reduzindo os danos com o meio ambiente.

## CONCLUSÕES

- Em ambas as rochas (fosfatada e potássica) o ácido sulfúrico produzido pela bactéria atuou, principalmente, na disponibilidade de potássio e de fósforo bem como na redução do pH dos biofertilizantes (fosfatado e potássico) após os 180 dias de incubação;
- Os biofertilizantes fosfatado e potássico além de serem fontes diretas de fósforo e potássio, indiretamente aumentam a disponibilidade de Ca e Mg, respectivamente;
- Para um melhor custo benefício recomenda-se o uso de 10% de enxofre, visto que, não foi observada diferença significativa entre as concentrações de 10 e 20%, ao longo dos tempos;
- O biofertilizante potássico é um fertilizante com elevado potencial, uma vez que além de disponibilizar o elemento, havendo condições de acidez ele poderá apresentar um efeito residual ao longo do tempo, desde que haja mineral a ser liberado e condições da bactéria acidificante atuar;
- Os biofertilizantes em questão podem ser utilizados no lugar dos fertilizantes minerais, e também, por pequenos e médios produtores, criando oportunidades para os agricultores de baixa renda.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, I. P. **Biofertilizante de rochas fosfatadas com enxofre inoculado com *Acidithiobacillus* na adubação da uva (*Vitis vinifera* L.) em planossolo do Vale do São Francisco**. 2007, 96f. Tese (Doutorado em Ciências do Solo). Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2007.

BARBOSA FILHO, M. P.; FAGERIA, N. K.; SANTOS, D. F.; COUTO, P. A. **Rochas brasileiras como fontes alternativas de potássio para a cultura do**

**arroz de terras Altas.** (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Arroz e Feijão), Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 24 p. 2007.

BERGER, L. R.; STAMFORD, N. P.; SANTOS, C. E. R. S.; FREITAS, A. D. S.; FRANCO, L. O.; STAMFORD, T. C. M. Plant and soil characteristics affected by biofertilizers from rocks and organic matter inoculated with diazotrophic bacteria and fungi that produce chitosan. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, v. 13, p. 592-603, 2013.

D'ANDRÉA, P. A. **ROCHAGEM NO BRASIL: REGULAMENTAÇÃO.** 2003. Disponível em: <<http://www.uoguelph.ca/rocks/news/abstracts/abs06.htm>>. Acesso em: 30 jan. 2016.

DUARTE, I. N.; SOUSA, R. T. X.; KORNDORFER, G. H.; FONTOURA, P. R.; SOARES, R. A. B. Biotita: fonte de potássio para agricultura. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 28, Supplement 1, p. 98-103, 2012.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (Embrapa). **Manual de Análises Químicas de Solo, Plantas e Fertilizantes.** 2ª ed., Brasília, DF: Embrapa – Informações Tecnológicas, 2009, 627p.

EPSTEIN, E.; BLOOM, A. J. **Mineral nutrition of plants:** principles and perspectives. Sunderland: Sinauer Associates, 2004. 400 p.

FAQUIN, V. **Nutrição Mineral de Plantas.** Lavras: UFLA – FAEPE, 2005. 183p.

GARCIA JÚNIOR, O. O enxofre e suas transformações microbianas. *In*: CARDOSO, E. J. B.; TSAI, S. M. AND NEVES, M. C. P. (eds). **Microbiologia do solo.** (Sociedade Brasileira de Ciência do Solo: Campinas), p. 319-329, 1992.

GRANT, C.A.; PLATEN, D.N.; TOMAZIEWICZ, D.J.; SHEPPARD, S.C. A importância do fósforo no desenvolvimento inicial da planta. **Informações Agronômicas**, Piracicaba, n.95, 2001.

INSTITUTO BRASILEIRO DE MINERAÇÃO. Fosfato, Potássio, Fertilizantes. **Informações e Análises da Economia Mineral Brasileira.** 6ª edição, 2011.

KÄMPF, N.; CURI, N. & MARQUES, J. J. Óxidos de alumínio, silício, manganês e titânio. In: MELO, V.F. & ALLEONI, L.R.F., eds. **Química e mineralogia do solo**. Viçosa, MG, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, v.1, p. 573-610, 2009.

LIMA, R. C. M.; STAMFORD, N. P.; SANTOS, C. E. R. S.; DIAS, S. H. L. Rendimento da alface e atributos químicos de um Latossolo em função da aplicação de biofertilizantes de rochas com fósforo e potássio. **Brazilian Journal Horticulture**, v. 25, p. 224-229, 2007a.

MALAVOLTA, E. **Manual de nutrição mineral de plantas**. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, 2006. 638p.

MELAMED, R.; GASPAR, J. C.; MIEKELEY, N. Pó de rocha como Fertilizante Alternativo para Sistemas de Produção Sustentáveis em Solos Tropicais. In: LAPIDO-LOUREIRO, F. E. V.; MELAMED, R.; NETO, J. F. (Ed.). **Fertilizantes: agroindústria e sustentabilidade**. Rio de Janeiro, RJ: CETEM, p. 385-395, 2009.

MELO, V. F.; CASTILHOS, R. M. V. & PINTO, L. F. S. Reserva Mineral do Solo. In: MELO, V.F. & ALLEONI, L.R.F., eds. **Química e mineralogia do solo**. Viçosa, MG, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, v.1, p. 252-321, 2009.

NASCIMENTO, M.; LAPIDO-LOUREIRO, F. E. **Fertilizantes e sustentabilidade: o potássio na agricultura brasileira, fontes rotas e alternativas**. (série Estudo e Documentos, 66). Rio de Janeiro: CETEM/MCT, 66 p., 2004.

OLIVEIRA, W. S.; STAMFORD, N. P.; SILVA, E. V. N.; SANTOS, C. E. R. S.; FREITAS, A. D. S.; ARNAUD, T. M. S.; SARMENTO, B. F. Biofertilizer produced by interactive microbial processes affects melon yield and nutrients availability in a Brazilian semiarid soil. **Australian Journal of Crop Science**, v. 8, p. 1124-1131, 2014.

RAIJ, B. van. **Fertilidade do solo e adubação**. Piracicaba: Agronômica Ceres/Potafos, 1991. 343 p.

ROBERTS, T. Reservas de minerais potássios e a produção de fertilizantes potássicos no mundo. **Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato, Piracicaba. (Informações Agrônomicas)**, v. 107, p. 2-3, 2004.

SAS Institute. The SAS 9.2 software. System for Windows. CD-ROM for Windows. 2011.

SILVERMAN, M. P.; LUNDGREN, D. G. Studies on the chemoautotrophic iron bacterium *Ferrobacillus ferrooxidans* I. An improved medium and a harvesting procedure for securing high cell yields. **Journal Bacteriology**, n.77, p.642-647, 1959.

SOARES, W. V.; LOBATO, E.; SOUSA, D. M. G.; REIN, T. A. Avaliação do fosfato natural de Gafsa para recuperação de pastagem degradada em Latossolo Vermelho-Escuro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.35, p. 819-825, 2000.

SOUSA, A. E. & FONSECA, D. S. Fosfato. *In*: Rodrigues, A. F. S. (coord) **Economia Mineral do Brasil**. Departamento Nacional de Produção Mineral, Brasília, p. 546-458, 2009.

STAMFORD, N. P.; SIMÕES NETO, D. E.; FREITAS, A. D. S.; OLIVEIRA, E. C. A.; OLIVEIRA, W. S.; CRUZ, L. Rock biofertilizer and earthworm compost on sugarcane performance and soil attributes in two consecutive years. **Scientia Agricola Journal**, v.73, p.29-33, 2016.

STAMFORD, N. P.; SILVA JÚNIOR, S.; SANTOS, C. E. R. S.; FREITAS, A. D. S.; SANTOS, C. M. A., ARNAUD, T. M. S.; SOARES, H. R. Yield of grape (*Vitis labrusca* cv. Isabel) and soil nutrients availability affected by biofertilizer with diazotrophic bacteria and fungi chitosan. **Australian Journal of Crop Science**, v. 8, p. 301-306, 2014.

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



STAMFORD, N. P.; SANTOS, C. E. R. S.; SILVA JUNIOR, S.; LIRA JUNIOR, M. A.; FIGUEIREDO, M. V. B. 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, 2008a.

STAMFORD, N. P.; LIMA, R. A.; LIRA JUNIOR, M. A.; SANTOS, C. R. S. Effectiveness of phosphate and potash rocks with *Acidithiobacillus* on sugarcane yield and their effects on soil chemical attributes. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.24, p. 2061–2066, 2008b.

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

STAMFORD, N. P.; LIMA, R. A.; SANTOS, C. E. R. S.; DIAS, S. H. L. Rock biofertilizers with *Acidithiobacillus* on sugar cane yield and nutrient uptake in a Brazilian soil. **Geomicrobiology Journal**, v. 23, p. 261-265, 2006.

STAMFORD, N. P.; SANTOS, C. E. R. S.; JÚNIOR, W. P. S.; DIAS, S. L. Biofertilizantes de rocha fosfatada com *acidithiobacillus* como adubação alternativa de caupi em solo com baixo p disponível. **Revista Analytica**, nº 9, p.48-53, 2004.

STAMFORD, N. P.; FREITAS, A. D. S.; FERRAZ, D. S.; MONTENEGRO, A. and SANTOS, C. E. R. S. Nitrogen fixation and growth of cowpea (*Vigna unguiculata*) and yam bean (*Pachyrhizus erosus*) in a sodic soil as affected by gypsum and Sulphur inoculated with *Thiobacillus* and rhizobial inoculation. **Tropical Grasslands**, v. 37, p. 11-19, 2003.

TAIZ, L. & ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 4 ed. Artmed. Porto Alegre – RS, 2009. 848 p.

TOLEDO, M. C. M. de & PEREIRA, V. P. A variabilidade de composição da apatita associada a carbonatitos. **Revista do Instituto Geológico**, São Paulo, v. 22, p. 27-64, 2001

van STRAATEN, P. **Rocks for crops – Agrominerals of sub - Saharan Africa**. (ICRAF: International Center for Research in Agroforestry). Nairobi, Kenya. University of Guelph, Ontario, 2002. 338 p.

VILLAR, L. D. & GARCIA, O. Effect of anaerobic digestion and initial pH on metal bioleaching from sewage sludge. **J. Environ Sci Health A Tox. Hazard Subst. Environ. Eng.**, v. 41, p. 211-22, 2006.

## **CAPÍTULO II**

### **ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA QUITOSANA FÚNGICA E DE NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA NO CONTROLE DO FUNGO *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense***

# ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA QUITOSANA FÚNGICA E DE NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA NO CONTROLE DO FUNGO

*Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*

## RESUMO

Na fruticultura, a cultura da banana (*Musa* spp.) é uma importante fonte de alimento e de renda para a população, uma vez que o seu cultivo proporciona a geração de empregos. No entanto, o cultivo da bananeira é afetado pelo fungo, *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* (FOC) causador do mal-do-Panamá, que é uma doença endêmica distribuída por todas as regiões produtoras do mundo, e que provoca perdas elevadas no campo, tanto na produção quanto na qualidade dos frutos. Na agricultura, a quitosana vem sendo aplicada no revestimento de sementes; como agente antibacteriano; antifúngico; na resistência da planta a doenças e a insetos. Deste modo os objetivos deste trabalho foram caracterizar a quitosana fúngica, produzir e caracterizar as nanopartículas de quitosana (nanoquitosana) fúngica, assim como verificar a atividade antifúngica da quitosana e da nanoquitosana, *in vitro*, em relação ao fungo patógeno FOC, causador do mal-do-Panamá na cultura da banana. Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Biotecnologia Ambiental da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE). A quitosana fúngica utilizada no presente estudo foi cedida pela KitoZyme®, caracterizada como de baixo peso molecular e com grau de desacetilação de 86%. A atividade antimicrobiana da quitosana e da nanoquitosana foi avaliada contra o FOC e a Concentração Inibitória Mínima (CIM), para ambas, foi de 1,0 mg mL<sup>-1</sup> e a Concentração Fungicida Mínima (CFM) foi de 1,0 mg mL<sup>-1</sup> para a quitosana. A concentração de 0,5 mg mL<sup>-1</sup> (CIM/2) de quitosana reduziu em 27% o crescimento radial (CR) do patógeno em comparação ao controle (meio batata-dextrose-ágar (BDA)), além de alterar a macromorfologia do FOC. Com esta mesma concentração, 0,5 mg mL<sup>-1</sup> de quitosana, foi obtido 100% de inibição da germinação dos esporos, reduzindo a elongação do tubo germinativo do FOC. A nanoquitosana, de um modo geral, não apresentou efeito contra o patógeno em estudo, com exceção para o experimento de esporulação, que com 0,5 mg mL<sup>-1</sup> apresentou o menor número de conídios comparado ao controle, diferentemente da quitosana. Desse modo, os resultados do presente estudo demonstram o potencial antimicrobiano da quitosana fúngica como uma alternativa para o controle do mal do Panamá causada pelo fungo fitopatogênico *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*.

**Palavras-chave:** Biocontrole; biopolímero; FOC; fungo fitopatógeno; fruticultura; *Musa* spp.

# ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF CHITOSAN FUNGAL AND CHITOSAN NANOPARTICLES ON CONTROL OF THE FUNGUS *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*

## ABSTRACT

The banana crop (*Musa* spp.) is one of the most important fruit source and income for the agricultural population, since their cultivation provides employment generation. However, the banana crop is affected by the fungus *Fusarium oxysporum* f.sp. Foc (FOC) that cause the Panama disease, which is endemic and distributed by all the producing regions of the world, promoting great reduction on banana yield in the field, and affecting both the production and the quality of fruits. In agriculture, the biopolymer chitosan has been applied in seed coating as bacterial agent and antifungic; promoting plant resistance to diseases and for insect control. Thus, the objectives of this study were the characterization of the chitosan obtained from fungi, produce and characterize the effects of chitosan nanoparticles (fungic nanochitosan), as well as to observe the antifungic activity of chitosan and nanochitosan obtained from fungi, *in vitro*, against the pathogen FOC, that promote Panamá disease in banana crop. The assays were realized in Laboratory (Laboratory of Environmental Biotechnology) at the University Federal Rural of Pernambuco (UFRPE). The fungal chitosan used in this study was provided by KitoZyme®, characterized as low molecular weight and with deacetylation degree of 86%. The antimicrobial activity of chitosan and nanochitosan was evaluated against FOC and the Minimal Inhibitory Concentration (MIC) for both was 1.0 mg mL<sup>-1</sup> and Minimal Fungicidal Concentration (MFC) was 1.0 mg mL<sup>-1</sup> to chitosan. The concentration of 0.5 mg mL<sup>-1</sup> (MIC/2) chitosan reduced by 27% the radial growth (RG) of the pathogen compared to the control (potato-dextrose agar (PDA)), in addition to changing the macromorphology the FOC. With this same concentration, 0.5 mg mL<sup>-1</sup> of chitosan was obtained in 100% inhibition of spore germination by reducing the elongation of the germ tube FOC. The nanochitosan, generally was not effective against the pathogen in the study, except for sporulation experiment that with 0.5 mg mL<sup>-1</sup> showed the lowest number of conidia compared to the control, unlike of the chitosan. Thus, the results of this study showed the potential antimicrobiano of the fungic chitosan as viable alternative to the control of the Panama disease caused by the phytopatogenic fungus *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*.

**Keywords:** Biocontrol; biopolymer; FOC; phytopathogenic fungi; fruticulture; *Musa* spp.

## INTRODUÇÃO

Na fruticultura brasileira, a cultura da banana (*Musa spp.*) é de suma importância, com grande relevância econômica e social para a Zona da Mata do estado de Pernambuco (SILVA JUNIOR et al., 2010; ALMEIDA, 2013). Sendo essa fruta, uma importante fonte de alimento e de renda para a população, uma vez que o seu cultivo proporciona a geração de empregos (SILVA JUNIOR et al., 2010). Entre os estados do Nordeste, que é a segunda maior região produtora de banana do país, Pernambuco ocupa a terceira posição com 368.708 t (IBGE, 2015).

No entanto, o cultivo da bananeira é afetado por um grande número de doenças, sejam causadas por fungos, bactérias, vírus ou nematoides, prejudicando a produção e a qualidade dos frutos (GURGEL et al., 2010). Dentre as doenças merece destaque o mal-do-Panamá, que é uma doença endêmica distribuída por todas as regiões produtoras do mundo, e que provoca perdas elevadas no campo (CORDEIRO et al., 2004; GURGEL et al., 2010)

Biopolímero do tipo polissacarídeo, a quitosana, tem uma estrutura molecular quimicamente similar à celulose, apresentando diferença somente nos grupos funcionais, no qual a quitosana apresenta grupos amina ( $\text{NH}_2$ ) ao invés dos grupos hidroxila ( $\text{OH}$ ) que estão presentes na celulose e dispostos na estrutura do carboidrato (AZEVEDO et al., 2007).

Obtida pela desacetilação alcalina da quitina (*N* – acetilglucosamina), a quitosana, é um biopolímero policatiônico  $\beta$ -1,4 ligado à D-glucosamina, que é uma poliamina linear, e tem um amplo potencial para aplicações em razão de uma variedade de propriedades dentre elas, biodegradabilidade, biocompatibilidade, atividade antimicrobiana e atoxicidade (SILVA et al., 2015).

A quitosana é derivada da quitina, que é extraída do exoesqueleto de crustáceos (camarão, lagosta ou caranguejos); de insetos, e a partir da parede celular de fungos (SILVA et al., 2006; DIAS et al., 2013; DEEPMALA et al., 2014). Quitosana de fungos como *Mucor rouxii*, *Gongronella butleri* e *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus* (STREIT, 2004); *Rhizopus arrhizus* (SILVA, 2007); *Cunninghamella elegans* (FRANCO et al., 2005; PAIVA et al., 2014) entre outros, é uma fonte alternativa para obtenção de quitina e quitosana.

Devido às propriedades antivirais, antibacterianas e antifúngicas, a quitosana vem sendo avaliada quanto ao uso agrícola (EL HADRAMI et al., 2010; DIAS et al., 2013). Na agricultura, a quitosana vem sendo aplicada no revestimento de sementes (VELÁSQUEZ, 2003); como agente antibacteriano (BERGER et al., 2011; PAIVA et al., 2014); como agente antifúngico (DI PIERO & GARDA, 2008; BERGER et al., 2011); na resistência da planta às doenças e aos insetos (BOONLERTNIRUN et al., 2008).

As nanopartículas são materiais produzidos em escala nanométrica, podendo ter suas propriedades melhoradas, obtendo um material mais leve, resistente e/ou funcional (BLANCO, 2011). São oriundas de materiais poliméricos, podendo ser compostas de polímero natural, como por exemplo, a quitosana (BLANCO, 2011; ARNAUD, 2012).

Devido a maior área superficial e a densidade de cargas, as nanopartículas possuem um maior contato com a superfície de carga negativa das células bacterianas (SHI et al., 2006), podendo apresentar resultados mais satisfatórios frente a quitosana. A aplicação de nanopartículas de quitosana na solução de problemas da agricultura ainda está em estágio inicial (KASHYAP et al., 2015).

Deste modo os objetivos deste trabalho foram caracterizar a quitosana fúngica, produzir e caracterizar as nanopartículas de quitosana (nanoquitosana) fúngica, assim como verificar a atividade antifúngica da quitosana e da nanoquitosana, em experimentos *in vitro* em relação ao fungo patógeno *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* (FOC), causador do mal-do-Panamá na cultura da banana.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Biotecnologia Ambiental da Universidade Federal Rural de Pernambuco, UFRPE, em Recife-PE. Sendo algumas análises realizadas na Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, em Recife-PE.

## **Obtenção da quitosana**

A quitosana utilizada neste estudo foi a KiOnutrime® - CsG, obtida e extraída do fungo *Aspergillus niger*, cedida pela empresa KitoZyme S. A., localizada na Bélgica.

## **Caracterização da quitosana**

Quanto à caracterização da quitosana foram realizadas as seguintes análises: determinação das características estruturais; determinação do grau de desacetilação (GD) e do peso molecular.

### **Caracterização estrutural**

As características estruturais foram determinadas por espectroscopia vibracional na região do infravermelho (IV) segundo a metodologia de Santos et al. (2003).

A análise foi realizada na Central Analítica do Departamento de Química Fundamental (DQF–UFPE), e os espectros de IV foram registrados em espectrofotômetro BRUKER Modelo IFS 66, na região entre  $4.000\text{ cm}^{-1}$  e  $400\text{ cm}^{-1}$ .

Foram pesados aproximadamente 1,5 mg de quitosana fúngica, que foi seca em estufa a vácuo durante 15 horas a  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente, foram adicionados 100 mg de KBr e a mistura homogeneizada em almofariz de ágata. Foram preparadas as pastilhas e deixadas na estufa a vácuo a  $110\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 20 horas.

### **Grau de desacetilação (GD)**

O grau de desacetilação (GD), número de grupos amina ( $\text{NH}_2$ ) em relação ao número de grupos amida na cadeia polimérica (ALVES, 2008; ARNAUD, 2012), foi determinado por ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN  $^1\text{H}$ ) conforme a metodologia descrita por Signini et al. (2000) e utilizando o equipamento da Varian Unity Plus em 300 MHz. A análise foi



realizada na Central Analítica do Departamento de Química Fundamental (DQF) da UFPE.

A solução de quitosana foi preparada pela dissolução da quitosana, com massa em torno de 10 mg em 1 mL D<sub>2</sub>O (água deuterada) contendo 1% HCl (37%), permanecendo 24 horas em agitação até formar uma solução viscosa. Uma alíquota dessa solução foi colocada em tubo de 5 mm de diâmetro para a realização da análise de acordo com os parâmetros programados no equipamento, temperatura de 50 °C, tempo de relaxação de 6 segundos e pulso de 90° (SIGNINI et al., 2000).

De acordo com o método preconizado por Signini et al. (2000), o GD foi calculado pela Equação (1), que utiliza a área do pico na região de 2ppm atribuído aos núcleos de hidrogênio do grupo acetoamido (H<sup>ac</sup>) e a área do pico em 3,4 ppm referente ao núcleo de hidrogênio na posição 2 do anel glicopiranosídico (H<sup>2</sup>).

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

### **Massa molar**

A massa molecular foi determinada por medida de viscosidade, no Departamento de Química Fundamental da UFPE, de acordo com a metodologia proposta por Signini & Campana-Filho, (1998).

As medidas foram realizadas utilizando um capilar de vidro (capilar 150) tipo Cannon-Fenske, termostaticado a (25 ± 0,01) °C, em um viscosímetro AVS-350 da Schott-Geräte. Para a determinação da viscosidade intrínseca, [η], foram preparadas soluções de quitosana em 25 mL de solução de ácido clorídrico 1% sob agitação constante por 15 horas, com posterior aquecimento em banho-maria a 80 °C por 2 minutos e após atingir a temperatura ambiente, foi adicionado mais 25 mL da solução de ácido clorídrico 1%, para obtenção de soluções de concentração final variando de 0,1 a 1,0 mg mL<sup>-1</sup>. Alíquotas de 15 mL da solução foram usadas nos capilares para medição do tempo de escoamento expresso em segundos, e foram realizadas três medidas de cada amostra e calculada a média.

A razão do tempo de escoamento da solução do biopolímero pelo tempo de escoamento da solução do solvente é chamada de viscosidade relativa. A viscosidade específica da quitosana fúngica foi calculada aplicando a média dos tempos de escoamento na expressão descrita abaixo (Equação 2). Ambas as viscosidades são adimensionais.

$$\eta_{esp} = \left( \frac{t - t_0}{t_0} \right) \quad (2)$$

Onde:

$\eta_{esp}$ : viscosidade específica da amostra

t: tempo de escoamento da solução no viscosímetro

$t_0$ : tempo de escoamento do solvente puro no viscosímetro

A viscosidade reduzida é a viscosidade específica dividida pela concentração e tem como dimensão o inverso da concentração (Equação 3).

$$\eta_{red} = \frac{\eta_{esp}}{C} \quad (3)$$

Onde:

$\eta_{red}$ : viscosidade reduzida da amostra.

C: concentração em gramas de polímero em 100 mL de solução.

A viscosidade intrínseca da quitosana foi obtida pela extrapolação do gráfico de viscosidade reduzida versus concentração à diluição infinita, com base na Equação 4 de Huggins (1942).

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

A viscosidade intrínseca de uma solução polimérica está relacionada com a massa molar viscosimétrica média, através da equação de Mark-Houving descrita por Arnaud (2012) (Equação 5). O valor da constante  $K$  e  $a$  dependem do polímero, do solvente e da temperatura. No presente estudo 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  $\alpha$ , respectivamente.

$$[\eta] = K(\bar{M}_v)^\alpha \quad (5)$$

### **Obtenção das nanopartículas de quitosana (nanoquitosana)**

As nanopartículas de quitosana (nanoquitosana) foram produzidas a partir da quitosana fúngica, pelo método de gelificação iônica preconizado por Yang et al. (2010) e adaptado por Arnaud (2012).

Para o preparo das nanopartículas de quitosana pelo método de gelificação iônica, foram dissolvidas 0,5 g de quitosana em 50 mL de ácido acético 2% e agitadas por 30 minutos. Posteriormente, foram adicionados 20 mL de tripolifosfato de sódio (TPP) 1% (v/v) à solução de quitosana por gotejamento através de uma bomba peristáltica na velocidade aproximada de  $0,3 \text{ ml min}^{-1}$  (CALVO et al., 1997).

Logo após o gotejamento a solução foi mantida sob agitação durante 2 horas. Passado esse período a solução foi transferida para eppendorfs e centrifugada a 13 400 rpm por 10 minutos. Em seguida foi retirado o sobrenadante, e acrescentado água destilada ao precipitado para lavagem, e cada amostra foi homogeneizada com a finalidade de retirar o excesso de reagentes utilizados no processo de preparação das nanopartículas. A lavagem com posterior centrifugação a 13.400 rpm por 5 minutos foi repetida cinco vezes, sempre intercalando a lavagem com a centrifugação. Após a última lavagem, foram retirados os sobrenadantes e os precipitados foram liofilizados para utilização nos experimentos.

## **Caracterização das nanopartículas de quitosana (nanoquitosana)**

### **Microscopia eletrônica de varredura (MEV)**

A caracterização das nanopartículas de quitosana foi realizada por meio da microscopia eletrônica de varredura (MEV) na Central Analítica do Departamento de Química Fundamental da UFPE.

As nanopartículas de quitosana foram ressuspensas em água destilada para realização do tratamento térmico, que foi usado para individualizar e reestruturar as nanopartículas. O tratamento foi realizado por agitação de uma suspensão purificada de nanopartículas de quitosana durante 30 min a 50 °C e 900 rpm (BUGNICOURT et al., 2014).

A MEV foi utilizada para observar a morfologia das nanopartículas de quitosana. As nanopartículas com e sem tratamento térmico foram liofilizadas e fixadas individualmente em stubs com fita dupla-face de carbono e cobertas com uma camada de 10nm de platina usando um sistema de metalização Bal-Tec MED 020. Posteriormente, foram analisadas no microscópio eletrônico de varredura (MEV-QUANTA 200FEG).

### **Realização dos experimentos de atividade antifúngica**

O patógeno utilizado nos experimentos foi o fungo *Fusarium oxysporum* f.sp. *ubense* (FOC) causador do Mal-do-Panamá, isolado AM M, tendo como identificação morfológica o código NF9UTN3C015 (SILVA JÚNIOR, 2014), que foi obtido da Coleção do Laboratório de Fitopatologia no Instituto Agronômico de Pernambuco (IPA). A estirpe foi mantida em meio de cultivo batata, dextrose e ágar (BDA) e estocada sob refrigeração (4°C).

Para a realização dos experimentos, a quitosana foi solubilizada em ácido acético 1% (v/v), para obtenção de uma solução mãe de 20 mg mL<sup>-1</sup>, com pH ajustado entre 5,5 e 5,8 usando NaOH 30%. Sendo a solução mãe colocada sob agitação constante em overnight, para obtenção do gel de quitosana (SHIGEMASA & MINAMI, 1996).

As nanoquitosanas foram dissolvidas em água destilada (QI et al., 2004) e também em ácido acético 1% (v/v), para obtenção de uma solução mãe de 5 mg mL<sup>-1</sup>, com pH ajustado entre 5,5 e 5,8 (SHIGEMASA & MINAMI, 1996)

usando NaOH 1% quando dissolvida em água e NaOH 30% quando dissolvida em ácido acético. Inicialmente, as nanoquitosanas foram dissolvidas em dois solventes para ver se haveria alguma diferença quanto a sua dissolução, ambos ficando sob agitação entre 30 min e 1 h. Como não houve diferença na dissolução, os trabalhos seguiram com a nanoquitosana dissolvida em água.

## **Experimento I- Atividade Antimicrobiana**

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) da quitosana e das nanopartículas de quitosana (nanoquitosana) foi determinada através da técnica de macrodiluição em caldo Batata-Dextrose (BD).

Foram realizadas diluições da quitosana com concentração inicial de 20 mg mL<sup>-1</sup>, atingindo as concentrações finais de 12; 10; 8; 6; 4; 2; 1 e 0 mg mL<sup>-1</sup>. Posteriormente foi inoculado 0,2 mL de suspensão esporíca, com 3,5 x 10<sup>6</sup> esporos mL<sup>-1</sup>, do patógeno *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* (FOC), em cada tubo da diluição, inclusive nos tubos estabelecidos como controle, que continham apenas o meio de cultura (BD).

Já para a nanoquitosana, foram realizadas diluições com concentração inicial de 2 mg mL<sup>-1</sup> atingindo as concentrações finais de 1,2; 1,0; 0,8; 0,6; 0,4; 0,2; 0,1 e 0 mg mL<sup>-1</sup> (representando 10 vezes menos o valor utilizado no gel de quitosana) e diluições com a concentração de 10 mg mL<sup>-1</sup> atingindo as concentrações finais de 6; 5; 4; 3; 2; 1; 0,5 e 0 mg mL<sup>-1</sup> (representando a metade do valor utilizado no gel de quitosana). Em seguida foi inoculado 0,2 mL de suspensão esporíca, com 3,5 x 10<sup>6</sup> esporos mL<sup>-1</sup>, do patógeno FOC, em cada tubo da diluição, inclusive nos tubos estabelecidos como controle, que continham apenas o meio de cultura (BD).

Em seguida, houve a incubação dos tubos em estufa de crescimento a 28 °C por 168 horas (sete dias). Ao término do período de incubação, o tubo correspondente a menor concentração de quitosana e de nanoquitosana que não demonstrou crescimento fúngico visível foi considerada como a CIM.

Por último, alíquotas de 100 µL dos tubos com ausência de crescimento fúngico foram inoculadas em placas de Petri contendo meio Batata-Dextrose-Ágar (BDA), sendo posteriormente incubadas em estufa de crescimento a 28 °C durante 168 horas. Foi considerada como Concentração Fungicida Mínima

(CFM) a menor concentração que não possibilitou o crescimento da estirpe teste em meio BDA (SHARMA; TRIPATHI, 2008).

A princípio as nanoquitosanas foram preparadas em duas concentrações, como ambas se comportaram do mesmo modo quanto à atividade antifúngica, os demais experimentos se deram a partir da menor solução mãe ( $2 \text{ mg mL}^{-1}$ ).

### **Experimento II- Crescimento Radial e Efeitos na Macromorfologia**

Discos de cultura fúngica do patógeno FOC, com dois dias de crescimento (antes de esporular) e 10 mm de diâmetro, foram inoculados em placa de Petri com o meio BDA adicionado de quitosana e de nanopartículas de quitosana (nanoquitosana) nas concentrações  $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$ ;  $0,25 \text{ mg mL}^{-1}$  e  $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$ , determinadas com base nos resultados da concentração inibitória mínima (CIM), (CIM/10); (CIM/4); (CIM/2), respectivamente. Em seguida as placas foram incubadas em estufa de crescimento a  $28 \text{ }^\circ\text{C}$ , durante 144 h. Esse período foi referente ao tempo que o tratamento controle atingiu a borda da placa de Petri. E o tratamento controle foi representado pelo fungo crescido no meio BDA sem adição de quitosana e de nanoquitosana.

O crescimento foi avaliado através do crescimento radial, medido pelo diâmetro da colônia em dois sentidos perpendiculares, em milímetros, a cada 24 h de incubação. Os resultados foram expressos como média aritmética de triplicatas.

Para a avaliação da eficiência da quitosana e da nanoquitosana sobre os efeitos na macromorfologia (aspectos macroscópicos) de FOC (AM M), placas de culturas controle tratadas foram fotografadas.

### **Experimento III- Esporulação**

A partir de cultura fúngica do patógeno FOC com 144h de crescimento oriundas do estudo do crescimento radial, em meio Batata-Dextrose-Ágar (BDA) contendo quitosana e nanopartículas de quitosana (nanoquitosana) nas concentrações  $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$ ;  $0,25 \text{ mg mL}^{-1}$  e  $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$ , foram retirados com auxílio de um furador de meio três discos de 10 mm de diâmetro de cada placa, sendo um da região central, outro da região mediana e outro da região

periférica das colônias. Os três discos foram transferidos para tubos de ensaio contendo 10 mL de uma mistura (1:1) de solução salina (NaCl a 0,89% p/v) e solução de Tween 80 (0,1% v/v). Por meio de vigorosa agitação em agitador de tubos de ensaio tipo vortex, extraíram-se os conídios, e procedeu-se à contagem em Câmara de Neubauer (BARBOSA et al., 2002).

O experimento foi realizado com sete tratamentos: 0,1 mg mL<sup>-1</sup>; 0,25 mg mL<sup>-1</sup>; 0,5 mg mL<sup>-1</sup> de quitosana e 0,1 mg mL<sup>-1</sup>; 0,25 mg mL<sup>-1</sup>; 0,5 mg mL<sup>-1</sup> de nanopartículas de quitosana e tratamento controle (contendo apenas o meio BDA). O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com três repetições. E os dados obtidos foram analisados pelo programa estatístico SAS versão 9.2 (SAS Institute 2011), sendo realizada a ANOVA, e o teste comparativo de médias que tomou como base o Tukey (p < 0,05).

#### **Experimento IV- Germinação**

Soluções de quitosana e de nanopartículas de quitosana nas concentrações de 0,1 mg mL<sup>-1</sup>; 0,25 mg mL<sup>-1</sup>; 0,5 mg mL<sup>-1</sup> e 1,0 mg mL<sup>-1</sup> foram testadas em relação ao seu poder de inibição da germinação dos esporos do patógeno FOC. Alíquotas de 300 µL de cada solução contendo as diferentes concentrações de quitosana e nanoquitosana foram homogeneamente misturadas com 300 µL da suspensão esporíca, com 3,5 x 10<sup>6</sup> esporos mL<sup>-1</sup>, obtidos de culturas com 7 dias de crescimento em meio Batata-Dextrose-Ágar (BDA) e incubados a 28°C por 24 horas. O experimento foi realizado em triplicata e o tratamento controle consistiu em suspensão de esporos em água destilada autoclavada.

Passado este período, alíquotas de 30 µL foram adicionadas em lâminas e coradas com corante azul de Amann e observadas em microscópio óptico, Olympus modelo BX41, sendo o conídio considerado germinado quando o comprimento de seu tubo germinativo foi maior ou igual ao menor diâmetro do conídio. A eficiência da inibição da germinação dos esporos foi verificada através da comparação do número de esporos germinados nas soluções adicionadas de quitosana e de nanoquitosana em comparação com o número de esporos germinados no tratamento controle (FENG & ZHENG, 2007).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Caracterização da quitosana

De acordo com Milioli (2011), as propriedades físico-químicas da quitosana frequentemente mais analisadas são o grau de desacetilação; massa molar; viscosidade e grau de polimerização. Sendo assim, no presente estudo foram realizadas as seguintes análises: determinação do grau de desacetilação (GD%); determinação das características estruturais (Espectroscopia vibracional na região do infravermelho) e determinação do peso molecular.

### Caracterização estrutural

A espectroscopia na região do infravermelho permite observar e classificar algumas bandas relativas a vibrações características dos grupos funcionais presentes na estrutura da quitosana. A Tabela 1 mostra as bandas observadas nos espectros da quitosana fúngica e suas respectivas atribuições.

**Tabela 1.** Atribuição das bandas do infravermelho da quitosana fúngica.

Número de onda (cm <sup>-1</sup> )	Tentativas de atribuições
593,38 - 1.082,2	Anéis Piranosídicos
1.378	(-CH <sub>2</sub> -OH) V <sub>C-O</sub>
1.418	(amida) V <sub>C-N</sub>
1.595	(amida II) δ <sub>NH</sub>
1.697	(amida I) V <sub>C=O</sub>
2.882	V <sub>C-H</sub>
3.446	V <sub>O-H</sub>
	(amina) δ <sub>NH</sub>

O espectro obtido para a quitosana fúngica revela um pico largo em 3.446 cm<sup>-1</sup>, na região correspondente ao estiramento OH. Esta aparece sobreposta à banda de deformação axial NH do grupo amina (NUNTHANID et al., 2001). No entanto, Figueiredo (2002) relata que o grupo amina primária



livre (-NH<sub>2</sub>) na posição C<sub>2</sub> da glucosamina apresenta outro pico na região entre 1.220 e 1.020 cm<sup>-1</sup>.

O pico em 2.882 cm<sup>-1</sup> representa o estiramento C-H alifático da amostra de quitosana fúngica. O pico em 1.647 cm<sup>-1</sup> corresponde ao grupo amina acetilado da quitina indicando que as amostras não estão totalmente desacetiladas (FIGUEIREDO, 2002). No entanto, Anjos (2005) especifica este pico em torno de 1655 cm<sup>-1</sup> 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<sup>-1</sup>.

E o pico em 1.378 cm<sup>-1</sup> demonstra o estiramento C-O do grupo alcoólico primário (-CH<sub>2</sub>-OH) da amostra de quitosana fúngica. A deformação axial de C-N da amida aparece em 1.418 cm<sup>-1</sup> para a quitosana em questão. A banda intensa entre 600 e 1.100 cm<sup>-1</sup> está relacionada aos anéis piranosídicos (SHIGEMASA et al., 1996).

### **Grau de desacetilação (GD)**

Conforme Arnaud (2012) o GD é considerado um dos principais parâmetros na caracterização da quitosana. Pois, esta propriedade é de fundamental importância para a diferenciação entre quitina e quitosana.

A técnica do RMN <sup>1</sup>H é muito confiável e precisa, com ela podemos analisar o próton H (H<sup>+</sup>) que estão ligados aos monômeros. Com essa técnica é visto o núcleo dentro do átomo, e pelo fato do H<sup>+</sup> ter poucos elétrons, ela torna-se confiável.

A integração dos picos do espectro de RMN <sup>1</sup>H da quitosana, que é a integração da linha de base, utilizados para o cálculo do grau de desacetilação a partir da equação de Signini et al. (2000), foram H<sup>ac</sup>=5,94 e H<sup>2</sup>=14,09. E o valor do grau de desacetilação em porcentagem (GD%) da quitosana determinado por RMN <sup>1</sup>H a partir da equação de Signini et al. (2000) foi de 86%.

Vale salientar que quando a desacetilação é maior que 50%, a quitina se torna solúvel em solução aquosa ácida e passa a ser quitosana, que apresenta um GD entre 66 e 95% (TOLAIMATEA et al., 2003; AGNIHOTRI et al., 2004; RINAUDO, 2006; MILIOLI, 2011).

Para o cálculo do GD por RMN  $^1\text{H}$  é preferível optar pelo uso da metodologia de Signini et al. (2000), pelo fato dessa metodologia não levar em consideração os picos próximos da água deuterada ( $\text{D}_2\text{O}$ ). Logo, não temos a interferência da  $\text{D}_2\text{O}$ , podendo ver o núcleo do hidrogênio ( $\text{H}^+$ ), o próton em si, que estão ligados aos monômeros.

### **Massa molar**

As propriedades físico-químicas da quitosana dependem não somente do grau de desacetilação, mas também da sua massa molar média (ARNAUD, 2012). E essas determinações da massa molar média de polímeros podem ser realizadas por medidas de viscosidades.

A partir das medidas de viscosidade, foram obtidos os valores da viscosidade intrínseca (0,039) e a massa molar viscosimétrica média da quitosana fúngica ( $4,0 \times 10^3$ ). Sendo considerada uma quitosana fúngica de baixo peso molecular.

O peso molecular é uma das diferentes características que podem interferir na atividade biológica da quitosana (PACHECO et al., 2008; COQUEIRO & DI PIERO, 2011). Conforme Pedro (2009), de acordo com o peso molecular do polímero há diferentes mecanismos de ação, por exemplo, uma quitosana de baixo peso molecular é capaz de penetrar nas células e se ligar ao DNA microbiano inibindo a transcrição e tradução.

Resultados semelhantes foram relatados por Badawy & Rabea (2009) que testaram o efeito da quitosana com diferentes pesos moleculares sobre o mofo cinzento causado por *Botrytis cinerea* em frutos de tomate e verificaram que quanto menor o peso molecular da quitosana maior atividade antifúngica.

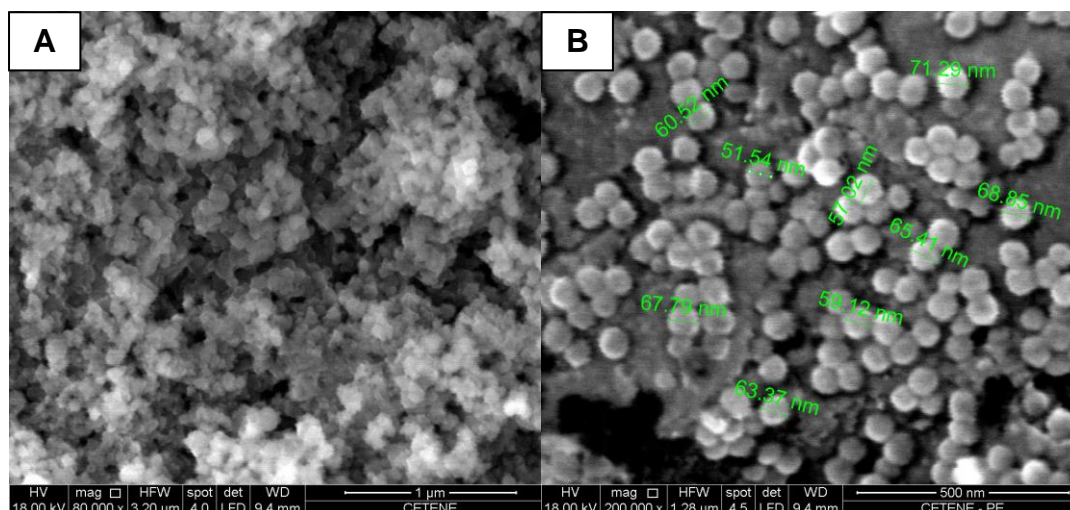
Alguns autores como Chittenden & Singh (2009) constataram que os componentes vitais das células e as atividades fisiológicas dos fungos são afetados ligeiramente quando é utilizado quitosana com menor peso molecular, pois as mesmas penetram facilmente a parede celular dos fungos.

Hernández-Lauzardo et al. (2008) analisando o efeito antifúngico da quitosana com diferentes pesos moleculares sobre o desenvolvimento *in vitro* (crescimento micelial, esporulação, morfologia e germinação de esporos) de três isolados de *Rhizopus stolonifer*, observaram que a quitosana de baixo peso molecular foi mais eficiente na inibição do crescimento micelial.

## Caracterização das nanopartículas de quitosana (nanoquitosana)

### Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A MEV foi utilizada para observar a morfologia das nanopartículas de quitosana, diferenciando as nanoquitosanas com e sem tratamento térmico. Com este tratamento foi obtido a reestruturação das partículas da nanoquitosana, tornando-a esférica e uniforme, o que é excelente para um melhor desempenho desse tipo de material, para análises como a atividade microbiana (Figura 1).



**Figura 1** – Imagem de microscopia eletrônica de varredura (MEV) das nanopartículas de quitosana antes (A) e depois (B) do tratamento térmico. Barras de escala = 1 μm (A); 500 nm (B).

### Experimento I- Atividade Antimicrobiana

Quanto aos efeitos da atividade antifúngica *in vitro*, a quitosana fúngica, com grau de desacetilação (GD) de 86% e de baixo peso molar, solubilizada em ácido acético 1% apresentou atividade fungistática e fungicida para o patógeno *Fusarium oxysporum* f.sp. *cupense* (FOC) isolado AM M, em meio de cultura. A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e da concentração fungicida mínima (CFM) da quitosana consta na Tabela 2.

**Tabela 2.** Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) da quitosana fúngica e da nanopartícula de quitosana (nanoquitosana) para a estirpe do fungo *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* (AM M) *in vitro*.

Cepa Fúngica	CIM (mg mL <sup>-1</sup> )	CFM
<b>Quitosana</b>		
<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>cubense</i> (AM M)	1,0	1,0
<b>Nanoquitosana</b>		
<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>cubense</i> (AM M)	1,0	-----

A concentração de 1,0 mg mL<sup>-1</sup> de quitosana foi capaz de inibir o crescimento do patógeno FOC, que é um fungo filamentosos, e este mesmo valor foi encontrado para a determinação da CFM.

Alcatara (2011), trabalhando com quitosana extraída de fungo, observou em seu estudo resultados com valores iguais para CIM e para CFM (5,0 mg mL<sup>-1</sup>), para os fungos *Penicillium citrinum*, *Penicillium pinophilum* e *Fusarium moniliforme*, que também são fungos filamentosos.

Berger et al. (2014), avaliando CIM e CBM (Concentração Bactericida Mínima) para determinadas bactérias, encontrou valores de CIM de 0,2 a 0,5 mg mL<sup>-1</sup> com quitosana fúngica e valores de CBM de 0,4 a 1,0 mg mL<sup>-1</sup>.

Tajdini et al. (2011), avaliaram a CIM de doze estirpes de bactérias e fungos, e os dados obtidos mostraram que as atividades antimicrobianas com quitosana fúngica foram mais eficazes contra a *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Cândida albicans* e *Cândida glabrata*, em comparação com a quitosana de camarão.

Os dados do presente estudo com FOC, utilizando quitosana fúngica, obteve valor para CFM (1,0 mg mL<sup>-1</sup>) menor que os encontrados por Alcatara (2011), demonstrando efeito positivo da quitosana em estudo.

Os resultados obtidos com a quitosana fúngica utilizada no presente trabalho confirmaram seu potencial quanto à atividade antifúngica, apresentando valores de CIM e CFM relativamente baixos ao observados na literatura.

No entanto, a quitosana fúngica além das vantagens equivalentes a da quitosana comercial, apresentam como benefício o tempo para obtenção de biomassa, que é relativamente curto para posterior extração da quitosana, sem que haja necessidade da espera, por exemplo, do cultivo de camarão; não dependendo da questão da sazonalidade (FRANCO et al., 2005).

Além de ser um processo fácil e economicamente viável a extração de quitosana fúngica, possibilita a extração simultânea de quitina e quitosana, diferentemente do método comumente utilizado para extração de quitosana de crustáceo, que é considerado dispendioso e demorado (TAJDINI et al., 2010; BERGER et al., 2011)

Além do mais, segundo Austin et al. (1981, citado por AMORIM et al., 2001) existem algumas limitações quanto à utilização da quitosana proveniente de crustáceos como, a necessidade do material ser bem triturado para obtenção de um pó e a utilização de soluções alcalinas fortes para desacetilação da quitina que podem poluir o meio ambiente; e ainda de acordo com Franco (2000) existem as dificuldades de adaptação das espécies de crustáceo a um determinado ambiente e a possibilidade dos resíduos de proteínas causarem reações alérgicas.

Desse modo, os resultados sugerem que a utilização da quitosana fúngica pode ser de grande interesse como fonte alternativa à quitosana de camarão, no que diz respeito ao uso como fungicida natural.

FAI et al. (2011), verificou que o micélio de *Mucor circinelloides* é uma boa fonte de quitina e de quitosana, e o crescimento do fungo em meio jactupé mostrou potencial em proporcionar um bom rendimento de quitosana no prazo de dois dias.

Fato que merece destaque na atividade antimicrobiana da quitosana, ou seja, na sua atuação é a própria natureza policatiônica do biopolímero. Pois, em meio ácido os grupos amino da quitosana captam íons hidrogênios do meio, resultando em uma carga global positiva, permitindo sua interação com moléculas carregadas negativamente (RINALDO, 2006).

Logo, Benhamou (1996) sugere que as cargas positivas da quitosana podem interagir com os resíduos carregados negativamente das macromoléculas expostas na superfície da célula de patógenos, acarretando alteração na permeabilidade da membrana celular.

A natureza policatiônica da quitosana está intimamente relacionada ao seu grau de desacetilação, que quanto mais elevado (97,5%) maior a densidade de carga positiva, confirmando um espectro de ação antimicrobiano maior em relação à quitosana com grau de desacetilação menor (83,7%) (KONG et. al., 2008).

Em relação à nanopartícula de quitosana (nanoquitosana), a mesma também, apresentou atividade fungistática frente ao FOC isolado AM M, em meio de cultura. No entanto, não apresentou atividade fungicida para o patógeno em questão. A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e da concentração fungicida mínima (CFM) da nanoquitosana é apresentada na Tabela 2.

A mesma CIM de  $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$  foi encontrada para a nanoquitosana que foi capaz de inibir o crescimento do patógeno FOC, no entanto não foi encontrado a CFM para o fungo. Pois, os mesmos quando transferidos para placas com meio Batata-Dextrose-Ágar (BDA), voltaram a apresentar crescimento a uma temperatura de  $28 \text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Porém, Neves (2013) avaliando o efeito de nanopartículas de quitosana em duas bactérias, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, relatou ação inibitória e bactericida contra as duas bactérias testadas. Que segundo Qi et al. (2004) o efeito se deu devido as nanopartículas apresentarem maior área superficial e maior afinidade com as células bacterianas.

Ao comparar a quitosana com a nanoquitosana com relação à atividade antimicrobiana foi verificado que a quitosana se comportou de modo mais eficiente que a nanoquitosana. Pois, foi encontrada além da CIM a CFM com a quitosana. Diferentemente da nanoquitosana, que apresentou apenas a CIM, ou seja, demonstrou frente ao FOC apenas efeito fungistático.

## **Experimento II- Crescimento Radial e Efeitos na Macromorfologia**

Para os ensaios que avaliaram o crescimento radial do FOC (Tabela 3), foi observado que a concentração de  $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$  (CIM/2) de quitosana reduziu o crescimento do FOC em 34% após 2 dias de crescimento, seguida por taxa inibitória de 27, 25 e 24%, após 3, 4 e 5 dias de crescimento, respectivamente. Apresentando ao final do ensaio, 6 dias de crescimento (144 h), uma redução de 27% da CR quando comparado ao controle.

**Tabela 3.** Crescimento radial (mm) de *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* (AM M) durante 144 h de cultivo em meio BDA (controle) sob diferentes tratamentos de nanopartículas de quitosana (nanoquitosana) e de quitosana nas concentrações de 0,1; 0,25 e 0,5 mg mL<sup>-1</sup>.

Tempo (h)	Tratamentos						
	Controle	Nanoquitosana			Quitosana		
		0,1	0,25	0,5	0,1	0,25	0,5
	mg mL <sup>-1</sup>						
0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
24	9,6 ± 0,3	9,8 ± 0,2	9,5 ± 0,1	9,2 ± 0,2	10,0 ± 0,1	7,8 ± 0,1	6,5 ± 0,1
48	17,2 ± 0,3	17,4 ± 0,4	17,1 ± 0,2	16,6 ± 0,1	17,6 ± 0,3	14,5 ± 0,3	11,4 ± 0,3
72	24,0 ± 0,4	24,3 ± 0,3	24,1 ± 0,3	23,6 ± 0,1	24,7 ± 0,3	21,0 ± 0,5	17,6 ± 0,3
96	30,5 ± 0,5	30,9 ± 0,7	30,7 ± 0,1	30,0 ± 0,3	31,1 ± 0,2	26,8 ± 0,7	22,8 ± 0,4
120	36,7 ± 0,5	36,0 ± 2,4	36,0 ± 0,9	35,6 ± 1,2	36,2 ± 0,6	30,7 ± 1,8	27,8 ± 1,0
144	42,5 ± 0,3	41,0 ± 3,3	41,0 ± 1,9	40,3 ± 2,1	40,7 ± 1,3	33,6 ± 2,4	30,8 ± 3,1

A concentração de 0,5 mg mL<sup>-1</sup> (CIM/2) de quitosana apresentou melhores resultados em comparação as menores concentrações 0,25 mg mL<sup>-1</sup> (CIM/4) e 0,1 mg mL<sup>-1</sup> (CIM/10). Confirmando que a inibição do crescimento radial do patógeno, mostrou-se diretamente relacionada com a concentração de quitosana, conseqüentemente a taxa inibitória foi mais elevada nas maiores concentrações de quitosana durante o período avaliado. Já as nanopartículas de quitosana (nanoquitosana), não apresentaram resultados satisfatórios para o ensaio de crescimento radial nas mesmas concentrações de quitosana 0,5; 0,25 e 0,1 mg mL<sup>-1</sup>, expressando uma redução de apenas 5% do patógeno ao término do ensaio (114 h), em sua maior concentração.

Nascimento (2013), avaliando a eficiência da quitosana obtida comercialmente de crustáceo (Sigma®), na inibição de patógeno fúngico de pós-colheita de goiaba, observou que a concentração de 2,5 mg mL<sup>-1</sup> (CIM/2) de quitosana inibiu o crescimento do patógeno *Colletotrichum gloeosporioides* em 44% após 2 dias de crescimento, seguida por taxa inibitória de 32, 29 e 27%, após 3, 4 e 5 dias de crescimento, respectivamente. Valores de inibição semelhantes aos encontrados no atual estudo. Vale ressaltar que a CIM e a

CFM do atual estudo foi de 1 mg mL<sup>-1</sup> frente ao utilizado por Nascimento (2013), que relatou uma CIM de 5,0 mg mL<sup>-1</sup> e uma CFM de 10,0 mg mL<sup>-1</sup>.

Alcatara (2011) utilizando quitosana fúngica, verificou uma diminuição do crescimento radial de todos os fungos testados nas concentrações abaixo da mínima inibitória (abaixo da CMI) e inibição significativa do crescimento fúngico nas concentrações mínima inibitória (CMI).

Berger (2010) trabalhando com quitosana obtida a partir de crustáceos, das marcas Sigma® e Polimar®, observou que de modo geral não houve diferença significativa no crescimento micelial do fungo *Fusarium oxysporum* f.sp. *tracheiphilum* entre ambas quitosanas. Embora a quitosana da Polimar® em suas maiores concentrações (5 e 6 mg mL<sup>-1</sup>) tenha apresentado efeito fungicida para o patógeno, o mesmo não ocorrendo para a da Sigma®, que para todas as concentrações proporcionou apenas um efeito fungioestático quando comparado com o controle (apenas meio BDA).

Resultados satisfatórios também foram encontrados por Di Piero & Garda (2008), utilizando quitosana de crustáceo, que obtiveram redução no crescimento micelial do fungo *Colletotrichum lindemuthianum*, a partir de 1 mg mL<sup>-1</sup> de quitosana. Tendo o efeito inibidor de maior importância com o aumento da concentração de quitosana até 3 mg mL<sup>-1</sup>, quando ocorreu a estabilização.

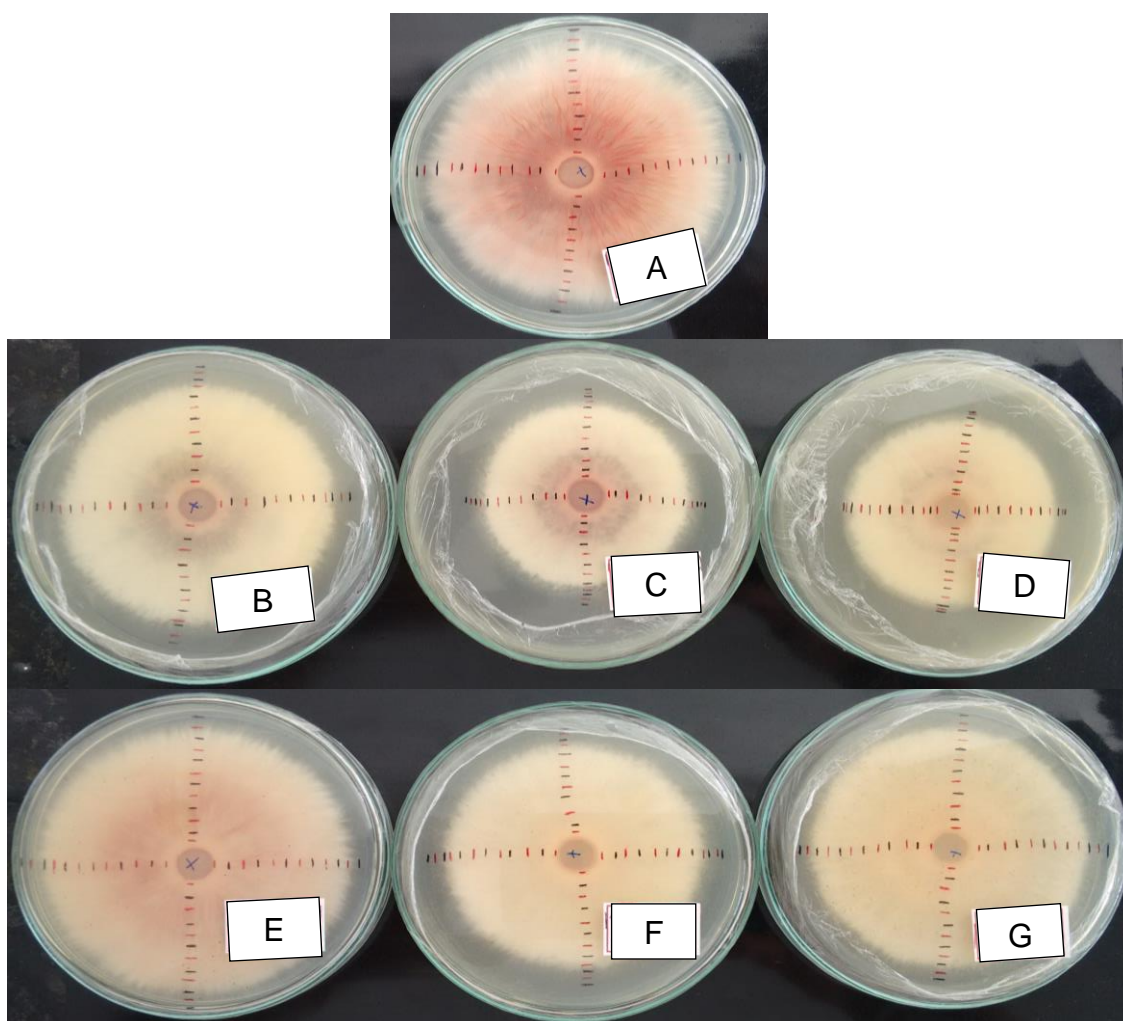
Felipini (2008), avaliando o crescimento micelial de *Colletotrichum acutatum*, verificou que a dose de quitosana que resultou em menor diâmetro das colônias foi a de 4 mg mL<sup>-1</sup>, a qual reduziu em cerca de 41%, quando comparada com a testemunha. O autor percebeu que não houve incremento de redução da colônia em sua maior dose 5 mg mL<sup>-1</sup>.

Quanto aos efeitos na macromorfologia, macroscopicamente foi visível a alteração na macromorfologia do patógeno (Figura 2), com o controle contendo apenas o meio BDA (Figura 2A) em resposta as diferentes concentrações de quitosana (Figura 2B; 2C e 2D), sendo observada a redução de adensamento micelial; o surgimento de setores apresentando diferentes colorações (rosa claro; amarelo-queimado e branco) e a mudança de coloração das colônias (rosa claro; amarelo-queimado e branco) e do micélio aéreo com predomínio das cores amarelo-queimado e branco.

As concentrações estudadas de quitosana também agiram inibindo a esporulação do fungo, inibindo a multiplicação celular (reprodução assexuada) dos fungos. Podemos inferir que houve um efeito fungioestático, retardando a



multiplicação, visto que as hifas cresceram ao nível periférico, mas não se mostrando viável ao desenvolvimento do fungo.



**Figura 2** – Macromorfologia de *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* (AM M), em meio BDA sob diferentes tratamentos de quitosana e de nanopartículas de quitosana (nanoquitosana). A: Cultura controle (apenas meio); B: 0,1 mg mL<sup>-1</sup> quitosana; C: 0,25 mg mL<sup>-1</sup> quitosana; D: 0,5 mg mL<sup>-1</sup> quitosana; E: 0,1 mg mL<sup>-1</sup> nanoquitosana; F: 0,25 mg mL<sup>-1</sup> nanoquitosana e G: 0,5 mg mL<sup>-1</sup> nanoquitosana.

Em relação aos tratamentos com nanoquitosana (Figura 2E, 2F e 2G), embora não tenha apresentado mudança na velocidade de crescimento do fungo na CR, com este tratamento foi visualizada a alteração na pigmentação das colônias e também do micélio aéreo, provavelmente interferindo na esporulação do patógeno, interferindo na macromorfologia do patógeno.

Di Piero & Garda (2008), em trabalho com o fungo *Colletotrichum lindemuthianum*, testando quitosana de crustáceo em meio BDA, observaram que com o aumento da concentração até 3 mg mL<sup>-1</sup> houve um efeito de maior relevância, a ocorrência de alteração na morfologia das colônias nas placas, que apresentavam os bordos irregulares.

Tanto na CR quanto na macromorfologia do patógeno, no presente trabalho, a quitosana fúngica demonstrou resultados satisfatórios se mostrando mais eficiente quando comparada aos tratamentos com nanoquitosana.

### **Experimento III- Esporulação**

O efeito das nanopartículas de quitosana (nanoquitosana) na esporulação do *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* (Tabela 4) foi expressivo, apresentando diferença significativa nas suas três concentrações em relação ao tratamento controle. Embora, os tratamentos com nanoquitosana não tenham apresentado diferença significativa entre si, em sua maior concentração (0,5 mg mL<sup>-1</sup>), apresentou o menor número de conídios, principalmente quando comparado ao tratamento controle (apenas meio BDA), ambos apresentaram valores de 7,50 x 10<sup>4</sup> e 1,01 x 10<sup>6</sup> conídios mL<sup>-1</sup>, respectivamente.

Comportamento inverso foi obtido nos tratamentos com quitosana, que à medida que aumentou a sua concentração aumentou a esporulação do patógeno. O que pode ser explicado pelo fato dos esporos serem estruturas de resistência em condições adversas. Os tratamentos com quitosana não apresentaram diferença significativa entre si, e as suas duas maiores concentrações, também, não demonstraram diferença significativa em relação ao tratamento controle.

As nanopartículas também apresentaram menor número de conídeos quando comparadas a quitosana, pois como visto anteriormente, a quitosana fez com que a esporulação se comportasse de modo distinto, e ambas apresentaram diferença significativa.

**Tabela 4.** Esporulação de *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* (AM M) cultivado em meio BD (controle) sob diferentes tratamentos de nanopartículas de quitosana (nanoquitosana) e de quitosana nas concentrações de 0,1; 0,25 e 0,5 mg mL<sup>-1</sup>.

<b>Tratamentos (mg mL<sup>-1</sup>)</b>	<b><i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>cubense</i> (AM M)*</b>
<b>Controle</b>	1,01x10 <sup>6</sup> C
<b>Nanoquitosana 0,1</b>	2,50x10 <sup>5</sup> AB
<b>Nanoquitosana 0,25</b>	2,75x10 <sup>5</sup> B
<b>Nanoquitosana 0,5</b>	7,50x10 <sup>4</sup> A
<b>Quitosana 0,1</b>	2,65x10 <sup>5</sup> AB
<b>Quitosana 0,25</b>	6,65x10 <sup>5</sup> BC
<b>Quitosana 0,5</b>	1,04x10 <sup>6</sup> C
<b>CV (%)</b>	32,52

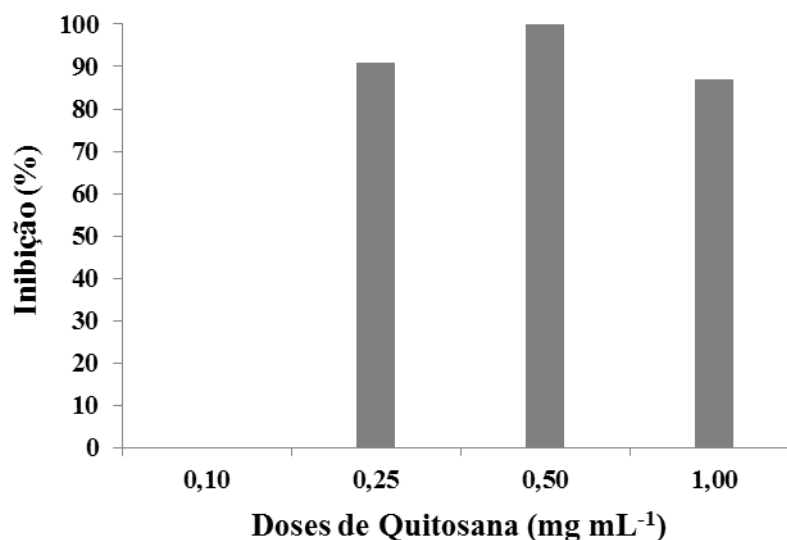
\*Nº de conídeos x 10<sup>x</sup>. \*\*Médias com a mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Baños et al. (2004), constataram que a esporulação de *Fusarium oxysporum* reduziu significativamente quando tratados com quitosana a 0,5% (3,5 x 10<sup>5</sup> esporos mL<sup>-1</sup>), e a concentração de quitosana de 1,5% reduziu significativamente a esporulação o *Rhizopus stolonifer* (1,3 x 10<sup>6</sup> esporos mL<sup>-1</sup>) quando comparados ao controle (4,0 x 10<sup>5</sup> e 1,8 x 10<sup>6</sup> esporos mL<sup>-1</sup>, respectivamente). Enquanto que o *Penicillium digitatum* mostrou significativamente maior esporulação nas concentrações de quitosana 0,5% (4,2 x 10<sup>7</sup> esporos mL<sup>-1</sup>) e 1,5% (2,1 x 10<sup>7</sup> esporos mL<sup>-1</sup>) em comparação ao controle (1,8 x 10<sup>6</sup> esporos mL<sup>-1</sup>).

#### **Experimento IV- Germinação**

O tratamento com a quitosana fúngica foi eficiente na inibição da germinação dos esporos de *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* (FOC) (Figura 4). Na concentração de 0,5 mg mL<sup>-1</sup> (CIM/2) foi obtido 100% de inibição da germinação de esporos reduzindo a elongação do tubo germinativo do FOC. As concentrações de quitosana com 0,25 mg mL<sup>-1</sup> (CIM/4) e 1,0 mg mL<sup>-1</sup> (CIM), também, apresentaram excelentes respostas em relação à inibição da germinação, com 91 e 87%, respectivamente, de inibição. Em relação ao

tratamento com  $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$  (CIM/10) de quitosana, em todas as repetições houve 100% de germinação, não sendo eficiente na inibição do patógeno.



**Figura 3** - Efeito de quitosana sobre a germinação de esporos de *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* (AM M) cultivado em meio BD (controle) sob diferentes tratamentos de quitosana nas concentrações de 0,1; 0,25; 0,5 e 1,0  $\text{mg mL}^{-1}$ .

Di Piero & Garda (2008), em bioensaios realizados *in vitro*, observaram que a quitosana de crustáceos ( $\text{GD}\% = 85\%$ ) reduziu o crescimento micelial e a germinação de esporos de *Colletotrichum lindemuthianum*. Segundo os autores, concentrações de quitosana tão baixas quanto  $20 \mu\text{g mL}^{-1}$  ( $0,02 \text{ mg mL}^{-1}$ ) reduziram em aproximadamente 85% a germinação de *C. lindemuthianum*, enquanto a dose de  $80 \mu\text{g mL}^{-1}$  ( $0,08 \text{ mg mL}^{-1}$ ) inibiu totalmente o processo germinativo do fungo.

Felipini (2008) notou que houve efeito das doses de quitosana sobre a germinação de esporos de *C. acutatum*, causador da Podridão Amarga em maçãs, e com a aplicação da maior dose  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  ( $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$ ) a germinação do fitopatógeno foi 66% menor que o controle com água destilada.

Resultados satisfatórios também foram obtidos por Liu et al. (2007), que observaram que a germinação de esporos de *Penicillium expansum* foi significativamente inibida pela quitosana a 0,5%, e a germinação de *Botrytis cinerea* foi completamente inibida pela quitosana a 1%, causadores do bolor azul e do mofo cinzento nos frutos de tomate, respectivamente.

No que diz respeito, as nanopartículas de quitosana (nanoquitosana), essas, não foram eficientes na inibição da germinação. Tendo todas as doses testadas apresentado 100% de germinação (por isso, a ausência da figura).

De acordo com Xia et al. (2011), o mecanismo de ação da quitosana ainda não está totalmente elucidado, embora a ação antimicrobiana do polímero ocorra diante de uma gama de micro-organismos como bactérias, fungos e algas.

As nanopartículas de quitosana do presente trabalho, de um modo geral, não apresentaram efeito contra o patógeno em estudo, com exceção para o experimento de esporulação, fato este que pode ter ocorrido devido ao modo de obtenção das mesmas, que seguiu um modelo descrito para quitosana de crustáceo (comercial), e que por isso, pode não ter sido tão eficiente para o preparo de nanopartículas de quitosana provenientes de fungos.

De acordo com Shi et al. (2006), devido a maior área superficial e a densidade de cargas, as nanopartículas possuem um maior contato com a superfície de carga negativa das células microbianas. Sendo assim, mais estudos sobre a ação das nanopartículas de quitosana fúngica são necessárias para determinar a sua eficiência antifúngica e seu uso como alternativa a quitosana de crustáceos.

## **CONCLUSÕES**

- A quitosana fúngica demonstrou potencial antimicrobiano em relação ao fungo fitopatogênico FOC da cultura da banana sendo uma alternativa para o controle do mal-do Panamá;
- As nanoquitosanas, de um modo geral, não apresentaram efeito contra o patógeno em estudo, com exceção para o experimento de esporulação, o qual obteve resultados expressivos na redução deste no patógeno;
- São necessários mais estudos sobre a ação das nanopartículas de quitosana fúngica, para determinar a sua eficiência antifúngica e seu uso como alternativa a quitosana de crustáceos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALCATARA, S. R. C. **Utilização de quitosana como biocida na agricultura em substituição aos agrotóxicos.** Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento e Meio Ambiente) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa - PB, 2011.

ALVES, K. S. **Alquilação redutiva da quitosana a partir do glutaraldeído e 3-amino-1-propanol.** Dissertação (Mestrado em Química). Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 97p. 2008.

ARNAUD, T. M. S. **Preparação, caracterização e aplicações de nanocompósitos de Quitosana/Quantum Dots fluorescentes.** Tese (Doutorado em Ciências de Materiais) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife – PE, 183 p., 2012.

AUSTIN, R. R.; BRINE, C. J.; CASTLE, J. E.; ZIKAKIS, J. P. Chitin: New facets of research. *Science*, 212, p. 744-753, 1981. *In*: AMORIM, R. V. da S.; SOUZA, W. de; FAKUSHIMA, K.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. de. Faster chitosan production by Mucoralean strains in submerged culture. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 32, p. 20-23, 2001.

AZEVEDO, V. V. C.; CHAVES, S. A.; BEZERRA, D. C.; LIA FOOK, M. V.; COSTA, A. C. F. M. Quitina e Quitosana: aplicações como biomateriais. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 2.3, p. 27-34, 2007.

BADAWY, M. E. I. & RABEA, E. I. Potential of the biopolymer chitosan with different molecular weights to control postharvest gray mold of tomato fruit. **Postharvest Biology and Technology**, V. 51, P. 110–117, 2009.

BARBOSA, C. C.; MONTEIRO, A. C.; CORREIA, A. C. B. E PEREIRA, G. T. Crescimento e esporulação de isolados de *Verticillium lecanii* sob diferentes condições nutricionais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, p. 821-829, 2002.

BAUTISTA-BAÑOS, S.; HERNÁNDEZ-LÓPEZ, M. and BOSQUEZ-MOLINA, E. Growth Inhibition of Selected Fungi by Chitosan and Plant Extracts. **Revista Mexicana de Fitopatología**, v. 22, p. 178-186, 2004.

BENHAMOU, N. Elicitor-induced plant defence pathways. **Trends in Plant Science**, v. 1, p. 233-240, 1996.

BERGER, L. R.; STAMFORD, T. C.; STAMFORD-ARNAUD, T. M.; DE ALCÂNTARA, S. R.; DA SILVA, A. C.; DA SILVA, A. M.; DO NASCIMENTO, A. E.; DE CAMPOS-TAKAKI, G. M. Green conversion of agroindustrial wastes into chitin and chitosan by *Rhizopus arrizus* and *Cunninghamella elegans* strains. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, p. 9082-9102, 2014.

BERGER, L. R. R.; STAMFORD, T. C. M.; STAMFORD, N. P. Perspectivas para o uso da quitosana na agricultura. **Revista Iberoamericana de Polímeros**, v. 12, n. 4, p. 1-21, 2011.

BERGER, L. R. R. **Efeito da quitosana e do biofertilizante-bioprotetor na murcha-de-fusário em caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp)**. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo). Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 75p. 2010.

BLANCO, M. A. **Avaliação da incorporação de nanopartículas de quitosana ao cimento endodôntico AH PLUS™**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Metalúrgica e de Materiais) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro – RJ, 2011.

BOONLERTNIRUN, S.; BOONRAUNG, C. and SUVANASARA, R. Application of Chitosan in Rice Production. **Journal of Metals, Materials and Minerals**, v.18, n.2, p. 47-52, 2008.

BUGNICOURT, L.; ALCOUFFE, P.; LADAVIÈRE, C. Elaboration of chitosan nanoparticles: Favorable impact of a mild thermal treatment to obtain finely divided, spherical, and colloidally stable objects. **Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects**, v. 457, p. 476–486, 2014.

CALVO, P.; REMUÑÁN-LÓPES, C.; VILA-JATO, J. L. and ALONSO, M. J. Novel Hydrophilic Chitosan-Polyethylene Oxide Nanoparticles as Protein Carriers. **Journal of Applied Polymer Science**, v.63, p. 125-132, 1997.

CHITTENDEN, C. & SINGH, T. *In vitro* evaluation of combination of *Trichoderma harzianum* and chitosan for the control of sapstain fungi. **Biological Control**, V. 50, P. 262–266, 2009.

COQUEIRO, D. S. O. & DI PIERO, R. M. Atividade de quitosanas com diferentes pesos moleculares sobre *Alternaria solani*. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v.78, p.459-463, 2011.

CORDEIRO, Z. J. M.; MATOS, A. P.; MEISSNER FILHO, P. E. Doenças e Métodos de Controle. *In*: BORGES, A. L.; SOUZA, L. S., editores. **O Cultivo da Banana**. Crus das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, p. 146-182, 2004.

DIAS, K. B.; SILVA, D. P.; FERREIRA, L. A.; FIDELIS, R. R.; COSTA, J. L.; SILVA, A. L. L.; SCHEIDT, G. N. Chitin and chitosan: Characteristics, uses and production current perspectives. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 4, n.3, p. 184-191, 2013.

DI PIERO, R. M. E GARDA, M. V. Quitosana reduz a severidade da antracnose e aumenta a atividade de glucanase em feijoeiro-comum. **Pesq. agropec. bras.**, v.43, n.9, p.1121-1128, 2008.

DEEPMALA, K.; HEMANTARANJAN, A.; BHARTI, S.; NISHANT BHANU, A. A Future Perspective in Crop Protection: Chitosan and its Oligosaccharides. **Advances in Plants & Agriculture Research**, v. 1, p. 1-8, 2014.

EL HADRAMI, A.; ADAM, L. R.; EL HADRAMI, I. AND DAAYF, F. Chitosan in Plant Protection. **Marine Drugs**, v. 8, p. 968-987, 2010.

FAI, A. E. C.; STAMFORD, T. C. M.; STAMFORD-ARNAUD, T. M.; SANTA-CRUZ, P. D.; DA SILVA, M. C. F.; CAMPOS-TAKAKI, G. M.; STAMFORD, T. L. M. Physico-Chemical Characteristics and Functional Properties of Chitin and Chitosan Produced by *Mucor circinelloides* Using Yam Bean as Substrate. **Molecules**, v. 16, p. 7143-7154, 2011.



FENG, W.; ZHENG, X. Essential oils to control *Alternaria alternata* *in vitro* and *in vivo*. **Food Control**, v. 18, p. 1126–1130, 2007.

FILIPINI, R. B. **AVALIAÇÃO DE QUITOSANA PARA O CONTROLE DA PODRIDÃO AMARGA DA MACIEIRA**. Monografia (Engenharia Agrônômica) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis - SC, 2008.

FRANCO, L. de O.; STAMFORD, T. C. M.; STAMFORD, N. P.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. de. *Cunninghamella elegans* (IFM 46109) como fonte de quitina e quitosana. **Revista Analytica**, n. 14, 40-44, 2005.

FRANCO, L. de O. **Biorremocão de Metais Pesados por Quitina e Quitosana Obtidos de *Cunninghamella elegans* (IFM 46109)**. 2000. Dissertação de Mestrado, Recife, Brasil, Universidade Federal de Pernambuco, 2000

GURGEL, L. M. S.; ROSA, R. C. T.; COELHO, R. S. B. Doenças. *In*: SILVA JUNIOR, J. F.; LOPES, G. B. M.; FERRAZ, L. G. B., editores. **Sistema de Produção de Banana para a Zona da Mata de Pernambuco**. Aracajú: Embrapa Tabuleiros Costeiros, Recife: IPA, p. 75-94, 2010.

HERNÁNDEZ-LAUZARDO, A. N.; BAUTISTA-BAÑOS, S.; VELÁZQUEZ-DEL VALLE, M. G.; MÉNDEZ-MONTEALVO, M. G.; SÁNCHEZ-RIVERA, M. M.; BELLO-PÉREZ, L. A. 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, 2008.

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

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola**. Rio de Janeiro, v.29, n.4, p.1-81, 2015.

KASHYAP, P. L.; XIANG, X.; HEIDEN, P. Chitosan nanoparticle based delivery systems for sustainable agriculture. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 77, p. 36-51, 2015.

KONG M.; CHEN, X. G.; LIU, C. S.; LIU, C. G.; MENG, X. H.; YU LE, J. Antibacterial mechanism of chitosan microspheres in a solid dispersing system against *E. coli*. **Colloids and surfaces B. Biointerfaces**. V. 65, p. 197–202, 2008.

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

MILIOLI, C. C. **Avaliação da atividade antimicrobiana da Quitosana em pó dopada com prata**. 2011. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2011.

NASCIMENTO, J. I. G. **Atividade antifúngica da quitosana na expansão da vida de prateleira de goiaba minimamente processada**. Dissertação (Mestrado em Nutrição) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife - PE, 2013.

NEVES, A. C.; SCHAFFNER, R. A.; KUGELMEIER, C. L.; WIEST, A. M.; ARANTES, M. K. Otimização de processos de obtenção de quitosana a partir de resíduo da carcinicultura para aplicações ambientais. **Revista Brasileira de Energias Renováveis**, v. 2, p. 34-47, 2013.

PAIVA, W. S.; SOUZA NETO, F. E.; BATISTA, A. C. L. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DA QUITOSANA FÚNGICA. **Perspectiva online: Biologia & Saúde**, Campos dos Goytacases, v. 13, p. 37-43, 2014.

PEDRO, A. S.; SÃO PEDRO, A.; CABRAL-ALBUQUERQUE, E.; FERREIRA, D.; SARMENTO, B. Chitosan: na option for development of essencial oil delivery systems for oral cavity care? *Carbohydrate Polymers*, v. 76, p. 501-508, 2009.

QI, L.; XU, Z.; JIANG, X.; HU, C. and ZOU, X. Preparation and antibacterial activity of chitosan nanoparticles. **Carbohydrate Research**, v. 339, p. 2693–2700, 2004.

RINALDO, M. Chitin and chitosan: properties and applications. **Progress in Polymer Science**, v. 31, p. 603-632, 2006.

SANTOS, J. E.; SOARES, J. P.; DOCKAL, E. D.; CAMPANA FILHO, S. P.; CAVALHEIRO, E. T. G. Caracterização de Quitosanas Comerciais de Diferentes Origens. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, vol. 13, p. 242-249, 2003.

SAS Institute. The SAS 9.2 software. System for Windows. CD-ROM for Windows. 2011.

SHARMA, N.; TRIPATHI, A. Effects of *Citrus sinensis* (L.) Isbeck epicarp essential oil on growth and morphogenesis of *Aspergillus niger*. **Microbiological Research**, v.163, n.3, p.337-344, 2008.

SHI, Z.; NEOH, K. G.; KANG, E. T.; WANG, W. Antibacterial and mechanical properties of bone cement impregnated with chitosan nanoparticles. **Biomaterials**, v. 27, p. 2440-2449, 2006.

SHIGEMASA, Y. & MINAMI, S. Applications of chitin and chitosan for biomaterials. **Biotechnology & Genetic Engineering Reviews**, v. 17, p. 383-420, 1996.

SIGNINI, R.; DESBRIÈRES, J.; CAMPANA FILHO, S. P. On the stiffness of chitosan hydrochloride in acid-free aqueous solutions. **Carbohydrate Polymers**, V. 43, p. 351–357, 2000.

SILVA, J. F. M.; PRADO, G.; MADEIRA, J. E. G. C.; OLIVEIRA, M. S.; FARACO, A. A. G.; MALTA, C. M.; NICOLI, J. R.; PIMENTA, R. S. Utilização de filme de quitosana para o controle de aflatoxinas em amendoim. **Bragantia**, Campinas, 2015.

SILVA JUNIOR, W. J. **MANEJO DA FUSARIOSE DA BANANEIRA UTILIZANDO *Trichoderma* sp. E ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Lippia sidoides***. 2014. 60 f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal Federal Rural de Pernambuco, Recife. 2014.

SILVA JUNIOR, J. F. da; LOPES, G. M. B.; FERRAZ, L. G. B. **Sistema de Produção de Banana para a Zona da Mata de Pernambuco**. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, Recife: IPA, 2010, 140 p.

SILVA, A. C. **Produção de quitina e quitosana em culturas submersas de *Rhizopus arrhizus* nos meios milhocina e sintético para Mucorales.** Dissertação (Mestrado) – Universidade Católica de Pernambuco. 97f – Recife, 2007.

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

STREIT, F. **Estudo do aproveitamento do bagaço de maçã para produção de quitosana fúngica.** Dissertação (Mestrado) em Engenharia de Alimentos. Florianópolis, 2004.

TAJDINI, F.; AMINI, M. N.; NAFISSI-VARCHEH, N.; FARAMARZI, M. A. Production, physicochemical and antimicrobial properties of fungal chitosan from *Rhizomucor miehei* and *Mucor racemosus*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 47, p. 180–183, 2010

VELÁSQUEZ, C. L. Algunos usos del quitosano em sistemas acuosos. **Revista Iberoamericana de Polímeros**, v.4, p. 91, 2003.

XIA, W.; LIU, P.; ZHANG, J.; CHEN J. Biological activities of chitosan and chitooligosaccharides. **Food Hydrocolloids**, v. 25, p. 170–179, 2011.

YANG, H. C.; WANG, W. H.; HUANG, K. S.; HON, M. H. Preparation and application of nanochitosan to finishing treatment with anti-microbial and anti-shrinking properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 79, p. 176-179, 2010.

## **CAPÍTULO III**

### **EFEITO DO BIOPROTETOR E DA QUITOSANA FÚNGICA NO CONTROLE DO MAL-DO-PANAMÁ EM BANANEIRA**

## EFEITO DO BIOPROTETOR E DA QUITOSANA FÚNGICA NO CONTROLE DO MAL-DO-PANAMÁ EM BANANEIRA

### RESUMO

O bioprotetor (PNPK), formado a partir do biofertilizante de rocha misto, inoculado com o fungo *Cunninghamella elegans*, que possui quitina e quitosana em sua parede celular e a adição de quitosana aumenta a disponibilidade de nutrientes, especialmente P e N, além de acrescentar ao material, propriedade antifúngica. As bananeiras são relativamente exigentes quanto ao cultivo. No entanto a cultura é afetada por um grande número de doenças, e dentre elas merece destaque o mal-do-Panamá, que é uma doença endêmica distribuída por todas as regiões produtoras do mundo, e que provoca perdas elevadas no campo. Deste modo o trabalho tem como objetivo principal avaliar o efeito da quitosana e do bioprotetor (PNPK) no controle de fitopatógeno, bem como observar o status nutricional de mudas de banana (variedade Williams (resistente) e variedade Maçã (altamente suscetível)). Também foram avaliados os efeitos do referido insumo em atributos químicos do solo. O experimento foi conduzido em casa de vegetação da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), usando vasos (capacidade 2,0 kg) com solo Argissolo Vermelho Amarelo (1,5 kg vaso<sup>-1</sup>). No plantio foi utilizada uma planta por vaso, sendo aplicados os tratamentos de adubação 30 dias antes da inoculação do patógeno. O delineamento experimental adotado foi em blocos casualizados, com arranjo fatorial 4 x 2 x 2 (quatro tratamentos de adubação; duas variedades de banana com e sem o fungo patogênico *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* (FOC)) com 3 blocos. As mudas de banana foram colhidas 40 dias após a inoculação do patógeno e avaliadas as seguintes variáveis: índice de severidade da doença, biomassa seca da parte aérea, análise de N, P e K das plantas e análise dos atributos químicos do solo. O resultado do experimento demonstrou que a aplicação do bioprotetor PNPK2 (150% da dose recomendada) e PNPK2+Q (150% da DR acrescido de quitosana) resultaram no menor índice de severidade da doença, mal-do-Panamá, nas plantas inoculadas com FOC. Os melhores resultados de N, P e K da parte aérea foram com o PNPK2 e o PNPK2+Q, independente da variedade, e os resultados dos atributos químicos do solo, também, alcançaram os maiores valores para os teores de K disponível, Ca e Mg trocável, quando receberam o PNPK2 e PNPK2+Q, com exceção para os teores de P que apresentou seus melhores resultados com o tratamento PNPK1 (100% da DR). Deste modo o bioprotetor pode ser uma possível opção para redução da severidade do mal-do-Panamá, além de poder ser fonte alternativa de nutrientes.

**Palavras-chave:** Banana; fonte de nutrientes; *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*; PNPK; var. Maçã; var. Williams.

## EFFECTS OF BIOPROTECTOR AND FUNGIC CHITOSAN ON CONTROL OF THE PANAMÁ DISEASE ON BANANA CROP

### ABSTRACT

The bioprotector (PNPK) produced from PK rock biofertilizers mixed with organic matter (earthworm compost) inoculated with the fungus *Cunninghamella elegans*, that contain chitin and chitosan in the cellular walls. This biopolymer increases nutrients availability, especially N and P, and also promotes antifungic characterist for plants supplied with the bioprotector. The banana is relatively demanding in nutrients for normal plant growth and yield. However, the banana crop is affect by various plant diseases, and one of the most important for banana is the Panamá disease very distributed in the world and promotes great losses in field conditions. Thus the study aimed to evaluate the effect of chitosan and of the bioprotector (PNPK) in the control of the phytopatogen, as well as to observe the nutritional status of banana seedlings (cultivar “Williams”- resistant and cultivar “maça”– susceptible to the Panamá disease). Also, the work objective to evaluate the effects in soil chemical attributes. The experiment was conducted in a greenhouse at the University Federal Rural of Pernambuco (UFRPE), using pots (2 kg) with a Red Yellow Argissoil (1.5 kg vaso<sup>-1</sup>). One seedling per pot was used and applied the fertilizer treatments and after thirty days of growth applied the plant pathogen *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* (FOC). The experiment was conducted in a factorial 4x2x2, in the completely randomized design, with 3 replications. Were used four fertilizer treatments, two cultivars with and without FOC. The banana seedlings were collected with fourty days of growth after pathogen inoculation. In plant harvest were evaluated: Index of disease severity, shoot dry biomass, total N, P and K in shoot dry biomass and analyzed soil chemical attributes. The results demonstrate the higher effect of the bioprotector (PNPK2) applied in rate 150% of recommended rate (RR) and PNPK2+Q (150% RR with chitosan) and this treatment showed low index of disease severity for Panamá disease. The Best results for total N, P and K in shoot dry matter were obtained with PNPK2 and PNPK2+Q, independent of the cultivar. The results of the soil chemical analyzes (available K, exchangeable Ca and Mg) showed that higher values when applied the treatment PNPK2 and PNPK2+Q, except for available P that presented higher values with the tratment PNPK1 (100% RR). Thus, we may conclude that the bioprotector may be viable potential to be applied for reduction of the Panana disease and alternative for nutrient support.

**Keywords:** Banana; nutritional status; *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*; PNPK; cv. Maçã; cv. Williams.

## INTRODUÇÃO

O estudo do uso de novos insumos com potencial agrícola é de grande interesse quando se pensa em uma agricultura sustentável (STAMFORD et al., 2005). Pois, trata-se de uma alternativa para a substituição dos adubos convencionais (fertilizantes minerais solúveis) (STAMFORD et al., 2008), que têm altos custos e são bastante agressivos aos solos (SANCHEZ, 2002). Biofertilizantes de rocha fosfatada (BP) e potássica (BK) já demonstraram eficiência agrônômica em diferentes culturas (STAMFORD et al., 2011; STAMFORD et al., 2016).

Devido aos biofertilizantes de rochas não disponibilizarem N para as plantas, foi iniciada a produção de biofertilizante misto (BNPK), usando biofertilizante de rochas (BP e BK) em mistura com materiais orgânicos (húmus de minhoca, resíduos de frutas, bebidas entre outros), inoculados com bactérias diazotróficas de vida livre, que promove enriquecimento do produto em N, através do processo de fixação biológica de N<sub>2</sub> (LIMA et al., 2010).

Sendo o bioprotetor (PNPK), formado a partir do BNPK, inoculado com o fungo *Cunninghamella elegans*, que possui quitina e quitosana em sua parede celular e também é capaz de solubilizar polifosfato inorgânico (FRANCO et al., 2011), que promovem aumento no teor de fósforo. E de acordo com Berger et al. (2011) e Franco et al. (2011) a adição de *C. elegans* aumenta a disponibilidade de nutrientes, especialmente P e N, acrescentando ao material propriedade antifúngica.

A banana (*Musa* spp.) é uma das frutas mais relevantes no que se refere à produção e à comercialização em todo o mundo (FIORAVANÇO, 2003). A produção de banana no Brasil em 2015 alcançou valores de 7.160.265 t, e o rendimento médio ficou em torno de aproximadamente 14,5 t ha<sup>-1</sup> (IBGE, 2015). Trata-se de uma das mais importantes espécies frutíferas cultivadas em Pernambuco, e a de maior expressão econômica e social para a Zona da Mata do estado (SILVA JUNIOR et al., 2010).

As bananeiras são relativamente exigentes quanto ao cultivo (MARTINS & FURLANETO, 2008). Vale salientar que é necessário levar em consideração algumas características do solo, como topografia, profundidade, textura, estrutura e fertilidade (MARTINS & FURLANETO, 2008; SILVA et al., 2010).



No que se refere à ocorrência e resistência às doenças, o cultivo da bananeira é afetado por um grande número de doenças, sejam causadas por fungos, bactérias, vírus ou nematoides, prejudicando a produção e a qualidade dos frutos (GURGEL et al., 2010). E dentre as doenças merece destaque o mal-do-Panamá, que é uma doença endêmica distribuída por todas as regiões produtoras do mundo, e que provoca perdas elevadas no campo, sendo a banana “Williams” resistente, enquanto a banana “Maçã” é considerada altamente suscetível (CORDEIRO et al., 2004; GURGEL et al., 2010).

Deste modo o trabalho tem como objetivo principal avaliar o efeito da quitosana e do bioprotetor (PNPK) no controle do fitopatógeno *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*, bem como observar o status nutricional de mudas de banana (variedade Williams - resistente e variedade Maçã - altamente suscetível). Também serão avaliados os efeitos do referido insumo em atributos químicos do solo.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Local do experimento, solo e fertilizantes utilizados**

O experimento foi conduzido na casa de vegetação da Universidade Federal Rural de Pernambuco, UFRPE, em Recife-PE, em vasos (capacidade 2,0 kg), contendo o solo Argissolo Vermelho Amarelo (EMBRAPA Solos, s.d.) (1,5 kg vaso<sup>-1</sup>) com pH 5,4. O solo foi coletado a uma profundidade de 0-20 cm, na Estação Experimental de Cana-de-açúcar do Carpina (EECAC), Carpina-PE, 07° 51' 03" S e 35° 15' 17" W a uma altitude de 184 m (BELTRÃO et al., 2005). O clima do município do Carpina, segundo a classificação de Koppen é predominante As', Tropical Chuvoso com verão seco (BELTRÃO et al., 2005). As amostras foram peneiradas (2,0 mm de diâmetro), homogeneizadas e analisadas quanto às características físicas e químicas (Tabela 1) de acordo com a metodologia da EMBRAPA (2009), no Laboratório de Fertilidade e de Física do Solo do Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA).

**Tabela 1.** Características químicas e físicas do Argissolo Vermelho Amarelo da Estação Experimental de Cana-de-açúcar do Carpina (EECAC), no município do Carpina, PE.

Área	Características Químicas								pH H <sub>2</sub> O 1:2,5
	P	Ca	Mg	K	Na	Al	H	CTC	
	mg dm <sup>-3</sup>	Cmolc dm <sup>-3</sup>							
<b>Carpina – PE</b>	4,6	2,6	1,55	0,14	0,04	0,05	3,82	8,2	5,4

Área	Características Físicas					Umidade Residual %	ds*	dp** g cm <sup>-3</sup>
	Granulometria (%)							
	Areia Grossa	Areia Fina	Silte	Argila				
<b>Carpina – PE</b>	55	23	5	17		1,2	1,41	2,53

\*Densidade do solo (ds), \*\*Densidade da partícula (dp).

Antes de instalar o experimento, o bioprotetor (BNPK) utilizado como fonte de fertilizante natural, foi analisado quanto às características químicas (Tabela 2) de acordo com a metodologia recomendada pela EMBRAPA (2009) no Laboratório de Fertilidade e de Física do Solo do Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA).

**Tabela 2.** Caracterização química do bioprotetor (PNPK).

Material	P	N	Ca	Mg	K	CTC	pH
	mg dm <sup>-3</sup>	g kg <sup>-1</sup>	Cmolc dm <sup>-3</sup>				H <sub>2</sub> O 1:2,5
<b>BNPK</b>	1.350	7,5	55,5	13,8	1,4	73,8	6,5

A mistura de fertilizante NPK solúvel (FNPK) foi composta pelos fertilizantes convencionais sulfato de amônio (20% N), superfosfato simples (20% P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) e sulfato de potássio (50% K<sub>2</sub>O), seguindo a recomendação do IPA (2008) para banana, sendo o cálculo da quantidade a aplicar realizado de acordo com a análise do solo.

## Obtenção das mudas

Foram utilizados duas variedades de bananeira, uma altamente suscetível (Maçã) e uma resistente (Williams) ao mal-do-Panamá causado pelo fungo patogênico *Fusarium oxysporum* f. sp. *Cubense* (FOC).

As mudas da variedade Maçã utilizadas foram mudas micropropagadas de bananeira, produzidas e cedidas pela Biofábrica CAMPO – CPA / Embrapa Mandioca e Fruticultura, situada em Cruz das Almas (BA). As mudas foram obtidas por meio de cultura de meristema a partir de plantas do pomar da Embrapa, de acordo com o protocolo utilizado na rotina de produção. As mudas utilizadas estavam com trinta dias, e apresentavam, em média 3 folhas, e passaram por um período de aclimatação de 30 dias, sendo irrigadas para manutenção da umidade.

As mudas da variedade Williams foram provenientes do rizoma da planta mãe, coletadas no bananal cultivado no campo da EECAC. As mudas se encontravam no tamanho de mudas do tipo rebento (com 20 a 30 cm de altura).

## Delineamento experimental

O delineamento experimental adotado foi em blocos casualizados, com arranjo fatorial 4 x 2 x 2 (quatro tratamentos de adubação; duas variedades de banana com e sem FOC) com 3 repetições.

Foram testados os seguintes tratamentos: (1) F<sub>100</sub> = FNPk na dose recomendada (DR); (2) P<sub>100</sub> = bioprotetor (PNPK) na DR; (3) P<sub>150</sub> = PNPK 150% da DR; (4) P<sub>150Q</sub> = PNPK 150% da DR + adição de quitosana (10 vezes a Concentração Inibitória Mínima (CIM), determinada nos experimentos *in vitro*).

Para os tratamentos de adubação o tratamento controle foi o fertilizante mineral solúvel, já em relação a patogenicidade do fungo, para os tratamentos com inoculação do patógeno, os controles foram todos os tratamentos que não receberam a inoculação do fungo.

A base dos tratamentos foi a utilização do PNPK, que é constituído de rocha potássica e rocha fosfatada, acrescida de enxofre elementar (10%) e inoculados com bactéria *Acidithiobacillus thiooxidans* (fontes diretas de potássio e de fósforo e indiretas de magnésio e de cálcio, respectivamente).

Com posterior acréscimo de matéria orgânica e inoculação com a bactéria diazotrófica de vida livre (fonte de nitrogênio), enriquecida com resíduo de sorvete (fonte carbono (energia)) para proporcionar melhor crescimento das bactérias diazotróficas de vida livre. Com adição, também, da massa micelial do fungo *Cunninghamella elegans* que além de disponibilizar nutrientes apresenta propriedade antifúngica.

### **Obtenção e preparo da quitosana**

A quitosana utilizada na caracterização e nos ensaios foi a KiOnutrime® - CsG, obtida e extraída do fungo *Aspergillus niger*, cedida pela empresa KitoZyme S. A., localizada na Bélgica.

Para a aplicação da quitosana no experimento, a mesma foi solubilizada em ácido acético 1% (v/v), para obtenção de uma solução mãe de 10 mg mL<sup>-1</sup>, com pH ajustado entre 5,5 e 5,8 usando NaOH 30%. A solução mãe foi colocada sob agitação constante em overnight, para obtenção do gel de quitosana (SHIGEMASA & MINAMI, 1996).

### **Obtenção e inoculação do patógeno**

O patógeno utilizado nos experimentos foi o fungo *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* (FOC) causador do Mal-do-Panamá, isolado AM M, tendo como identificação morfológica o código NF9UTN3C015 (SILVA JÚNIOR, 2014), obtido da Coleção do Laboratório de Fitopatologia do Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA). A estirpe foi mantida em meio de cultivo batata, dextrose e ágar (BDA) e estocada sob refrigeração (4°C).

O isolado de *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* (AM M) foi crescido em meio líquido de Armstrong (ARMSTRONG & ARMSTRONG, 1948) por 20 dias, a uma temperatura de 28 °C, sob uma agitação mecânica constante de 120 rpm.

Ao final deste período, procedeu-se a contagem dos esporos em câmara de Neubauer, onde se mediu a concentração de esporos mL<sup>-1</sup>, para posterior inoculação nos vasos. Desse modo, o inóculo aplicado no experimento foi de 2,8 x 10<sup>6</sup> esporos mL<sup>-1</sup>. Em cada vaso contendo uma planta recebeu o

tratamento com 20 mL da suspensão esporica do FOC, próximo ao pseudocaule das mudas, 72 horas após o corte das raízes.

### **Condução do experimento**

No plantio foi utilizada uma planta por vaso. As mudas da variedade Maçã foram transferidas para os vasos com o solo (1,5 kg vaso<sup>-1</sup>) até atingirem de 20 a 30 cm de altura. Trinta dias após a transferência das mudas da variedade Maçã, foram trazidas e transplantadas, também, para os vasos as mudas da variedade “Williams” do tipo rebento, e então foram aplicados os tratamentos de adubação.

Após 30 dias as plantas foram removidas cuidadosamente do solo e suas raízes lavadas em água corrente, para retirada do excesso de solo e em seguida cortadas a 7-10 cm da base (para criar condições de entrada do fungo), e a seguir as mudas foram retornadas para os vasos. Todas as plantas do experimento, inclusive as usadas como testemunhas do fungo foram submetidas ao mesmo procedimento, para serem dadas as mesmas condições para todos os tratamentos.

Em cada vaso que recebeu os tratamentos com quitosana foram aplicados 10 mL da solução mãe de quitosana próximo ao pseudocaule das mudas, 24 horas após o corte das raízes. Com 72 horas após o corte das raízes, nas mudas que receberam o tratamento com FOC, foram aplicados 20 mL da suspensão esporica, próximo ao pseudocaule. Após a inoculação com FOC as plantas foram mantidas por 40 dias em de casa-de-vegetação, sendo irrigadas diariamente, para manutenção da umidade (SANTOS, 2010).

Aos 40 dias após a inoculação do patógeno, as mudas foram coletadas, separando-se a parte aérea do sistema radicular na região do colo. O sistema radicular foi utilizado para análise da patogenicidade do fungo FOC, por meio de escalas de nota e os sintomas internos foram avaliados de acordo com Silva Júnior (2014) adaptado de Mohamed et al. (1993). A escala variou de 1 a 6 onde: 1 = ausência de descoloração nos rizomas, planta sadia; 2 = pontos isolados de descoloração no rizoma; 3 = descoloração de até 25% do rizoma; 4 = descoloração entre 25 e 50% do rizoma; 5 = descoloração superior a 50% do rizoma; e 6 = descoloração total do rizoma ou planta morta.

A parte aérea das plantas foi acondicionada em sacos de papel, deixados em estufa de circulação forçada, a 65°C, durante 72 horas, para posteriormente se proceder à avaliação da MSPA. A parte aérea foi pesada para obtenção da MSPA, e em seguida o material foi moído para posterior análise de N, P e K na parte aérea das plantas, de acordo com as recomendações da Embrapa (2009). As amostras foram submetidas à digestão nitro - perclórica, e nos extratos determinou-se: P com molibdato de amônio e ácido ascórbico, pelo método colorimétrico; K por fotometria de chama. A análise de N total da parte aérea, foi realizada pelo método de Kjeldhal semi-micro (TEDESCO et al., 1995). Estas análises foram determinadas no Laboratório de Biotecnologia Ambiental na Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE).

As amostras de solo foram secas ao ar e passadas em peneira de 2 mm, obtendo-se a terra fina seca ao ar (TFSA) utilizada para as determinações químicas no Laboratório de Biotecnologia Ambiental na Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE). As análises de solo foram realizadas de acordo com a metodologia da Embrapa (2009), sendo o pH em água (H<sub>2</sub>O 1:2,5) determinado por potenciometria, utilizando o pHmetro (modelo mPA-210); o P e o K disponíveis foram extraídos pela solução extratora (Mehlich 1), sendo o K determinado por fotometria de chama e o P por colorimetria; Ca e Mg trocáveis foram extraídos com solução extratora de KCl 1 mol L<sup>-1</sup> e determinados por espectrofotometria de absorção atômica.

### **Análises estatísticas**

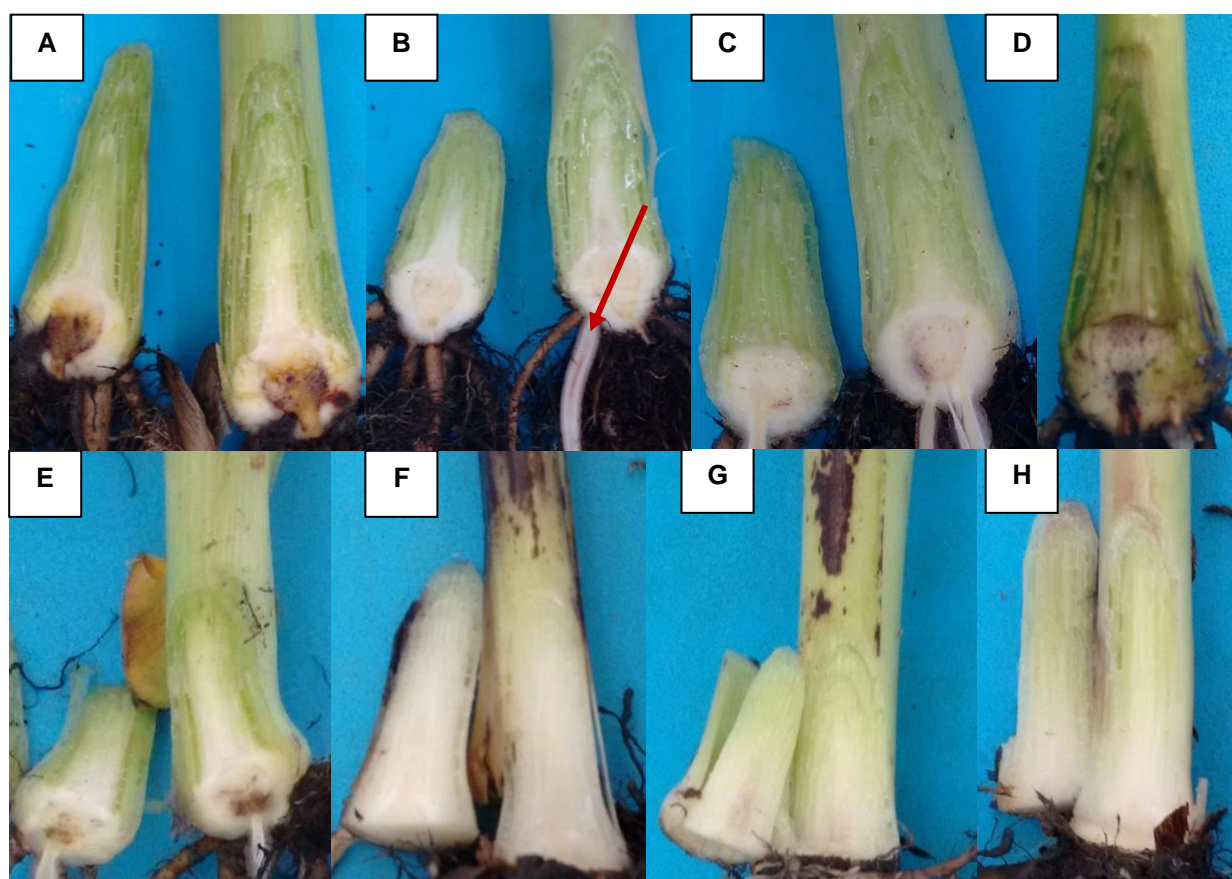
Os dados obtidos nas análises químicas da planta e do solo e o índice de severidade da doença foram analisados pelo programa estatístico SAS versão 9.2 (SAS Institute 2011), sendo realizada a ANOVA, e o teste comparativo de médias que tomou como base o Tukey ( $p < 0,05$ ).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Análise da severidade da doença mal-do-Panamá na banana

Os resultados visualizados na Figura 1 demonstram que houve a infecção da planta com conseqüente aparecimento dos sintomas com maior expressão na variedade Maçã, que é altamente susceptível embora tenham ocorrido na variedade Williams, que é considerada resistente ao patógeno.

O desenvolvimento dos sintomas internos nas plantas inoculadas evidencia que o método de inoculação foi eficiente, já que o desenvolvimento de sintomas é considerado evidência de infecção bem sucedida.



**Figura 1** – Efeito dos tratamentos de fertilizante mineral (FNP na dose recomendada (DR)) e bioprotetor (PNP1=bioprotetor na DR; PNP2=150% da DR), acrescido de quitosana fúngica. A: FNP+FOC\* (Maçã=M); B: PNP2+Q+FOC (M); C: PNP2+FOC (M); D: PNP1+FOC (M); E: FNP+FOC (Williams=W); F: PNP2+Q+FOC (W); G: PNP2+FOC (W) e H: PNP1+FOC (W). \**Fusarium oxysporum* f.sp. *cabense* (FOC).

No entanto, não foi possível observar e nem avaliar os sintomas externos das plantas, pois as mesmas não chegaram a expressar este tipo de sintoma. O fato ocorrido pode ser típico do isolado em questão (AM M), já que os mesmos resultados foram observados por Silva Júnior, (2014), que verificou na variedade Maçã que o isolado AM M promoveu os sintomas internos ao contrário dos sintomas externos, ou seja, foi possível ver que não havia qualquer tipo de sintoma externo perceptível, mesmo a planta estando internamente comprometida.

Também pode ser considerado que o tempo de desenvolvimento do fungo na planta, desde a infecção até chegar à murcha da planta e consequente morte da mesma, seja maior que o decorrido no experimento (40 dias). Deve ser observado que o tempo no trabalho foi uma média do usado em testes desse porte.

Os valores na Tabela 3 mostram que a aplicação do bioprotetor PNPk2 e PNPk2+Q resultaram no menor índice de severidade da doença, mal-do-Panamá, nas plantas inoculadas com *Fusarium oxysporum* f.sp. *ubense* (FOC), apresentado diferença significativa em comparação à fertilização mineral.

**Tabela 3.** Índice de severidade da doença mal-do-Panamá (%) em mudas de banana altamente suscetível (variedade Maçã) e resistente (variedade Williams) inoculadas com *Fusarium oxysporum* f.sp. *ubense* (isolado AM M) coletadas 40 dias após a inoculação.

Tratamento* Fungo	----- Maçã -----		----- Williams -----	
	Com	Sem	Com	Sem
	.....Sintomas Internos.....		.....Sintomas Internos.....	
<b>FNPk</b>	4,00 Bb	1,00 Aa	2,00 Aba	1,00 Aa
<b>PNPk 1</b>	2,33 ABab	1,00 Aa	1,00 Aa	1,00 Aa
<b>PNPk 2</b>	1,33 Aa	1,00 Aa	1,00 Aa	1,00 Aa
<b>PNPk 2 + Q</b>	1,33 Aa	1,00 Aa	1,00 Aa	1,00 Aa
<b>C. V. (%)</b>	45,79		49,45	

Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. As letras maiúsculas representam as comparações entre cultivares e as minúsculas indicam as comparações entre tratamentos. Tratamento\*: Fertilizante mineral (FNPk na dose recomendada (DR)), bioprotetor (PNPk1=bioprotetor na DR; PNPk2=150% da DR), acrescido de quitosana fúngica (Q).



O bioprotetor é composto de biofertilizante de rochas potássica e fosfatada acrescido de matéria orgânica e inoculado com bactéria fixadora de N (diazotrófica de vida livre), além de ser inoculado com biomassa de fungo (*Cunninghamella elegans*) que contém quitosana em sua parede celular (FRANCO et al., 2004; 2005) podendo atuar como substância fungicida e/ou fungioestática (STAMFORD et al., 2007).

Provavelmente, a biomassa do fungo *C. elegans* aplicada ao biofertilizante para a produção de bioprotetor, através da acidez promovida por bactéria oxidante de enxofre do gênero *Acidithiobacillus* foi o que promoveu a desacetilação da quitina (também presente na parede celular do fungo) formando quitosana, conforme visto em Santana et al. (2014).

Em relação à quitosana aplicada diretamente ao solo, como a mesma não apresentou diferença significativa entre os tratamentos, o que pode ter ocorrido é que a dose (10 mL) ou a concentração (10 mg mL<sup>-1</sup>) tenha sido inferior ao necessário. Embora, a concentração tenha sido aplicada com base ao encontrado em experimentos *in vitro*, e como, geralmente, teste no combate de fungo *in vivo*, são realizados ao menos em uma concentração 10 vezes superior ao avaliado *in vitro*.

Pode ter ocorrido também, que a forma de aplicação da quitosana não tenha sido eficiente, já que a mesma foi aplicada diretamente ao solo, assim como foi aplicado posteriormente o fungo patógeno FOC, que é um fungo de solo. Logo, são necessários mais estudos para obter um melhor aproveitamento do uso da quitosana fúngica.

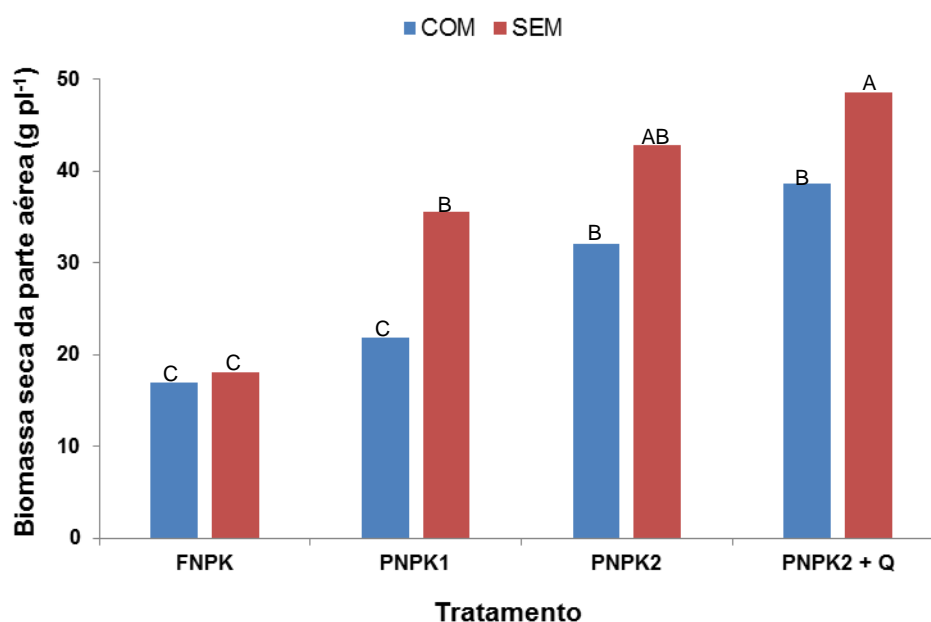
Berger (2010), avaliando o índice de severidade da doença murcha-de-fusário em feijão caupi sob inoculação com *Fusarium oxysporum* f.sp. *tracheiphilum*, e aplicação de bioprotetor no solo e pulverização de quitosana observou que a aplicação da quitosana em sua maior dose (6 mg mL<sup>-1</sup>) correspondeu ao menor índice de severidade da doença.

## **Análises das plantas**

### **Biomassa seca da parte aérea**

Os resultados obtidos para a biomassa seca da parte aérea (variedade Maçã), e o efeito dos tratamentos de adubação são observados na Figura 2,

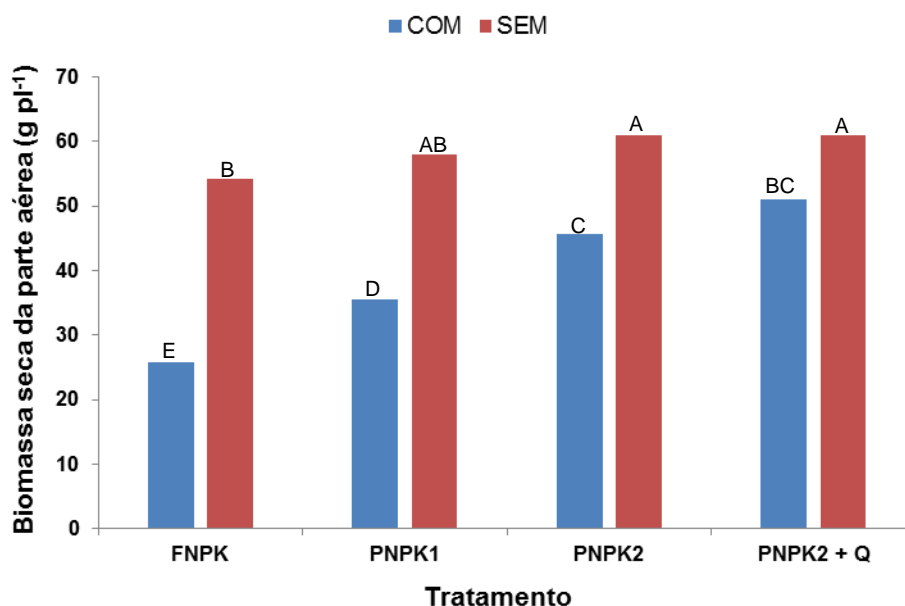
sendo, os melhores resultados obtidos com a aplicação do bioprotetor (PNPK), independentemente da dose, frente ao tratamento controle (FNPk). Vale ressaltar que, mesmo na presença do patógeno *Fusarium oxysporum* f.sp. *cabense* (FOC), na variedade Maçã que é altamente susceptível a doença, os tratamentos PNPk2 e PNPk2+Q (bioprotetor + quitosana) apresentaram diferença significativa quando comparado a fertilização mineral.



**Figura 2** – Efeito dos tratamentos de fertilizante mineral (FNPk na dose recomendada (DR)), bioprotetor (PNPk1=bioprotetor na DR; PNPk2=150% da DR), acrescido de quitosana fúngica (Q), com e sem inoculação do patógeno *Fusarium oxysporum* f.sp. *cabense*, na biomassa seca da parte aérea da banana (variedade Maçã). \*Médias com a mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. C.V. (%) = 7,65.

Os resultados obtidos para a biomassa seca da parte aérea (Williams), e o efeito dos tratamentos de adubação são observados na Figura 3.

Os resultados mostraram que o bioprotetor na dose mais elevada PNPk2 e PNPk2+Q apresentaram diferença significativa quanto ao fertilizante solúvel. Considerando que os adubos comerciais além de caros são bastante agressivos ao solo, é importante que o bioprotetor na dose recomendada mostrou que pode ser utilizado em substituição ao fertilizante convencional com resultados equivalentes.



**Figura 3** – Efeito dos tratamentos de fertilizante mineral (FNPk na dose recomendada (DR)), bioprotetor (PNPk1=bioprotetor na DR; PNPk2=150% da DR), acrescido de quitosana fúngica (Q), com e sem inoculação do patógeno *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*, na biomassa seca da parte aérea da banana (variedade Williams). \*Médias com a mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. C.V. (%) = 4,03.

Resultados satisfatórios e semelhantes foram obtidos por Oliveira (2011), que trabalhando com melão em um Argissolo Vermelho Amarelo, verificou que todos os tratamentos com PNPk apresentaram diferença significativa em comparação ao FNPk, e que com a aplicação do PNPk, no maior nível 12 t ha<sup>-1</sup> obteve, também, os maiores valores para biomassa seca da parte aérea.

Felix (2011), trabalhando com alface crespa em dois ciclos consecutivos utilizando PNPk em comparação ao fertilizante mineral (FNPk), observou que o PNPk3 (150% dose recomendada) apresentou diferença significativa quando comparado com o FNPk em relação à biomassa seca da parte aérea no 1º ciclo, e para o 2º ciclo (representava o efeito residual do adubo) o PNPk2 (dose recomendada) apresentou o melhor resultado frente ao FNPk, com diferença significativa.

## **Análises químicas das plantas**

O teor de N total da variedade Maçã e Williams observado na Tabela 4 demonstram que o tratamento PNPk2+Q apresentou os melhores resultados com diferença significativa em relação aos demais tratamentos, inclusive o controle, independente da presença ou ausência do FOC. O tratamento com PNPk2, também, apresentou diferença significativa em relação ao controle FNPk, mostrando ser equivalente ao PNPk2+Q.

De acordo com Boonlertnirun et al. (2008) o contato prolongado da raiz da planta no solo com quitosana, pode favorecer a interação entre as cargas positivas da quitosana e as cargas negativas dos nutrientes contidos no solo, o que pode influenciar a absorção de nutrientes pelas plantas e contribuir para aumento o rendimento das mesmas.

Outro fator referente ao aumento do teor de N total na parte aérea das mudas de banana está relacionado ao fato do bioprotetor ter recebido a inoculação com a bactéria diazotrófica de vida livre, e como as bactérias diazotróficas de vida livre têm a capacidade de realizar fixação biológica de nitrogênio sem a necessidade de associação com planta, o N absorvido pode ter vindo deste processo natural dos micro-organismos.

Na variedade Maçã o N total mostrou um aumento de 95% com o tratamento PNPk2+Q na presença do patógeno (FOC), em comparação ao tratamento com fertilizante químico solúvel. Enquanto a variedade Williams apresentou um aumento de 102% com o mesmo tratamento na presença patógeno, em relação ao tratamento controle. As duas variedades não apresentaram diferença significativa entre si.

Felix (2011) obteve resultados positivos com a aplicação do bioprotetor (50% dose recomendada) para o N total na parte aérea da cultura alface, mesmo sem apresentar diferenças significativas, foi equivalente ao valor encontrado para o FNPk, além de apresentar efeito residual.

**Tabela 4.** Nitrogênio, fósforo e potássio total na parte aérea da banana (variedade Maçã e Williams) em função da aplicação dos tratamentos de fertilizante mineral (FNPk na dose recomendada (DR)), bioprotetor (PNPK1=bioprotetor na DR; PNPk2=150% da DR), acrescido de quitosana fúngica (Q), com e sem inoculação do patógeno *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*.

Tratamento	Fungo	----- Maçã -----			----- Williams -----		
		N	P	K	N	P	K
		.....g pl <sup>-1</sup> .....			.....g pl <sup>-1</sup> .....		
FNPk	Com	1,29 De	0,75 Ee	2,40 Db	1,29 Dd	0,78 Ed	1,95 Dd
	Sem	1,67 Dd	1,10 Dd	1,75 Db	1,77 CDc	1,17 CDc	3,13 CDc
PNPK 1	Com	1,62 Dd	1,25 CDcd	2,52 Db	1,88 CDc	1,03 DEcd	3,82 Cc
	Sem	2,02 CDc	1,47 BCc	2,26 Db	2,08 Cc	1,37 CDbc	5,52 ABab
PNPK 2	Com	2,10 Cc	1,38 Cc	5,03 Ba	2,09 Cc	1,50 BCb	4,82 BCb
	Sem	2,70 Bb	1,73 Bb	5,70 Aba	2,63 Bb	1,73 Bab	5,79 Aba
PNPK 2+ Q	Com	2,51 Bb	1,57 BCbc	5,00 Ba	2,61 Bb	1,43 Cbc	5,59 ABab
	Sem	3,20 Aa	2,03 Aa	5,46 Aba	3,20 Aa	1,92 Aa	6,27 Aa
C. V. (%)		5,84	6,31	8,22	5,84	6,31	8,22

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. As letras maiúsculas representam as comparações entre variedades e as minúsculas indicam as comparações entre tratamentos.

Oliveira (2011) verificou que o teor de N total apresentou diferença significativa entre os tratamentos, e que o PNPk 12 t ha<sup>-1</sup> apresentou o teor mais elevado de N (1,61 g pl<sup>-1</sup>) frente ao FNPk (1,12 g pl<sup>-1</sup>) em cultivo com melão.

O P total acumulado na parte aérea (Tabela 4) das mudas de banana demonstrou que para a variedade Maçã todos os tratamentos com PNPk apresentaram diferença significativa em relação ao FNPk, independente da presença ou ausência do patógeno.

Vale salientar que o PNPk2+Q (sem a presença do patógeno) apresentou os melhores resultados e com diferença significativa em relação aos demais tratamentos com PNPk, diferentemente dos resultados com a presença do patógeno.

Quanto à variedade Williams os tratamentos PNPk2 e PNPk2+Q, com e sem fungo, não apresentaram diferença entre si. Porém, ambos apresentaram

diferença significativa em relação ao controle. Apenas o tratamento com PNPk1, com e sem fungo, foi equivalente ao fertilizante químico, o que não diminui o valor do adubo proposto no presente trabalho.

Assim como para o teor de N total, o teor de P total entre as variedades não foi significativo. Porém, a variedade Maçã com o tratamento PNPk2+Q apresentou um aumento de P de 109% quando comparado ao adubo químico, mesmo sob inoculação com o patógeno. A variedade Williams, para o mesmo tratamento com bioprotetor, apresentou um aumento de 83% em relação ao FNPk, ambos na presença do patógeno.

Os resultados mostram que o bioprotetor pode ser uma alternativa em substituição aos fertilizantes químicos solúveis, pois de acordo com Raij (1986), o uso de fontes alternativas de fósforo é considerado possível quando obtidos rendimentos mínimos de 80 a 90% do apresentado pela fonte solúvel.

Diferentemente do presente trabalho que, apresentou diferenças significativas entre o bioprotetor e o fertilizante mineral solúvel para N e P total na biomassa da parte aérea, Berger et al. (2013), observaram que o N e P total acumulados na biomassa seca da parte aérea do caupi, não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos de fertilização com bioprotetor e o fertilizante mineral (FNPk), com exceção para o PNPk com quitosana de crustáceo (2 e 4 mg mL<sup>-1</sup>) frente ao FNPk no P total.

Com relação ao teor de K (Tabela 4) para a variedade Maçã os tratamentos PNPk2 e PNPk2+Q apresentaram diferença significativa em relação ao FNPk, na presença ou ausência do patógeno. O PNPk1 (bioprotetor na dose recomendada) não apresentou diferença entre o FNPk (dose recomendada), sendo ambos equivalentes (com e sem patógeno). Mesmo assim, é interessante observar que não deixou de ser um resultado positivo.

No K total acumulado na parte aérea da variedade Williams todos os tratamentos com bioprotetor foram superiores e apresentaram diferença significativa quando comparados ao controle (FNPk) com e sem a presença do patógeno (FOC). Os tratamentos com bioprotetor entre si não apresentaram diferença significativa, com exceção para o PNPk1 (com FOC) que apresentou valores mais reduzidos e equivalentes ao FNPk sem fungo.

Na variedade Williams os valores mais elevados de potássio foram apresentados com o PNPk2+Q, com aumentos de 187% em relação ao FNPk, ambos na presença do patógeno. E na variedade Maçã com PNPk2+Q foi

observado um aumento de 108%, frente ao FNPk inoculado com o patógeno. As variedades Maçã e Williams não apresentaram diferenças significativas entre si, para os tratamentos PNPk2 e PNPk2+Q, quanto ao teor de potássio disponível.

Berger et al. (2013), trabalhando com caupi sob aplicação de bioprotetor (PNPK) com quitosana de crustáceo e de fungo e fertilização mineral (FNPk), obtiveram valores positivos e significativos de potássio disponível para o PNPk com quitosana fúngica e FNPk em relação aos bioprotetores com quitosana de crustáceo.

Oliveira (2011) observou que com relação ao teor de K o teste de médias mostrou diferença significativa entre os tratamentos aplicados, sendo a maior média apresentada pelo PNPk na dose  $12 \text{ t ha}^{-1}$  ( $1,31 \text{ g planta}^{-1}$ ) em comparação ao tratamento com FNPk ( $0,73 \text{ g planta}^{-1}$ ).

## **Análises químicas do solo**

### **pH do solo**

Os valores para pH do solo (Tabela 5), não apresentaram diferença significativa entre os tratamentos de fertilização (FNPk; PNPk1; PNPk2 E PNPk2+Q) apesar de terem promovido aumento no pH do solo. De acordo com os resultados obtidos não houve interferência da presença e ausência de *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*, com relação ao pH do solo. E o pH do biofertilizante manteve-se estável.

A bananeira é uma cultura que suporta uma faixa ampla de pH, podendo se desenvolver em solos com pH, que varia entre 3,5 e 9,0, sendo ideal o pH entre 6,0 e 6,5 (BORGES & OLIVEIRA, 2000). O pH dos bioprotetores apresentaram valores que ficaram em torno de 6,17 e 6,93, em sua grande maioria dentro da faixa considerada ideal para o desenvolvimento da cultura.

Oliveira et al. (2014), obtiveram os mesmos resultados, com a cultura do melão em um Argissolo Vermelho Amarelo, no qual o pH do solo não apresentou efeitos significativos após a aplicação dos tratamentos de fertilização.

**Tabela 5.** pH, P e K disponível, Ca e Mg trocável determinados no solo, em função da aplicação dos tratamentos de fertilizante mineral (FNPK na dose recomendada (DR)), bioprotetor (PNPK1=bioprotetor na DR; PNPK2=150% da DR), acrescido de quitosana fúngica (Q), com e sem inoculação do patógeno *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*, ao final do experimento com mudas de banana.

Tratamento	Fungo	pH	P	K	Ca <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>
		H <sub>2</sub> O (1:2,5)	mg dm <sup>-3</sup>	.....cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> .....		
FNPK	Com	5,83 B	49,00 C	0,15 D	3,25 E	1,50 D
	Sem	6,45 AB	42,67 C	0,16 D	4,42 D	2,33 C
PNPK 1	Com	6,17 B	449,00 A	0,35 C	5,02 C	2,54 C
	Sem	6,47 AB	470,67 A	0,40 BC	5,71 B	2,98 B
PNPK 2	Com	6,73 AB	315,33 B	0,60 AB	6,52 A	2,93 B
	Sem	6,40 AB	426,00 AB	0,63 AB	6,78 A	3,20 AB
PNPK 2+ Q*	Com	6,53 AB	434,67 AB	0,73 A	6,32 A	3,04 AB
	Sem	6,93 A	420,00 AB	0,57 B	6,75 A	3,42 A
C. V. (%)		3,32	13,38	13,28	3,28	4,72

\*Médias com a mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

### P e K disponível no solo

Os resultados de P disponível no solo (Tabela 5) demonstraram que os tratamentos com aplicação de PNPK (bioprotetor) promoveram os teores mais elevados de P no solo. Os tratamentos com bioprotetor apresentaram diferença significativa em comparação ao fertilizante mineral (FNPK), embora os bioprotetores não tenham apresentado diferença significativa entre si, e a presença e ausência de *F. oxysporum* f.sp. *cubense* (FOC) não influenciou na disponibilidade deste elemento no solo.

Resultados semelhantes foram relatados por Oliveira et al. (2014), que trabalhando com a cultura do melão, em um Argissolo Vermelho Amarelo, obtiveram efeitos significativos de PNPK quanto ao P disponível, comparado com o tratamento com fertilizante mineral solúvel (FNPK).

O teor de K disponível no solo (Tabela 5) foi significativo para o PNPK independente da dose aplicada quando comparados com o FNPK,



apresentando maiores valores com PNPk2 e PNPk2+Q, visto que de um modo geral não houve influência do FOC quanto à disponibilidade deste elemento.

Stamford et al. (2014), obtiveram resultados satisfatórios, com relação ao K disponível, quando aplicados os tratamentos com PNPk (150% dose recomendada) e FNPk, em solo cultivado com uva.

Os teores de P e K disponíveis no presente estudo foram devido ao uso dos biofertilizantes de rocha fosfata e potássica, respectivamente, que fazem parte do processo de produção do bioprotetor utilizado, e que são fontes de P e K, e são extraídos das rochas de origem por reação de acidólise, através de bactérias acidificantes, que na presença de enxofre, produzem ácido sulfúrico.

Quanto ao aumento da disponibilidade dos elementos pode ser considerado que a quitosana serve como fonte de carbono para os microrganismos do solo, ajudando a acelerar o processo de mineralização da matéria orgânica e, conseqüentemente, liberar nutrientes, que são facilmente absorvidos pelas plantas (BOONLERTNIRUN et al., 2008).

### **Ca e Mg trocável no solo**

Os resultados obtidos para cálcio trocável estão apresentados na Tabela 5. Foi verificado que os valores obtidos pelos tratamentos PNPk2 e PNPk2+Q não apresentaram diferença significativa entre si. No entanto mostraram diferença significativa frente ao PNPk1 e FNPk. A menor dose do bioprotetor PNPk1 (dose recomendada), mesmo apresentando valores inferiores aos demais tratamentos com bioprotetor, ainda sim obteve resultados superiores e significativos ao FNPk.

Stamford et al. (2014), em trabalho com uva no Vale do São Francisco (Latosolo Vermelho Amarelo) verificaram que o conteúdo  $Ca^{2+}$  no solo mostrou influência significativa dos tratamentos de fertilização, especialmente quando aplicado PNPk na maior dose (150% dose recomendada), que apresentou a maior quantidade de cálcio no solo ( $4,5 \text{ cmol}_c \text{ dm}^{-3}$ ), seguido por PNPk aplicado na dose de 100% (recomendada).

No presente estudo foram verificados valores entre 6,32 e 6,78  $\text{cmol}_c \text{ dm}^{-3}$  para PNPk2+Q (150% dose recomendada com quitosana) e PNPk2 (150% dose recomendada), respectivamente, na presença e ausência do FOC.

O teor de magnésio trocável no solo (Tabela 5) apresentaram valores significativos com os tratamentos com bioprotetor frente ao fertilizante químico. Confirmando a efeito positivo do PNPk (bioprotetor) na disponibilidade de determinados elementos.

Stamford et al. (2014), também observaram efeito significativo na disponibilidade de  $Mg^{+2}$  ao aplicar o BNPk acrescido da biomassa de *C. elegans* (PNPK) em um solo do Vale do São Francisco cultivado com uva (*Vitis labrusca*).

## CONCLUSÕES

- A aplicação dos tratamentos PNPk2 e PNPk2+Q resultaram no menor índice de severidade da doença, mal-do-Panamá, nas plantas inoculadas com fungo causador da doença, *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* (FOC) aos 40 dias após inoculação do patógeno;
- O bioprotetor influenciou as variáveis nas plantas e nos atributos químicos do solo, tornando este produto, uma alternativa para a substituição dos fertilizantes minerais solúveis;
- Este biofertilizante pode ser também, uma alternativa para pequenos produtores, que não dispõem de recursos para aquisição dos fertilizantes convencionais, criando oportunidade de melhorar sua produtividade sem agredir o solo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARMSTRONG, G. M. & ARMSTRONG, J. K. Nonsusceptible hosts as carriers of wilt fusaria. **Phytopathology**, v. 38, p. 808-826, 1948.

BELTRÃO, B. A.; MASCARENHAS, J. de C.; MIRANDA, J. L. F. de; SOUZA JUNIOR, L. C. de; GALVÃO, M. J. da T. G.; PEREIR, S. N. **Projeto cadastro de fontes de abastecimento por água subterrânea - Estado de**

**Pernambuco: Diagnóstico do município de Carpina.** [s.l.] CPRM - Serviço Geológico do Brasil, p. 11, 2005.

BERGER, L. R.; STAMFORD, N. P.; SANTOS, C. E. R. S.; FREITAS, A. D. S.; FRANCO, L. O.; STAMFORD, T. C. M. Plant and soil characteristics affected by biofertilizers from rocks and organic matter inoculated with diazotrophic bacteria and fungi that produce chitosan. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, v. 13, p. 592-603, 2013.

BERGER, L. R. R.; STAMFORD, T. C. M.; STAMFORD, N. P. Perspectivas para o uso da quitosana na agricultura. **Revista Iberoamericana de Polímeros**, v. 12, n. 4, p. 1-21, 2011.

BERGER, L. R. R. **Efeito da quitosana e do biofertilizante-bioprotetor na murcha-de-fusário em caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp).** Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo). Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 75p. 2010.

BOONLERTNIRUN, S.; BOONRAUNG, C.; SUVANASARA, R. Application of chitosan in Rice production. **J. Metals Mat. Min.**, v. 18, p. 47-52, 2008.

BORGES, A. L.; OLIVEIRA, A. M. G. **Nutrição, calagem e adubação.** In: CORDEIRO, Z. J. M. **Banana. Produção: aspectos técnicos.** EMBRAPA – BRASÍLIA: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, p. 47-59, 2000.

CORDEIRO, Z. J. M.; MATOS, A. P.; MEISSNER FILHO, P. E. Doenças e Métodos de Controle. In: BORGES, A. L.; SOUZA, L. S., editores. **O Cultivo da Banana.** Crus das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, p. 146-182, 2004.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (Embrapa). **Manual de Análises Químicas de Solo, Plantas e Fertilizantes.** 2ª ed., Brasília, DF: Embrapa - Informações Tecnológicas, 627p. 2009.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA Solos, **Zoneamento Agroecológico de Pernambuco.** Disponível em: <http://www.uep.cnps.embrapa.br/zape/>. Acesso em: 03 fev. 2016.

FELIX, F. F. **Produção e efeitos de Biofertilizante Bioprotetor com quitosana na alface**. 2011. 60f. Tese (Doutorado em Ciência do Solo). Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife. 2011.

FIORAVANZO, J. C. **Mercado mundial da banana: produção, comércio e participação brasileira**. Informações Econômicas - SP, v. 33, n. 10, out. 2003.

FRANCO, L. de O.; ALBUQUERQUE, C. D. C.; STAMFORD, N. P.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. de. Avaliação da atividade ácida e acúmulo de fosfato inorgânico em amostras de *Cunninghamella elegans*. **Revista Analytica**, v. 54, p. 70-78, 2011.

GURGEL, L. M. S.; ROSA, R. C. T.; COELHO, R. S. B. Doenças. *In*: SILVA JUNIOR, J. F.; LOPES, G. B. M.; FERRAZ, L. G. B., editores. **Sistema de Produção de Banana para a Zona da Mata de Pernambuco**. Aracajú: Embrapa Tabuleiros Costeiros, Recife: IPA, p. 75-94, 2010.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola**. Rio de Janeiro, v.29, n.4, p.1-81, 2015.

LIMA, F. S.; STAMFORD, N. P. ; SOUSA, C. S. ; LIRA JÚNIOR, M. A.; MALHEIROS, S. M. M. ; VAN STRAATEN, P. Earthworm compound and rock biofertilizer enriched in Nitrogen by inoculation with free living diazotrophic bacteria. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 27, p. 1-7, 2010.

MARTINS, A. N. & FURLANETO, F de P. B. Bananicultura: Pesquisas voltadas para a agricultura familiar. **Revista Tecnologia & Inovação Agropecupária**. p. 77-86, 2008.

MOHAMED, F., MOHAMED, E., ARNAUD-SANTANA & COYNE, D.P. Rooting of bean leaves and use in germplasm evaluation for common bacterial blight resistance. **Euphytica**, v. 65, p. 1261-1266, 1993.

NASCENTE, A. S.; COSTA, J. N. M.; COSTA, R. S. C, da. **Cultivo da banana em Rondônia. Sistemas de produção, 2**. Disponível em:

<https://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Banana/CultivodaBananaRO/autores.htm>. Acesso em 05 fev. 2016.

OLIVEIRA, W. S.; STAMFORD, N. P.; SILVA, E. V. N.; SANTOS, C. E. R. S.; FREITAS, A. D. S.; ARNAUD, T. M. S.; SARMENTO, B. F. Biofertilizer produced by interactive microbial processes affects melon yield and nutrients availability in a Brazilian semiarid soil. **Australian Journal of Crop Science**, v. 8, p. 1124-1131, 2014.

OLIVEIRA, W. S. **Eficiência agrônômica de biofertilizante – bioprotetor na produtividade e qualidade do melão em argissolo vermelho amarelo no sudoeste da Bahia**. 2011. 57 f. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo). Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife. 2011.

RAIJ, B. V. Condições mínimas de eficiência para fosfatos alternativos ao superfosfato. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.10, p.235-239, 1986.

SANCHEZ, P.A. Soil fertility and hunger in Africa. **Science**, v.295, p.2019-2020, 2002.

SANTANA, R. S.; STAMFORD, N. P.; SANTOS, C. E. R. S.; SILVA JÚNIOR, S.; FREITAS, A. D. S. & ARNAUD, T. M. S. Influence of Bioprotector Produced by Interspecific Microbial Inoculation on Green Pepper Characteristics and Nutrient Uptake. **Global Journal of Science Frontier Research: D Agriculture and Veterinary**, v. 14, p. 6-14, 2014.

SANTOS, A. F. J. **Análise da expressão gênica em bananeira cultivada com silício e inoculada com *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense**. 2010. 92 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola). Universidade Federal do Recôncavo da Bahia e Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas – BA. 2010.

SAS Institute. The SAS 9.2 software. System for Windows. CD-ROM for Windows. 2011.

SHIGEMASA, Y. & MINAMI, S. Applications of chitin and chitosan for biomaterials. **Biotechnology & Genetic Engineering Reviews**, v. 17, p. 383-420, 1996.

SILVA, A. B. da; SOUSA, A. R. de; ACCIOLY, L. J. de O. Solos. In: SILVA JUNIOR, J. F. da. **Sistema de Produção de Banana para a Zona da Mata de Pernambuco**. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, Recife: IPA, p. 17-23, 2010.

SILVA JUNIOR, W. J. **MANEJO DA FUSARIOSE DA BANANEIRA UTILIZANDO *Trichoderma* sp. E ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Lippia sidoides***. 2014. 60 f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife. 2014.

SILVA JUNIOR, J. F. da; LOPES, G. M. B.; FERRAZ, L. G. B. **Sistema de Produção de Banana para a Zona da Mata de Pernambuco**. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, Recife: IPA, p. 11-13, 2010.

STAMFORD, N. P.; NETO, D. E. S.; FREITAS, A. D. S.; OLIVEIRA, E. C. A.; OLIVEIRA, W. S.; CRUZ, L. Rock biofertilizer and earthworm compost on sugarcane performance and soil attributes in two consecutive years. **Scientia Agricola**, v.73, n.1, p.29-33, 2016.

STAMFORD, N. P.; SILVA JÚNIOR, S.; SANTOS, C. E. R. S.; FREITAS, A. D. S.; SANTOS, C. M. A., ARNAUD, T. M. S.; SOARES, H. R. Yield of grape (*Vitis labrusca* cv. Isabel) and soil nutrients availability affected by biofertilizer with diazotrophic bacteria and fungi chitosan. **Australian Journal of Crop Science**, v. 8, p. 301-306, 2014.

STAMFORD, N. P.; SANTOS, C. E. de R. e S.; FELIX, F. F.; OLIVEIRA, F. L. N. de. Biofertilizers From Phosphate and Potash Rocks with *Acidithiobacillus* and Organic Matter Enriched by Free Living Diazotrophic Bacteria. In: ARAÚJO, A. S. F. de; FIGUEIREDO, M. do V. B. **Microbial Ecology of Tropical Soils**. Nova Science Publishers. p. 149-157, 2011.

STAMFORD, N. P.; IZQUIERDO, C. G.; FERNÁNDEZ, M. T. H.; MORENO, M. del C. M. Biofertilizante de rochas fosfatadas e potássicas com enxofre e *Acidithiobacillus*. In: FIGUEIREDO, M. do V. B.; BURITY, H. A.; STAMFORD, N. P.; SANTOS, C. E. de R. e S. **Microrganismos e Agrobiodiversidade: o novo desafio para a agricultura**. Guaíba: Agrolivros, p. 401-421, 2008.

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

STAMFORD, N. P.; SANTOS, C. E. R. S.; SANTOS, P. R.; SANTOS, K. S. R.; MONTENEGRO, A. Effects of rock phosphate, sulphur with and without *Acidithiobacillus* and organic byproducts on mimosa (*Mimosa caesalpinifolia*) grown in a Brazilian tableland soil. **Tropical Grasslands**, v. 39, p. 54-61, 2005.

TEDESCO, M. J.; GIANELLO, C.; BISSANI, C. A.; BOHNER, H.; VOLKWEISS, S. J. **Análises de solo, plantas e outros materiais**. Porto Alegre, Departamento de solos, UFRGS, 1995. 174 p.

## CONCLUSÕES GERAIS

- O estudo do biofertilizante e do bioprotetor foi relevante para comprovar o efeito do uso de pó de rochas em conjunto com micro-organismos como uma alternativa aos fertilizantes minerais solúveis. Visto que, além de serem fontes de nutrientes para as plantas, o bioprotetor pode ser utilizado no controle do mal-do-Panamá, doença causada pelo fungo *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* (FOC) responsável por grandes perdas em cultivos de banana, pois, o mesmo diminuiu a severidade da doença em estudo;
- A quitosana fúngica foi capaz de inibir o crescimento do FOC em ensaios *in vitro*, evidenciando seu potencial no combate a doença também conhecida como murcha vascular. Mostrando ser uma nova possibilidade frente à inexistência de medidas eficazes de controle da doença. Para tanto, serão necessários novos estudos para chegarem a doses e/ou concentrações que *in vivo* sejam eficazes.

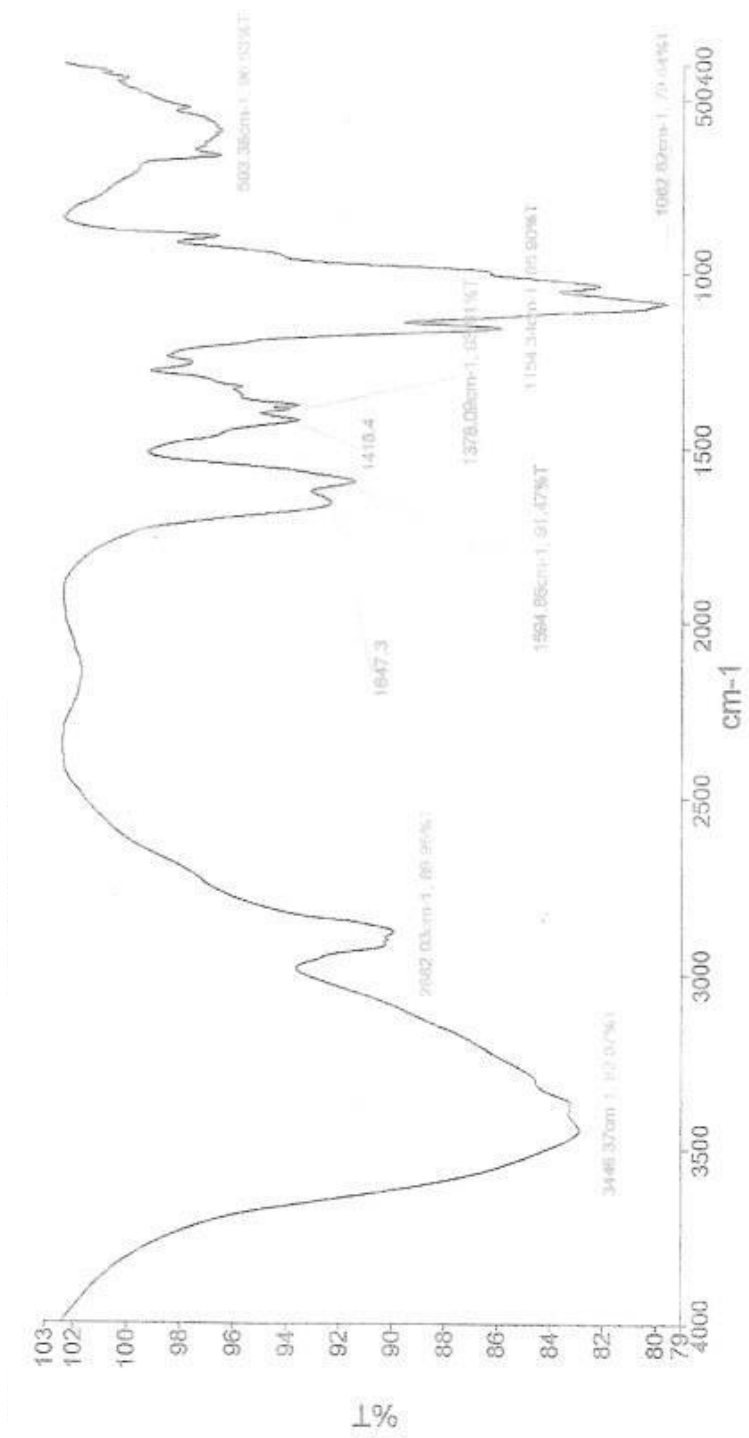


# APÊNDICE



**Figura 1-** Vista parcial do experimento em casa de vegetação com banana (variedade Maçã e Williams) em função da aplicação dos tratamentos de fertilização: fertilizante mineral (FNPk na dose recomendada (DR)) e bioprotetor (PNPK1=bioprotetor na DR, PNPk2=150% da DR, PNPk2+Q=150% da DR acrescido de quitosana fúngica), com e sem inoculação do patógeno *Fusarium oxysporum* f.sp. *cabense*, ao final do experimento (40 dias após a inoculação do patógeno).

# **ANEXOS**



**Figura 1-** Espectro das bandas do infravermelho da quitosana fúngica.

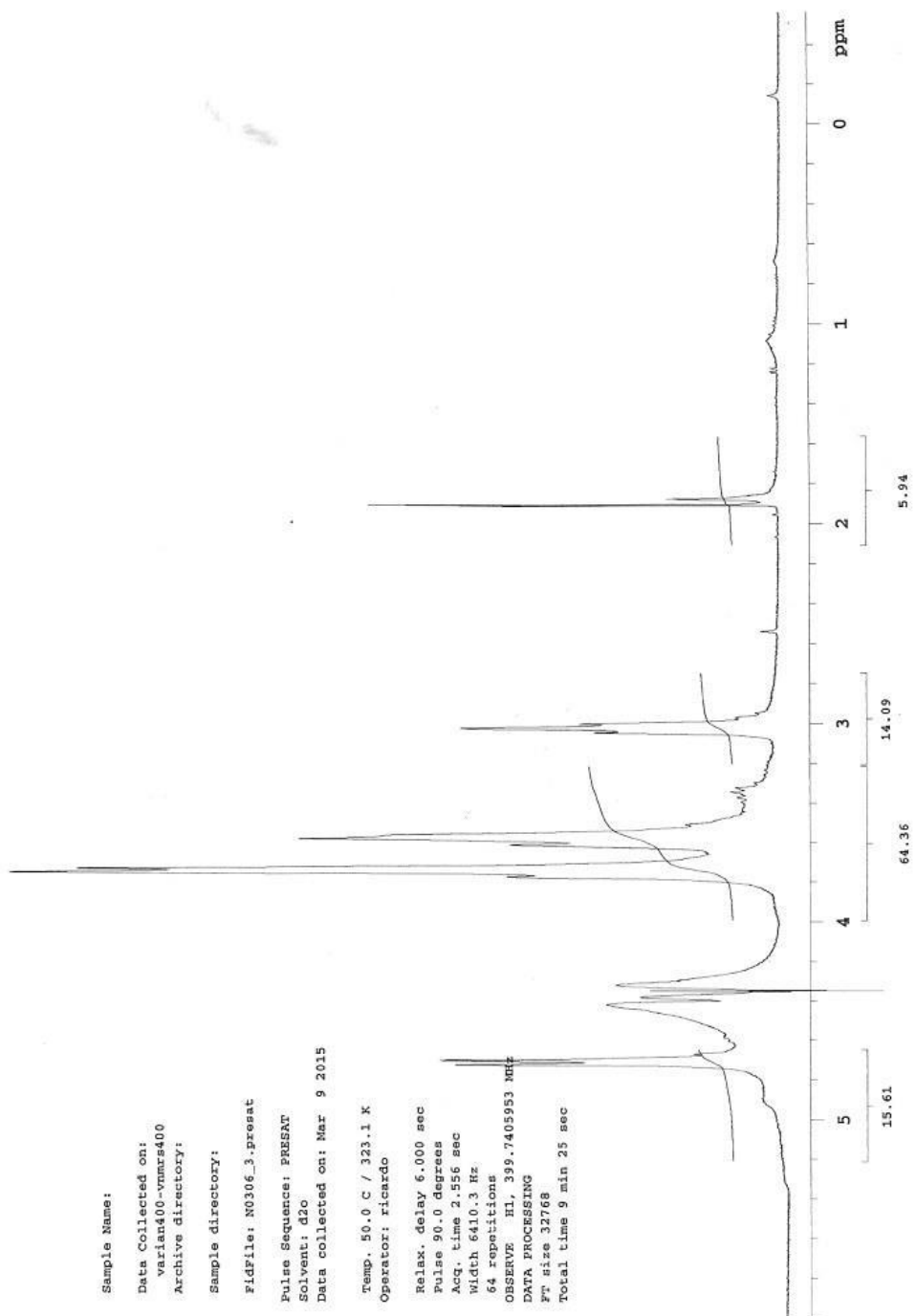


Figura 2- Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da quitosana fúngica.