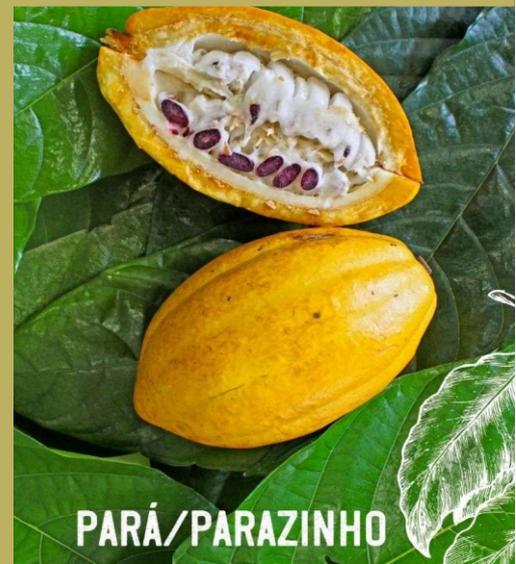
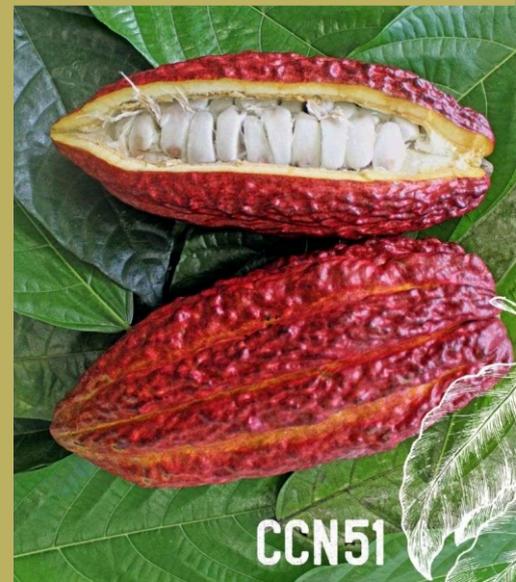
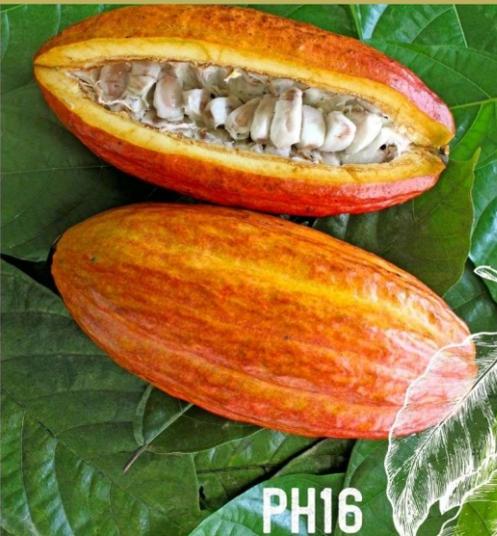


Agrotropica

Volume 33, número 2, maio a agosto de 2021



Centro de Pesquisas do Cacau
Ilhéus - Bahia

© 2021 Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

Todos os direitos reservados. Permitida a reprodução parcial ou total desde que citada a fonte e que não seja para venda ou qualquer fim comercial.

A responsabilidade pelos direitos autorais de textos e imagens desta obra é do autor.

Ano 2021.

Tiragem: 1000 exemplares

Elaboração, distribuição, informações:

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira

Superintendência Regional no Estado da Bahia

Centro de Pesquisas do Cacau

Editor: Ronaldo Costa Argôlo.

Coeditores: Quintino Reis de Araujo e George Andrade Sodré

Editores eletrônicos: Jacqueline C. C. do Amaral e Selenê Cristina Badaró.

Capa: Ronaldo Costa Argôlo Filho

Agrotropica, v. 1, nº1 (1989)
Ilhéus, BA, Brasil, CEPLAC/CEPEC, 1989

v.

Quadrimestral

Substitui "Revista Theobroma"

1. Agropecuária - Periódico.

CDD 630.5

INFORMAÇÕES SOBRE A CAPA: Comemorativa dos 50 anos da revista Agrotropica. Criada em 1971 como revista Theobroma, e que passou a ser denominada Agrotropica a partir de 1989. Atualmente são recomendadas pela Ceplac para plantio comercial as variedades: SJ 02, Cepec 2002 ou VB 1151, CCN 51, PS 1319, PH 16, CP 49, Cepec 2007 ou VB 681, Ipiranga 1, FA 13, Vencedora 20 ou Ven 20, PH 09, CCN 10, LP 06, PH 15, Salobrinho 3 ou SAL 3 e BJ 11.

INFORMATION ON THE COVER: Commemorative of the 50th anniversary of the Agrotropica magazine. Created in 1971 as Theobroma magazine, which became Agrotropica in 1989. The following varieties are currently recommended by Ceplac for commercial planting: SJ 02, Cepec 2002 or VB 1151, CCN 51, PS 1319, PH 16, CP 49, Cepec 2007 or VB 681, Ipiranga 1, FA 13, Vencedora 20 or Ven 20, PH 09, CCN 10, LP 06, PH 15, Salobrinho 3 or SAL 3 and BJ 11.

AGROTRÓPICA é indexada em:

AGRINDEX; THE BRITISH LIBRARY; CAB (i.e. Horticultural Abstracts, Review of Plant Pathology, Forestry Abstracts); AGROBASE; Agricultural and Environment for Developing regions (TROPAG); ULRICH'S INTERNATIONAL PERIODICALS DIRECTORY (Abstract on Tropical Agriculture, Agricultural Engineering Abstracts, Agroforestry Abstracts, Bibliography of Agriculture, Biological Abstracts, Chemical Abstracts, Exerp Medical, Food Science & Technology Abstracts, Indice Agricola de America Latina y el Caribe, Nutrition Abstracts, Protozool. Abstracts, Review of Applied Entomology, Seed Abstracts, Tropical Oil Seeds Abstracts).



**MINISTÉRIO DA AGRICULTURA,
PECUÁRIA E ABASTECIMENTO**

**CEPLAC - Comissão Executiva do
Plano da Lavoura Cacaueira**

AGROTRÓPICA. Publicação quadrimestral do Centro de Pesquisas do Cacau (CEPEC)/CEPLAC.

Comitê Editorial:

Edna Dora Martins Newman Luz; George Andrade Sodré; Jacques Hubert Charles Delabie; José Luís Bezerra; José Marques Pereira; José Raimundo Bonadie Marques; Karina Peres Gramacho; Manfred Willy Muller; Raúl René Melendez Valle; Uilson Vanderlei Lopes.

Editor: Ronaldo Costa Argôlo.

Coeditor: Quintino Reis de Araujo e George Andrade Sodré.

Editoração eletrônica: Jacqueline C.C. do Amaral e Selenê Cristina Badaró.

Capa: Ronaldo Costa Argôlo Filho

Endereço para correspondência:

AGROTRÓPICA, Centro de Pesquisas do Cacau (CEPEX), 45600-970, Itabuna, Bahia, Brasil.

Telefone: (73) 3214 -3211

E-mail:

r-agrotropica.ceplac@agricultura.gov.br

Tiragem: 1000 exemplares

AGROTRÓPICA

V. 33

Maio - agosto

2021

N.2

CONTEÚDO

ARTIGOS

- 91** Novas fontes de resistência - avaliação de germoplasma do cacaueiro para incidência natural da vassoura de bruxa (em inglês). **J. L. Pires, E. D. M. N. Luz, G. R. P. Melo.**
- 101** Fungos micorrízicos arbusculares no crescimento e nutrição de mudas clonais de *Theobroma cacao* L. **M. A. N. Santos, C. S. Sousa, E. Gross, L. J. X. Oliveira Filho, T. M. Lima, B. T. Goto.**
- 109** Estudo da clarificação do mel de cacau como pré-tratamento para produção de uma bebida fermentada. **T. G. de Souza, B. T. A. Koelher, S. M. M. de Souza, R. R. Maldonado (in memoriam), E. Aguiar-Oliveira.**
- 117** Teste de Tetrázólio em sementes de espécies do domínio fitogeográfico amazônico. **P. P. Gonçalves, J. Garlet.**
- 127** Uma nova espécie de *Xylaria* em *Salzmannia nitida* na Bahia, Brasil (em inglês). **L. de O. Barbosa, E. A. A. Duarte, J. Pereira, J. L. Bezerra.**
- 131** Vida útil de polpa de frutos de *Passiflora cincinnata* CV. BRS Sertão Forte congelada. **M. M. Rinaldi, A. M. Costa.**
- 143** Ácido Giberélico na germinação de sementes e desenvolvimento inicial de plântulas de mamoeiro. **M. V. S. Paixão, R. B. C. Grobério, A. C. N. Hoffay, A. C. Correa, G. M. Cremonini.**

NOTA CIENTÍFICA

- 149** Registro de Buprestidae (Insecta: Coleoptera) com potencial danoso em plantio comercial de cupuaçuzeiro, em Nova Califórnia, RO. **R. S. Santos, A. Siviero.**



MINISTRY OF AGRICULTURE
LIVESTOCK AND FOOD SUPPLY

CEPLAC - Executive Commission of
the Cacao Agriculture Plan

AGROTRÓPICA. Published every four months by the Cocoa Research Center (CEPEC)/CEPLAC.

Editorial Committee:

Edna Dora Martins Newman Luz; George Andrade Sodré; Jacques Hubert Charles Delabie; José Luís Bezerra; José Marques Pereira; José Raimundo Bonadie Marques; Karina Peres Gramacho; Manfred Willy Muller; Raúl René Melendez Valle; Uilson Vanderlei Lopes.

Editor: Ronaldo Costa Argôlo.

Coeditor: Quintino Reis de Araujo and George Andrade Sodré.

Desktop publish: Jacqueline C.C. do Amaral and Selenê Cristina Badaró.

Cover: Ronaldo Costa Argôlo Filho

Address for correspondence:

AGROTRÓPICA, Cocoa Research Center (CEPEC), 45600-970, Itabuna, Bahia, Brazil.

Telephone: 55 (73) 3214 - 3211

E-mail:

r-agrotropica.ceplac@agricultura.gov.br

Circulation: 1000 copies.

AGROTRÓPICA

V.33

May - August

2021

N.2

CONTENTS

ARTICLES

- 91 New sources of resistance - cacao germplasm evaluation for natural incidence of witches' broom. **J. L. Pires, E. D. M. N. Luz, G. R. P. Melo.**
- 101 Arbuscular mycorrhizal fungi on the growth and nutrition of clonal seedlings of *Theobroma cacao* L. (in Portuguese) **M. A. N. Santos, C. S. Sousa, E. Gross, L. J. X. Oliveira Filho, T. M. Lima, B. T. Goto.**
- 109 Study of the clarification of cocoa honey as a pre-treatment for the production of a fermented beverage (in Portuguese). **T. G. de Souza, B. T. A. Koelher, S. M. M. de Souza, R. R. Maldonado (in memoriam), E. Aguiar-Oliveira.**
- 117 Tetrazolium test in seeds of species of the amazonic phytoogeographic domain (in Portuguese). **P. P. Gonçalves, J. Garlet.**
- 127 A new species of *Xylaria* on *Salzmannia nitida* in Bahia, Brazil. **L. de O. Barbosa, E. A. A. Duarte, J. Pereira, J. L. Bezerra.**
- 131 Shelf life of pulp of fruit of *Passiflora cincinnata* cv. BRS Sertão Forte frozen (in Portuguese). **M. M. Rinaldi, A. M. Costa.**
- 143 Gibberelic acid in seed germination and initial development of papaya seedlings (in Portuguese). **M. V. S. Paixão, R. B. C. Grobério, A. C. N. Hoffay, A. C. Correa, G. M. Cremonini.**

SCIENTIFIC NOTE

- 149 Record of Buprestidae (Insecta: Coleoptera) with harmful potential in a commercial cupuassu tree plantation, in Nova Califórnia, Rondônia state, Brazil (in Portuguese). **R. S. Santos, A. Siviero.**

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

1. O original para publicação em português, inglês ou espanhol, deve ter no máximo 18 páginas numeradas, em formato A4 (21,0 x 29,7 cm), fonte Times New Roman, corpo 12, espaço 1,5 (exceto Resumo e Abstract, em espaço simples), digitado em Word/Windows. O artigo deverá ser encaminhado à Comissão Editorial da revista por meio eletrônico. No rodapé da primeira página deverão constar o endereço postal completo e o endereço eletrônico do(s) autor(es). As figuras e tabelas devem vir à parte.

2. Os artigos devem conter: título, resumo, abstract, introdução, material e métodos, resultados e discussão, conclusões, agradecimentos e literatura citada.

3. Os artigos científicos e notas científicas devem conter introdução que destaque os antecedentes, a importância do tópico e revisão de literatura. Nos materiais e métodos devem-se descrever os materiais e métodos usados, incluindo informações sobre localização, época, clima, solo etc., bem como nomes científicos se possível completo de plantas, animais, patógenos etc., o desenho experimental e recursos de análise estatística empregada. Os resultados e discussão poderão vir juntos ou separados e devem incluir tabelas e figuras com suas respectivas análises estatísticas. As conclusões devem ser frases curtas, com o verbo no presente do indicativo, sem comentários adicionais e derivados dos objetivos do artigo.

4. **Título** - Deve ser conciso e expressar com exatidão o conteúdo do trabalho, com no máximo 15 palavras.

5. **Resumo e Abstract** - Devem conter no máximo 200 palavras. Abstract deve ser tradução fiel do resumo em inglês.

6. **Palavras chave** - Devem ser no máximo de seis, sem estar contidas no título.

7. **Introdução** - Deverá ser concisa e conter revisão estritamente necessária à introdução do tema e suporte para a metodologia e discussão.

8. **Material e Métodos** - Poderá ser apresentado de forma descritiva contínua ou com subitens, de forma a permitir ao leitor a compreensão e reprodução da metodologia citada com auxílio ou não de citações bibliográficas.

9. **Resultados, Discussão e Conclusões** - De acordo com o formato escolhido, estas partes devem ser apresentadas de forma clara, com auxílio de tabelas, gráficos e figuras, de modo a não deixar dúvidas ao leitor, quanto à autenticidade dos resultados, pontos de vistas discutidos e conclusões sugeridas.

10. **Agradecimentos** - As pessoas, instituições e empresas que contribuíram na realização do trabalho deverão ser mencionadas no final do texto, antes do item Referências Bibliográficas.

11. **Unidades de medida** - Usar exclusivamente o Sistema Internacional (S.I.).

12. **Figuras (gráficos, desenhos, mapas)** - devem ser apresentadas com qualidade que permita boa reprodução gráfica; devem ter 8,2 cm ou 17 cm de largura; as fotografias devem ser escaneadas com 300 dpi e gravadas em arquivo TIF, separadas do texto.

13. **As tabelas** - devem ser apresentadas em Word ou Excel, e os dados digitados em Times New Roman.

14. **Literatura Citada** - No texto as referências devem ser citadas da seguinte forma: Silva (1990) ou (Silva, 1990).

A normalização das referências deve seguir os exemplos abaixo:

PERIÓDICO

REIS, E. L. 1996. Métodos de aplicação e fracionamentos de fertilizantes no desenvolvimento da seringueira (*Hevea brasiliensis*) no Sul da Bahia. *Agrotropica* (Brasil) 8(2):39-44.

LIVRO

BALL, D. M.; HOVELAND, C. S.; LACEFIELD, G. D. 1991. *Southern forrages*. Atlanta, PPI. 256p.

PARTE DE LIVRO

ENTWISTLE, P. F. 1987. *Insects and cocoa*. In: Wood, G.A.R.; Lass, R. A. *Cocoa*. 4 ed. London, Longman. pp.366-443.

DISSERTAÇÃO

ROCHA, C. M. F. 1994. Efeito do nitrogênio na longevidade da folha de cacau (*Theobroma cacao* L.). *Dissertação Mestrado*. Salvador, UFBA. 31p.

TESE

ROHDE, G. M. 2003. *Economia ecológica da emissão antropogênica de CO₂ - Uma abordagem filosófica-científica sobre a efetuação humana alopoiética da terra em escala planetária*. Tese Doutorado. Porto Alegre, UFRGS/IB. 235p.

MONOGRAFIA SERIADA

TREVIZAN, S. D. P.; ELOY, A. L. S. 1995. *Nível alimentar da população rural na Região Cacaueira da Bahia*. Ilhéus, CEPLAC/CEPEC. *Boletim Técnico* n° 180. 19p.

PARTE DE EVENTO

PIRES, J. L. et al. 1994. *Cacao germplasm characterisation based on fat content*. In: *International Workshop on Cocoa Breeding Strategies*, Kuala Lumpur, 1994. *Proceedings*. Kuala Lumpur, INGENIC. pp.148-154.

A literatura citada deverá referir-se, de preferência, a trabalhos completos publicados nos últimos 5 anos.

15. **Correspondência de encaminhamento** do artigo deverá ser assinada pelo autor e coautores.

Os autores receberão cópias do seu trabalho publicado.

GUIDELINES TO AUTHORS

1 - The manuscript for publication in Portuguese, English or Spanish, not exceed 18 numbered pages, format A4, in Times New Roman, 12, 1.5 spaced (except Resumo and Abstract, simple spaced) typed in Word. The article must be addressed to the Editorial Commission in 4 printed copies and also in CD copy. Complete mailing address and e-mail of the author(s) must appear at the bottom of first page. Three out of the four copies should not state the author's name or acknowledgements, since these copies will go to reviewers. Figures (drawings, maps, pictures and graphs) and tables should be sent separately and ready for publication;

2 - Articles must contain: title, abstract, introduction, materials and methods, results and discussion, conclusions, acknowledgements and literature cited (references);

3 - Scientific articles and notes must include an introduction highlighting the background and importance of the subject and literature review. Under materials and methods one must mention informations about locations, time, climate, soil, etc. and furnish latin names of plants, animals, pathogens, etc., as well experimental designs and statistical analysis used. Conclusions must be objective and derived from relevant results of the research.

4 - Title - It must be concise (not exceed 15 words) and express the real scope of the work.

5 - Abstract - No more than 200 words.

6 - Key words - Six at most, and should not be present in the title.

7 - Introduction – should be concise containing a strictly necessary review to the introduction of the topic and support for the methodology and discussion

8 - Materials and Methods – may be presented in a continuous descriptive form or with subheadings, in a manner that allows the reader to understand and reproduce the described methodology. Bibliographic citations can be used.

9 - Results, Discussion and Conclusions – In accordance with the format chosen, these parts should be presented clearly, with the aid of tables, graphs and figures so as to leave no doubt as to the authenticity of the results, viewpoints discussed and conclusions emitted.

10 - Acknowledgements – Persons, institutions and companies that contributed to the accomplishment of the work should be mentioned at the end of the text before the Bibliographic References

11 - Measurement units - Use only the International System.

12 - Figures (drawings, maps, pictures and graphs) - They must possess good quality for graphic reproduction;

size 8.2 cm or 17 cm wide; photos should be scanned at 300 dpi and recorded, out of the text, in TIF file.

13 - Tables - It should be present in Word or Excel and data typed in Times New Roman, 12.

14 - References - literature cited in the text must be written as follows: Silva (1990) or (Silva, 1990).

Citation should be given as follows.

PERIODICALS

REIS, E. L. 1996. Métodos de aplicação e fracionamentos de fertilizantes no desenvolvimento da seringueira (*Hevea brasiliensis*) no Sul da Bahia. *Agrotropica* (Brasil) 8(2): 39 - 44.

BOOKS

BALL, D. M.; HOVELAND, C. S.; LACEFIELD, G. D. 1991. Southern forrages. Atlanta, PPI. 256p.

BOOK CHAPTERS

ENTWISTLE, P. F. 1987. Insects and cocoa. In: Wood, G.A.R.; Lass, R. A. Cocoa. 4 ed. London, Longman. pp.366-443.

DISSERTATION

ROCHA, C. M. F. 1994. Efeito do nitrogênio na longevidade da folha de cacau (*Theobroma cacao* L.). Dissertação Mestrado. Salvador, UFBA. 31p.

THESIS

ROHDE, G. M. 2003. Economia ecológica da emissão antropogênica de CO₂ - Uma abordagem filosófica-científica sobre a efetuação humana alopoiética da terra em escala planetária. Tese Doutorado. Porto Alegre, UFRGS/IB. 235p.

SERIAL MONOGRAPHS

TREVIZAN, S. D. P.; ELOY, A. L. S. 1995. Nível alimentar da população rural na Região Cacaueira da Bahia. Ilhéus, CEPLAC/CEPEC. Boletim Técnico nº 180. 19p.

PART OF MEETINGS

PIRES, J. L. et al. 1994. Cacao germplasm characterisation based on fat content. In: International Workshop on Cocoa Breeding Strategies, Kuala Lumpur, 1994. Proceedings. Kuala Lumpur, INGENIC. pp.148-154.

Literature cited should include published papers rather in the last 5 years.

15 - Correspondence of guiding will have to be signed by the author and coauthors.

Authors will receive the reprints of their published paper.

NEW SOURCES OF RESISTANCE - CACAO GERMPLASM EVALUATION FOR NATURAL INCIDENCE OF WITCHES' BROOM

*José Luis Pires**, *Edna Dora Martins Newman Luz*, *Gilson Roberto Pires Melo*

Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira, Centro de Pesquisa do Cacau, Ilhéus, Bahia, Brazil.
joseluiszoegapires@gmail.com, ednadora@yahoo.com.br, grpmelo@uol.com.br,

*Corresponding author: joseluiszoegapires@gmail.com

This study is part of the first ones that came to guide the recurrent selection processes for the association of resistance genes conducted by the Cocoa Research Center, at Ilhéus, Bahia. Two sets of accessions of the Cocoa Germoplasm Collection of this Center were evaluated for natural incidence of witches' broom, the biggest phytosanitary problem for cacao cultivation in Brazil. For the first set, which consisted of 573 accessions, it was considered the incidence of brooms on pods of up to 10 plants per row, with one or two rows of each accession, in five years of evaluation. For the second, formed by 154 genotypes pre-selected among the accessions introduced in the period with indications of good performance in relation to witches' broom, it was computed seven removals of vegetative brooms in the canopy, being each accession represented by one to three rows with up to seven plants. For both sets, a large number of genotypes of different origins were observed among the resistant ones, indicating the perspective of the occurrence of different resistance genes and possibilities of genetic gain in associating these different genes.

Key words: *Moniliophthora perniciosa*, plant breeding, *Theobroma cacao*.

Novas fontes de resistência - avaliação de germoplasma do cacau para incidência natural da vassoura de bruxa. Este trabalho é parte dos primeiros estudos que vieram nortear os processos de seleção recorrentes para associação de genes de resistência conduzidos pelo Centro de Pesquisas do Cacau, em Ilhéus, Bahia. Dois conjuntos de acessos da Coleção de Germoplasma deste Centro foram avaliados quanto à incidência natural de vassoura de bruxa, o maior problema fitossanitário da cacauicultura no Brasil. Para o primeiro conjunto, com 573 acessos, foi considerada a incidência de vassouras em frutos de até 10 plantas por fileira, com uma ou duas fileiras por cada acesso, em cinco anos de avaliação. Para o segundo, formado por 154 genótipos pré-selecionados entre os acessos introduzidos no período com perspectivas de bom desempenho em relação à vassoura de bruxa, foram computadas sete remoções de vassouras vegetativas na copa, sendo cada acesso representado por de uma a três fileiras, com até sete plantas cada. Para ambos os conjuntos, foi observado um grande número de genótipos de diferentes origens entre os resistentes, indicando a perspectiva de ocorrência de diferentes genes de resistência e possibilidades de ganho genético na associação desses diferentes genes.

Palavras-chave: *Moniliophthora perniciosa*, melhoramento de plantas, *Theobroma cacao*.

Introduction

Since the last decade of the 20th Century witches' broom disease (WBD) has threatened the cacao growing region of Southern Bahia State, Brazil, and the Brazilian cacao production was strongly reduced (Luz, Sgrillo and Santos Filho, 2005; Oliveira and Luz, 2012). Efforts have been applied to improve the cacao production and minimize losses through persistent replacement of susceptible Comum varieties by genetic materials carrying genes of resistance to *Moniliophthora perniciosa* (Singer) Aime & Phyllips-Mora, causal agent of WBD.

The central issue for the genetic improvement of cacao crop in Bahia became, then, the pursuit of resistant varieties. Populations were developed by crossing possible sources of resistance to WBD from different origins, including wild materials, and high yielded genotypes, to screening parents with high combining ability and selecting the most resistant and productive progenies, plants and clones, within a process of recurrent selection (Lopes et al., 2011; Pires et al., 2012a; Pires et al., 2012b). Results from this research were previously published (Albuquerque et al., 2010; Benjamin et al., 2016; Gramacho et al., 2016; Paim et al., 2006; Pimenta Neto et al., 2018; Rodrigues et al., 2020; Silva et al., 2010).

Efforts to reach improved genetic materials start by identifying genotypes carrying genes for WBD resistance through germplasm evaluation, a continuous and important step in any breeding program. This paper aims to reveal these early studies resulting in advances for the cacao breeding program for WBD resistance in Bahia, Brazil. And the hypothesis of the study is that there are resistant genotypes of different origins, what indicates perspectives of the occurrence of different resistance genes and possibilities of genetic gain in associating these different genes.

Materials and Methods

Two sets of accessions were evaluated, the first consisting of 573 accessions, planted between 1978 and 1990, and the second with 154 clones, established in the field by grafting onto adult plants in the years 1998 and 1999. For the first set, it was considered the incidence of brooms on pods of up to 10 plants per

row, one or two rows as representatives of each accession, and 5 years of evaluation (1995 to 1999 - 12 harvests). For the second, it was computed 7 removals of vegetative brooms in the canopy, from 1999 to 2002, with each clone represented by one to three rows with up to 7 plants.

Set 1 - distinctions among accession groups for pod infection by *Moniliophthora perniciosa*, correlations between this characteristic, other symptoms and black pod disease incidence (*Phytophthora* spp.)

The variable produced by the ratio between the number of WBD infected pods (sum of all pods in the row, per harvest) and the sum of healthy and infected pods, was considered. Analyzes were carried out with the following sources of variation: harvest, group of accessions, accession within group and the interactions harvest x group of accessions and harvest x accession within group. To estimate adjusted means and contrasts among means, the model was reduced by removing the interactions (SAS INSTITUTE, 1988).

The correlations between the WBD infected pods and the number of vegetative brooms, cushion brooms and the black pod rot (BPR) infected pods were also analyzed, using data from Pires, Luz and Lopes (1997) and others from more recent cacao germplasm evaluations.

Set 2 - distinctions among accessions and accession groups for vegetative brooms

The Set 2 was established in two areas, one with 91 (subset A) and another with 63 accessions (subset B), and these were analyzed separately.

The subset A was divided into two blocks of proportional dimension areas, the first comprising accessions planted in 1998 and accessions planted in 1999, and the second only accessions planted in 1999. Of these 91 accessions, 33 are represented by two or three rows and the rest for just one.

For this subset A, analyzes of the differences among accessions were performed according to the model with the following sources of variation: removal period, block, planting age, accession, removal period x accession, planting age x accession and trunk area 20 cm above the ground (covariate for covariance analysis, obtained by converting the diameter of the

trunk or main branches of the plant, considered as circular, into area); and accessions averages were estimated by removing interactions from the model. In turn, the analysis of differences among groups or series of accessions of common origin followed the model: removal period, block, planting age, group, accession within group, removal period x group, planting age x group, removal period x accession within group, planting age x accession within group and trunk area 20 cm (covariate - covariance analysis); and groups averages were also estimated by removing interactions from the model (SAS INSTITUTE, 1988).

For subset B, which includes only accessions represented by a single row, the analyzes of the differences among accessions were carried out, initially, having as sources of variation: removal period, accession, removal period x accession and trunk area at 20 cm from the ground (covariable); and the difference among groups: removal period, group, accession within group, removal period x group, removal period x accession within group and trunk area. In the interpretation of the differences among accessions, to reduce the tendency of errors resulting from the influence of the fixed effects of the environment in these differences, the residue was increased by the disregard of the removal period x access interaction. The groups and accessions averages were again estimated by removing the interactions from the models, and in these, as in the previous ones, all effects, with the exception of block effect, were considered fixed.

Results and Discussion

1-Accessions set 1 - distinctions among accession groups regarding infection in pods

1.1 - Data quality

In Set 1, a group of 23 accessions, represented in the collection by more than one row, presented for the variable percentage of infected pods (IP% = 100 times the ratio: number of WBD infected pods over the number of WBD infected pods plus the number of healthy pods) a coefficient of variation of 19.47% for the averages of rows within accession, obtained from the model with the sources of variation: harvest period (Hp), accession (A) and row (R) within accession.

With this model, significant effects of Hp (at 0.01%), significant differences among A (at 0.01%) and non-significant for row within accession effects (44.27%) were observed, which could suggest that the fixed effects of environment are not important (only the Hp with medium levels of infection, which allow a better differentiation of genotypes, as will be seen later, were considered). This observation, however, contrasts with what indicates the high coefficient of variation average. It also opposes to the values observed for the correlations among row within accessions averages and the coefficients of determination for the repeatability of these averages. The correlation and the coefficients of determination, for the methods of Analysis of Variance, Main Component and Structural Analysis (Cruz, 1997; Cruz, Carneiro and Regazzi, 2014), were, respectively, 0.86 and from 92.15 to 92.40, for the situation in which the highest averages of the various genotypes are grouped in one set and the lowest in another, and 0.54 and from 69.22 to 71.89, for the situation in which half of the highest averages among the pairs of averages of accessions and half of the lowest formed each set used for the calculation.

The coefficients of determination for a single row, considering the two situations described, are slightly less than 85% for the first situation, and well below 70% for the second.

Thus, considering these values, the option was to restrict the analysis of the incidence of WBD in pods to the differences among series or groups of genotypes of related origin, without any considerations on the individual accession performance. The genotype groups considered have a distribution in the collection close to a random distribution.

1.2 - Distinctions among accession groups

The groups or series of genotypes were listed, or formed, according to their origin (Wadsworth et al., 1997), with the elements of distinct formation in relation to their series having been separated (Table 1).

During the period considered, the germplasm collection had averages of infected pods (IP%) among 13.66 and 87.37%: 13.96; 87.37; 69.69; 13.66; 60.40; 45.23; 22.05; 29.04; 35.64; 80.40; 55.41; and 51.00%. The average number of pods considered per clone/harvest was 32 and cases with less than 4 pods in one harvest were not considered.

Table 1 - List of studied groups

Origin	Group/Series	Description
State of Acre	AC	series CAB, AB, IQ, SE.
State of Amazonas	AM	series CAB, AM.
State of Bahia	BAH	selections in varieties from Bahia, E. Santo - series Cepec
State of Pará	BE	series Be
State of Amazonas	CA	series Ca
State of Pará, Exp. station	CAS	series CAS
Costa Rica	CC	series CC
Equador	CCN	series CCN
	CEQ	series Cepec - family of unknown origin
State of Bahia – hybrids	CHC	series Cepec – Criollo hybrids
State of Amapá	CJ	series CJ
State of Acre	CSU	series Cruzeiro do Sul
State of Bahia – hybrids	CTF	series Cepec - Trinitario x Forastero hybrids
State of Espirito Santo	EEG	series EEG
Equador	EET	series EET
Granada	GS	series GS
Trinidad	ICS	series ICS
Peru – Amazon	IMC	series IMC
State of Amazonas	MA	series Ma
México	MEX	series P
Equador	MOQ	series Moq
Peru – Amazon	NA	series Na
Venezuela	OC	series Oc
Peru – Amazon	PA	series Pa
State of Pará	PAR	series CAB
Peru – Amazon	PER	genotypes from Peru - series: Amazon, Mo
Peru – Amazon	POU	series Pound
State of Acre	RB	series RB
México	RIM	series RIM
State of Roraima	RR	series CAB
Colômbia	SC	series SC
Peru – Amazon	SCA	series Scavina
Equador e Trinidad	SD1	Scavina 6 descendants - series: TSA, TSH, EET
State of Bahia	SD2	Scavina 6 descendants - series Cepec
Guatemala	SGU	series Sgu
State of Bahia	SAI	series SIAL
State of Bahia	SIC	series SIAL
Colômbia	SPA	series SPA
Colômbia	SPE	series SPEC
Costa Rica	UF	series UF

In order to focus on an element strongly questioned by farmers who cultivate resistant varieties descended from Scavina, which is the high pod losses in some situations, the analyzes were conducted separately for three levels of infection: high, medium and low, limited by arbitrary values of 65% and 25% of loss in average.

10% probability of error. The harvest period x group interaction was significant at 0.01% at medium and high levels and at 2% at low level; and the interaction harvest period x clone within the group was only significant at the high level (0.02%), and not in the others, at 10%.

The IP% variable had a different distribution from the normal by the Kolmogorov-Smirnov test (SAS INSTITUTE, 1988), with strong deviations, mainly, for the high and low infection levels ($D = 0.188$; 0.061 and 0.227 ; for the low, medium and high level, respectively), and among several transformations tested, the one that produced the best effects was the arcsin of the square root of the proportion between the number of WBD infected pods and the sum of the numbers of healthy and infected pods ($D = 0.160$; 0.071 and 0.163). This transformation was used for data analysis. It produced a small increase in deviation to the medium level, but it was also applied to this level to maintain a standard.

In the analyzes, the limit of seven times for the ratio between the highest and lowest variance within the groups was respected, so that, for the high level, it was necessary to exclude the series CCN, APA, CJ and EEG, for the medium the series APA, and for the low level the groups AM and RR (Table 2).

Harvest period and groups, or series of genotypes, were distinguished by 0.01% at high, medium and low levels, and the effects of clone within series were identified as significant at 0.01% at medium and high levels, and as not significant at low, for

Table 2 - Group means for the WBD infected pods: transformed (IPtr) and untransformed variable (IP%), probability of error for the rejection of the contrast null hypothesis for each group and the Scavina series, by the T test, at the levels of low (L), medium (M) and high inoculum pressure (H) (Prob), and Least Significant Difference for Tukey, at 5 %, for group (LSD)

Group	M			H			L		
	IPtr	Prob	IP%	IPtr	Prob	IP%	IPtr	Prob	IP%
AC	0.564	0.0699	31.46	1.234	0.0593	82.46	0.221	0.1008	10.55
APA							0.813	<.0001	55.92
AM	0.677	0.0057	42.65	1.160	0.2000	79.43			
BAH	0.852	<.0001	54.07	1.222	0.0422	82.20	0.327	0.0110	17.95
BE	0.762	<.0001	48.32	1.151	0.1304	79.13	0.305	0.0137	13.84
CA	0.897	<.0001	57.72	1.214	0.0480	83.25	0.426	0.0011	21.61
CAS	0.726	0.0011	43.93	1.303	0.0151	89.23	0.296	0.0301	12.86
CC	0.861	<.0001	55.31	1.316	0.0042	87.58	0.397	0.0017	24.12
CCN	0.922	<.0001	60.72				0.354	0.0094	19.21
CEQ	0.601	0.0230	35.95	0.286	<.0001	14.38	0.060	0.5061	1.34
CHC	0.770	<.0001	48.64	1.126	0.1897	76.07	0.350	0.0051	17.50
CJ	0.810	<.0001	51.49				0.363	0.0052	17.36
CSU	0.651	0.0049	37.71	1.108	0.2487	71.17	0.210	0.0769	10.33
CTF	0.781	<.0001	49.21	1.116	0.2159	77.03	0.268	0.0261	11.97
EEG	0.830	<.0001	53.64				0.292	0.0171	13.76
EET	0.682	0.0020	41.20	1.159	0.1147	80.56	0.382	0.0035	18.21
GS	0.796	0.0001	49.85	1.075	0.4349	72.07	0.291	0.0342	13.06
ICS	0.801	<.0001	50.04	1.192	0.0520	78.97	0.509	<.0001	30.88
IMC	0.656	0.0037	39.69	1.112	0.2352	75.60	0.198	0.0924	8.44
MA	0.734	0.0004	46.85	1.317	0.0084	89.17	0.339	0.0097	14.88
MEX	0.933	<.0001	63.09	1.320	0.0059	91.11	0.341	0.0116	17.34
MOQ	0.781	0.0004	47.89	1.157	0.2110	81.55	0.314	0.0325	18.08
NA	0.709	0.0012	42.13	1.191	0.1138	78.05	0.367	0.0086	18.25
OC	0.642	0.0111	39.39	1.139	0.2104	75.82	0.365	0.0076	16.85
PA	0.571	0.0303	32.33	1.031	0.5611	71.26	0.216	0.0594	8.93
PAR	0.723	0.0006	46.32	1.265	0.0207	83.88	0.188	0.1265	7.57
PER	0.686	0.0024	42.36	1.067	0.4531	75.17	0.311	0.0161	16.11
POU	0.617	0.0108	36.38	1.147	0.1419	75.40	0.349	0.0053	16.61
RB	0.638	0.0053	38.95	1.172	0.0854	77.65	0.297	0.0145	17.48
RIM	0.967	<.0001	64.36	1.335	0.0013	90.59	0.486	0.0001	27.91
RR	0.635	0.0305	37.26	1.233	0.1319	84.19			
SC	0.770	0.0002	49.95	1.328	0.0068	89.67	0.339	0.0107	17.47
SCA	0.361		23.99	0.965		62.58	-0.004		-2.09
SD1	0.533	0.0845	29.34	1.028	0.5898	69.35	0.204	0.0797	7.22
SD2	0.680	0.0011	41.09	1.076	0.3380	72.23	0.266	0.0242	11.43
SGU	0.783	<.0001	48.60	1.168	0.1312	78.69	0.319	0.0149	14.66
SIA	0.769	<.0001	47.97	1.232	0.0180	83.50	0.255	0.0274	11.11
SIC	0.910	<.0001	59.89	1.334	0.0011	88.80	0.438	0.0004	23.74
SPA	0.746	0.0002	47.71	1.267	0.0190	83.95	0.234	0.0563	12.61
SPE	0.702	0.0041	44.60	1.278	0.0488	86.72	0.299	0.0302	13.85
UF	0.887	<.0001	57.11	1.174	0.0712	78.67	0.417	0.0010	24.74
VE	0.690	0.0029	41.44	1.221	0.0596	82.06	0.260	0.0552	11.38
LSD	0.239			0.258			0.327		

For the medium level of infection, or inoculum pressure, the Scavina series (Clones Scavina 6 and Scavina 12 - the most traditional sources of resistance to WBD) has a clear superiority over the local varieties (SIC, SIAL, EEG and BAH), and only does not differ, at 5%, from the group of their descendants SD1 and from the group AC, from Acre (Table 2 - contrasts).

With the high level, the Scavina series is still distinguished from the local groups SIC, SIAL and BAH, but the differences are proportionally smaller, and this series does not differ significantly, at 5%, from 23 of the evaluated groups (also due to a smaller number of evaluated harvests). The average for SD1, which represents great part of the varieties indicated for commercial planting, also approximates the averages of local varieties, so that, for these varieties, a great number of infected pods is expected in commercial planting with high inoculum pressure.

The CEQ group significantly outperforms the Scavinas, but this result is, most certainly, due to scape, and its average for the high level of inoculum pressure is lower than that observed for the medium level.

It can be noted, by the general harvest averages, that periods with large losses for Scavinas and descendants precede others of medium and low losses, so that there was no reason, at this time, to suppose the occurrence of changes in the pathogen towards the expansion of its virulence over resistant genotypes, an element that was verified posteriorly (Pires et al., 2012a, Pires et al., 2012b).

For the low level, the Scavina series shows again the lowest average and is distinguished from local varieties. However, due to the lower precision in the analysis, as a result of the smaller number of Hp and, certainly, the lower inoculum pressure for a good differentiation, it is not distinguished, at 5%, from nine of the evaluated groups. Illustrating the precision, the R² values, which indicate how much of the variation in losses is explained by the model, and the variation coefficients for the medium, high and low levels were, respectively, 0.978; 0.988; 0.977 and 31.27 13.75 and 50.86.

There were also clear distinctions among the other groups, which can be seen by observing the means and LSDs (Table 2), in this case with less precision than by the T test - it was calculated the DMSs, using the harmonic mean of the number of repetitions for groups.

The lowest averages were observed with Amazonian groups and groups that include materials selected for resistance (VE, OC - Wadsworth et al., 1997). And as a peculiarity, the APA series, consisting of clones APA 4 and 5, which may in fact be a single genotype, with a very consistent lignified layer inside the pod skin, which could be a factor for insects and rodent's resistance, was the series that presented the highest proportion of IP (in the three levels of inoculum pressure - data not shown for medium and high levels).

At the medium level of infection, among the groups known as not to be associated with Scavina, stood out the group AC, formed by materials collected in Acre; group CSU, composed of the Cruzeiro do Sul and RB series, both also from Acre; group POU, of the Pound series, and series PA, both from the Peruvian Amazon; and RR, a CAB series group collected in Rondônia. Two non-Amazonian groups also stood out: OC, from the Ocumare series, and VE, from the Chuao, Choroní, PQTO and Playa Alta series, all from Venezuela.

Some clones were selected based on this data of resistance in pods and data of vegetative and cushions

brooms, to form bases of the recurrent selection program initiated in this period, and many of them proved themselves as good materials per se and as parents, regarding resistance to WBD (Paim et al., 2006; Pimenta Neto, et al., 2018; Pires et al., 2012a; Pires et al., 2012b; Silva et al., 2010; Yamada et al., 2014).

The proportion of WBD infected pods was positively correlated with the total number of brooms (TB = vegetative plus cushion brooms), with the number of vegetative brooms (VB) and with the number of cushion brooms (CB), in the amounts of 0.59; 0.51 and 0.29; respectively, for all evaluated genotypes and 0.57; 0.47 and 0.24, excluding Scavinas and descendants (it were considered data of VB and CB from the Germplasm evaluation). This relation is even more evident when considering only the resistant genotypes: of 34 accessions with data on IP among the 40 selected by the lowest average of TB, only three have higher IP proportions than the collection average, so that there are very favorable prospects for gains with indirect selection.

Regarding a comparative analysis of WBD with the other of the two most important cocoa diseases in Brazil, for black pod (*Phytophthora* spp.) the best performances were also from wild groups or series of the Amazonian type or hybrids derived from this type, and the worsts from selections of cultivated materials, mainly of the Trinitarian-Criollo types (Pires et al., 1997). The proportion of black pod (BPD) infected pods is positively correlated with TB, and with the proportion of WBD Infected pods, when considering all evaluated genotypes (coefficients of 0.38 and 0.39 - significant at 0.01%, respectively), and when Scavinas and descendants are excluded (0.32 and 0.33, significant at 0.01%). But the association seems smaller when considering only Trinitarians-Criollos materials (0.17 and 0.23; at the significance levels of 11.99 and 3.32%) (it was considered data presented in Pires et al. (1997) and later germplasm evaluation data).

Again, the relations between characteristics are even more striking when considering only the extreme genotypes in terms of resistance. Of 22 accessions with data on BPD infected pods, among the 40 selected by the lowest averages of VB plus CB, none has a higher proportion of pod loss than the germplasm collection average. Of the 25 accessions with data on

BPD infected pods, among the 40 selected by the lowest proportions of WBD infected pods, only one has a higher average than the general average. This, in addition to indicate the existence of favorable prospects for gains with indirect selection, also suggests the existence of common mechanisms in the resistance to the two diseases (metabolites related to pathogenicity analogous in different species of fungi have been observed for a long time and in many cases - Wolpert et al., 2002).

2- Set 2 - distinctions among accessions and accession groups for vegetative brooms

The set of accessions evaluated here was pre-selected, among the accessions introduced in the period, according to information that led to prospects of good performance in relation to WBD, and grafted onto adult plants to accelerate their development, in order to achieve faster evaluation. Such accessions were established in areas with high inoculum pressure, with a susceptible genotype (SIC 23) intercalated among them, who, however, did not survive in any of his positions. This has also occurred with some accessions; thus, the survival of the materials is an indicator of resistance. The loss of this pattern of susceptibility impoverishes the results, but this occurrence is compensated, in part, by the presence of the series GNV, considered as a pattern of resistance. The series GNV is derived from a selection of plants in progenies of Scavina 6, 12 and EET 400 (descendant of Silécia 1) by the University of Gainesville - Florida, through screening by artificial inoculation (Wadsworth et al., 1997).

In the subset A, with 91 accessions, it was observed significant effects of removal period, block, series (described in Table 3), accessions within series, removal period x series, planting age x series, removal period x accession within series and trunk area at 20 cm from the ground, up to 2% probability. The planting age and the planting age x accession within the series are significant, at 2%, when not adjusted by the trunk area, but the first is significant at only 5%, when adjusted, and the second is not significant, which shows that the consideration of plant size produces some adjustment for age differences.

Using the repeated measures method (PROC GLM – REPEATED - SAS INSTITUTE, 1988), for the interpretation of the effects of removal period and

interactions that include it, no significant effects were observed for removal period and removal period x planting age, but the effects of removal period x series and removal period x accession within series remained significant. The significance of the interactions illustrates the difficulties in evaluating resistance and the need to contemplate a wide period of time to obtain data that adequately represent the genotypes.

The group formed by the two Moronas and the one formed by the two CABs showed averages for the number of vegetative brooms numerically inferior and statistically not different from that of GNVs (Table 3 - averages obtained from the transformation of the variable by extracting its square root, to approximate the distribution from normal curve; differences among variances within the series not bigger than 7 times; LSD obtained from the complete model for the harmonic mean of the number of repetitions per group or series). The Ucayali series, supposedly collected in the same region of Scavina; Gu, from French Guiana, and CCN, from Ecuador, also showed averages very close to that of GNVs (without significant distinction for the contrasts), which suggests that special attention

Table 3 - Transformed means of accession groups for the number of vegetative brooms (VB), number of accessions for each group (N), probabilities of error for the rejection of the null hypothesis of contrasts between means of each series with the GNV series (C -GNV), and Least Significant Difference for Tukey, at 5%, obtained for the harmonic mean of the number of group repetitions (LSD) - subset A

Group	N	VB	C-GNV	Group Origin
Amazon	2	1.554	<.0001	Peru
CAB	2	0.869	0.6204	Brazilian Amazon
CCN	3	1.047	0.4943	CCN 51, descendant
EB	16	1.138	0.0422	Ecuador-Nacional
EQX	3	1.316	0.0047	Equador
GNV	11	0.942		Hybrids
Gu	21	1.030	0.2205	French Guiana
Huallaga	7	1.444	<.0001	Peru
IMC	2	1.122	0.2098	Peru
LCTEEN	3	1.109	0.2395	Ecuador
Morona	2	0.756	0.1564	Peru
Na	3	1.561	<.0001	Peru
Pound	5	1.157	0.0293	Peru
Scavina	4	1.143	0.0484	Peru
Ucayali	7	1.081	0.0890	Peru
LSD Tukey 5%		0.400		

should be devoted to these series. IMC, from Peru and LCTEEN, from Ecuador, also did not differ from the GNV series.

The EB series, which was generated in Ecuador by a contest of broad engagement among farmers for the selection of plants of the national type resistant to WBD, showed a higher average than the GNV series, at 5% of significance, but no different at 1% (contrast). This also occurred for the Scavina and Pound series.

In assessing the differences among individual clones of subset A, the accessions were divided into two groups, one with 47 and the other with 41 elements, according to the variances within access, so that, in each group, the largest did not exceed the smallest in 7 times (three accessions had zero brooms). Significance was observed for the effects: removal period, block, accession, removal period x accession, and trunk area at 20 cm from the ground (covariate - covariance analysis), with the first group, and for these and planting age and planting age x accession for the second group, at 5%.

The averages, estimated with the removal of interactions from the model, of the accessions with the lowest incidence of the disease are shown in Table 4, together with the general averages of the two groups and the respective LSDs, obtained from the complete model from the harmonic average for cell repetitions. It were listed only the accessions that had averages lower than that presented by the GNV series, and this list included 23 genotypes of the series Gu, EB, Morona, Huallaga, LCTEEN, Ucayali, Pound, Scavina e EQX. These results confirm the expectations about resistance for the genotypes included in this evaluation process.

For subset B, of 63 accessions, significant effects of removal period, series, accession within series, removal period x series, removal period x accession within series, and trunk area, were observed at the level of 0.01% probability. This subset analyzed with the removal period as a repeated measure and by multivariate analysis produced similar results, with a single difference: no significant effects were observed for the removal period.

The series considered presented the following averages: CAB (42 accessions) - 0.784; EQX (3 accessions) - 0.373; Gu (5 accessions) - 0.472; Huallaga (6 accessions) - 1,144; IMC (2 accessions) - 1.03 and Ucayali (2 accessions) - 0.176 (averages

obtained transforming the variable by extracting its square root). The LSD, for Tukey at 5% significance was 0.350. Three other clones, each one of a different series, were not included in this analysis. So, the good performance of the Gu and Ucayaly series was repeated, now accompanied by the EQX group. The three representatives of this group (EQX 69, EQX 3348 and Coca 3370) come from collections in the region of the Coca River, while the EQXs of subset A

Table 4 - Transformed means of accessions for the number of vegetative brooms (VB), general means, Least Significant Difference (LSD), for Tukey, at 5%, and group related to the dimensions of variance to which each accession belongs (Group 0 = variance 0) - Subset A

Series	Clone	Group	VB
GU	GU 171C	0	0.09
EB	EB Rosa Maria	1	0.33
Morona	MO 20	1	0.36
EB	EB 0508	1	0.39
GNV	GNV 22	1	0.47
GNV	GNV 263	1	0.48
GU	GU 261C	0	0.55
Morona	MO 81	1	0.56
Huallaga	H 39	1	0.57
GNV	GNV 120	1	0.57
LCTEEN	LCTEEN 241	1	0.58
Ucayali	U 32	0	0.59
GU	GU 123C	1	0.62
GU	GU 123C	1	0.62
GNV	GNV 27	1	0.64
GNV	GNV 113	1	0.65
GU	GU 221H	1	0.66
GU	GU 171C	1	0.67
GNV	GNV 63	1	0.68
Pound	P 2A	1	0.69
CCN	CCN 51	1	0.71
Scavina	SCA 9	1	0.73
EET	EET 400	1	0.78
EB	EB 1010	1	0.78
Ucayali	U 11	1	0.78
EB	EB 1203	1	0.80
EQX	EQX 3161 1	1	0.80
EB	EB 0509	1	0.81
GNV	GNV 258	2	0.81
SCA	SCA 5	1	0.82
Huallaga	H 03	1	0.82
Average		1	0.79
Average		2	1.47
LSD-Tukey-5%		1	0.74
LSD-Tukey-5%		2	1.06

results from a prospection in the region of the San Miguel River, both in the east of Ecuador (Wadsworth et al., 1997).

For the evaluation of the differences among individual clones of subset B, similarly to that performed for A, the accessions were divided into two groups, one with 13 and the other with 48 elements, according to the variances within accession. For these, significance was observed for the effects: removal period, accession and removal period x accession, with the first group (covariate trunk area non-significant), and for all with the second.

Now taking the Gu series as a reference, Table 5 lists the accessions that had averages lower than that presented by this series, the general averages of the two groups and the respective LSDs, obtained from the reduced model, with the harmonic average of the accession's repetitions, for the first and second groups,

Table 5 - Transformed means of accessions for the number of vegetative brooms (VB), general means, Least Significant Difference (LSD) for Tukey, at 5%, and group related to the dimensions of variance to which each accession belongs (Group 0 = variance 0) - Subset B

Series	Clone	Group	VB
Scavina	SCA 19	1	0.00
CAB	CAB 324	0	0.02
CAB	CAB 148	0	0.04
CAB	CAB 169	1	0.07
LCTEEN	LCTEEN 37	1	0.07
CAB	CAB 197	1	0.13
Ucayali	U 10	1	0.13
Coca	Coca 3370	1	0.15
CAB	CAB 94	1	0.16
CAB	CAB 157	1	0.20
CAB	CAB 301	1	0.21
CAB	CAB 191	1	0.22
Ucayali	U 16	1	0.28
GU	GU 221C	1	0.34
CAB	CAB 196	2	0.36
CAB	CAB 309	1	0.42
GU	GU 125C	2	0.42
CAB	CAB 500	2	0.45
Amazon	Amazon 15	2	0.49
CAB	CAB 165	2	0.54
Average		1	0.18
Average		2	0.93
LSD-Tukey-5%		1	0.41
LSD-Tukey-5%		2	1.00

respectively. Again, there is the inclusion of a large number of accessions from different series: 18 accessions from the series: CAB, Scavina, LCTEEN, Ucayali, Coca and Amazon.

Once more, some accessions were selected based on data of VB resistance, to form some of the clone trials and progeny trials that constituted the bases of the recurrent selection program that are carried off at the Cocoa Research Center in Ilhéus, Bahia, and many proved themselves as good materials regarding resistance to WBD (Pimenta Neto et al., 2018; Rodrigues et al., 2020).

In general, for VB and WBD infected pods, or for the two set of clones evaluated, a large number of genotypes of different origins were among the resistant ones, indicating the perspective of the occurrence of different resistance genes and possibilities of gain in associating these different genes. This has been confirmed in other studies (Albuquerque et al., 2010; Paim et al., 2006; Pimenta Neto et al., 2018; Pires et al., 2012a; Pires et al., 2012b; Rodrigues et al., 2020).

Conclusions

The large number of genotypes of different origins observed among the resistant ones for VB and WBD infected pods, indicate the perspective of the occurrence of different resistance genes and possibilities of gain in associating these different genes.

For WBD infected pods, the best performances were obtained by groups of Amazonian materials, notably of series collected in Acre State, Rondônia, and the Peruvian Amazon, indicating these areas as very important for prospecting for new materials. Two groups of non-Amazonian materials, from Venezuela, were also highlighted.

The average for WBD infected pods of Scavina descendants, who represent the majority of varieties indicated for commercial planting in Bahia, approaches the averages of the traditional local varieties with a high level of inoculum pressure, so that, for these varieties, high pod loss is expected in commercial planting situations with high inoculum pressure.

The proportion of WBD infected pods is positively correlated with the numbers of VB, CB and TB, and there are very favorable prospects for gains with indirect selection.

Literature Cited

- ALBUQUERQUE, P. S. B. et al. 2010. Novel sources of witches' broom resistance (causal agent *Moniliophthora perniciosa*) from natural populations of *Theobroma cacao* L. from the Brazilian Amazon. *Euphytica* (172):125-138.
- BENJAMIN, C. S.; LUZ, E. D. M. N.; PIRES, J. L. 2016. Cacao families and parents selected as resistant to natural infection of *Moniliophthora perniciosa*. *Crop Breeding and Applied Biotechnology* (16):141-146.
- CRUZ, C. D. Programa GENES: aplicativo computacional em genética e estatística. 1997. Viçosa, MG, UFV. 442p.
- CRUZ, C. D.; CARNEIRO, P. D. S.; REGAZZI, A. J. 2014. Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético. Viçosa, MG, UFV. 668p.
- GRAMACHO, K. P. et al. 2016. Pathogenic variability of *Moniliophthora perniciosa* in three agroecological zones of the cacao region of Bahia, Brazil. *Crop Breeding and Applied Biotechnology* (16):07-13.
- LOPES, U. V. et al. 2011. Cacao breeding in Bahia, Brazil: Strategies and results. *Crop Breeding and Applied Biotechnology* (11):73-81.
- LUZ, E. D. M. N.; SGRILLO, R. B.; SANTOS FILHO, L. P. 2005. Quantificação de perdas causadas por doenças em cacaueteiro. In: Ribeiro do Valle, F.X. (Org.). Quantificação de perdas no manejo de doenças em plantas. Viçosa, MG, UFV. pp.104-121.
- PAIM, V. R. L. M. et al. 2006. Sources of resistance to *Crinipellis perniciosa* in progenies of cacao accessions collected in the Brazilian Amazon. *Scientia Agricola* (63):572-578.
- OLIVEIRA, M. L.; LUZ, E. D. M. N. 2012. Principais doenças do cacaueteiro e seu manejo. In: Valle, R. R. (Org.). Ciência, tecnologia e manejo do cacaueteiro. Brasília, DF, Ceplac. pp.187-275.
- PIMENTA NETO, A. A. et al. 2018. Selection of cocoa progenies for resistance to witches' broom. *Tropical Plant Pathology* (43):381-388.
- PIRES, J. L.; LUZ, E. D. M. N.; LOPES, U. V. 1997. Resistência em campo de clones de cacaueteiro à Podridão-Parda, causada por *Phytophthora* spp na Bahia, Brasil. *Fitopatologia Brasileira* (22):375-380.
- PIRES, J. L. et al. 2012a. Association among sources of resistance to witches' broom disease for the increment of the level and durability of the character. *Agrotrópica (Brasil)* (24):27-30.
- PIRES, J. L. et al. 2012b. New genes of resistance to witches' broom identified by the behavior of different clones over time In: 17th International Cocoa Research Conference, Lagos, Nigeria, 2012. Proceeding, COPAL, Lagos, Nigeria. pp.169-175.
- SILVA, S. D. V. M. et al. 2010. Parent selection for cocoa resistance to witches' broom. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* (45):680-685.
- RODRIGUES, G. S.; PIRES, J. L.; LUZ, E. D. M. N. 2020. Association of genes from different sources of resistance to major cacao diseases. *Revista Ceres (Brasil)* (67):383-394.
- SAS INSTITUTE INC. SAS/STAT User's Guide. Release 6.03. 1988 Cary, NC: SAS Institute Inc. 1028p.
- WADSWORTH, R. M. et al. 1997. International Cocoa Germplasm database. London, LIFFE. 1200p.
- WOLPERT, T. J.; DUNKLE, L. D.; CIUFFETTI, L. M. 2002. Host-selective toxins and avirulence determinants: What's in a name. *Annual Review of Phytopathology* (40):251-85.
- YAMADA, M. M. et al. 2014. Ocorrência de vassoura-de-bruxa em progênies de cacaueteiro selecionadas pelo programa de melhoramento na Estação Experimental Joaquim Bahiana. *Agrotrópica (Brasil)* (26):197-202.

FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES NO CRESCIMENTO E NUTRIÇÃO DE MUDAS CLONAIS DE *Theobroma cacao* L.

Maria Aparecida N. Santos¹, Carla S. Sousa², Eduardo Gross³, Leoberto J. X. Oliveira Filho³, Thâmara M. Lima³, Bruno T. Goto⁴

¹Universidade Federal do Recôncavo da Bahia. Rua G, 99A, Vereador Acácio Almeida, Itajuípe, Ba, Brasil. aparecida.santos13@bol.com.br. ²Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Baiano-Campus Alagoinhas. Rua Manoel Romão, 150, Alagoinhas Velha - Alagoinhas, Ba, Brasil. cssagro@yahoo.com.br. ³Universidade Estadual de Santa Cruz-Campus Soane Nazaré de Andrade, Rodovia Ilhéus/Itabuna, km 16, Bairro Salobrinho, Ilhéus, Ba, Brasil. egross@uesc.br, ileo.agro@gmail.com, thamaralima6@gmail.com. ⁴Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Avenida Senador Salgado Filho, 3000, Lagoa nova, Natal, RN, Brasil. brunogoto@hotmail.com.

O presente estudo teve como objetivo avaliar a eficiência de espécies de fungos micorrízicos arbusculares no crescimento e nutrição de mudas clonais de cacau. O experimento foi instalado em delineamento de blocos inteiramente casualizados, em esquema fatorial 4 x 4 + 1, sendo quatro espécies de fungos micorrízicos arbusculares: *Acaulospora mellea* Spain & N.C. Schenck, *Dentisculata heterogama* T. H. Nicolson & Gerd.) Sieverd., F.A. Souza & Oehl, *Scutellospora calospora* (T.H. Nicolson & Gerd.) C. Walker and F.E. Sanders (1986), *Glomus formosanum* Wu & Chen., mais tratamento controle e quatro clones de cacau: SJ 02, CEPEC 2002, CCN 51, PH 16; com cinco repetições. Após 120 dias, o experimento foi coletado e determinado: altura das mudas, diâmetro do caule, produção de biomassa seca na parte aérea e raízes, teores de macronutrientes na parte aérea, taxa de colonização micorrízica das raízes. O clone CCN 51 apresentou maiores teores de Ca e Mg, bem como diâmetro do caule e peso seco das raízes. Os clones PH 16 e CCN 51 apresentaram melhores rendimentos de peso seco da parte aérea, quando inoculados com as espécies fúngicas *A. mellea*, *S. calospora*, *G. formosanum*. Maiores valores referentes à taxa de colonização foram observados nas mudas inoculadas pelas espécies do gênero *Glomus*, *Scutellospora*, *Acaulospora*, sendo os gêneros *Acaulospora* e *Glomus* mais eficientes na absorção do S. A taxa de colonização apresentou correlação positiva com o desenvolvimento das mudas.

Palavras-chave: Produção de mudas, *Theobroma cacao* L. micorrização.

Arbuscular mycorrhizal fungi on the growth and nutrition of clonal seedlings of *Theobroma cacao* L. The present study aimed to evaluate the efficiency of arbuscular mycorrhizal fungi species in the growth and nutrition of clonal cocoa seedlings. The experiment was installed in a completely randomized block design, in a 4 x 4 + 1 factorial scheme, with four species of arbuscular mycorrhizal fungi: *Acaulospora mellea* Spain & N.C. Schenck, *Dentisculata heterogama* T. H. Nicolson & Gerd.) Sieverd., F.A. Souza & Oehl, *Scutellospora calospora* (T.H. Nicolson & Gerd.) C. Walker and F.E. Sanders (1986), *Glomus formosanum* Wu & Chen., plus control treatment and four cocoa clones: SJ 02, CEPEC 2002, CCN 51, PH 16; with five repetitions. After 120 days the experiment was collected and determined: height of seedlings, stem diameter, production of dry biomass in the aerial part and roots, content of macronutrients, colonization rate. The CCN 51 clone showed higher levels of Ca and Mg, as well as stem diameter and root dry weight. The PH 16 and CCN 51 clones showed better shoot dry weight yields when inoculated with the fungal species *A. mellea*, *S. calospora*, *G. formosanum*. Higher values regarding the colonization rate were observed in seedlings inoculated by species of the genus *Glomus*, *Scutellospora*, *Acaulospora*, with the genera *Acaulospora* and *Glomus* being more efficient in absorbing S. The colonization rate showed a positive correlation with the seedling development.

Key words: Seedling production, *Theobroma cacao* L. mycorrhization.

Introdução

No Sul da Bahia, a produção de mudas de cacau, constitui-se uma etapa importante no processo de recuperação e implantação de novas áreas de cultivo da cacauicultura na região. Contudo, o grande fator restritivo advém das dificuldades econômicas de manejar a cultura sob o dossel da floresta Atlântica, desestimulando grande parte dos cacauicultores (Sodré et al., 2012). Com isso, vários esforços vêm sendo desenvolvidos para minimizar os custos de produção do cacau, especialmente para os agricultores familiares, que não dispõem de recursos financeiros para investimento nas áreas cultivadas.

Paralelo a isso, estudos vêm sendo desenvolvidos com intuito de determinar a eficiência de microrganismos simbiotes presentes no solo em promover melhorias nutricionais às plantas (Sousa, Soares & Garrido, 2009; Pralon e Martins, 2001; Sugai, Collier e Saggin Júnior, 2011). Dentre os microrganismos que promovem benefícios nutricionais para as plantas, os fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) ganham grande destaque, por se associarem a maioria das plantas vasculares, auxiliando na absorção de nutrientes disponíveis no solo e disponibilizando-os por meio das raízes às plantas hospedeiras (Wang & Qiu, 2006).

Com o estabelecimento da associação entre os simbiotes, a planta se beneficia com o aumento da área de absorção, pelas hifas fúngicas, que disponibiliza água e minerais, especialmente o fósforo, elemento pouco móvel no solo (Pereira et al., 2012), e em contrapartida o fungo é beneficiado pelos exsudatos das raízes que permitem o ciclo de vida desses microrganismos (Hoffmann e Lucena, 2006).

A produção de mudas inoculadas com fungos micorrízicos tem demonstrado resultados satisfatórios, tornando-se uma alternativa promissora na minimização dos custos gerados com o manejo e adubação (Köhl, Lukasiewicz & Van Der Heijden, 2015; Garcia et al., 2017; Pel et al., 2018), melhorando o estado nutricional das mudas, propiciando melhor estabelecimento em campo e maior taxa de pegamento, o que diminui de forma expressiva as perdas, além de formar plantas de cacau mais resistentes aos fatores abióticos e problemas fitossanitários da cultura (Yan et al., 2012; Pereira et al., 2012; Cameron et al., 2013; Zhang et al., 2019).

No processo de produção de mudas, a escolha do material vegetal também é um fator determinante para as demais fases da implantação ou restauração das áreas de cacau (Sodré, 2017). Para isso é imprescindível a seleção de cultivar adaptada às condições edáficas da região e resistentes às enfermidades fúngicas comuns nessas áreas. Nesse aspecto, a Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira (CEPLAC, 2019), registrou algumas cultivares de cacau, com características específicas que favorecem o estabelecimento e produtividade da cacauicultura. No entanto, tais atributos por si só não minimizam os danos causados por fitopatógenos nos cultivos de cacau, sendo necessários manejos e tecnologias capazes de potencializar a produtividade desses clones.

Diante do exposto, o presente trabalho propôs avaliar a eficiência de quatro espécies de fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) na produção e nutrição de mudas clonais de cacau, visando obter melhorias no crescimento e no estado nutricional das mudas.

Material e Métodos

Instalação e condução do experimento

O experimento foi instalado no Instituto Biofábrica de Cacau (IBC), em delineamento de blocos inteiramente casualizados, esquema fatorial 4x4+1, sendo quatro clones de cacau (SJ 02, CEPEC 2002, CCN 51 e PH 16) x quatro espécies de fungos micorrízicos arbusculares (*Acaulospora mellea* Spain & N.C. Schenck, *Dentisculata heterogama* (T. H. Nicolson & Gerd.) Sieverd., F.A. Souza & Oehl, *Scutellospora calospora* (T.H. Nicolson & Gerd.) C. Walker and F.E. Sanders (1986) e *Glomus formosanum* Wu & Chen.), com um tratamento controle, com cinco repetições.

As mudas de cacau foram obtidas no Instituto Biofábrica de Cacau, cultivadas inicialmente em tubetes com capacidade para 288 mL contendo substrato. Inicialmente, hastes dos clones selecionados foram introduzidas nos tubetes contendo substrato para o enraizamento. Neste procedimento a extremidade das hastes antes do plantio foram tratadas com ácido indolbutírico, para auxiliar no enraizamento das estacas. O processo de enraizamento durou aproximadamente 60 dias e durante esse período, as mudas foram

mantidas no viveiro 50% de sombra, recebendo apenas irrigação com água isenta da solução nutritiva (em virtude da inoculação com os fungos micorrízicos).

Após o enraizamento, as mudas foram transferidas para sacos plásticos com capacidade para 3 kg, contendo substrato comercial, previamente esterilizado em autoclave a 120°C durante uma hora e meia, em três dias alternados. A inoculação das mudas com as espécies de fungos micorrízicos arbusculares foi realizada colocando-se próximo a região das raízes, o inóculo formado por solo, esporos, fragmentos de hifas e raízes colonizadas, no momento do transplante para os sacos.

A quantidade de inóculo foi definida de acordo com o número de esporos por grama de solo, utilizando-se 100 esporos por planta. No tratamento controle, foram adicionados 10 mL de uma suspensão obtida pela filtração da mistura de solo-inóculo isenta de propágulos de FMAs, para tentar equilibrar a população microbiana do solo. Após a inoculação, as mudas foram mantidas em condições de viveiro (50% de sombra), sendo irrigadas com água destilada, conforme necessidade, durante 120 dias, contados a partir do enraizamento das mudas.

- Avaliação do crescimento e estado nutricional das mudas micorrizadas

Após 120 dias, as mudas foram coletadas, sendo inicialmente realizada a medição da altura das mudas (distância entre o nível do solo e a inserção do broto terminal da haste principal), com auxílio de uma régua milimetrada; e do diâmetro do caule (5 cm acima do colo da planta) utilizando um paquímetro digital. Realizada a medição, as mudas foram cortadas, separando-se a parte aérea das raízes. As raízes foram lavadas e, com auxílio de uma pinça, subamostras (< 2 mm) foram coletadas aleatoriamente e preservadas em álcool etílico a 50% para determinação da taxa de colonização micorrízica utilizando o método da placa quadriculada (Giovannetti & Mosse, 1980). O restante das raízes foi acondicionado em estufa de secagem com ventilação forçada a 65°C, até a obtenção de peso constante para determinação da biomassa seca radicular.

Para determinação da colonização micorrízica, as raízes finas coletadas das mudas (< 2mm) foram lavadas repetidas vezes em água destilada e em seguida

imersas em solução de NaOH 10% por 24 h, em temperatura ambiente, para serem diafanizadas. Após esse período, foram lavadas com água destilada, tratadas com H₂O₂ alcalina por 45 minutos e em seguida com HCl 1% por 3 minutos. Posteriormente imersas em solução de azul de trypan 0,05% lactoglicerol por 24 h, em temperatura ambiente (Koske & Gemma, 1989), e após este período, conservadas em lactoglicerol ácido, até avaliação.

As raízes coradas foram avaliadas através do método da placa quadriculada (Giovannetti & Mosse, 1980). Neste método, fragmentos de raízes coradas foram colocados em placa quadriculada (quadrículas de 1,27 cm) e observados em microscópio estereoscópico (40x), sendo contados 100 segmentos de raiz que fizeram interseção com as linhas verticais e horizontais e registrou-se o número de segmentos colonizados. Considerou-se positivos, os segmentos de raízes que apresentaram estruturas típicas de fungos micorrízicos, tais como vesículas, arbusculos, hifas e pelotões.

A parte aérea das mudas de cacau foi colocada para secar em estufa de circulação forçada de ar a 65°C até atingir peso constante. Após este período, determinou-se a biomassa seca da parte aérea, através de pesagem, e em seguida, foi realizada moagem e digestão com ácido sulfúrico e peróxido de hidrogênio (Thomas, Sheard & Moyer, 1967) e nos extratos, foram determinados os teores dos macronutrientes (N, P, K, Ca, Mg e S).

- Análise estatística

Os resultados obtidos foram submetidos ao teste de normalidade (Shapiro-Wilk) e homocedasticidade (Bartlett). Os dados referentes a colonização micorrízica foram transformados em $\text{arc sen } \sqrt{x/100}$.

Foi também realizada análise de variância e teste de Scott e Knott, a 5% de probabilidade, para a comparação das médias. Realizou-se ainda um teste de correlação de Pearson (significância pelo teste t de Student, a 5% de probabilidade), entre as variáveis, teor de macronutrientes, altura das plantas, diâmetro do caule, produção de biomassa seca na parte aérea e raízes e taxa de colonização micorrízica das raízes, utilizando o programa estatístico R (R Core Team, 2019).

Resultado e Discussão

Houve efeito do fator clone sobre o diâmetro do caule (DM) e peso seco das raízes (PSR) (Tabela 1). A interação clones versus fungos (CXF) foi significativa para peso seco da parte aérea das mudas (PSPA) ($p \leq 0,05$), e taxa de colonização micorrízica das raízes (CM) ($p \leq 0,001$). As variáveis PSPA e CM foram influenciadas pela espécie fúngica testada ($p \leq 0,001$).

O tipo de clone influenciou nos teores dos nutrientes cálcio (Ca) ($p \leq 0,05$) e magnésio (Mg) ($p \leq 0,001$) (Tabela 2). Somente houve efeito do fator fungo sobre o teor de enxofre (S) na parte aérea das mudas. Não houve efeito significativo da interação clone x fungo (CxF).

De acordo com os resultados, nota-se que mudas do clone CCN 51 apresentaram maiores teores de Ca, em relação às mudas dos demais clones (Tabela 3). Paramo et al. (2014) avaliando a absorção e distribuição de nutrientes em clones de cacau e seus efeitos nos rendimentos, verificaram que o CCN 51 foi mais eficiente na absorção de nutrientes comparado a outros

Tabela 1. Resumo da análise de variância da altura (AL), diâmetro (DM), peso seco da parte aérea (PSPA), peso seco da raiz (PSR), taxa de colonização (CM)

Fonte de Variação	QM				
	AL	DM	PSPA	PSR	CM
Clone (C)	34,50 ^{ns}	0,505*	0,0047 ^{ns}	3,05*	0,0078 ^{ns}
Fungo (F)	177,72 ^{ns}	0,088 ^{ns}	0,013***	1,36 ^{ns}	0,1729***
C x F	64,60 ^{ns}	0,172 ^{ns}	0,0051*	1,88 ^{ns}	0,0508***
Resíduo	79,78	0,141	0,0018	0,99	0,0102
CV%	25,62	14,93	18,82	66,56	14,81

*** e * significativo ($p \leq 0,001$) e ($p \leq 0,05$), respectivamente pelo teste F. não significativo (ns), Quadrado Médio (QM), Coeficiente de Variação (CV).

Tabela 2. Resumo da análise de variância dos teores de potássio (K), cálcio (Ca), magnésio (Mg), nitrogênio (N), fósforo (P), enxofre (S)

Fonte de Variação	QM					
	K	Ca	Mg	N	P	S
Clone (C)	28,34 ^{ns}	12,38*	7,52***	8,97 ^{ns}	0,270 ^{ns}	0,268 ^{ns}
Fungo (F)	8,48 ^{ns}	1,32 ^{ns}	1,45 ^{ns}	2,72 ^{ns}	0,070 ^{ns}	0,316*
CxF	32,36 ^{ns}	3,94 ^{ns}	0,83 ^{ns}	4,50 ^{ns}	0,095 ^{ns}	0,078 ^{ns}
Resíduo	24,51	3,24	1,09	4,70	0,095	0,106
CV%	25,29	16,38	19,63	13,81	13,52	17,35

*** e * significativo ($p \leq 0,001$) e ($p \leq 0,05$), respectivamente pelo teste F. não significativo (ns), Quadrado Médio (QM), Coeficiente de Variação (CV).

Tabela 3. Teores de Ca (cálcio), Mg (magnésio), diâmetro do caule (DIAM) e peso seco das raízes (PSR) de diferentes clones de cacau

Clone	Ca (g kg ⁻¹)	Mg (g kg ⁻¹)	DM (cm)	PSR (g planta ⁻¹)
SJ 02	9,905 b	4,70 b	2,38 b	1,03 b
CEPEC 2002	10,87 b	4,75 b	2,74 a	2,02 a
CCN 51	12,11 a	6,03 a	2,59 a	1,70 a
PH 16	11,13 b	5,86 a	2,35 b	1,22 b

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

clones. Os clones SJ 02, CEPEC 2002 e PH 16 não diferiram estatisticamente entre si, com relação aos teores de Ca na parte aérea, cujos valores variaram entre 9,9 e 12,11 (g kg⁻¹). Não houve diferença significativa entre os clones CCN 51 e PH 16 com relação ao teor de Mg. De acordo com Paramo et al. (2014) essa diferença nos teores de nutrientes em clones de cacau pode ocorrer, uma vez que alguns clones são mais eficientes na absorção de determinados nutrientes que outros.

Verificou-se melhor desempenho dos clones CEPEC 2002 e CCN 51 em diâmetro do caule (DM) e peso seco da raiz (PSR), não diferindo estatisticamente entre si. Isso evidencia que há uma diferença entre os clones com relação à eficiência nutricional e produção de biomassa (Carmo Pinto et al., 2011). Os clones SJ 02 e PH 16 apresentaram desempenho inferior para essas variáveis.

Analisando o desempenho das mudas dos diferentes clones de cacau inoculadas com as espécies fúngicas, nota-se que as mudas do clone SJ 02 inoculadas com as espécies fúngicas não diferiram estatisticamente entre si, contudo, apresentaram maior incremento na produção de biomassa na parte aérea em comparação às mudas do tratamento controle (Tabela 4).

Mudas do clone CEPEC 2002 inoculadas com as espécies fúngicas não diferiram estatisticamente das mudas controle deste clone. Nesse caso, nota-se que provavelmente os rendimentos em peso seco da parte aérea (PSPA) das mudas de cacau foram provenientes de aspectos genéticos do próprio clone. Observa-se com os resultados

Tabela 4. Efeito da inoculação com espécies de fungo micorrízicos arbusculares (FMA) sobre o peso seco da parte aérea (g planta⁻¹) de diferentes clones de cacau

Espécies de FMAs	Clones			
	SJ 02	CEPEC 2002	CCN 51	PH 16
<i>Acaulospora mellea</i>	3,80 a B	5,85 a A	8,11 a A	3,85 b B
<i>Dentisculata heterogama</i>	5,50 a A	8,16 a A	2,21 b B	5,55 a A
<i>Scutellospora calospora</i>	7,18 a A	8,33 a A	7,29 a A	8,51 a A
<i>Glomus formosanum</i>	5,83 a A	4,93 a A	7,37 a A	2,74 b B
Controle	2,58 b A	4,56 a A	4,20 b A	3,48 b A

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula, na linha, e minúscula, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

que genótipos do CEPEC 2002 possuem alto potencial de produção de biomassa, sendo assim, o desenvolvimento das mudas desse clone independe da inoculação com fungos micorrízicos arbusculares (FMAs).

No caso do clone CCN 51, as espécies fúngicas *Ac. mellea*, *Sc. calospora* e *G. formosanum* promoveram incremento no peso seco da parte aérea das mudas. Dentro do mesmo clone não diferiram estatisticamente entre si com relação à produção de biomassa seca da parte aérea as mudas inoculadas com a espécie *D. heterogama* e tratamento controle. Para o clone PH 16 as espécies *D. heterogama* e *Sc. calospora*, destacaram-se, enquanto que mudas inoculadas com as espécies *Ac. mellea* e *G. formosanum* não diferiram das mudas controles.

Analisando a eficiência de cada espécie de FMAs entre os diferentes clones, observa-se que *Ac. mellea*, promoveu incrementos significativos na produção de biomassa seca na parte aérea dos clones CEPEC 2002 e CCN 51. A espécie *D. heterogama*, aumentou a produção de biomassa seca da parte aérea (PSPA) nas mudas de cacau dos clones SJ 02, CEPEC 2002 e PH 16. Não houve diferença significativa na produção de biomassa seca da parte aérea dos clones quando inoculados com a espécie *Sc. calospora*. Enquanto para a espécie *G. formosanum* apenas o PH 16 apresentou desempenho inferior aos outros clones para peso seco da parte aérea (PSPA) (Tabela 4). Vários trabalhos evidenciam os efeitos positivos da inoculação por fungos micorrízicos no aumento da produção de matéria seca em frutíferas (Trindade, Siqueira e Almeida, 2001; Minihoni e Auler, 2003).

Samarão et al. (2011) encontraram respostas positivas da inoculação com

fungos micorrízicos arbusculares proporcionando aumento na produção de matéria seca de mudas de gravioleira. Costa et al. (2001) testando a inoculação de FMAs em aceroleira também verificaram resultados expressivos da inoculação no aumento da matéria seca da parte aérea. Entretanto é preciso considerar o que foi verificado por Soares et al. (2012) em seu estudo sobre a inoculação de espécies de FMAs em mudas de jenipapeiro, que geralmente existe seletividade do hospedeiro

por determinadas espécies de FMAs. Nesse sentido, alguns clones de cacau são mais responsivos a inoculação micorrízica com determinada espécie em comparação a outras, e isso dependerá do grau de compatibilidade genética entre o fungo e a planta.

A taxa de colonização micorrízica das raízes depende muito da interação fungo/planta e também é influenciada por fatores ambientais (Folli-Pereira et al, 2012). De acordo com Cavalcante et al. (2002), a inoculação de diferentes espécies de FMA resulta em respostas diferenciadas por parte do hospedeiro. Nesse sentido verificou-se maiores taxa de colonização do clone SJ 02 pelas espécies *D. heterogama*, *Sc. calospora* e *G. formosanum*, com respectivamente 68%, 70% e 80% (Tabela 5). Mudas do clone CEPEC 2002 apresentaram maiores taxas de colonização, quando inoculadas pelas espécies *Sc. calospora* (79%) e *G. formosanum* (84%) que não diferiram estatisticamente entre si.

As mudas do clone CCN 51 quando inoculadas pelo fungo *G. formosanum* apresentaram maiores taxas de colonização micorrízica (84%), diferindo estatisticamente das mudas inoculadas com as demais espécies. Silveira et al. (2003) registraram resultados semelhantes avaliando a espécie do gênero *Glomus*

Tabela 5. Taxa de colonização micorrízica das mudas de diferentes clones de cacau

Espécies de FMAs	Clones			
	SJ 02	CEPEC 2002	CCN 51	PH 16
<i>Acaulospora mellea</i>	50 b A	41 b A	63 b A	56 c A
<i>Dentisculata heterogama</i>	68 a A	57 b A	60 b A	76 b A
<i>Scutellospora calospora</i>	70 a B	79 a B	71 b B	98 a A
<i>Glomus formosanum</i>	80 a A	84 a A	84 a A	54 c B

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula, na linha, e minúscula, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

em seu estudo com mudas de maracujazeiro. O clone PH 16, apresentou maior taxa de colonização pela espécie *Sc. calospora* (98%) seguida pela espécie *D. heterogama* (76%) que diferiram estatisticamente entre si e das demais espécies. Contudo, mudas deste clone inoculadas com as espécies *Ac. mellea* e *G. formosanum* não diferiram estatisticamente entre si com relação à taxa de colonização micorrízica.

Referente aos melhores clones dentro de cada espécie de FMAs para taxa de colonização observa-se que as espécies *Ac. mellea* e *D. heterogama*, não apresenta diferença estatística entre os clones utilizados. Enquanto para *Sc. calospora* apenas o clone PH 16 apresentou melhor taxa de colonização das raízes. Já para *G. formosanum* todos os clones apresentaram melhores taxas de colonização, exceto o PH 16, onde registrou-se resultado inferior aos demais clones dentro dessa espécie (Tabela 5).

Independente do tipo de clone, mudas de cacau inoculadas com as espécies fúngicas *Ac. mellea* e *G. formosanum*, apresentaram maiores teores de enxofre na parte aérea que as mudas inoculadas com as demais espécies (Tabela 6). Não houve diferença significativa nos teores de S na parte aérea das mudas de cacau inoculadas pelas espécies *D. heterogama*, *Sc. calospora* e as mudas do tratamento controle. O enxofre é de extrema importância no desenvolvimento da planta, suas funções assemelham-se ao do nitrogênio (Stipp e Casarin, 2010). Assim também como o nitrogênio, este elemento não se encontra disponível no solo para absorção pelas plantas, havendo a necessidade de processos microbiológicos para mineralização e disponibilização deste em forma de sulfato (SO_4^{2-}). Sendo assim, nota-se que houve uma contribuição significativa das espécies *Ac. mellea* e *G. formosanum* no teor de enxofre nas mudas de cacau.

No presente estudo também foi avaliada a correlação entre a taxa de colonização micorrízica (CM) com os parâmetros de crescimento (AL, DM, PSPA e PSR) e nutrição das mudas (N, P, K, S, Ca, Mg) (Tabelas 7 e 8).

Houve correlação positiva significativa entre taxa de colonização micorrízica (CM) e peso seco da parte aérea (PSPA) ($r = 0,61$), peso seco da raiz (PSR) ($r = 0,48$) e altura de plantas (ALT) ($r = 0,61$) (Tabela 7). Silveira et al. (2003) constataram em seu

Tabela 6. Teor de enxofre (g kg^{-1}) nas mudas de cacau de diferentes clones inoculadas pelas espécies de FMAs

Fungos	Enxofre (S) (g kg^{-1})
<i>Acaulospora mellea</i>	1,98 a
<i>Dentisculata heterogama</i>	1,72 b
<i>Scutellospora calospora</i>	1,86 b
<i>Glomus formosanum</i>	2,09 a
Controle	1,72 b

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Tabela 7. Coeficiente de correlação linear de Pearson para as variáveis de desenvolvimento das mudas e taxa de colonização

Desenvolvimento das mudas	CM
AL	0,61*
DM	0,33 ^{ns}
PSPA	0,61*
PSR	0,48*

*significativo a 5% de probabilidade pelo teste t. ns: não significativo a 5% de probabilidade pelo teste t.

Tabela 8. Coeficiente de correlação linear de Pearson para as variáveis de nutrição das mudas e taxa de colonização

Variáveis de nutrição das mudas	Taxa de Colonização
N	0,19 ^{ns}
P	0,21 ^{ns}
K	-0,20 ^{ns}
S	0,41*
Ca	-0,16 ^{ns}
Mg	0,13 ^{ns}

*significativo a 5% de probabilidade pelo teste t. ns: não significativo a 5% de probabilidade pelo teste t.

estudo correlação significativa entre taxa de colonização e produção de matéria seca, o que reflete efeito positivo da micorrização no crescimento das mudas. Soares et al. (2012), avaliando fungos micorrízicos arbusculares no crescimento e nutrição de mudas de jenipapeiro também encontraram correlações significativas entre a taxa de colonização e parâmetros de crescimento das mudas.

No tocante a correlação da taxa de colonização das raízes e as variáveis de nutrição das mudas de cacau os resultados demonstram que houve correlação significativa apenas para o elemento enxofre (S) ($r = 0,41$) (Tabela 8). Desse modo os fungos micorrízicos associados às raízes das mudas de cacau as tornaram mais eficientes na absorção do enxofre (S).

Os elementos nitrogênio (N), fósforo (P), potássio (K), Cálcio (Ca) e magnésio (Mg) não apresentaram correlações significativas com a taxa de colonização micorrízicas raízes. Entretanto a ausência de correlação não significa que não houve uma contribuição dos fungos micorrízicos arbusculares na nutrição das mudas de cacau, uma vez que para se medir essa eficiência vários fatores devem ser considerados como concentração do nutriente no solo e interação fungo/planta (Antoniolli e Kaminski, 1991; Oliveira, Oliveira e Figueredo, 2003).

Conclusão

- O clone CCN 51 apresentou melhor desempenho na absorção do Cálcio e Magnésio, maior peso seco da raiz e diâmetro do caule.

- Os clones PH 16, CCN 51 apresentaram melhores rendimentos em peso seco da parte aérea, quando inoculado com as espécies de FMAs: *Acaulospora mellea*, *Scutellospora calospora* e *Glomus formosanum*.

- Todos os clones apresentaram boas taxas de colonização das espécies de FMAs utilizadas exceto SJ 02, CEPEC 2002 e CCN 51 dentro da espécie *Scutellospora calospora* e PH 16 dentro da espécie *Glomus formosanum*.

- As espécies *Acaulospora mellea* e *Glomus formosanum* foram mais eficientes na absorção do Enxofre.

- Houve correlações significativas entre a taxa de colonização das raízes e o desenvolvimento das mudas.

Agradecimentos

À Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB) e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias, pela oportunidade de realizar este projeto e o curso de mestrado. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos. À Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC) pela disponibilização do laboratório, equipamentos e reagentes para realização das análises. Ao Instituto Biofábrica de Cacau pela disponibilização e preparo das mudas de cacau, bem como, de pessoal do corpo técnico para auxiliar em todo processo de montagem e condução do experimento.

Literatura Citada

- ANTONIOELLI, Z. I.; KAMINSKI, J. 1991. Micorrizas - Revisão Bibliográfica. *Ciência Rural (Brasil)* 21(3):441-455.
- CAMERON, D. D. et al. 2013. Mycorrhiza-induced resistance: more than the sum of its parts? *Trends In Plant Science* 18(10):539-545.
- CARMO PINTO, S. I. et al. 2011. Eficiência nutricional de clones de eucalipto na fase de mudas cultivados em solução nutritiva. *Revista Brasileira de Ciência do Solo* 35(1):523-533.
- CAVALCANTE, U. M. T. et al. 2002. Efeito de fungos micorrízicos arbusculares, da adubação fosfatada e da esterilização do solo no crescimento de mudas de maracujazeiro amarelo. *Revista Brasileira de Ciências do Solo* 26(1):1099-1106.
- COMISSÃO EXECUTIVA DO PLANO DA LAVOURA CACAUEIRA. 2019. Lista de clones. Disponível em <<http://www.ceplac.gov.br/radar/ListaClones.asp>> Acesso em 20 Set.
- COSTA, C. M. C. et al. 2001. Influência de fungos micorrízicos arbusculares sobre o crescimento de dois genótipos de aceroleira (*Malpighia emarginata* D.C.). *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 36(1):893-901.
- FOLLI-PEREIRA, M. S. et al. 2012. Micorriza arbuscular e a tolerância das plantas ao estresse. *Revista Brasileira de Ciência do Solo* 36(6):1663-1679.
- GARCIA, K. et al. 2017. Physiological Responses and Gene Co-Expression Network of Mycorrhizal Roots under K⁺ Deprivation. *Plant Physiology* 173(3):1811-1823.
- GIOVANNETTI, M.; MOSSE, B. 1980. An evaluation of techniques to measure vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytologist* 84(3):484-500.
- HOFFMANN, L. V.; LUCENA, V. S. 2006. Para entender Micorrizas Arbusculares. Embrapa Algodão-Documentos (INFOTECA-E), 1ª ed. Campina Grande, PB.
- KÖHL, L. et al. 2015. Establishment and effectiveness of inoculated arbuscular mycorrhizal fungi in

- agricultural soils. *Plant, Cell & Environment* 39(1):136-146.
- KOSKE, R. E.; GEMMA, J. N. 1989. A Modified Procedure for Staining Roots to Detect VA Mycorrhizas. *Mycological Research* 92(1):486-488.
- MINHONI, M. T. A.; AULER, P. A. M. 2003. Efeito do fósforo, fumigação do substrato e fungo micorrízico arbuscular sobre o crescimento de plantas de mamoeiro. *Revista Brasileira de Ciência do Solo* 27(5):841-847.
- OLIVEIRA, A. N.; OLIVEIRA, L. A.; FIGUEIREDO, F. 2003. Colonização micorrízica e concentração de nutrientes em três cultivares de bananeiras em um latossolo amarelo da Amazônia central. *Acta Amazônica (Brasil)* 33(3):345-352.
- PARAMO, Y. J. P. et al. 2014. Absorción y distribución de nutrientes en clones de cacao y sus efectos en el rendimiento. *Acta Agronómica* 63(2):145-152.
- PEL, R. et al. 2018. Growth benefits provided by different arbuscular mycorrhizal fungi to *Plantago lanceolata* depend on the form of available phosphorus. *European Journal of Soil Biology* 88(1):89-96.
- PEREIRA, M. S. F. et al. 2012. Micorriza arbuscular e a tolerância das plantas ao estresse. *Revista Brasileira de Ciência do Solo* 36(6):1663-1679.
- PRALON, A. Z.; MARTINS, M. A. 2001. Utilização do resíduo industrial ferkal na produção de mudas de *Mimosa caesalpiniaefolia*, em estéril de extração de argila, inoculadas com fungos micorrízicos arbusculares e rizóbio. *Revista Brasileira de Ciência do Solo* 25(1):55-63.
- R CORE TEAM. 2019. A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- SAMARÃO, S. S. et al. 2011. Desempenho de mudas de gravioleira inoculadas com fungos micorrízicos arbusculares em solo não-esterilizado, com diferentes doses de fósforo. *Acta Scientiarum Agronomy* 33(1):81-88.
- SILVEIRA, A. P. D. et al. 2003. Desempenho de fungos micorrízicos arbusculares na produção de mudas de maracujazeiro-amarelo, em diferentes substratos. *Bragantia* 62(1):89-99.
- SOARES, A. C. F. et al. 2012. Fungos micorrízicos arbusculares no crescimento e nutrição de mudas de jenipapeiro. *Revista Ciência Agronômica (Brasil)* 43(1):47-54.
- SODRÉ, G. A. 2017. Cultivo do cacauzeiro no estado da Bahia. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. 126p.
- SODRÉ, G. A. et al. 2012. Extrato da casca do fruto do cacauzeiro como fertilizante potássico no crescimento de mudas de cacauzeiro. *Revista Brasileira de Fruticultura* 34(3):881-887.
- SOUSA, C. S.; SOARES, A. C. F.; GARRIDO, M. S. 2009. Tomato seedlings grown in organic potting mix inoculated and incubated with streptomycetes. *Bragantia* 68(1):195-203.
- SUGAI, M. A. A.; COLLIER, L. S.; SAGGIN JÚNIOR, O. J. 2011. Inoculação micorrízica no crescimento de mudas de angico em solo de cerrado. *Bragantia* 70(2):416-423.
- STIPP, S. R.; CASARIN, V. 2010. A importância do enxofre na agricultura brasileira. *Informações agronômicas (Brasil)* 129(1):14-20.
- THOMAS, R. L.; SHEARD, R. W.; MOYER, J. R. 1967. Comparison of conventional and automated procedures for nitrogen, phosphorus, and potassium analysis of plant material using a single digestion. *Agronomic Journal* 59(1):240-243.
- TRINDADE, A. V.; SIQUEIRA, J. O.; ALMEIDA, F. P. 2001. Dependência micorrízica de variedades comerciais de mamoeiro. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 36(12):1485-1494.
- WANG, B.; QIU, Y. L. 2006. Phylogenetic distribution and evolution of mycorrhizas in land plants. *Mycorrhiza* 16(1):299-363.
- YAN, L. I. L. et al. 2012. Effects of arbuscular mycorrhizal fungi communities on soil quality and the growth of cucumber seedlings in a greenhouse soil of continuously planting cucumber. *Pedosphere* 22(1):79-87.
- ZHANG, Z. et al. 2019. Effects of arbuscular mycorrhizal fungi on inoculated seedling growth and rhizosphere soil aggregates. *Soil and Tillage Research* 194(1):1-7.

ESTUDO DA CLARIFICAÇÃO DO MEL DE CACAU COMO PRÉ-TRATAMENTO PARA PRODUÇÃO DE UMA BEBIDA FERMENTADA

Thalita Gomes de Souza¹, Bárbara Teodora Andrade Koelher¹, Soraya Maria Moreira de Souza², Rafael Resende Maldonado (in memoriam)³, Elizama Aguiar-Oliveira^{1,*}

¹Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), Ilhéus, Bahia, Brasil.

²Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira (CEPLAC)/ CEPEC, Itabuna, Bahia, Brasil.

³Colégio Técnico de Campinas (COTUCA), Universidade Campinas (UNICAMP), Campinas, São Paulo, Brasil.

*Autor para correspondência: eaoliveira@uesc.br

O mel de cacau (MC) é uma polpa mucilaginosa, rica em pectina, obtida do fruto do cacaueiro (*Theobroma cacao*) e apresenta bom potencial para a produção de bebidas alcoólicas, no entanto, faz-se necessário a redução da pectina principalmente para evitar a formação de precipitados. Assim, este estudo teve por objetivo investigar a clarificação do MC, como pré-tratamento, com duas etapas sequenciais: enzimática (pectinases comerciais) e física (bentonita). As melhores condições de clarificação que resultaram nos menores valores de absorvâncias ($abs_{600} = 0,055 \pm 0,037$) e densidade ($\rho = 1,0547 \pm 0,0012$ g/mL) foram definidas para a etapa enzimática como: 22,57 U/mL de poligalacturonase / 0,0131 U/mL de pectinametilsterase / 25 °C / 75 rpm / 30 min e para a etapa física como: 1,0 g/mL de bentonita / 30 min / 4.000 g. Foi ainda investigada a fermentação do MC clarificado apenas com as pectinases em comparação com o MC *in natura* e não foi possível identificar diferença significativa entre os teores alcoólicos obtidos (~8 %, v/v) após 24 h. Estes resultados sugerem a utilização das pectinases, e também da bentonita, no pré-tratamento do MC para que possa ser destinado à produção de bebidas fermentadas e/ou destiladas.

Palavras-chave: enzimas pectinolíticas, fermentado de fruta, planejamento de experimentos, produtos derivados de frutas.

Study of the clarification of cocoa honey as a pre-treatment for the production of a fermented beverage. Cocoa honey (MC) is a mucilaginous pulp, rich in pectin, obtained from the fruit of the cacao tree (*Theobroma cacao*) and has a good potential for the production of alcoholic beverages, however, it is necessary to reduce pectin mainly to avoid the formation of precipitates. Thus, this work aimed to investigate the clarification of CM, as a pre-treatment before fermentation, with two sequential stages: enzymatic (commercial pectinases) and physical (bentonite). The best clarification conditions that favored the lowest absorbance ($abs_{600} = 0.055 \pm 0.037$) and density ($\rho = 1.0547 \pm 0.0012$ g/mL) were defined for the enzymatic step as: 22.57 U/mL of polygalacturonase / 0.0131 U/mL of pectinamethylesterase / 25 °C / 75 rpm / 30 min and for the physical step as: 1.0 g/mL bentonite / 30 min / 4,000 g. The fermentation of the clarified MC only with pectinases was also investigated in comparison to the fermentation of MC *in natura* and it was not possible to identify a significant difference between the alcoholic levels obtained (~8 %, v / v) after 24 h. These results suggest the use of pectinases, and also bentonite, for the pretreatment of MC so that it can be used in the production of fermented and/or distilled beverages.

Key words: experimental design, fruit products, fruit wine, pectinolytic enzymes.

Introdução

O termo “pectina” se refere a um grupo complexo de polissacarídeos estruturais naturalmente encontrado em vegetais (Canteri et al., 2012), no entanto, a suspensão de partículas de pectina (associadas ou não a proteínas, polifenóis, etc.) em sucos e polpas de frutas resulta em uma turbidez e viscosidade indesejadas para processos e produtos industrializados. Os processos de clarificação industrial de sucos e polpas visam a melhoria tanto de características sensoriais quanto tecnológicas, por meio da hidrólise das substâncias pécticas, o que resulta na redução da turbidez e da viscosidade além de prevenir a formação de precipitados que pode acontecer durante as etapas de processamento ou durante o estoque do produto final (Pinelo, Zeuner & Meyer, 2010; Sandri et al., 2011). Diferentes metodologias podem ser aplicadas para se obter a clarificação de sucos e polpas, mas de forma geral, ela tem sido mais comumente obtida pelo emprego de pectinases (enzimas capazes de hidrolisar as substâncias pécticas) associadas (ou não) a outros agentes físicos como bentonita e alginato (Sainz e Ferri, 2015) ou outras técnicas como a microfiltração (Bagci, 2014). A escolha da metodologia a ser aplicada em diferentes escalas de processo, geralmente é feita em função de fatores como, por exemplo, viabilidade econômica e/ou técnica e a eficiência e compatibilidade com a polpa/suco.

As pectinases podem ser classificadas¹, a depender da forma como atuam sobre as substâncias pécticas, como: pectato liase (E.C. 4.2.2.2 – atua na ligação (1,4)- α -D-galacturonana do pectato), pectina liase (E.C. 4.2.2.10 – atua na posição (1,4)- α -D-galacturonana metil éster da pectina), poligalacturonase (E.C. 3.2.1.15 – hidrolisa de forma randômica as ligações (1,4)- α -D-galactosidurônicas de pectato e galacturonanas) e pectina metilesterase (E.C. 3.1.1.11 – hidrolisa a ligação éster entre o ácido galacturônico e o metanol na pectina). Estas enzimas são muito eficientes para a clarificação de sucos e polpas de frutas (Uenojo e Pastore, 2007) e são aplicadas, por exemplo, como soluções (Sandri et al., 2011) ou na forma imobilizada (Ázar et al., 2020).

¹BRENDA - The Comprehensive Enzyme Information System. Disponível em: <https://www.brenda-enzymes.org/index.php>, última consulta em 29/12/2020.

O “mel de cacau” (MC), em comparação com a “polpa de cacau” (PC), é um material mucilaginoso que se encontra mais aderido às sementes do cacau – fruto do cacaueiro (*Theobroma cacao*) – e, devido a seu maior teor de pectina (até cerca de 2,5 % m/v), apresenta uma maior viscosidade (Santos, 2012). Seu consumo tem sido feito na forma *in natura* (da mesma forma que a PC) ou empregado, por exemplo, na elaboração de geleias (Santos, 2012) e outros produtos como sorvete (Ramos et al., 2014) e fermentados de frutas (Magalhães-Guedes et al., 2019). O MC também é empregado (artesanalmente) na produção de licores (*blend* com cachaça), mas apresenta um bom potencial para a produção (em maior escala) de bebidas fermentadas e destiladas. No entanto, se o MC for empregado em etapas como fermentação e/ou destilação sem a redução do seu conteúdo inicial das substâncias pécticas isso pode resultar na formação de precipitados durante essas etapas.

Assim, tendo em vista a importância da cultura cacaueira na região Sul da Bahia e a necessidade de uma maior variedade de produtos derivados do cacau com maior valor agregado, o presente estudo teve por objetivo investigar as melhores condições para clarificação do MC empregando uma etapa enzimática (com pectinases comerciais) seguida de uma etapa de refinamento com agente clarificante (bentonita). Os resultados obtidos sugerem que, especialmente a clarificação enzimática, pode ser aplicada como etapa de pré-fermentação do MC para a obtenção de bebidas alcoólicas (ou outros produtos).

Material e Métodos

Mel de cacau (MC) *in natura* foi adquirido na cidade de Ilhéus (BA, Brasil) entre os meses de setembro a dezembro, em duas safras, em 2018 e 2019. O MC foi filtrado com peneira (de uso doméstico) com gaze e pasteurizado a 80 °C/ 1 a 2 min em banho-maria e, após resfriamento, foi congelado e assim mantido até o momento de uso. Bentonita, na forma de pó fino, foi doada pela empresa Brasil Minas (Guarulhos, SP, Brasil). As soluções enzimáticas Pectinex[®]: SMASH XXL (pectina liase de *Aspergillus niger*), ULTRA SP-L (poligalacturonase de *A. aculeatus*) e Yieldmash Extra (pectinametilesterase de *A. niger*) foram doadas pela empresa Novozymes (Araucária, PR) e continham, conforme informações

do fabricante, atividades de 22.500, 3.800 e 3,30 U/mL, respectivamente. A solução SMASH XXL também continha atividade residual (valor não declarado) de glicoamilase. A levedura comercial *Saccharomyces cerevisiae* CA-11, recomendada pelo fabricante para produção de cachaça, foi doada pela empresa LNF (Bento Gonçalves, RS, Brasil).

Clarificação: enzimática e física

A clarificação de mel de cacau (MC) foi realizada em duas etapas sequenciais, uma enzimática e uma física. Para este fim, foram empregados 50 mL de MC em Erlenmeyers (250 mL) sendo adicionado um volume total de 0,5 mL de soluções de pectinase; a reação foi conduzida em incubadora *shaker* (MA830 Marconi®). Em seguida, o agente clarificante bentonita foi adicionado, misturado e após um período de complexação (estática) em temperatura ambiente, o meio foi centrifugado (K14-4000 KASVI) resultando no mel de cacau clarificado (MCC).

O estudo das melhores condições para a clarificação foi conduzido com a ferramenta estatística de planejamento experimental (Rodrigues e Iemma, 2014) sendo aplicada uma matriz do tipo Placket-Burman (PB12) para sete variáveis independentes (fatores) e duas variáveis dependentes (respostas). Para a etapa enzimática, foram investigados os fatores: proporção volumétrica (PEC) do volume total de soluções enzimáticas contendo: pectina liase / poligalacturonase / pectina metilesterase de 0:3:2 a 4:1:0 (v:v:v), temperatura (T_{pec}) de 25 a 55 °C, velocidade de rotação (*rpm*) de 75 a 125 rpm e tempo de incubação (t_{pec} , min) de 30 a 90 min. Para a etapa física foram investigados os fatores: concentração de bentonina (CLA) de 1 a 4 g/L, tempo de complexação (t_{cla}) de 30 a 90 min e velocidade de centrifugação (*cent*) de 4.000 a 7.000 g. As respostas avaliadas para o MCC foram: densidade (ρ , g/mL) e absorvância (abs_{600}). A Análises dos Efeitos com 95 % de confiabilidade foi realizada com o auxílio do software estatístico Protimiza Experimental Design² de forma a se selecionar as melhores condições de clarificação.

Com base nas respostas obtidas, duas metodologias de clarificação foram selecionadas: C1 [etapa

enzimática = 22,57 U/mL de poligalacturonase / 0,0131 U/mL de pectinametilesterase / 25 °C / 75 rpm / 30 min; etapa física = 1,0 g/mL de bentonita / 30 min / 4.000 g] e C2 [etapa enzimática = 178,22 U/mL de pectina liase / 7,52 U/mL de poligalacturonase / 55 °C / 75 rpm / 30 min; etapa física = 1,0 g/mL de bentonita / 30 min / 7.000 g] e realizadas (triplicata) sendo os valores médios de abs_{600} e ρ comparados com o MC pelo teste de Tukey (realizado a 95 % de confiabilidade com o Excel®, Microsoft).

Fermentação do mel de cacau clarificado (MCC)

As fermentações foram conduzidas (triplicata) com 50 mL do MCC com adição de 0,5 g (peso seco) da levedura comercial e 5 g de sacarose para chaptalização; a incubação ocorreu em estufa B.O.D. sob condições estáticas a 29 °C / 24 h (Koelher, 2020). Inicialmente, foram avaliadas as metodologias de clarificação C1 e C2 e, ao final das fermentações, os fermentados (F-C1 e F-C2) foram centrifugados a 12.000 g por 20 min para separação da massa celular e de outras partículas; o sobrenadante foi analisado quanto a: abs_{600} , ρ , SS, pH e teor alcoólico. Em seguida, definiu-se uma nova condição C3, realizada apenas com a etapa enzimática de C1 (descrita no item anterior) e procedeu-se a fermentação (F-C3) em comparação com a fermentação do MC; estas duas condições foram analisadas quanto à composição de açúcares, álcoois e ácidos orgânicos.

Análises físico-químicas

As análises listadas a seguir foram realizadas com base nos protocolos definidos pelo Instituto Adolfo Lutz (IAL, 2008). A densidade (ρ , g/mL) foi determinada com picnômetro de 25 mL (Protocolo 215/IV). O pH (*pH*) foi determinado com pHmetro de bancada (Protocolo 017/IV) e o teor de sólidos solúveis (SS, °Brix) foi obtido com um refratômetro portátil calibrado (Protocolo 010/IV). A presença qualitativa de pectina foi determinada com o teste do álcool (Protocolo 048/IV). A leitura da absorvância (abs_{600}) foi realizada no comprimento de onda de 600 nm (UV-Vis NOVA®).

A determinação de sacarose, glicose, frutose, etanol, metanol, ácido láctico, ácido acético e ácido cítrico foi realizada por cromatografia líquida em um

²Protimiza Experimental Design®, disponível em: <https://experimental-design.protimiza.com.br/>, último acesso em 15/05/2021.

sistema HPLC (Hitachi Primaide) com coluna de troca iônica (Aminex HPX-87H, 300 x 7,8 mm, Bio-Rad) e detector de infra-vermelho (Knauer 98.00). As amostras foram diluídas em água ultrapura e filtradas em membrana PVDF (0,45 µm). Foi empregada a fase móvel de 0,005 N de H₂SO₄ e vazão de 0,6 mL/min sendo mantida a temperatura ambiente (~26 °C) com tempo de corrida de 20 min. A aquisição e integração dos picos foi realizada utilizando o software Star Chromatography Workstation 6.0 (Varian) com base em curvas-padrão previamente obtidas com padrões cromatográficos.

Resultados e Discussões

Estudo das condições de hidrólise

O mel de cacau (MC) *in natura*, foi inicialmente caracterizado com os seguintes valores: $abs_{600} = 0,722 \pm 0,016$ e $\rho = 1,0708 \pm 0,0011$ g/mL, $pH = 3,66 \pm 0,08$ e $SS = 14,40 \pm 2,26$ °Brix; os valores de SS e pH foram muito semelhantes aos relatados por Leite et al. (2019). As respostas obtidas com a clarificação realizada em diferentes condições (Tabela 1) foram submetidas a Análise de Efeitos (Tabela 2) para seleção das melhores condições de clarificação que resultassem nos menores valores de absorvância abs_{600} e ρ .

De acordo com a Análise dos Efeitos, para ambas as respostas, a curvatura (condições centrais) não foi estatisticamente significativa (Tabela 2). Isso indica que os valores médios das respostas dos ensaios centrais (13, 14 e 15): $abs_{600} = 0,046 \pm 0,014$ e $\rho = 1,0615 \pm 0,0021$ g/mL (Tabela 1) não representam uma melhora significativa em relação a todos os ensaios realizados que apresentaram valores médios de: $abs_{600} = 0,055 \pm 0,004$ e $\rho = 1,0537 \pm 0,0036$ g/mL (Tabela 2).

A Análise dos Efeitos para a resposta abs_{600} apresentou três fatores com efeitos negativos estatisticamente significativos ($p < 0,05$): a proporção entre as enzimas (PEC), a temperatura de reação enzimática (T) e a centrifugação ($cent$) (Tabela 2), indicando que seus menores níveis [0:3:2 (v:v:v), 25 °C e 4.000 g, respectivamente] foram favoráveis à clarificação. Entretanto, o menor valor experimental de abs_{600} – correspondendo a uma redução de 97,8 % em comparação com o MC – foi obtido com o ensaio 5 (Tabela 1) realizado nos maiores valores de PEC (4:1:0, v:v:v), T (55 °C) e $Cent$ (7.000 g).

A clarificação de suco de pêssego com solução comercial de poligalacturonase foi realizada por Sainz e Ferri (2015) na temperatura de 50 °C (valor mais próximo do ensaio 5) já no estudo da clarificação de suco de romã com solução contendo a mesma enzima

Tabela 1 - Matriz codificada Placket-Bruman (PB12) para a clarificação de 50 mL de mel de cacau com os fatores: proporção volumétrica das soluções de pectinases (PEC , v:v:v), temperatura (T), agitação (rpm), tempo de incubação (t_{pec} , min), concentração de bentonita (CLA , g/L), tempo de complexação (t_{cla} , min) e centrifugação ($cent$, g); os valores reais são apresentados entre parênteses. As respostas analisadas foram: absorvância (abs_{600}) e densidade (ρ , g/mL)

Ensaio	Fatores							Respostas	
	$PEC(v:v:v)$	$T(^{\circ}C)$	rpm	$t_{pec}(min)$	$CLA(g/L)$	$t_{cla}(min)$	$cent(g)$	abs_{600}	$\rho(g/mL)$
1	+1 (4:1:0)	-1 (25)	+1 (125)	-1 (30)	-1 (1,0)	-1 (30)	+1 (7000)	0,042	1,0655
2	+1 (4:1:0)	+1 (55)	-1 (75)	+1 (90)	-1 (1,0)	-1 (30)	-1 (4000)	0,062	1,0666
3	-1 (0:3:2)	+1 (55)	+1 (125)	-1 (30)	+1 (4,0)	-1 (30)	-1 (4000)	0,087	1,0471
4	+1 (4:1:0)	-1 (25)	+1 (125)	+1 (90)	-1 (1,0)	+1 (90)	-1 (4000)	0,077	1,0591
5	+1 (4:1:0)	+1 (55)	-1 (75)	+1 (90)	+1 (4,0)	-1 (30)	+1 (7000)	0,016	1,0443
6	+1 (4:1:0)	+1 (55)	+1 (125)	-1 (30)	+1 (4,0)	+1 (90)	-1 (4000)	0,026	1,0464
7	-1 (0:3:2)	+1 (55)	+1 (125)	+1 (90)	-1 (1,0)	+1 (90)	+1 (7000)	0,027	1,0680
8	-1 (0:3:2)	-1 (25)	+1 (125)	+1 (90)	+1 (4,0)	-1 (30)	+1 (7000)	0,061	1,0485
9	-1 (0:3:2)	-1 (25)	-1 (75)	+1 (90)	+1 (4,0)	+1 (90)	-1 (4000)	0,106	1,0708
10	+1 (4:1:0)	-1 (25)	-1 (75)	-1 (30)	+1 (4,0)	+1 (90)	+1 (7000)	0,029	1,0453
11	-1 (0:3:2)	+1 (55)	-1 (75)	-1 (30)	-1 (1,0)	+1 (90)	+1 (7000)	0,035	1,0522
12	-1 (0:3:2)	-1 (25)	-1 (75)	-1 (30)	-1 (1,0)	-1 (30)	-1 (4000)	0,090	1,0304
13	0 (2:2:1)	0 (40)	0 (100)	0 (60)	0 (2,5)	0 (60)	0 (5500)	0,039	1,0591
14	0 (2:2:1)	0 (40)	0 (100)	0 (60)	0 (2,5)	0 (60)	0 (5500)	0,036	1,0621
15	0 (2:2:1)	0 (40)	0 (100)	0 (60)	0 (2,5)	0 (60)	0 (5500)	0,062	1,0632

Tabela 2 - Análise dos Efeitos para as respostas absorvância (abs_{600}) e densidade (ρ , g/mL) para a clarificação do mel de cacau com os fatores: proporção volumétrica das soluções de pectinases (PEC , v:v:v), temperatura (T), agitação (rpm), tempo de incubação (t_{pec} , min), concentração de bentonita (CLA , g/L), tempo de complexação (t_{cla} , min) e centrifugação ($cent$, g)

Termos	Resposta: abs_{600}			Resposta: ρ (g/mL)		
	Efeito	Erro Pad.	p-valor	Efeito	Erro Pad.	p-valor
Média	0,055	0,004	< 0,0001*	1,0537	0,0036	< 0,0001*
Curvatura	-0,018	0,018	0,3439	0,0155	0,0161	0,3721
PEC	-0,026	0,008	0,0182*	0,0017	0,0072	0,8228
T	-0,025	0,008	0,0192*	0,0008	0,0072	0,9118
rpm	-0,003	0,008	0,7199	0,0042	0,0072	0,5835
t_{pec}	0,007	0,008	0,4355	0,0117	0,0072	0,1543
CLA	-0,001	0,008	0,8728	-0,0066	0,0072	0,3967
t_{cla}	-0,010	0,008	0,2713	0,0065	0,0072	0,3992
$Cent$	-0,040	0,008	0,0025*	0,0006	0,0072	0,9404

*Valores estatisticamente significativos com 95 % de confiabilidade ($p < 0,05$).

por Cerreti et al. (2017) foi definida a temperatura como 25 – 30 °C (mais próximo do valor indicado pela Análise de Efeito – Tabela 2). O emprego de temperaturas mais brandas pode ser muito mais vantajoso para preservar compostos bioativos ou sensoriais das polpas ou sucos, mas é preciso também avaliar em conjunto o desempenho da enzima na temperatura selecionada (Rai et al., 2004).

O menor valor de ρ (1,0304 g/mL) foi obtido nas condições do ensaio 12 (Tabela 1) em que todos os fatores se encontravam em seus menores níveis: esse ensaio resultou em reduções de 23,65 % em relação a ρ e 87,5 % em relação a abs_{600} do MC. Para comparação, o pré-tratamento de polpa de banana com pectinases e α -amilase realizado por Cheirsilp & Umsakul (2008) antes da etapa de fermentação para

obtenção de um “vinho de fruta”, também se mostrou viável, sendo possível observar uma redução de 55 % da viscosidade, outro parâmetro importante para o processamento de polpas e que foi investigado.

Na Figura 1a pode-se observar alguns exemplos da confirmação visual da clarificação em relação a formação de precipitados e a redução da turbidez do meio, já as Figuras 1b e 1c mostram exemplos da realização do teste qualitativo do álcool em que se observa a formação de precipitado que indica a presença de pectina.

Ao comparar os dois ensaios de maior destaque (Tabela 1) – o ensaio 5 (de menor abs_{600}) e o ensaio 12 (de menor ρ) – é possível observar que ambos tiveram em comum os menores níveis de rpm e t_{cla} , no entanto, faz-se necessário ressaltar a diferença entre os valores de PEC para estes dois ensaios. Cada uma das pectinases tem características catalíticas próprias e o resultado de suas ações depende também da natureza das substâncias pecticas disponíveis para sua ação. De acordo com as condições experimentais empregadas, a atividade enzimática mais expressiva no ensaio 12 foi a poligalacturonase ($PEC = 0:3:2$, v:v:v) e no ensaio 5 foi a pectina liase ($PEC = 4:1:0$, v:v:v) (Tabela 1). Pouco se tem mencionado sobre o uso combinado de diferentes pectinases, sendo muito mais comum o emprego das enzimas isoladamente, sendo a poligalacturonase uma das mais aplicadas, como por



Figura 1 - a) da formação de precipitados e diferentes turbidez apresentadas durante os procedimentos de clarificação e dos resultados do teste qualitativo para pectina b) após e c) antes a clarificação.

exemplo, nos estudos de: Cerreti et al. (2017), Bagci (2014) e Umsza-Guez et al. (2011). Já a pectina liase foi aplicada por Pinelo, Zeuner & Meyer (2010) na clarificação de suco de cereja e a pectinametilesterase foi empregada com suco de abacaxi por Patidar et al. (2016) e o estudo de Sandri et al. (2011) avaliou dois extratos contendo diferentes pectinases de *A. niger* na clarificação de uma solução de pectina.

Desta forma, duas novas condições de clarificação foram selecionadas: a condição C1 foi realizada nas mesmas condições do ensaio 12 (Tabela 1) – cujas condições estão em acordo com a Análise de Efeitos – e a condição C2 foi baseada no ensaio 5 (Tabela 1) – devido ao menor valor de abs_{600} – porém, com os valores de t_{pec} e CLA mantidos iguais aos de C1.

As repetições destas duas condições de clarificação, C1 e C2, apresentaram valores médios de: $abs_{600} = 0,055 \pm 0,037 / \rho = 1,0547 \pm 0,0012$ e $abs_{600} = 0,114 \pm 0,056 / \rho = 1,0660 \pm 0,0053$, respectivamente. Considerando a variabilidade dos experimentos, foi realizado o Teste de Tukey para médias entre as condições: MC, C1 e C2. Para a resposta abs_{600} , houve diferença estatisticamente significativa entre MC e os dois tratamentos de clarificação, no entanto, estes tratamentos não apresentaram diferença estatística entre si. De forma complementar, para a resposta ρ não foi identificada diferença estatisticamente significativa entre as três condições analisadas. Dessa forma, e com base na Análise de Efeitos, a condição C1 foi selecionada como referência para a fermentação.

Fermentação do mel de cacau clarificado

O MC foi clarificado pelas metodologias C1 (etapas enzimática e física) e C3 (apenas a etapa enzimática de C1) e fermentado; a Tabela 3 apresenta os resultados obtidos para abs_{600} , ρ , SS e pH antes (0 h) e após a fermentação (24 h). As condições iniciais (0 h) entre C1 e C3 sugerem uma melhor clarificação (menor abs_{600}) na condição C3 (apenas etapa enzimática). Provavelmente devido a suspensão de partículas muito finas de bentonita no meio que não puderam ser totalmente removidas

por centrifugação. No entanto, é possível ainda inferir que a utilização da bentonita não resulta em um impacto tão significativo quanto a ação das pectinases, sendo assim, é possível sugerir que a clarificação seja realizada apenas com as pectinases.

O desempenho dos fermentados F-C1 e F-C3 após 24 h foi muito semelhante (Tabela 3), sendo possível observar que o tempo de fermentação poderia ter sido maior de forma a se aumentar tanto a massa celular (para F-C1 foi de $1,04 \pm 0,16$ g e para F-C3 de $1,23 \pm 0,20$ g, peso úmido) quanto a redução de SS (que foi em torno de apenas 33 – 34 %, Tabela 3). Adicionalmente, foram observados acréscimos entre 50 e 87 % dos valores de abs_{600} após a fermentação (Tabela 3), o que pode ser atribuído, por exemplo, aos açúcares residuais no meio uma vez que a medida no tempo zero equivale ao MC clarificado antes da chaptalização para preparo do mosto. É possível ainda observar que os fermentados obtidos resultaram em meios mais clarificados (menor abs_{600}) em relação ao MC.

Em seguida, a condição F-C3, foi realizada novamente e as composições obtidas de açúcares, álcoois e ácidos orgânicos foram comparadas em relação à fermentação do MC (F-MC). De acordo com os resultados apresentados na Tabela 4, e considerando a que não foi detectado metanol em nenhuma das duas amostras e os teores alcoólicos (% v/v) foram estimados como $8,8 \pm 0,7$ % (F-MC) e $8,2 \pm 0,8$ % (F-C3), é possível observar que as duas condições apresentaram desempenhos semelhantes. Adicionalmente, é possível perceber uma maior composição de glicose e frutose na condição F-C3, o que pode ser entendido como um resultado da hidrólise das substâncias pécicas (Tabela 4).

Tabela 3 - Valores obtidos para a absorvância (abs_{600}), densidade (ρ , g/mL), teor de sólidos solúveis (SS , °Brix) e pH (pH) do mel de cacau clarificado com pectinases e bentonita (F-C1) e apenas com pectinases (F-C3) antes (0 h) e após (24 h) a fermentação com *S. cerevisiae* CA-11

Fermentado	abs_{600}		ρ (g/mL)	
	0 h	24 h	0 h	24 h
F-C1	$0,141 \pm 0,013$	$0,211 \pm 0,087$	$1,0627 \pm 0,0032$	$1,0517 \pm 0,0035$
F-C3	$0,105 \pm 0,005$	$0,196 \pm 0,031$	$1,0567 \pm 0,0072$	$1,0445 \pm 0,0142$
Fermentado	SS (°Brix)		pH	
	0 h	24 h	0 h	24 h
F-C1	$23,37 \pm 0,90$	$15,20 \pm 0,92$	$3,33 \pm 0,01$	$3,31 \pm 0,01$
F-C3	$20,80 \pm 1,06$	$13,87 \pm 3,42$	$3,44 \pm 0,01$	$3,35 \pm 0,05$

Tabela 4 - Composição (g/L) de açúcares, glicerol e ácidos orgânicos obtidos após a fermentação (30 °C / 24 h) de mel de cacau *in natura* (F-MC) e clarificado com pectinases (F-C3)

Fermentado	Sacarose (g/L)	Glicose (g/L)	Frutose (g/L)	Glicerol (g/L)	Ácd. Cítrico (g/L)	Ácd. Acético (g/L)	Ácd. Láctico (g/L)
F-MC	2,01 ± 0,04	7,26 ± 0,53	53,06 ± 2,74	9,85 ± 0,76	5,32 ± 0,23	0,64 ± 0,07	0,76 ± 0,07
F-C3	2,16 ± 0,09	12,21 ± 1,81	61,70 ± 2,90	9,63 ± 0,71	5,24 ± 0,40	0,67 ± 0,09	0,95 ± 0,02

Fato semelhante, aumento de açúcares solúveis, foi observado na clarificação de polpa de banana por Cheirsilp & Umsakul (2008). As composições residuais de açúcares (sacarose + glicose + frutose) de ambas as condições analisadas confirmaram mais uma vez que o tempo de fermentação empregado não foi suficiente para resultar em maiores teores alcoólicos, no entanto, a depender da característica desejada para o fermentado, o tempo de fermentação pode ser ajustado. A fermentação de polpa de cacau por *S. cerevisiae* UFLA CA 1162 foi, por exemplo, realizada a 22 °C e por 30 dias além de cerca de 50 dias de decantação e maturação (Duarte et al., 2010), já a fermentação de mel de cacau por *S. cerevisiae* AWRI726 foi realizada a 20 °C por 10 dias (Leite et al., 2019).

A realização apenas da etapa enzimática (como em C3) apresenta a vantagem de simplificação do processo, sendo conhecida a grande eficiência das pectinases. Por exemplo, na fermentação de polpas de cacau por Duarte et al. (2010), foram adicionadas as enzimas poligalacturonase e celulasas juntamente com a levedura para promover a fermentação e a clarificação de forma simultânea. Ainda sobre este exemplo, este fermentado resultou em um teor alcoólico (~8,13 %, v/v) muito semelhante ao obtido neste presente trabalho e foram obtidas ainda quantidades menores de glicose (~3,43 g/L), de glicerol (~7,14 g/L) e de ácido acético (~0,37 g/L), ausência de frutose e presença de metanol (~0,2 g/L) (Duarte et al., 2010). Já a fermentação de mel de cacau por 144 h resultou em um teor alcoólico maior (14 %, v/v) e quantidades maiores de sacarose (25,34 g/L) e menores de glicose (1,35 g/L) e de frutose (5,86 g/L). Em estudo desenvolvido em paralelo em nosso grupo de pesquisa (Koelher, 2020), as condições de fermentação de misturas de mel de cacau e polpa de cacau por *S. cerevisiae* L63 (boa produtora de pectinase) resultou em teores alcoólicos que variaram de 3 a 14 % (v/v) e absorvâncias em torno de 0,100.

Conclusões

Se considerarmos o consumo *in natura* do mel de cacau (MC), a clarificação pode interferir na aceitação sensorial devido à grande apreciação das suas características naturais (sabor, aroma e aparência), no entanto, para a produção de bebidas fermentadas, o aspecto cristalino tanto do mosto quanto do fermentado é desejado. Assim, a clarificação do MC é proposta neste estudo como técnica coadjuvante (prévia à fermentação) para a produção de bebidas fermentadas (e possivelmente destiladas) de forma a se obter produtos com maior valor agregado. De acordo com o estudo realizado, foi possível definir a clarificação do MC com pectinases comerciais (poligalacturonase e pectinametilesterase) e, opcionalmente, com uma etapa física sequencial empregando o agente clarificante bentonita. Os resultados obtidos (especialmente em relação à redução da absorvância) indicaram que a clarificação do MC é possível de ser obtida devido à redução do conteúdo das substâncias pécicas promovido em grande parte pela ação das pectinases. Assim, o emprego de pectinases é válido devido a sua eficiência e disponibilidade comercial atual, o que pode ser levado em consideração em diferentes escalas de produção de derivados do MC, quando aplicável.

Agradecimentos

Os autores são gratos pelo apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) - Processo: 425959/2018-0 - e pelo inestimável apoio experimental do Laboratório de Microbiologia Aplicada da Agroindústria (LABMA, UESC).

Literatura Citada

ÁZAR, R. I. S. L. et al. 2020. Apple juice clarification by a purified polygalacturonase from *Calonectria pteridis*. Food and Bioproducts Processing 119:238-245.

- BAGCI, P. O. 2014. Effective clarification of pomegranate juice: A comparative study of pretreatment methods and their influence on ultrafiltration flux. *Journal of Food Engineering* 141:58-64.
- CANTERI, M. H. G. et al. 2012. Pectina: da matéria-prima ao produto final. *Polímeros* 22(2):149-157.
- CERRETI, M. et al. 2017. Optimization of pectinase and protease clarification treatment of pomegranate juice. *LWT – Food Science and Technology* 82:58-65.
- CHEIRSILP, B.; K. UMSAKUL, K. 2008. Processing of banan-based wine product using pectinase and á amylase. *Journal of Food Process Engineering* 31(1):78-90.
- DUARTE, W. F. et al. 2010. Characterization of different fruit wines made from cacao, cupuassu, gabioba, jaboticaba and umbu. *LWT - Food Science and Technology* 43(10):1564-1572.
- INSTITUTO ADOLFO LUTZ - IAL. 1991. Métodos físico químicos para análise de alimentos. 4ª ed. Coordenadores: Odair Zenebon, Neus Sadocco Pascuet e Paulo Tiglea, São Paulo, SP, Instituto Adolfo Lutz. 1020p.
- KOELHER, B. T. A. 2020. Avaliação da aplicabilidade de cepas *Saccharomyces cerevisiae* na produção de bebidas alcoólicas utilizando mel e polpa de cacau como substrato. Dissertação de Mestrado. Ilhéus, Bahia. Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC). 80p.
- LEITE, P. B. et al. 2019. Cocoa's Residual Honey: Physicochemical Characterization and Potential as a Fermentative Substrate by *Saccharomyces cerevisiae* AWRI726. *The Scientific World Journal* 5698089.
- MAGALHÃES-GUEDES, K. T. et al. Bebida alcoólica de mel de cacau fermentada por levedura *Saccharomyces cerevisiae*: Tecnologia de aproveitamento de resíduo alimentício. In: *Inovação em Ciência e Tecnologia de Alimentos*. V. B. Viera e N. Piovesan (eds). São Paulo, Atena. pp.37-45.
- PATIDAR, M. K. et al. 2016. Papaya peel valorization for production of acidic pectin methylesterase by *Aspergillus tubingensis* and its application for fruit juice clarification. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 6:58-67.
- PINELO, M.; ZEUNER, B.; MEYER, A. S. 2010. Juice clarification by protease and pectinase treatments indicates new roles of pectin and protein in cherry juice turbidity. *Food and Bioproducts Processing* 88(2-3):259-265.
- RAI, P.; MAJUMDAR, G. C.; DASGUPTA, S.; DE, S. 2004. Optimizing pectinase usage in pretreatment of mosambi juice for clarification by response surface methodology. *Journal of Food Engineering* 64(3):397-403.
- RAMOS, D. C. et al. 2014. Composições Alimentícias de Chocolate e de Gelado Comestível Contendo Mel de Cacau. Patente BR 10 2013 005053-9 A2.
- RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. 2014. Planejamento de experimentos e otimização de processos: uma estratégia seqüencial de planejamentos. 3ª ed. Campinas, SP, Editora Casa do Pão. xp.
- SAINZ, R. L.; FERRI, V. C. 2015. Vida-de-prateleira de sucos clarificados de pêssegos das variedades jubileu e eldorado. *Brazilian Journal of Food Technology* 18(3):239-249.
- SANDRI, I. G. et al. 2011. Clarification of fruit juices by fungal pectinases. *LWT - Food Science and Technology* 44(10):2217-2222.
- SANTOS, C. O. 2012. Aproveitamento industrial de “mel” de cacau (*Theobroma cacao* L.) na produção de geléia sem adição de açúcar. Dissertação de Mestrado. Salvador, Bahia, Universidade Federal da Bahia (UFBA). 92p.
- UENOJO, M.; PASTORES, G. M. 2007. Pectinases: aplicações industriais e perspectivas. *Química Nova* 30(2):388-394.
- UMSZA-GUEZ, M. A. et al. 2011. Effect of pectinolytic enzymes on the physical properties of caja-manga (*Spondias cytherea* Sonn.) pulp. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 31(2):517-526.



TESTE DE TETRAZÓLIO EM SEMENTES DE ESPÉCIES DO DOMÍNIO FITOGEOGRÁFICO AMAZÔNICO

Pamela Porfirio Gonçalves, Juliana Garlet

Universidade do Estado de Mato Grosso - UNEMAT, Departamento de Engenharia Florestal. Faculdade de Ciências Biológicas e Agrárias, Campus II, Perimetral Rogério Silva, s/n, Jardim Flamboyant, 78580-000, Alta Floresta (MT), Brasil. pamela.goncalves@unemat.br. julianagarlet@unemat.br

O objetivo deste trabalho foi o levantamento de dados através de pesquisas por metodologias adequadas para a aplicação do teste de tetrazólio em sementes nativas do domínio fitogeográfico amazônico. Foi realizada uma pesquisa seletiva no site Flora do Brasil (2020) por espécies nativas do Brasil e do bioma amazônico, a partir da lista que consta no documento do MAPA (Brasil, 2013). Posteriormente, realizou-se uma pesquisa exploratória de forma qualitativa em bancos de dados *online* do Google Acadêmico, Scielo e Scopus por artigos, dissertações, teses, trabalhos de conclusão de curso, com teste de tetrazólio para tais espécies, seguida de uma análise seletiva e analítica, compilando as metodologias indicadas nos trabalhos para a realização de testes de tetrazólio. Das 141 espécies do domínio fitogeográfico Amazônico que constam na lista no documento do MAPA, apenas para 36 foram encontrados estudos com análise de sementes utilizando tetrazólio. Assim, verificou-se que existem poucos trabalhos na literatura que fornecem informações para a aplicação do teste de tetrazólio nas espécies Amazônicas. Restringindo assim, o uso dessa análise de grande importância para os programas de controle de qualidade de sementes, evidenciando a necessidade de pesquisas que proporcionem o enquadramento dessas metodologias na RAS (Regras para Análise de Sementes).

Palavras-chave: Sementes florestais, teste de vigor, viabilidade.

Tetrazolium test in seeds of species of the amazonic phytogeographic domain.

The objective of this work was to collect data through research by appropriate methodologies for the application of the tetrazolium test in native seeds and in the Amazonian phytogeographic domain. A selective search was carried out on the Flora do Brasil website (2020) for species native to Brazil and the Amazon biome, from the list in the MAPA document (Brasil, 2013). Subsequently, an exploratory research was carried out in a qualitative way in *online* databases of Google Scholar, Scielo and Scopus for articles, dissertations, theses, conclusion papers, with a tetrazolium test for such species, followed by a selective analysis and analytical, compiling the methodologies indicated in the works for carrying out tetrazolium tests. Of the 141 species in the Amazonian phytogeographic domain that are listed in the MAPA document, only 36 studies with seed analysis using tetrazolium were found. Thus, it was found that there are few studies in the literature that provide information for the application of the tetrazolium test in Amazonian species, restricting the use of this analysis of great importance for seed quality control programs, highlighting the need for research that provides the framing of these methodologies in the RAS (Rules for Seed Analysis).

Key words: Forest seeds, vigor test, viability.

Introdução

A avaliação da qualidade fisiológica das sementes é indispensável para a comercialização dos lotes. O teste de germinação é muito utilizado para determinar se fisiologicamente as sementes estão viáveis, porém, é um teste que requer períodos de tempo relativamente longos, principalmente em espécies que possuem germinação lenta. Portanto, os testes que avaliam de forma rápida e eficaz a viabilidade e/ou vigor das sementes, estão sendo cada vez mais estudados por serem uma ferramenta promissora em programas de controle de qualidade de sementes.

O controle de qualidade de sementes florestais em laboratório é realizado através de análises, cujo objetivo principal é determinar o valor das sementes de um lote após sua extração e beneficiamento, antes de serem remetidas ao viveiro ou para armazenamento (Fowler e Martins, 2001). A demanda por sementes florestais tem-se tornado maior para recuperações de áreas degradadas, recomposição de matas ciliares e reserva legal, como também para plantios com intuito de produção madeireira. Porém, ainda existe uma vasta carência de estudos em tecnologias de análises de sementes para atender essa demanda.

A RAS (Regras para Análise de Sementes) (Brasil, 2009) disponibiliza métodos oficiais para análise de pureza, peso de mil sementes, determinação do grau de umidade, teste de germinação, e para diversas outras análises, que reúnem um conjunto de técnicas, procedimentos e prescrições, que padronizam a metodologia empregada para uma dada espécie, os quais são de uso obrigatório em laboratórios credenciados pelo MAPA que realizam essas análises.

Os estudos com tecnologia de sementes atualmente, tem-se voltado em técnicas que avaliam a qualidade fisiológica de sementes com períodos de tempos mais curtos, facilitando o controle de qualidade para produção de sementes em larga escala. Os testes de embrião excisado, condutividade elétrica, raios X, e de tetrazólio, são exemplos de testes rápidos e promissores. Mas esse estudo irá abordar metodologias para o teste de tetrazólio em espécies do bioma amazônico.

O teste de tetrazólio é utilizado para determinar a viabilidade de forma rápida e eficaz, além de apresentar resultados até em sementes com dormência,

e em sementes que se encontram em estado de dureza após o teste de germinação. As metodologias estão disponíveis na RAS para determinadas espécies, e em artigos de pesquisa, porém, seu emprego ainda é muito limitado. Pois para a grande maioria das espécies em geral não existe metodologias para a realização do teste, e principalmente em espécies nativas da região amazônica.

O teste de tetrazólio é um teste bioquímico, no qual as sementes são embebidas em uma solução incolor de 2,3,5-trifenil cloreto ou brometo de tetrazólio, nas concentrações entre 0,05% a 1,0%, variando para sementes de diferentes espécies, ao qual é usado como um indicador para revelar o processo de redução que acontece dentro das células vivas. Neste processo, os íons de H⁺ liberados durante a respiração dos tecidos vivos são transferidos por um grupo de enzimas, particularmente, a desidrogenase do ácido málico, e interagem com o tetrazólio, o qual é reduzido a um composto vermelho, estável e não difusível chamado de trifenil formazan. Como esta reação se processa no interior das células vivas e o composto não se difunde, há nítida separação dos tecidos vivos e coloridos que respiram, daqueles mortos e que não colorem (Brasil, 2009).

A realização do teste de tetrazólio exige a aplicação de procedimentos que preparam as sementes para a coloração, tais como, o pré-umedecimento que se faz necessário para algumas espécies e altamente recomendado para outras, facilitando a absorção da solução do reagente; exposição dos tecidos do embrião para a coloração, que permite melhor absorção da solução de tetrazólio e facilita a avaliação para muitas espécies. Sendo utilizadas diferentes técnicas para expor os tecidos internos, como a perfuração e/ou escarificação mecânica da semente, corte longitudinal, corte transversal, incisão transversal, extração do embrião, e até a remoção do tegumento. O pH da solução deve estar entre 6,5 a 7,5, pois soluções ácidas retardam a reação, a temperatura entre 30-40°C, não ultrapassando os 40°C para que não ocorra a degradação das proteínas, o armazenamento das sementes em solução de tetrazólio deve estar sob pressão nula ou desprezível, e no escuro, tornando a reação mais rápida e evitando a redução do sal, uma vez que a luz causa este efeito (Peske et al., 2006).

O objetivo principal do teste de tetrazólio é distinguir as sementes viáveis das não viáveis. Uma avaliação cuidadosa, baseada nos padrões de coloração e de sanidade dos tecidos, torna possível separar diferentes categorias de sementes dentro desses dois grupos (Brasil, 2009). As sementes consideradas viáveis colorem completamente, como também parcialmente, desde que apresente padrões de coloração que indiquem a viabilidade, e as sementes não viáveis não colorem ou não possuem coloração bem definida.

As informações sobre o teste de tetrazólio em sementes de espécies nativas da Amazônia são escassas e estão dispersas em diversos artigos científicos, diante disto, essa pesquisa teve por objetivo reunir todas essas informações neste artigo, com o intuito de facilitar a procura do material por estudantes e pesquisadores.

Material e Métodos

Esta pesquisa trata-se de uma revisão bibliográfica, não sistematizada, classificada como exploratória de forma qualitativa, realizada por meio de levantamentos bibliográficos em periódicos científicos, nos idiomas português e inglês. A lista de espécies utilizada para realizar a pesquisa consta no documento do MAPA (Brasil, 2013). Tais espécies foram consultadas no site da Flora do Brasil (2020), com o objetivo de buscar por espécies nativas do Brasil e do domínio fitogeográfico da Amazônia.

Com base nesses resultados, foi pesquisado em bancos de dados *online* do Google Acadêmico e Scielo, por artigos científicos com informações de metodologias para adequação do teste de tetrazólio das espécies listadas, realizando uma leitura exploratória, seletiva e analítica, e assim, compilando as indicações sugeridas por diversos autores em uma tabela. As palavras chaves utilizadas foram: Sementes florestais; Teste de vigor; Viabilidade e o nome científico das espécies pesquisadas.

Resultados e Discussão

Das 141 espécies do domínio fitogeográfico da Amazônia que foram pesquisadas, e que constam no documento do MAPA (Brasil, 2013), apenas para

36 dessas obtém-se trabalhos com metodologias para a aplicação adequada do teste de tetrazólio (Tabela 1).

Considerando o número reduzido de espécies com testes de tetrazólio observadas nesta pesquisa, constata-se que a tecnologia de sementes florestais nativas carece de estudos. Segundo Calvi e Ferraz (2014), em 2013 apenas 26% das espécies de interesse comercial na Amazônia Ocidental possuíam normas para a avaliação da qualidade das sementes.

A utilização do teste de tetrazólio para determinação da qualidade fisiológica das sementes não é nova, foi desenvolvido por Delouche et al. 1976, mas a explicação pela falta de metodologias em espécies florestais nativas, se dá pelo comércio das mesmas até o momento ser ainda incipiente.

O teste de tetrazólio possui uma metodologia muito rápida e confiável, proporcionando resultados precisos da viabilidade e vigor das sementes, garantindo um ótimo desempenho no campo. Piña-Rodrigues e Santos (1988) afirmam que os resultados obtidos no teste de tetrazólio tendem a ser melhores que os obtidos no teste padrão de germinação, em função de não se verificar a presença de fungos e não se identificar a ocorrência de sementes dormentes.

A RAS (Brasil, 2009) já indica a utilização de testes rápidos em espécies que apresentam germinação lenta, a fim de minimizar prejuízos com relação ao tempo de avaliação de um lote de sementes.

No entanto, para a maioria das espécies florestais nativas, principalmente amazônicas, não há metodologias conhecidas e certificadas pela RAS para esse teste de controle de qualidade, devido principalmente não ser de interesse econômico e a fisiologia dessas espécies serem desconhecidas. Porém, a preocupação com a conservação genética, e o crescente mercado de sementes nativas para restauração florestal, poderá estimular pesquisas específicas em busca de normas para esses testes laboratoriais.

Oliveira e Ranal (2014) acreditam que o ato, em si, da legislação outorgar o aumento do número de espécies a serem utilizadas em projetos de reflorestamento ou reestruturação de áreas degradadas, em detrimento de indivíduos, dará auxílio para a formação de campos de produção de sementes nativas.

Tabela 1- Espécies florestais nativas, do domínio fitogeográfico Amazônico, seus respectivos nomes científicos, família botânica, e indicações para a realização do teste de tetrazólio

Espécie	Indicação
<i>Anadenanthera peregrina</i> (L.) Speg. (Fabaceae)	Pré-condicionar quatro repetições de 25 sementes em imersão na água destilada por 24 horas a 25°C, posteriormente realizar a retirada do tegumento das sementes e submergir os embriões em solução de 2,3,5-trifenil cloreto de tetrazólio (pH 6,5) na concentração de 0,1% por 24 horas a 30°C, sendo sempre mantido nesse período no escuro (Pinho, Borges e Pontes, 2010).
<i>Astronium graveolens</i> Jacq. (Anacardiaceae)	Submeter quatro repetições de 10 sementes à embebição em rolos de papel umedecidos (2,5 vezes a massa do papel) e acondicioná-los em câmara de germinação regulada na temperatura de 35°C por 6 horas, com posterior retirada do tegumento, sem corte longitudinal, e imersas em solução de 2,3,5-trifenil cloreto de tetrazólio (pH de 6,5 a 7,0) com concentração de 0,25% por 2 horas ou 0,50% por 1 hora (Fogaça, 2003).
<i>Bactris gasipaes</i> Kunth (Arecaceae)	Quatro repetições de 10 sementes, aos quais os embriões excisados são submetidos à imersão em solução de 2,3,5-trifenil cloreto de tetrazólio na concentração de 0,5% por 4 horas (Ferreira e Sader, 1987).
<i>Bertholletia excelsa</i> Bonpl. (Lecythidaceae)	Retirar a testa lenhosa das sementes, seccionar as amêndoas longitudinalmente e realizar o processo de embebição em água destilada por 20 horas, e após esse período submetê-las à imersão em solução de 2,3,5-trifenil cloreto de tetrazólio (pH 6,0 a 7,0) na concentração de 0,5%, sendo mantidas em banho-maria a 45°C por 10 a 20 minutos (Reis et al., 1979).
<i>Bixa orellana</i> L. (Bixaceae)	Seccionar as sementes ao meio e imergir em solução de 2,3,5-trifenil cloreto de tetrazólio na concentração de 0,075%, permanecendo no escuro, a 30°C por 24 horas. (Obs.: nesse estudo o teste de tetrazólio foi realizado somente nas sementes que ainda permanecia em estado de dureza após o teste de germinação) (Picolotto et al., 2013).
<i>Terminalia corrugata</i> (Ducke) Gere & Boatwr (Combretaceae)	Imersão das sementes em solução de 2,3,5-trifenil cloreto de tetrazólio na concentração de 1,0% por 24 horas. Para avaliação secciona-las longitudinalmente. (Obs.: nesse estudo o teste de tetrazólio foi realizado somente nas sementes que ainda permanecia em estado de dureza após o teste de germinação) (Azevedo, 2008).
<i>Byrsonima crassifolia</i> (L.) Kunth (Malpighiaceae)	Submeter os pirenos ao pré-condicionamento por imersão em um copo contendo 100 ml de água, por 24 horas a 25°C, com posterior quebra do endocarpo e extração das sementes, e seguido de hidratação das sementes por imersão em água (24 horas a 25°C), remoção dos tegumentos e extração dos embriões, utilizando quatro repetições de 25 embriões para o teste de tetrazólio. Imersão dos embriões em solução de 2,3,5-trifenil cloreto de tetrazólio na concentração de 1,0%, por 3 horas a 40°C. (Grzybowski et al., 2016).
<i>Cabralea canjerana</i> (Vell.) Mart. (Meliaceae)	Imersão das sementes em água destilada por 24 horas a 25°C, com posterior seccionamento longitudinal através do centro do eixo embrionário, e imersão em solução de 2,3,5-trifenil cloreto de tetrazólio na concentração de 1,0% a 25°C por 2 a 3 horas (Grunenvaldt, Cantarelli e Salamoni, 2014).
<i>Calophyllum brasiliense</i> Cambess. (Calophyllaceae)	Embebição das sementes em água destilada por 24 horas, estando acondicionadas em becker e mantidas em câmara de germinação tipo B.O.D na ausência de luz e sob temperatura constante de 25°C, com posterior retirada do tegumento e imersão dos embriões em solução de 2,3,5-trifenil cloreto de tetrazólio na concentração de 0,5% (concentração mais eficaz) por 3 horas em câmara a 30°C, na ausência de luz (Fré, 2010).
<i>Carapa guianensis</i> Aubl. (Meliaceae)	Seccionar longitudinalmente as sementes e submetê-las ao pré-condicionamento em água destilada por 24 horas a 25°C, com posterior imersão em solução de 2,3,5-trifenil cloreto de tetrazólio na concentração de 0,1% por 6 horas na temperatura de 30°C, sendo acondicionadas em copos plásticos, coberto com filme de plástico, na ausência de luz (Amoêdo, 2015).

Continuação Tabela 1.

<i>Casearia sylvestris</i> Sw. (Salicaceae)	Submersão de cinco repetições de 10 sementes em água destilada por 6 horas a 30°C, com posterior imersão em solução de 2,3,5-trifenil cloreto de tetrazólio na concentração de 0,5% sob a temperatura de 30°C durante 24 horas. Após esse período, seccioná-las longitudinalmente para análise da coloração (Marcos Filho, 2005).
<i>Colubrina glandulosa</i> Perkins (Rhamnaceae)	Pré-umedecimento das sementes em papel toalha e acondicionamento das mesmas em câmara de germinação a 30°C por 5 horas, posteriormente cortá-las longitudinalmente e transversalmente, com a porção do cotilédone contendo o embrião, e por fim, imergir em solução de 2,3,5-trifenil cloreto de tetrazólio na concentração de 0,075% por 4 horas a 30°C, na ausência de luz (Moraes et al., 2019).
<i>Copaifera langsdorffii</i> Desf. (Fabaceae)	Submeter quatro repetições de 25 sementes ao processo de embebição em água destilada por 120 horas, e posteriormente realizar a retirada do tegumento e imergir as sementes em solução de 2,3,5-trifenil cloreto de tetrazólio na concentração 0,2% por 10 horas a 30°C, sendo acondicionado em recipiente escuro. Para a avaliação da coloração deve seccioná-las longitudinalmente (Vieira, 2015).
<i>Cupania vernalis</i> Cambess. (Sapindaceae)	Submeter as sementes ao pré-condicionamento, onde serão embebidas entre papel de germinação, previamente umedecido com água destilada (2,5 vezes a massa do papel) e acondicionados dentro de sacos plásticos, por 48 horas a 30°C, em câmara de germinação, com posterior remoção total do tegumento, seguido de corte longitudinal da semente, e imersão em solução de 2,3,5-trifenil cloreto de tetrazólio na concentração de 0,05% por 2 horas a 40°C (Freitas, 2016).
<i>Dipteryx alata</i> Vogel (Fabaceae)	Submeter quatro repetições de 25 sementes ao processo de embebição em água destilada por 12 horas, com posterior remoção do tegumento e imersão em solução de 2,3,5-trifenil cloreto de tetrazólio na concentração de 0,2% por 12 horas a 30°C, sendo acondicionado em recipiente escuro. Para a avaliação da coloração deve seccioná-las longitudinalmente (Vieira, 2015).
<i>Enterolobium schomburgkii</i> (Benth.) Benth. (Fabaceae)	Pré-condicionamento em embebição lenta das sementes, sendo acomodadas em três folhas papel germitest, previamente umedecido (2,5 vezes a massa do papel), por 14 horas a 30°C, em câmara de germinação do tipo B.O.D, com posterior remoção do tegumento manualmente e imersão dos embriões em solução de 2,3,5-trifenil cloreto de tetrazólio na concentração de 0,5% por 3 horas a 35°C, sendo mantidos na B.O.D, na ausência de luz (Borges, 2019).
<i>Eugenia stipitata</i> McVaugh (Myrtaceae)	Cortar as sementes longitudinalmente em quatro secções e remover o tegumento, posteriormente imergir dois quartos em solução de 2,3,5-trifenil cloreto de tetrazólio na concentração de 1,0% por 24 horas a 30°C, no escuro em tubos de plástico de 2,0 ml (Calvi, 2015).
<i>Genipa americana</i> L. (Rubiaceae)	Submeter as sementes ao processo de embebição em água destilada, colocadas em placas de petri e papéis filtro, por 48 horas, após esse período, imergir as sementes em solução de 2,3,5-trifenil cloreto de tetrazólio na concentração de 1,0%, por 4 horas, em estufa a 35°C, sendo acondicionadas em recipientes de vidro cobertos com papel alumínio (Rodrigues, 2016).
<i>Hancornia speciosa</i> Gomes (Apocynaceae)	Quatro repetições de 25 sementes. Seccionar as sementes com três cortes, sendo dois laterais e um na parte superior oposta ao eixo embrionário para a retirada do embrião, e imergir em solução de 2,3,5-trifenil cloreto de tetrazólio na concentração de 0,075% por 60 a 90 minutos, em B.O.D, a 40°C (Barros et al., 2010).
<i>Handroanthus albus</i> (Cham.) Mattos (Bignoniaceae)	Imersão das sementes em água destilada por 24 horas, após esse período realizar a remoção do tegumento e imergir em solução de 2,3,5-trifenil cloreto de tetrazólio na concentração de 0,05% durante 15 horas em temperatura controlada de 30°C (Delfes et al., 2020).

Continuação Tabela 1.

<i>Handroanthus impetiginosus</i> (Mart. ex DC.) Mattos (Bignoniaceae)	Quatro repetições de 25 sementes. Realizar a retirada da parte alada da semente e em seguida submetê-las ao processo de embebição em água destilada por 15 horas a 30°C, com posterior retirada do tegumento e imersão em solução 2,3,5-trifenil cloreto de tetrazólio nas concentrações de 0,15 ou 0,30% por 6 horas a 30°C, no escuro (Custodio et al., 2018).
<i>Hevea brasiliensis</i> (Willd. ex A.Juss.) Müll.Arg. (Euphorbiaceae)	Quatro repetições de 50 sementes (BRASIL, 2009). Retirar o tegumento com auxílio de um martelo, seguido de embebição das sementes em papel toalha umedecido por 18 horas, e após este período, imersão em solução de 2,3,5-rifenil cloreto de tetrazólio na concentração de 0,5% por 2 horas, em estufa a 40°C (Wetzel, Cícero e Ferreira, 1992).
<i>Jacaratia spinosa</i> (Aubl.) A.DC. (Caricaceae)	Submeter as sementes ao processo de embebição em água destilada, colocadas em placas de petri e papéis filtro, por 48 horas, após esse período, imergir as sementes em solução de 2,3,5-trifenil cloreto de tetrazólio na concentração de 1,0%, por 4 horas, em estufa a 35°C, sendo acondicionadas em recipientes de vidro cobertos com papel alumínio (Rodrigues, 2016).
<i>Kielmeyera coriacea</i> Mart. & Zucc. (Calophyllaceae)	Submeter três repetições de 20 sementes ao processo de embebição em água destilada por 24 horas em temperatura constante de 25°C, e posteriormente colocar em contato com a solução 2,3,5-trifenil cloreto de tetrazólio na concentração de 0,5% por 24 horas em câmara de germinação à temperatura constante de 25°C. Para a avaliação deve seccionar as sementes ao meio e examinar a metade que contém o eixo embrionário (Ramos, 2011).
<i>Mauritia flexuosa</i> L.f. (Arecaceae)	Extração dos embriões com posterior embebição em gerbox, utilizando papel mata borrão, por 72 horas, em câmara de germinação na temperatura de 25°C, após esse período imergir os embriões em solução de 2,3,5-trifenil cloreto de tetrazólio na concentração de 0,5% por 4 horas sob temperatura de 30°C (Ribeiro et al., 2010; Rubio Neto et al., 2012; Spera, Cunha e Teixeira, 2001; Vitorino et al., 2017).
<i>Mimosa caesalpinifolia</i> Benth. (Fabaceae)	Submeter as sementes ao processo de embebição entre papel por 24 horas a 25°C, com posterior remoção do tegumento e imersão das sementes em solução de 2,3,5-trifenil cloreto de tetrazólio na concentração de 0,075% à 35 °C durante 1 hora (Silva, 2020).
<i>Parkia multijuga</i> Benth. (Fabaceae)	Quatro repetições de 25 sementes. Submeter as sementes à escarificação mecânica utilizando lixa, e imergir em água destilada por 48 horas em temperatura ambiente, com posterior remoção do tegumento, e realizar a imersão dos embriões em 400 ml de solução de 2,3,5-trifenil cloreto de tetrazólio (pH 6,5) na concentração de 0,1% por 6 horas a 35°C, mantidos em copos plásticos descartáveis no escuro. Para melhor avaliação deve seccionar os embriões longitudinalmente (Costa et al., 2018).
<i>Psidium acutangulum</i> DC. (Myrtaceae)	Submeter as sementes ao processo de embebição em água destilada por 72 horas nas temperaturas de 30 ou 40°C, com posterior corte transversal nas sementes, a fim de expor o eixo embrionário sem causar danos em sua estrutura. Após o pré-condicionamento e preparo, imergir a metade das sementes que contém o eixo embrionário em solução de 2,3,5-trifenil cloreto de tetrazólio na concentração de 0,50%, nas temperaturas de 30°C e 40°C durante três horas, na ausência de luz (Nascimento e Reis, 2014).
<i>Sapindus saponaria</i> L. (Sapindaceae)	Imersão das sementes em ácido sulfúrico por 30 minutos e submissão ao pré-umedecimento por 24 horas a 30°C, e em seguida imergir em solução de 2,3,5-trifenil cloreto de tetrazólio na concentração de 0,075% durante 4 horas, em câmara regulada a 30°C, sendo acondicionadas em copos plásticos de 50 ml cobertos com papel alumínio (Neves, 2018).
<i>Schizolobium parahyba</i> (Vell.) Blake (Fabaceae)	Quatro repetições de 20 sementes. O pré-condicionamento consiste em submeter às sementes escarificadas manualmente (com lixa nº 80, na região oposta ao embrião) a 48 horas de embebição, entre papel de filtro umedecido, e acondicionado a 35°C, com posterior retirada do tegumento, evitando-se danos ao embrião. Após este período são submetidas à solução de 2,3,5-trifenil cloreto de tetrazólio na concentração de 0,10% por 4 horas, a 35°C, no escuro (Fogaça et al., 2011).

Continuação Tabela 1.

<i>Schizolobium parahyba</i> var. <i>amazonicum</i> (Huber ex Ducke) Barneby (Fabaceae)	Escarificação mecânica das sementes utilizando lixa, e posterior imersão em água destilada por 24 horas, à temperatura ambiente (25°C). Após este período realizar a remoção do tegumento e imergir os endospermas e embriões em solução de 2,3,5-trifenil cloreto de tetrazólio (pH 6,5) durante 3 horas a temperatura de 25°C, na ausência de luz (Shimizu, 2009).
<i>Senegalia polyphylla</i> (DC.) Britton & Rose (Fabaceae)	As sementes são pré-condicionadas em gerbox com água destilada por 36 horas na câmara de germinação a 30°C. Após esse período, os tegumentos são removidos manualmente e os embriões imersos em solução de 2,3,5-trifenil cloreto de tetrazólio, em gerbox protegidos da luz, na concentração de 0,075% por 6 horas a 30°C em câmara de germinação (Lima e Cunha, 2019).
<i>Senna multijuga</i> (Rich.) H.S. Irwin & Barneby (Fabaceae)	Hidratar as sementes entre papel germitest umedecido durante 14 horas. Depois de hidratadas, realizar a remoção dos tegumentos e endospermas, e imergir os embriões na solução de 2,3,5-trifenil cloreto de tetrazólio na concentração de 0,075% a 35°C, permanecendo incubados por 5 horas em câmara de germinação (B.O.D), no escuro. Para a avaliação da coloração deve seccionar os embriões longitudinalmente (Ferreira, Davide e Motta, 2004).
<i>Spondias mombin</i> L. (Anacardiaceae)	Submeter três repetições de 20 sementes ao processo de embebição em água destilada por 24 horas em temperatura constante de 25°C, e posteriormente colocar em contato com a solução 2,3,5-trifenil cloreto de tetrazólio na concentração de 0,5% por 24 horas em câmara de germinação à temperatura constante de 25°C. Para a avaliação deve seccionar as sementes ao meio e examinar a metade que contém o eixo embrionário (Ramos, 2011).
<i>Tabebuia aurea</i> (Silva Manso) Benth. & Hook.f. ex S.Moore (Bignoniaceae)	Submeter as sementes ao pré-condicionamento de punção seguida de embebição por 3 horas a 30°C, com posterior retirada da parte alada e do tegumento. Após isso, submetê-las a 5 horas de imersão em solução de 2,3,5-trifenil cloreto de tetrazólio na concentração de 0,20% a 30°C, no escuro (Silva et al., 2018).

Conclusão

Foi observado que existem poucos trabalhos científicos na literatura que abordam o estudo para utilização do teste de tetrazólio no controle da qualidade fisiológica das sementes em espécies florestais nativas, do domínio amazônico.

Ficou evidente a necessidade de pesquisas em espécies no geral, para proporcionar o enquadramento de metodologias na RAS (Regras para Análise de Sementes), a fim de obter a disposição essa tecnologia que fornece resultados rápidos e precisos, facilitando para o mercado sementeiro o controle de qualidade dos lotes de sementes a serem comercializados.

Agradecimentos

A FAPEMAT pela bolsa de iniciação científica á primeira autora.

Literatura Citada

- AMOÊDO, S. C. 2015. Avaliação da viabilidade das sementes e amplitude térmica de germinação de duas espécies arbóreas amazônicas (*Carapa guianensis* Aubl. e *Carapa surinamensis* Miq.–Meliaceae). Dissertação Mestrado. Manaus, AM, INPA. 62p.
- AZEVEDO, M. I. R. 2008. Estrutura e restauração de cerradão em Palmas - TO e germinação de sementes de *Buchenavia tomentosa* Eichler, *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne, *Guazuma ulmifolia* Lam. e *Enterolobium gummiferum* (Mart.) J. F. Macbr. Tese Doutorado. Viçosa, MG, UFV. 118p.
- BARROS, D. I. et al. 2010. Teste de tetrazólio em sementes de mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes). Revista ACTA Tecnológica - Revista Científica (Brasil) 5(2):17-31.

- BORGES, M. de M. R. 2019. Metodologia do teste de tetrazólio para a avaliação da qualidade fisiológica de sementes de *Enterolobium schomburgkii* (Benth.) Benth. e *Apuleia leiocarpa* (Vogel) J. F. Macbr. Monografia (Agronomia). Belém, PA, UFRA. 32p.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. 2009. Regras para análise de sementes. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Secretaria de Defesa Agropecuária, Brasília, DF, Mapa/ACS. 395p.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. 2013. Instruções para análise de sementes de espécies florestais, de 17 de janeiro de 2013. Brasília, DF, MAPA. 98p.
- CALVI, G. P. 2015. Armazenamento das sementes recalcitrantes de *Eugenia stipitata* McVaugh: aspectos tecnológicos e fisiológicos. Tese Doutorado. Manaus, AM, INPA. 89p.
- CALVI, G. P.; FERRAZ, I. D. K. 2014. Levantamento das espécies florestais de interesse econômico e o cenário da produção de sementes e mudas na Amazônia Ocidental. ABRATES 24(2):24-75.
- COSTA, M. A. et al. 2018. Seed quality evaluation by tetrazolium staining of *Parkia multijuga* Benth. Agricultural Sciences 8(5):577-586.
- CUSTODIO, D. C. S. et al. 2018. Teste de tetrazólio em de *Handroanthus impetiginosus* (Mart. ex DC.) Mattos. In: Simpósio de Ciências Agrárias e Ambientais. Minas Gerais, 2018.
- DELFE, L. da R. et al. 2020. Análise da qualidade de sementes florestais. In: Seminário de Iniciação Científica, 30. Florianópolis, SC, UDESC.
- FERREIRA, R. A.; DAVIDE, A. C.; MOTTA, M. S. 2004. Vigor e viabilidade de sementes de *Senna multijuga* (Rich.) Irwin et. Barn. e *Senna macranthera* (Collad.) Irwin et. Barn., em um banco de sementes em solo de viveiro. Revista Brasileira de Sementes 26(1):24-31.
- FERREIRA, S. A. N.; SADER, R. 1987. Avaliação da viabilidade de sementes de pupunha (*Bactris gasipaes* H.B.K.) pelo teste de tetrazólio. Revista Brasileira de Sementes 9(2):109-114.
- FLORADO BRASIL. 2020. Algas, Fungos e Plantas. 2020. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/listaBrasil>. Acesso em: 20 de abril de 2020.
- FOGAÇA, C. A. 2003. Padronização do teste de tetrazólio para a avaliação da viabilidade de sementes de três espécies florestais. Dissertação Mestrado. Jaboticabal, SP, FCAV/UNESP. 49p.
- FOGAÇA, C. A. et al. 2011. Teste de tetrazólio em sementes de *Copaifera langsdorffii* e *Schizolobium parahyba*. Floresta (Brasil) 41(4):895-904.
- FOWLER, J. A. P.; MARTINS, E. G. 2001. Manejo de sementes de espécies florestais. 1. ed. Colombo, PR, Embrapa. 76p.
- FRÉ, M. 2010. Avaliação da germinação, viabilidade e vigor de sementes de *Calophyllum brasiliense* Camb. Monografia (agronomia). Florianópolis, SC, UFSC. 60p.
- FREITAS, L. C. N. 2016. Qualidade de sementes de *Cupania vernalis* (Cambess.) provenientes de remanescentes florestais da região oeste do Paraná. Dissertação Mestrado. Marechal Cândido Rondon, PR, UNIOESTE. 56p.
- GRUNENVALDT, R. L.; CANTARELLI, E. B.; SALAMONI, A. T. 2014. Armazenamento e viabilidade de sementes de *Cabralea canjerana* (Vell.) Mart. Science 5(1):98-105.
- GRZYBOWSKI, C. R. de S. et al. 2016. Physiological potential and conservation of murici (*Byrsonima crassifolia*) seeds. Revista Brasileira de Fruticultura (Brasil) 39(5):(e-475).
- LIMA, T. L.; CUNHA, M. do C. L. 2019. Viabilidade de sementes de *Senegalia polyphylla* (DC.) Britton & Rose pelo teste do tetrazólio. Ciência Agrícola (Brasil) 17(3):23-30.
- MARCOS FILHO, J. 2005. Fisiologia de sementes de plantas cultivadas. Piracicaba, SP, FEALQ. 495p.
- MORAES, P. H. F. et al. 2019. Preparo da semente de colubrina para a execução do teste de tetrazólio. Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável (Brasil) 14(5):625-628.
- NASCIMENTO, W. M. O.; REIS, A. H. A. 2014. Teste de tetrazólio para determinar a viabilidade

- em sementes de araçá-pera. In: Congresso Brasileiro de Fruticultura, 23. Mato Grosso, Cuiabá.
- NEVES, M. I. R. da S. 2018. Caracterização, germinação de sementes e desenvolvimento pós-seminal de *Sapindus saponaria* L. Tese Doutorado. Rio Largo, AL, UFAL. 87p.
- OLIVEIRA, J. P. R.; RANAL, M. A. 2014. Sementes florestais brasileiras: início precário, presente inebriante e o futuro, promissor? *Ciência Florestal* 24(3):771-784.
- PESKE, S. T. et al. 2006. Sementes: fundamentos científicos e tecnológicos. 2. ed. Pelotas, RS, Universidade Federal de Pelota. 454p.
- PICOLOTTO, D. R. N. et al. 2013. Germinação de sementes de urucum em função de métodos de superação de dormência e temperaturas. *Pesquisa Agropecuária Tropical (Brasil)* 43(3):232-238.
- PIÑA-RODRIGUES, F. C. M.; SANTOS, N. F. R. 1988. Teste de tetrazólio. In: Piña-Rodrigues, F. C. M. (coord.). 1988. Manual de análise de sementes florestais. Campinas, SP, Fundação Cargill. V. 1. 100p.
- PINHO, D. S.; BORGES, E. E. de L.; PONTES, C. A. 2010. Avaliação da viabilidade e vigor de *Anadenanthera peregrina* (L.) Speg. submetidas ao envelhecimento acelerado e ao osmocondicionamento. *Revista Árvore (Brasil)* 34(3):425-434.
- RAMOS, K. M. O. 2011. Avaliação da qualidade das sementes de *Kielmeyera coriacea* Mart. através da técnica de condutividade elétrica, teste de tetrazólio e de germinação. Dissertação Mestrado. Brasília, DF, UnB. 78p.
- REIS, G. G. et al. 1979. Calibração do teste de tetrazólio em sementes de castanha-do-Brasil. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/381236/calibracao-do-teste-de-tetrazolio-em-sementes-de-castanha-do-brasil>. Acesso em: 26 de abril de 2020.
- RIBEIRO, L. M. et al. 2010. Critérios para o teste de tetrazólio na estimativa do potencial germinativo em macaúba. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 45(4):361-368.
- RODRIGUES, L. L. 2016. Frugivoria e dispersão de sementes pelo Jabuti-Piranga *Chelonoidis carbonaria*. Monografia (Ecologia). Rio Claro, SP, UNESP. 46p.
- RUBIO NETO, A. et al. 2012. Effect of drying and soaking fruits and seeds on germination of macaw palm (*Acrocomia aculeata* [Jacq.] Loddiges ex Mart.). *Acta Scientiarum Agronomy (Brasil)* 34(2):179-185.
- SANTOS, M. M.; ATAÍDE, G. da M.; PIRES, R. M. de O. 2019. Qualidade fisiológica de sementes de garapa (*Apuleia leiocarpa*) submetidas ao envelhecimento acelerado. *Revista Biotemas (Brasil)* 32(4):11-17.
- SHIMIZU, E. S. C. 2009. Aspectos fisiológicos e bioquímicos relacionados à quebra de dormência física em sementes de paricá [*Schizolobium parahyba* var. *amazonicum* (Huber ex Ducken) Barneby]. Dissertação Mestrado. Belém, PA, UFRA. 46p.
- SILVA, C. B. 2020. Padronização e otimização do teste de tetrazólio para sementes de *Mimosa caesalpinifolia* (Benth.). Dissertação Mestrado. Maceió, AL, UFAL. 68p.
- SILVA, L. M. 2003. Superação de dormência de diásporos de cajazeira (*Spondias mombin* L.). Dissertação Mestrado. Lavras, MG, UFLA. 64p.
- SILVA, M. B. et al. 2018. Teste de tetrazólio em sementes de *Tabebuia aurea* (Silva Manso) Benth. & Hook f. ex S. Moore. In: Simpósio de Ciências Agrárias e Ambientais. Minas Gerais, BH, 2018.
- SPERA, M. R. N.; CUNHA, R.; TEIXEIRA, J. B. 2001. Quebra de dormência, viabilidade e conservação de sementes de buriti (*Mauritia Flexuosa*). *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 36(12):1567-1572.
- VIEIRA, V. de O. 2015. Qualidade fisiológica e tratamento homeopático em sementes florestais provenientes da rede de sementes do Xingu, Mato Grosso, Brasil. Dissertação Mestrado. Alta Floresta, Mato Grosso, UNEMAT. 64p.
- VITORINO, G. M. et al. 2017. Pré estabelecimento da remoção do embrião de *M. flexuosa* para

a execução de teste de tetrazólio.
In: Congresso Estadual de Iniciação Científica
e Tecnológica do IF Goiano, 6. Goiás,
Goiânia.

WETZEL, M. M. V. S.; CÍCERO, S. M.; FERREIRA,
B. C S. 1992. Aplicação do teste de tetrazólio em
sementes de seringueira. Revista Brasileira de
Sementes 14(1):83-88. ●

A NEW SPECIES OF *Xylaria* ON *Salzmannia nitida* IN BAHIA, BRAZIL

*Leonardo de Oliveira Barbosa*¹, *Elizabeth Amélia Alves Duarte*², *Jadergudson Pereira*³, *José Luiz Bezerra*¹

¹Center of Agricultural, Environmental and Biological Sciences, Federal University of Reconcavo of Bahia, 44380-000, Cruz das Almas, Bahia, Brazil. barbosleonard@gmail.com; zelulabezerra@yahoo.com.br

²Postgraduate Program in Biotechnology, Maria Milza Faculty, 44350-000, Governador Mangabeira, Bahia, Brazil. elizabethaad@gmail.com

³Department of Agronomy, Santa Cruz State University, Rod. Jorge Amado, km 16, 45662-900, Ilhéus, Bahia, Brazil. j.gudson@hotmail.com

Xylaria salzmanniae sp. nov. is described on dead leaves of *Salzmannia nitida* (Rubiaceae) in Serra da Jiboia, municipality of Santa Teresinha, semiarid region of Bahia, Brazil.

Key words: Brazilian fungi, Rubiaceae, Taxonomy, Xylariaceae.

Uma nova espécie de *Xylaria* em *Salzmannia nitida* na Bahia, Brasil. *Xylaria salzmanniae* sp. nov. é descrita em folhas mortas de *Salzmannia nitida* (Rubiaceae) na Serra da Jiboia, município de Santa Teresinha, região semiárida da Bahia, Brasil.

Palavras-chave: Fungos brasileiros, Rubiaceae, Taxonomia, Xylariaceae.

Introduction

The genus *Xylaria* comprises 218 species, mostly growing saprophytically on plant remains but some are coprophilous or endophytes (Ju and Rogers, 2019). Pathogenicity is not well demonstrated in *Xylaria* but *X. polymorpha* (Pers.) Grev. is regarded as a real plant pathogen causing butt rot on urban trees (Proffer, 1988). The generic delimitation of *Xylaria*, *Podosordaria* and *Poronia* is based primarily on the anamorphs, but this premise is still under discussion. *Podosordaria* is known to have a lindquistia-like anamorph. This character is used to separate this genus from *Xylaria* which possesses an anamorph of another type (*Xylaria* type) (Daranagama et al., 2016). *Podosordaria aristata* (Mont.), *P. axifera* (Mont.) and *X. sicula* Pass. & Beltrani, which occur on leaves and fruits of several plants, have sexual morphs resembling our species but their teleomorphs are poorly described in the literature.

The Atlantic Rain Forest stretches along the Eastern coastline of Brazil but remnants of it can be found on the slopes of hills of the semiarid region of Bahia where the rain precipitation varies from 220 to 400 mm per year (INMET, 2019). In Serra da Jiboia, an altitude marsh located in the municipality of Santa Teresinha, State of Bahia, Northeast of Brazil (12°51'S, 39°28'W) (IBGE, 2021), an interesting fungus was noted occurring in association with *Salzmannia nitida* DC a shrub of the family Rubiaceae which occurs in the littoral areas of Brazil and other neotropical countries (Pereira and Barbosa, 2004). Stromata of the fungus were present on decaying leaves fallen on the ground and on dead leaves hanging in the plant.

The objective of this paper was to identify and describe the fungus encountered on *Salzmannia nitida* which is proposed as a new species, *Xylaria salzmanniae* nov. sp.

Materials and Methods

The material consisting of dead leaves of *S. nitida* with fungal stroma was taken to the Microbiology Laboratory of the Federal University of Recôncavo da Bahia - UFRB, in Cruz das Almas, for morphological characterization and isolation in pure culture. Fragments of the fungal species were transferred to Petri dishes containing BDA medium and incubated at 28 °C. The isolated *Xylaria* sp. was then characterized

by macro and micromorphology. Subsequently, five replicates of the fungal isolate were preserved in sterile distilled water (Castellani, 1967).

Morphology observation

The stromal surface and hairiness were observed using a dissecting scope. For micromorphological characterization, perithecial fragments containing asci, ascospores and paraphyses were mounted between microscope slides and coverslips using Melzer reagent, 3% KOH, lactic acid plus cotton blue and acid fuchsin stains. The observations were made using a LEICA ICC50 HD microscope, plus the LAS program (version 4.5.0). Shape and size of perithecia, asci, ascospores, conidiophores, conidiogenous cells, conidia and ascospore germ slits were analysed and used to compare our species with other *Xylaria* species described in the literature.

Our descriptions was deposited in MycoBank database (MB 833222).

Results and Discussion

Xylaria salzmanniae J. L. Bezerra, L. O. Barbosa & J. Pereira sp. nov. Figures A-G.

Etymology: *salzmanniae*, referring to the host plant.

Stromata capitate, black, usually simple, context fleshy, white, more abundant below the perithecial cavities (Figure 1 D), 0.8-2.3 mm total length; fertile region suglobose, aristate, surface smooth to slightly rough, black, 0.1-0.8 mm diam.; stipe cylindraceous, simple, pilose, 0.5-2.0 mm long, rarely bifurcate or absent (Figure 1); orange granules surrounding ascomata absent; KOH reaction absent. Perithecia 3-4 per stroma, immersed, of membranaceous consistence, 50-230 × 40-200 µm, with slightly prominent ostiole; arista filiform, dark at maturity, 100-270 × 10-40 µm. Asci cylindrical clavate, 8-spored, 75-95 × 7-10 µm, amyloid apical ring hat-shaped, 4,5-10 × 2 µm. Paraphyses hyaline, filamentous, slightly mucous. Ascospores ellipsoid, smooth, asymmetrical, 11-14 × 5-6 µm, germ slit straight, longitudinal, of the spore size. Asexual morph of the *Xylaria* type, on pulvinate stromata, covered by hyaline, cylindrical, parallel, contiguous conidiophores, simple or bifurcate, denticulate, continuous or 1-2 septate, 15-20 × 4-7 µm, denticles 0.5-1 µm long. Conidia ellipsoid, continuous, smooth, thin walled, 4-6 × 1.5-2 µm (Table 1).



Figure 1. *Xylaria salzmaniae*. (A) Colonized dead leaves and branches (arrow) of *Salzmania nitida*. (B) Stromata on leaves (arrow). (C) Captate stroma showing pilose stipe (arrow). (D) Perithecial cavities (arrow) and white context. (E) Ascospores with longitudinal germ slit (arrow) and amyloid ring in the ascus. (F) Conidiophores and conidia (arrow). (G) Pure culture on BDA medium forming stromata. Barrs: 1 cm (B); 3 cm (C e D); 20 µm (E e F).

Cultural characteristics: Only the anamorph was observed on BDA colonies attaining 90 mm diameter after eight days of incubation; conidial stromata formed at the 16th day (Figure 1); the mycelium was white, depressed, dense, velvety with dark, pulvinate conidiomata formed on the surface.

Type: Brazil, Bahia, Serra da Jiboia, municipality of Santa Teresinha, alt. 161 m, (UTM: zone 24 L, 447912 W 8579954 S), on fallen leaves of *Salzmania nitida* DC. (Rubiaceae), 4 July 2006, J. L. Bezerra & L. O. Barbosa (Holotype AAUF 68937) (Figure 2).

Xylaria salzmaniae possibly is an endophyte that forms stromata on the host leaves when they mature and die. Pathogenicity tests performed indoors with on *S. nitida* seedlings and healthy detached leaves did not succeed. This species

Table 1 – *Xylaria salzmaniae* and other xylariaceous stipitate species on leaves and fruits

Taxon	<i>Xylaria salzmaniae</i>	<i>X. sicula</i> ¹	<i>Podosordaria aristata</i> ²	<i>P. axifera</i> ³
Country/Host	Brazil / <i>Salzmania nitida</i>	Moroco / <i>Olea europae</i>	Mexico/ <i>Guazuma ulmifolia</i>	Central and South America / <i>Schefflera</i> spp. and <i>Panax</i> sp
Substrate	Dead leaves	Dead fruits and leaves	Dead fruits	Dead leaves
Stroma head	Subglobose, aristate	Subglobose to irregular, aristate	Globose to conic, aristate	Subglobose to irregular, aristate
Stroma stipe(mm)	0,8-2,3 long	10-30 long	35-40 long	2-4 long
Ascus(µm)	75-95 x 7-10	100 x 7	100-115 x 6-7.5	260-280 x 7.15-9.6
Ascospore (µm)	Ellipsoid, asymmetrical 11-15 x 5-7	Ellipsoid, asymmetrical 10 x 4-5	Cymbiform, asymmetrical 9-10 x 4-4,5	Elongated 21-28 x 6-7
Germ slit	Straight (spore length)	Straight (spore length)	Straight (3/4 spore length)	Straight to sigmoid (spore length)

¹Saccardo (1882); ²Gonzalez and Rogers (1989); ³Laessoe and Lodge (1994).



Figure 2. A- Location of the municipality of Santa Teresinha-Ba, included in the semiarid region. B- Location (UTM: zone 24 L, 447912 W 8579954 S) of the collection area in the Serra da Jibóia reserve. Image source: Google Earth e Google Map.

differs from *Podosordaria aristata*, *P. axifera* and *X. sicula* by a combination of features as shown in Table 1. More similarity was apparent with *X. sicula* from which differs by much shorter stromata stipes, geographical distribution and host. *Xylaria sphaerica* was described by Haung et al. (2015) on wood from Hainan, China, showing some similarities to *X. sicula* but presenting protruding branches near the base of the stromata head. This character differs strongly from *P. salzmaniae*. No culture or anamorph were mentioned.

In view of the results obtained in this work, it is concluded that the fungus under study is a new species of the genus *Xylaria*, named *X. salzmaniae* in reference to the plant host.

Literatura Citada

- CASTELLANI, A. 1967. Maintenance and cultivation of common pathogenic fungi of man in sterile distilled water. Further researches. *Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 70:181.
- DARANAGAMA, D. A. et al. 2016. Mycosphere Essays 13 – Do xylariaceous macromycetes make up most of the Xylariomycetidae? *Mycosphere* 7:582–601. 10.5943/mycosphere/7/5/5.
- GONZÁLEZ, F. S. M.; ROGERS, J. D. 1989. A preliminary account of *Xylaria* of Mexico. *Mycotaxon* 34:283-373.
- HUANG, G.; WANG, R.; GUO, L.; LIU, N. 2015. Three new species of *Xylaria* from China. *Mycotaxon* 130:299-304.
- IBGE. 2021. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística-Cidades. Available from: <https://cidades.ibge.gov.br/>. Accessed: 22 March 2021.
- INSTITUTO NACIONAL DE METEOROLOGIA - INMET. 2019. Available from: <http://www.inmet.gov.br/portal/index.php?r=tempo/graficos>. Accessed: 22 Out 2019.
- JU, Y. M.; ROGERS J. 2019. Xylariaceae: Home of the Xylariaceae (version Oct 2017). In: *Species 2000 & ITIS Catalogue of Life, 2019. Annual Checklist*. Roskov, Y. et al. (eds.). Digital resource at www.catalogueoflife.org/annual-checklist/2019. Species 2000: Naturalis, Leiden, the Netherlands.
- LAESOE, T.; LODGE, D. J. 1994. Three Host-Specific *Xylaria* Species. *Mycologia* 86:436-446.
- PEREIRA, M. S.; BARBOSA, M. R. V. 2004. A família Rubiaceae na Reserva Biológica Guaribas, Paraíba, Brasil. Subfamílias Antirheoideae, Cinchonoideae e Ixoroideae. *Acta Botânica brasileira* 18:305-318.
- PROFFER, T. J. 1988. *Xylaria* Root Rot of Urban Trees Caused by *Xylaria polymorpha*. *Plant Disease* 72:79.
- SACCARDO, P. A. 1882. *Sylloge Pyrenomycetum*, vol. 1. *Sylloge Fungorum* 1:1-768. ●

VIDA ÚTIL DE POLPA DE FRUTOS DE *Passiflora cincinnata* CV. BRS SERTÃO FORTE CONGELADA

Maria Madalena Rinaldi, Ana Maria Costa

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária/Embrapa Cerrados (CPAC) BR 020, km 18, Rodovia Brasília-Fortaleza, Caixa Postal: 08223, 73310-970, Planaltina, DF, Brasil. madalena.rinaldi@embrapa.br, ana-costa@embrapa.br

O processamento de polpas de frutos é importante na medida em que agrega valor econômico, evita desperdícios e minimiza perdas que podem ocorrer durante a comercialização do produto *in natura*, além de possibilitar ao produtor uma alternativa na utilização dos frutos. Objetivou-se avaliar a vida útil de polpa de frutos de *Passiflora cincinnata* armazenada sob congelamento a -18 °C por 24 meses. A cada três meses foram realizadas análises de pH, sólidos solúveis, acidez titulável, Ratio, cor (L*, a*, b*, incremento no escurecimento, croma e ângulo hue), polifenóis, vitamina C, flavonoides e antocianinas. Visivelmente não ocorreu variação significativa da cor da polpa de frutos de *P. cincinnata* durante o armazenamento. Os valores de sólidos solúveis e antocianinas não variaram significativamente. Ocorreu oscilação nos valores de pH, acidez titulável, Ratio e flavonoides. Os valores de polifenóis e vitamina C reduziram no decorrer do armazenamento. Polpa de frutos de *P. cincinnata* podem ser armazenadas sob congelamento a -18 °C por até seis meses sem nenhuma alteração significativa na sua constituição química. A partir deste período ocorre redução significativa nos valores de polifenóis e vitamina C.

Palavras-chave: armazenamento, conservação, maracujá, alimentos funcionais.

Shelf life of pulp of fruit of *Passiflora cincinnata* cv. BRS Sertão Forte frozen. The processing of fruit pulps is important insofar as it adds economic value, avoids waste and minimizes losses that may occur during the commercialization of the product *in natura*, besides allowing the producer an alternative in the use of the fruits. The objective was to evaluate the useful life of *Passiflora cincinnata* fruit pulp stored under freezing at -18 °C for 24 months. Analyses of pH, soluble solids, titratable acidity, Ratio, color (L*, a*, b*, increase in browning, chroma and hue angle), polyphenols, vitamin C, flavonoids and anthocyanins and were carried out every three months. There was not a significant variation in the color of the fruit pulp of *P. cincinnata* during storage. The values of soluble solids and anthocyanins did not vary significantly. There was an oscillation in the values of pH, titratable acidity, Ratio and flavonoids. The values of polyphenols and vitamin C decreased during storage. Fruit pulp of *P. cincinnata* can be stored under freezing at -18 °C for up to six months without any significant change in its chemical constitution. From this period there is a significant reduction in the values of polyphenols and vitamin C.

Key words: storage, conservation, passion fruit, functional food.

Introdução

O maracujá do mato (*Passiflora cincinnata* Mast) tem ganhado importância econômica à medida que apresenta perspectivas de exploração de mercados específicos seja para consumo *in natura* ou processado. Este maracujá é uma alternativa para melhoria na renda de pequenos produtores rurais que cultivam ou exploram por meio do extrativismo em áreas onde esta fruta é abundante (Azoubel et al., 2010). Os frutos de *P. cincinnata* são ricos em vitamina C; potássio; e as plantas são resistentes a pragas e doenças e adaptadas a regiões secas sujeitas a estresses hídricos. Além disso, a produção do maracujá-do-mato demanda menos recursos quando comparado à produção do maracujazeiro amarelo, além de ser uma cultura que não demanda a utilização de defensivos químicos (Flori et al., 2011).

Uma das alternativas para a comercialização destes frutos é em forma de polpa sendo que atualmente há grande propensão de substituição do suco de frutas pronto (*in natura*) pela polpa industrializada (Fonseca, Carvalho e Viana, 2021; Albuquerque et al., 2021). Há vantagens como a não utilização de aditivos e conservantes químicos, a praticidade para o consumidor e a preservação do sabor natural da fruta. A produção de polpas de frutas congeladas é uma excelente alternativa podendo ser elaborada nas épocas de safra permitindo a oferta das polpas nos períodos de entressafra, evitando os problemas ligados à sazonalidade (Castro et al., 2015).

Dentre as formas de conservação das frutas, o congelamento da polpa mostra-se bastante viável, pois favorece a conservação e consumo, preservando o valor nutritivo, a capacidade antioxidante e o aroma e sabor (Carvalho, Mattietto e Beckman, 2017). As polpas são fáceis de comercializar e são importantes fontes de matéria-prima, podendo ser empregadas na elaboração de outros produtos como iogurtes, doces, biscoitos, bolos, sorvetes e sucos. Adicionalmente, apresentam-se como alternativa de consumo de frutos sazonais, para os mercados nacionais ou internacionais, mesmo em períodos de entressafra de produção (Gonçalves et al., 2018).

O congelamento da polpa é uma das técnicas de conservação mais empregadas devido a sua facilidade de operação, baixo custo de instalação e sua eficiência

na retenção de grande parte dos compostos bioativos, nutricionais e sensoriais de coloração, sabor e aroma (Gonçalves, 2017). Dentre as alternativas de conservação para polpa de fruta, o congelamento ainda é o procedimento mais utilizado (Carvalho, Mattietto e Beckman, 2017). As autoras observaram que o armazenamento sob congelamento foi eficaz na manutenção das características químicas e de atividade antioxidante das polpas de frutas mistas armazenadas a -18 °C por 365 dias.

No Brasil a qualidade de polpas de fruta comercializadas é regulamentada pela Instrução Normativa de Nº 1 de 07 de janeiro de 2000 que determina os Padrões de Identidade e Qualidade (PQI's) (Brasil, 2000). Esta legislação define polpa de fruta como sendo o produto não fermentado, não concentrado, não diluído, obtida de frutos polposos, em processo tecnológico adequado, com um teor mínimo de sólidos totais, proveniente da parte comestível do fruto. Ainda de acordo com esta legislação, na garantia da qualidade, as variáveis como acidez titulável, sólidos solúveis, açúcares redutores e totais, vitamina C e pH são importantes para a padronização do produto e análise de alterações ocorridas durante o processamento e armazenamento.

Assim, o trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar a vida útil de polpa de frutos de *P. cincinnata* cv. BRS Sertão Forte armazenada sob congelamento a -18 °C.

Material e Métodos

O experimento foi realizado no Laboratório de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Embrapa Cerrados localizado em Planaltina - DF. Foi utilizado frutos de *P. cincinnata* oriundos de experimento de campo conduzido na fazenda experimental da Embrapa Cerrados, 15°36'13.02"S; 47°43'17.34"O, e altitude aproximada de 1050 m - Planaltina - DF. As mudas da *P. cincinnata* variedade BRS SF (nome fantasia BRS Sertão Forte) foram transplantadas para as covas com 3,5 meses de idade. Os cultivos foram instalados em dezembro de 2016 em sistema de espaldeira com espaçamento 2,5 m x 2,5 m entre plantas e entre linhas, adubação na cova e irrigação por gotejamento.

Os frutos com aproximadamente 100 dias de desenvolvimento foram colhidos manualmente nas

primeiras horas do dia com o objetivo de evitar a absorção do calor de campo. No laboratório os frutos foram selecionados, lavados em água corrente, drenados em escuradores industriais para retirar o excesso de água da lavagem, sanitizados por 20 minutos em solução com 200 ppm de hipoclorito de sódio ativo, enxaguados por 10 minutos em solução com 10 ppm de hipoclorito de sódio ativo e drenados em escurador industrial. Foi realizado o corte manual dos frutos, despulpamento, envase em embalagens de polietileno de baixa densidade (PEBD) com espessura de 200 mm e capacidade para 100 g, fechamento da embalagem em seladora própria para alimentos, congelamento e armazenamento a -18 °C por 24 meses. Ao todo foram armazenadas 60 embalagens com 100 g de polpa de frutos de *P. cincinnata*.

A cada três meses de armazenamento a polpa foi analisada quanto ao pH, acidez titulável, sólidos solúveis e Ratio de acordo com Carvalho et al. (1990). Cor (L^* , a^* , b^*): determinada em espectrofotômetro MiniScan[®] EZ marca HunterLab, sendo realizadas cinco leituras por fruto. O valor de L^* define a luminosidade ($L^* = 0$ preto e $L^* = 100$ branco) e a^* e b^* são responsáveis pela cromaticidade ($+a^*$ vermelho e $-a^*$ verde), b^* ($+b^*$ amarelo e $-b^*$ azul). Valores de a^* e b^* iguais a zero equivalem à cor cinza. Por meio do módulo L^* , a^* e b^* calculou-se o incremento no escurecimento [$((L^* - L^{*0})^2 + (a^* - a^{*0})^2 + (b^* - b^{*0})^2)^{1/2}$], croma (saturação ou intensidade da cor; 0 - cor impura e 60 - cor pura) e o ângulo hue (ângulo da cor; 0° vermelho; 90° amarelo; 180° verde; 270° azul e 360° negro) por meio das fórmulas: croma [$(a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$] e ângulo hue [arco tangente (b^*/a^*)] para a^* positivo e [arco tangente (b^*/a^*) (-1) + 90] para a^* negativo, conforme recomendado por Hunterlab (2008).

Polifenóis totais: Para a obtenção do extrato foram pesados de 5 a 15 g de amostra, adicionados 40 mL de metanol 50% (metanol:água destilada, 50:50, v/v), homogeneizados e deixados em repouso por 60 minutos, a temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Centrifugados a 15.000 rpm durante 20 minutos. O sobrenadante 1 foi recolhido em um balão volumétrico de 100 mL. A partir do resíduo da primeira extração, adicionaram-se 40 mL de acetona 70% (acetona:água destilada, 70:30, v/v), e repetiu-se o processo anterior, ou seja, homogeneização e repouso por 60 minutos, a temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Centrifugados

novamente a 15.000 rpm durante 20 minutos a 20 °C, recolhido o sobrenadante 2 e adicionado ao sobrenadante 1 no balão volumétrico completando para 100mL com água destilada (Larrauri, Rupérez & Saura-Calixto, 1997). Em tubos de ensaio adicionaram-se 1 mL do extrato obtido, 1 mL do Folin Ciocateau (1 folin: 3 águas destilada), 2 mL do carbonato de sódio 20%, 2 mL de água destilada e homogeneizado. As leituras, em espectrofotômetro a 700 nm foram realizadas aos 30 minutos após a adição dos reagentes. Os ensaios foram realizados em triplicata e em ambiente escuro (Obanda & Owuor, 1997). As leituras foram realizadas em espectrofotômetro SHIMADZU UV-Vis UV-1601. O branco da leitura foi 1 mL de água destilada acrescentando todos os reagentes acima citados. O espectrofotômetro foi zerado com água destilada. O cálculo do teor de polifenóis totais foi realizado por meio da elaboração da curva do ácido gálico em 5 concentrações diferentes. Os resultados obtidos foram expressos em miligramas de ácido gálico por 100 g de amostra.

Flavonoides totais e antocianinas: Pesou-se de 5 a 10 g de amostra, adicionando 30 mL de uma solução de etanol-HCl (1,5N) (85:15 v/v) e homogeneizado em politron por 1 minuto. Transferiu-se o conteúdo para um balão volumétrico de 50 mL (sem filtrar) envolto com papel alumínio, aferindo o balão com a solução etanol-HCl (1,5N), deixando repousar por uma noite sob refrigeração. Após o período de repouso, filtrou-se o material, sempre ao abrigo da luz. Realizou-se a leitura em espectrofotômetro SHIMADZU UV-Vis UV-1601 a 374 nm. Os resultados foram expressos em mg por 100 g de amostra (Francis, 1982). Para a determinação das antocianinas realizou-se a leitura em comprimento de onda a 535 nm.

Vitamina C: Para a vitamina C (ou ácido ascórbico) foi pesado dois gramas da amostra e misturado com 20 ml de MA (mistura ácida: HPO₃ 6% e ácido acético 2N) em um tubo de centrifuga de 50ml. Homogeneização da amostra na solução ácida com a ajuda do homogeneizador (Omni[®] Mixer Homogenizer) por aproximadamente 2 minutos e centrifugação a 15000 rpm por 20 minutos a 4 °C. Após foi pipetado 1 ml da amostra ou da diluição da solução padrão e colocado em um tubo de ensaio. Foram adicionados 0,05ml de DCPIP 0,2%, agitado e incubado à temperatura ambiente por 1 hora, ao abrigo da luz.

Adicionou-se 1 ml de tiouréia 2% e agitado. Adicionou-se 0,5 ml de DNPH 2% e agitado novamente. Tampouse o tubo de ensaio e levou ao banho-maria a 60 °C por 3 horas. Após isso, colocaram-se os tubos em banho de gelo e acrescentou-se 2,5 ml de H₂SO₄ 90% gelado e agitou-se cuidadosamente para dissolver o osazone (Cohen, 2006). O teor de ácido ascórbico foi determinado pelo método DNPH com leitura da absorbância realizada a 540 nm. Foi utilizado espectrofotômetro (Shimadzu® UV-Vis UV-1601). Os resultados foram apresentados em mg de ácido ascórbico por 100 g de produto.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com três repetições para cada tratamento, sendo que cada repetição consistiu em cinco embalagens de 100 g de polpa de *P. cincinnata* congelada e mantida a -18 °C. Para a análise estatística, os dados foram submetidos à análise de variância utilizando o teste F e as médias agrupadas por meio do teste Tukey em nível 5% de probabilidade de erro. Todas as análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do programa estatístico Assistat (Silva, 2015). Também foi realizada análise de regressão independentemente de ser significativamente diferente ou não pelo teste F. A escolha das equações foi feita com base na significância da regressão sobre o coeficiente de determinação (R²). O programa estatístico usado foi Excel versão 2010.

Resultados e Discussão

Os valores de pH apresentaram oscilação significativa durante o período de armazenamento da polpa e apresentaram correlação positiva forte (R = 0,76) em um polinômio de terceira ordem, com valores variando entre 2,98 após o processamento e 2,84 aos seis meses de armazenamento (Figura 1). As oscilações, provavelmente, são ocasionadas pelas características intrínsecas dos próprios frutos. Frutos de *P. cincinnata* apresentam baixos valores de pH devido as próprias características do produto (D'Abadia et al., 2020). Comparando-se os resultados obtidos com os padrões de

identidade e qualidade para as polpas em estudo, estabelecidos na Instrução Normativa nº 1, de 07 de janeiro de 2000 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (Brasil, 2000), os valores de pH para as amostras de *P. cincinnata* encontram-se de acordo com a legislação que estabelece valores entre 2,7 e 3,8 para a polpa de maracujás em geral.

Abreu et al. (2009), em estudos com cinco diferentes variedades de maracujá obtiveram valores de pH entre 3,04 a 3,08. De acordo com Santos, Coelho & Carreiro (2008) o baixo valor de pH pode representar um fator limitante para o crescimento de bactérias patogênicas, mantendo os índices de contaminação bacteriana em níveis baixos, o que é desejável. Baixos valores de pH em polpas de frutas garantem sua conservação sem a necessidade de tratamento térmico muito severo, não comprometendo sua qualidade nutricional (Santos e Boêno, 2016).

A acidez titulável também apresentou oscilação significativa correspondendo ao ocorrido com o pH. Os valores variaram entre 4,42 e 5,32 g de ácido cítrico anidro/100 ml de polpa sendo que pela análise de regressão, não houve influencia do tempo de armazenamento da polpa (Figura 1) onde as oscilações podem ser explicadas devido às próprias características da matéria prima. Os valores são significativamente superiores ao mínimo de acidez total estabelecido na

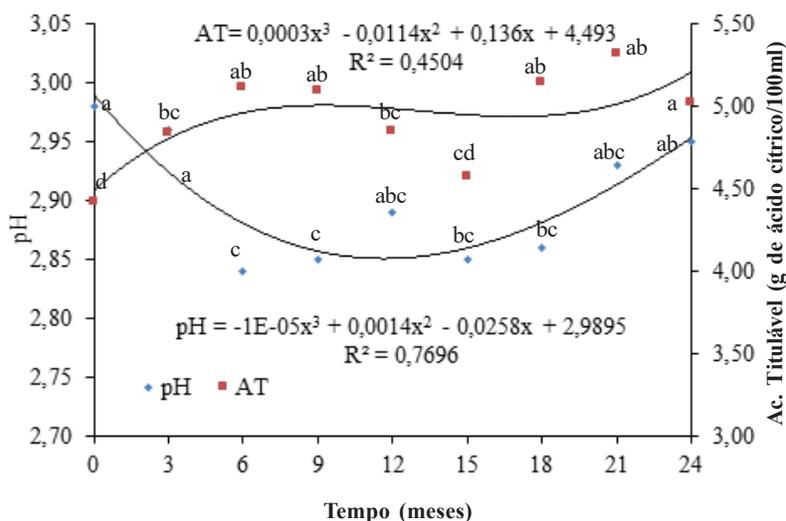


Figura 1. Valores de pH e acidez titulável (AT) em polpa de frutos de *P. cincinnata* mantidas sob congelamento por 24 meses.

Instrução Normativa nº 1, de 07 de janeiro de 2000 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (Brasil, 2000) que é de no mínimo 2,5 gramas de ácido cítrico por 100 gramas de polpa. A acidez e a medida do pH em determinados alimentos, fornece uma indicação do seu grau de deterioração, confirmada pela acidez ou basicidade desenvolvida. A determinação da acidez fornece dados importantes na apreciação do estado de conservação de um produto alimentício (Macedo, 2001). A acidez é importante, não somente para determinar a relação de doçura de um produto, mais também pela sua grande utilidade na indústria de alimentos, como conservante podendo prolongar a vida útil, índice para avaliação de qualidade e maturidade, indicador sensorial entre outras funções (Aroucha et al., 2010).

Dentre os ácidos mais encontrados em frutos estão: o málico, tartárico, cítrico e pirúvico. Estes por serem voláteis, contribuem para o aroma da fruta (Chitarra e Chitarra, 2005). Em frutos *in natura* durante o amadurecimento, geralmente ocorre uma diminuição da acidez e modificação da proporção entre os diversos ácidos encontrados nos frutos (Salgado, Guerra e Melo Filho, 1999).

Os sólidos solúveis não variaram significativamente durante o armazenamento (Figura 2). Os valores estiveram entre 10,08 °Brix e 10,50 °Brix situando-se bem próximo ao mínimo estabelecido (11 °Brix) pela

legislação para polpa de maracujás em geral (*Passiflora* spp.) (Brasil, 2000). O teor de sólidos solúveis pode variar com a intensidade de chuva durante a safra, fatores climáticos, variedade, solo e outros (Santos et al., 2004).

Os valores obtidos no presente experimento foram inferiores ao obtidos por D'Abadia et al. (2020) em frutos de *P. cincinnata* aos 100 dias após a antese também produzidos na Embrapa Cerrados (12,9 °Brix) e também por Abreu et al. (2009) em cinco genótipos de maracujazeiro-azedo cultivados no Distrito Federal (12,68 °Brix a 13,58 °Brix). Sólidos solúveis presentes nos frutos na forma combinada são responsáveis pela doçura, sabor e cor atrativas como derivado das antocianinas e pela textura, quando combinados adequadamente polissacarídeos estruturais. Os principais açúcares em frutos são: glicose, frutose e sacarose em proporções variadas, de acordo com a espécie (Chaves et al., 2004).

O Ratio (SS/AT) é uma das melhores formas de avaliação do sabor dos frutos, a qual ocorre, em grande parte, devido ao balanço de ácidos e açúcares, sendo mais representativo que a mensuração destas variáveis isoladamente. Deste modo, quando os valores desta relação são altos, significa que o fruto está em bom grau de maturação, pois esse grau aumenta quando há decréscimo de acidez e alto conteúdo de sólidos solúveis (Batista et al., 2013). No presente trabalho os valores de Ratio estiveram entre 1,96 aos dezoito meses de armazenamento e 2,29 logo após o processamento da polpa correspondendo aos valores de sólidos solúveis e acidez titulável (Figura 2). De maneira geral, quanto maior os valores de Ratio melhor é o sabor dos frutos.

Os valores de L* não apresentaram variação significativa até os 21 meses de armazenamento da polpa, porém houve correlação positiva forte ($R^2 = 0,8778$) em função do tempo de armazenamento a partir da análise de regressão em um polinômio de terceira ordem (Figura 3). Aos 24 meses ocorreu redução para esta variável com valor de 48,81. Os valores estiveram entre 48,81 e 65,05. Maiores

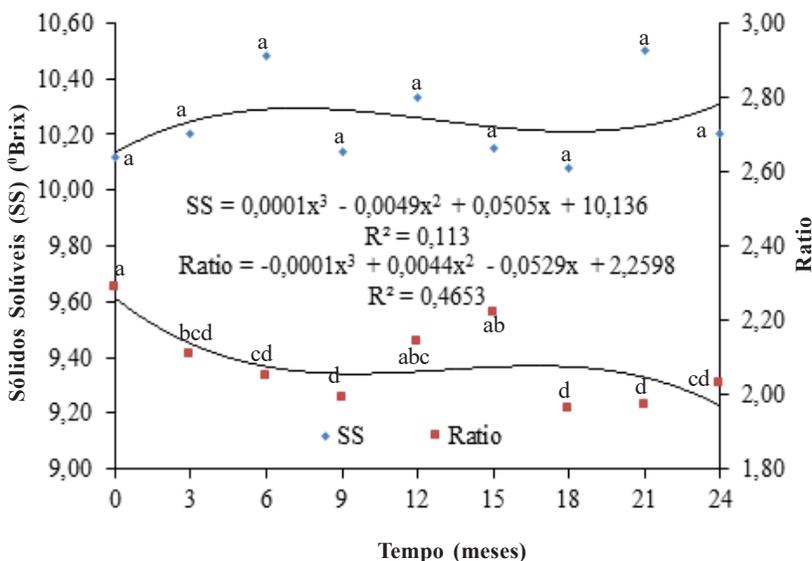


Figura 2. Valores de sólidos solúveis (SS) e Ratio em polpa de frutos de *P. cincinnata* mantidas sob congelamento por 24 meses.

valores de L^* significa que a polpa está menos escurecida o que é desejável para a comercialização da mesma. Visualmente não foi observado escurecimento na polpa dos frutos de *P. cincinnata* durante os 24 meses de armazenamento.

Os valores de a^* apresentaram oscilação durante o armazenamento com valores entre 0,32 e 1,35 (Figura 3). Os valores de a^* apresentaram uma correlação fraca ($R^2 = 0,5002$) e estiveram durante todo o armazenamento próximo a valores negativos que representa cor esverdeada do produto.

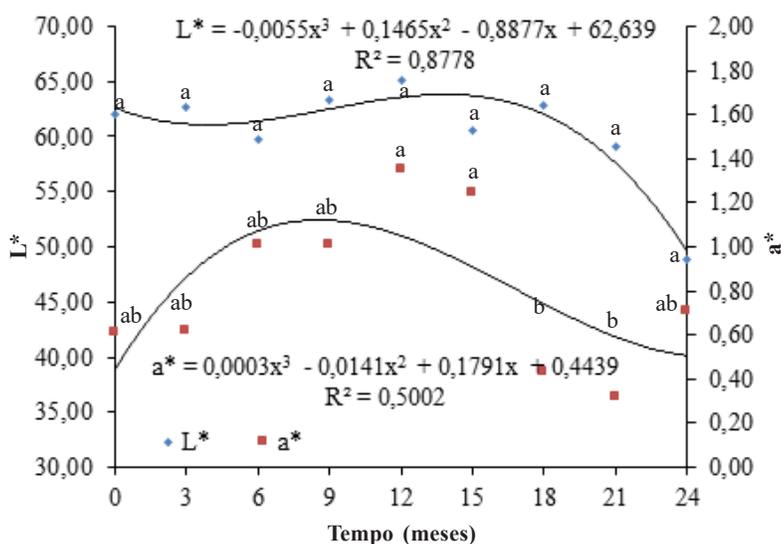


Figura 3. Valores de L^* (luminosidade) e a^* em polpa de frutos de *P. cincinnata* mantidas sob congelamento por 24 meses.

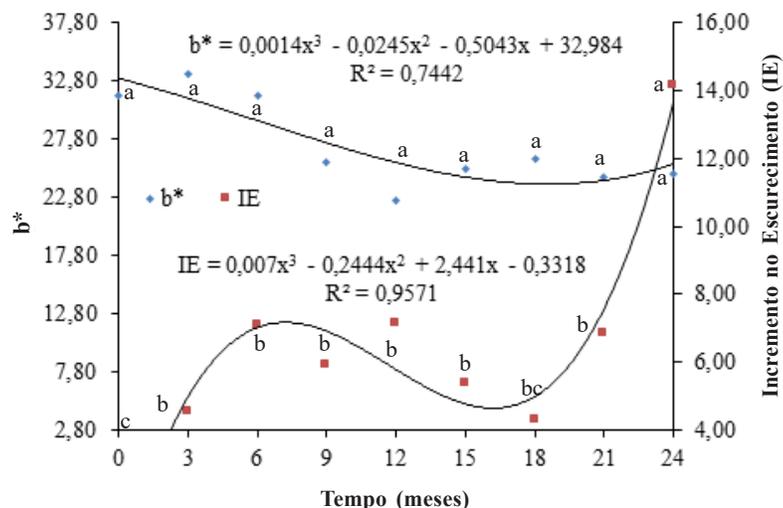


Figura 4. Valores de b^* e incremento no escurecimento (IE) em polpa de frutos de *P. cincinnata* mantidas sob congelamento por 24 meses.

Visualmente, esta é a cor característica da polpa de frutos de *P. cincinnata*. Os valores de b^* não variaram significativamente comprovando que o tempo e condição de armazenamento não influenciaram nesta variável (Figura 4). A colorimetria tem sido utilizada para caracterizar a cor de diferentes pigmentos, a exemplo das antocianinas (Montes et al., 2005), clorofila (Sin-necker et al., 2002) e carotenoides (Meléndez-Martínez, Vicario & Heredia, 2003).

Vianna-Silva (2010), determinando a qualidade de suco de maracujá obtiveram as coordenadas L^*

variando de 44,51 a 46,01, a^* de 4,38 a 7,94 e b^* de 38,97 a 39,28. A cor é um atributo de qualidade importante tanto para frutos *in natura* quanto aos produtos pós-processamento, sendo um fator decisivo na escolha do produto pelo consumidor (Sebastiany, Rego e Vital, 2010). A determinação instrumental da cor em polpas de frutas congeladas, medida por meio dos parâmetros L^* , a^* e b^* , torna-se de grande valia na avaliação de qualidade desses produtos, sendo que variações nos valores destas variáveis podem representar diferenças, sobretudo, na época de colheita e no estágio de maturação da matéria-prima (Pereira et al., 2006).

O incremento no escurecimento apresentou oscilação durante o armazenamento indicando que até os 21 meses de armazenamento o escurecimento da polpa foi aceitável. Ao mesmo tempo, houve correlação positiva muito forte onde o tempo de armazenamento influenciou no escurecimento da polpa (Figura 4). O incremento no escurecimento que corresponde à análise da diferença total de cor é obtido a partir dos valores de L^* , a^* e b^* , em um determinado período de armazenamento e os valores correspondentes a um padrão, que no presente trabalho, referiu-se a polpa no início do armazenamento. A medida do incremento no escurecimento tem o objetivo de verificar o escurecimento do

produto durante o armazenamento. De maneira geral, para produtos vegetais, considera-se que, quando os valores de IE > 10, o grau de escurecimento é elevado. No presente trabalho aos 24 meses o incremento atingiu o valor de 14,16 estando acima do limite aceitável para esta variável em produtos (Figura 4).

O croma apresentou o menor valor (22,59) aos 12 meses de armazenamento correspondendo ao maior valor de a^* (1,35) e menor valor de b^* (22,55), sendo que não houve correlação em função do tempo de armazenamento, a exemplo do a^* e b^* (Figuras 3, 4 e 5). O croma é a relação entre os valores de a^* e b^* , onde se obtém a cor real do objeto analisado. Esta variável está relacionada com a intensidade da cor, onde frutos com maiores valores de croma apresentam cores mais vivas e, conseqüentemente, mais atrativas e aceitáveis pelo consumidor. Para frutos, de maneira geral, independentemente do tratamento, ocorre uma mudança crescente nos valores de croma em função do tempo de armazenamento, sendo considerada normal, ao longo do amadurecimento (Sirqueira, 2012). Este comportamento não foi observado nos valores de croma da polpa estudada no presente trabalho.

O ângulo hue, que é obtido a partir de a^* e b^* , apresentou correlação desprezível ($R^2 = 0,3665$), com valores de 86,57 aos 12 meses de armazenamento e 90,70 após o processamento da polpa (Figura 5). De maneira geral os valores de ângulo hue estiveram

próximos de 90°, o que indica cor amarelada dos frutos. Quanto à coloração, a coordenada h° (ângulo hue) varia de 0 a 360°, sendo 0° - vermelho, 90° - amarelo, 180° - verde, 270° - azul e 360° - negro (Cremasco et al., 2016). Valores de tonalidade de cor mais próximos de zero indicam produto mais vermelho, ao passo que valores mais próximos de 90° indicam produto com predominância de cor amarela (Cajamarca et al., 2017).

Os valores de polifenóis em função do tempo de armazenamento apresentaram ajuste muito forte ($R^2 = 0,9447$) na análise de regressão, sendo o valor inicial de 43,15 mg de ácido gálico por 100 g de polpa, não reduzindo significativamente até os seis meses de armazenamento, chegando a 22,48 aos 9 meses de armazenamento, comportamento não desejado. No final do armazenamento (24 meses) os valores de polifenóis na polpa foi de 11,44 mg de ácido gálico por 100 g (Figura 6).

Uma dieta balanceada, rica em polifenóis, diminui o risco de consumi-los em excesso e evita a necessidade de suplementação (Cory et al., 2018). Apesar de não haver uma quantidade recomendada para o consumo de polifenóis, a adoção da recomendação diária de frutas e hortaliças representa um aumento de 16 vezes na disponibilidade nacional de polifenóis (Faller e Fialho, 2009).

A vitamina C também apresentou correlação muito forte em função do tempo de armazenamento, sendo de 24,06 mg de ácido ascórbico/100 g de polpa no início do experimento, reduzindo para abaixo de 18,38 mg de ácido ascórbico/100 g de polpa a partir dos seis meses. Ao final do armazenamento (24 meses) o valor de vitamina C foi de 10,59 mg de ácido ascórbico/100 g de polpa (Figura 6). A vitamina C é um antioxidante de muito fácil degradabilidade, sendo reduzida desde o processamento e obtenção das polpas de frutas e também durante todo o armazenamento (Pereira et al., 2006). Vários estudos têm enfatizado o papel significativo dos antioxidantes naturais nas frutas, incluindo

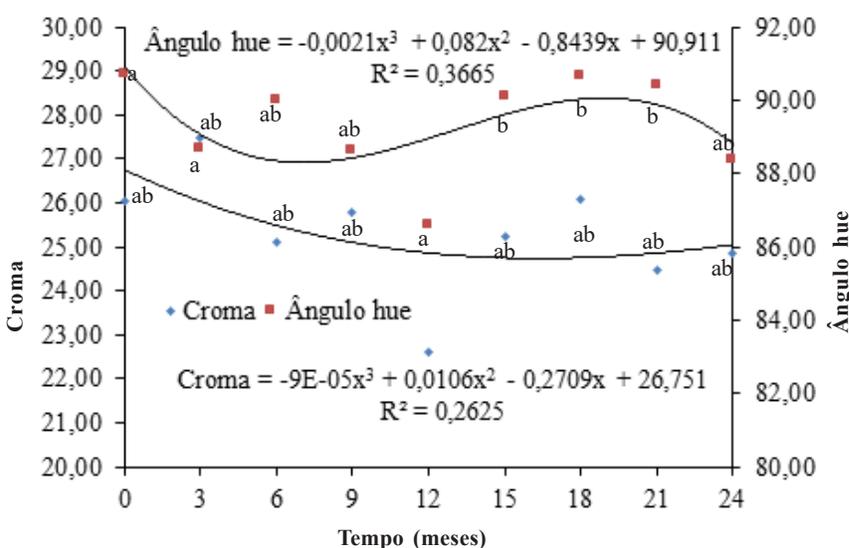


Figura 5. Valores de croma e ângulo hue em polpa de frutos de *P. cincinnata* mantidas sob congelamento por 24 meses.

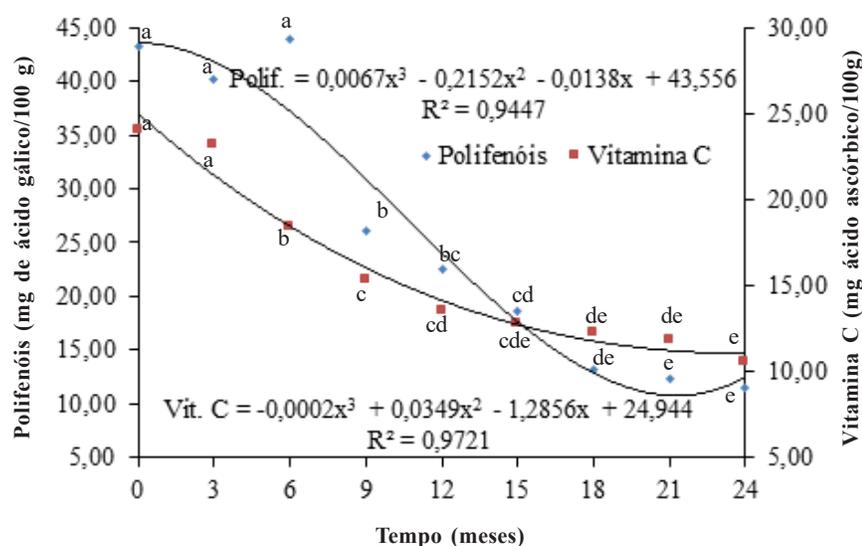


Figura 6. Valores de polifenóis e vitamina C em polpa de frutos de *P. cinnamata* mantidas sob congelamento por 24 meses.

vitamina C, carotenóides e compostos fenólicos (Vasconcelos et al., 2021). Geralmente, as polpas são comercializadas em embalagens flexíveis (sacos plásticos de polietileno) ou tetra pak, pela facilidade de manuseio. O tipo de embalagem utilizada no acondicionamento tem influência na vida útil, visto que a vitamina C apresenta baixa estabilidade e está sujeita à degradação pela ação do oxigênio, luz, pH, açúcares e aminoácidos livres (Cid, Asticisaran & Ybellu, 1991). Muitos fatores pré e pós-colheita influenciam a sua concentração, desde a cultivar utilizada até condições climáticas, práticas de plantio, método de colheita e processamento (Lee & Kader, 2000).

A vitamina C é uma vitamina hidrossolúvel e termolábil, sendo rapidamente oxidada quando exposta ao ar. Por esse motivo, ela é usada como índice de qualidade nutricional de produtos derivados de frutas e vegetais. Quando comparado a outros nutrientes, esta vitamina é mais sensível à degradação durante o processamento e subsequente estocagem (Danieli et al., 2009). O ácido ascórbico (vitamina C) tem função muito importante devido a sua ação fortemente redutora. É largamente empregado como agente antioxidante para estabilizar a cor e o aroma do alimento. Além do emprego como conservante, o ácido ascórbico é utilizado pelo enriquecimento de alimentos ou restauração a níveis normais, do valor nutricional

perdido durante o processamento (Aldrigue et al., 2002).

De acordo com a legislação brasileira, a ingestão diária recomendada (IDR) de vitamina C para um adulto é de 45 mg (Brasil, 2005). Assim sendo, o conteúdo de vitamina C obtido no presente experimento permite afirmar que a polpa de frutos de *P. cinnamata* é uma boa fonte de vitamina C. A determinação do conteúdo de ácido ascórbico em frutas é muito importante, pois além de seu papel fundamental na nutrição humana, sua degradação pode favorecer o escurecimento não enzimático, e causar aparecimento de sabor

estranho (Cardello e Cardello, 1998).

O teor de vitamina C difere com a variação da espécie, tipo de tecido, grau de maturação e procedência (Castro et al., 2015). O ácido ascórbico é também um índice da qualidade dos alimentos (Brasil, 2000) e pode ser influenciado pelas condições de cultivo, processamento e armazenamento de matéria-prima e produto final (Chitarra e Chitarra, 2005). As não conformidades observadas podem ser relacionadas às práticas de processamento, exposição à luz e oxigênio e às condições de armazenamento, uma vez que o ácido ascórbico é altamente reativo (Teixeira e Monteiro, 2006).

Os flavonoides apresentaram diferença significativa durante o armazenamento da polpa e, ao mesmo tempo, apresentou correlação muito forte ($R^2 = 0,9088$) em função do tempo de armazenamento, com valor inicial de 12,71 mg/100 g de amostra, reduzindo significativamente aos três meses de armazenamento, voltando a aumentar a partir do 18 mês de armazenamento, estatisticamente igual aos valores iniciais (Figura 7). Os flavonoides são pigmentos naturais amplamente distribuídos em plantas, frutas e vegetais, que protegem o organismo contra danos produzidos por agentes oxidantes, como os raios ultravioletas, poluição ambiental, substâncias químicas presentes no alimento, entre outros (Martínez-Flórez et al., 2002).

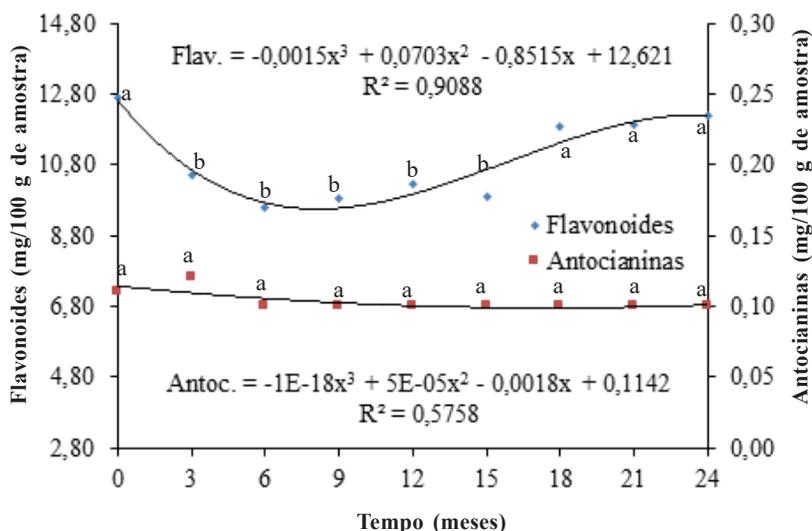


Figura 7. Valores de flavonoides e antocianinas em polpa de frutos de *P. cinninata* mantidas sob congelamento por 24 meses.

Os compostos fenólicos estão associados à atividade antioxidante, que é uma ação que retarda ou impede o dano oxidativo, processo causado por substâncias chamadas radicais livres, que podem levar à disfunção das células e o aparecimento de problemas como doenças cardíacas, diabetes e câncer (Silva et al., 2017). Os compostos bioativos que fazem parte dos alimentos são de natureza variada, e pelas divergências no conhecimento de sua estrutura físico-química e de seus mecanismos de ação fisiológica, investigá-los detalhadamente é essencial sob o ponto de vista nutricional e farmacológico (Campos et al., 2011).

As antocianinas não apresentaram variação significativa durante todo o armazenamento estando entre 0,10 e 0,12 mg/100 g de amostra (Figura 7) não havendo efeito do tempo de armazenamento. As antocianinas são responsáveis pela pigmentação nas frutas. São pigmentos que se encontram dispersos nos vacúolos celulares dos vegetais, responsáveis pelas cores que variam de tonalidades como rosa e vermelho até nuances como roxo e azul. Pertencem à classe dos flavonoides, grupo mais importante de compostos hidrossolúveis (Sampaio, 2015). As antocianinas participam na inibição da peroxidação de lipídeos, na desagregação de plaquetas e ação antitumoral e antimutagênico (Angelo e Jorge, 2011). As antocianinas e flavonoides produzem uma atividade antioxidante e, conseqüentemente, atuam na proteção das células do

organismo contra os danos oxidativos causados pelos radicais livres (Santos et al., 2017). A sensibilidade ao pH é o principal fator limitante no processamento e utilização das antocianinas, afetando a cor e a estabilidade química (Lopes et al., 2007).

Conclusões

Não ocorre variação significativa da cor da polpa de frutos de *P. cinninata* durante o armazenamento por 24 meses a -18°C . Os valores de sólidos solúveis e antocianinas também não variam significativamente. Ocorre oscilação nos valores de pH, acidez titulável, Ratio e flavonoides em polpa

de frutos de *P. cinninata* durante o armazenamento por 24 meses a -18°C .

Os valores de polifenóis e vitamina C reduzem no decorrer do armazenamento. Polpa de frutos de *P. cinninata* podem ser armazenadas sob congelamento a -18°C por até seis meses, sem nenhuma alteração significativa na sua constituição química. A partir deste período ocorre redução significativa nos valores de polifenóis e vitamina C.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) projeto nº 404847/2012-09 pelo apoio financeiro, e à Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) pelo apoio no desenvolvimento deste projeto de pesquisa.

Literatura Citada

- ABREU, S. P. M. et al. 2009. Caracterização físico-química de genótipos de maracujazeiro-azedo cultivado no distrito federal. Revista Brasileira de Fruticultura 31(2):487-491.
- ALBUQUERQUE, A. P. et al. 2021. Utilização de polpa de frutas em pó carregadoras de probióticos como alimento funcional: aspectos gerais e

- perspectivas. *Brazilian Journal of Food Technology* 24:e2019310.
- ANGELO, P. M.; JORGE, N. 2011. Compostos fenólicos em alimentos - uma breve revisão. *Revista Instituto Adolfo Lutz* 66(1):34-56.
- ALDRIGUE, M. L. et al. 2002. Aspecto da ciência e tecnologia de alimentos. Editora UFPB, João Pessoa, PB. v.1. 198p.
- AROUCHA, E. M. M. et al. 2010. Acidez em frutas e hortaliças. *Revista Verde (Brasil)* 5(2):01-04.
- AZOUBEL, et al. 2010. Processo agroindustrial: aproveitamento da polpa de maracujá do mato (*Passiflora cincinnata*) para a fabricação de estruturado de frutas. Comunicado Técnico, Petrolina, PE. 3p.
- BATISTA, A. G. et al. 2013. Parâmetros de qualidade de polpas de frutas congeladas: uma abordagem para produção do agronegócio familiar no Alto Vale do Jequitinhonha. *Tecnologia & Ciência Agropecuária* 7(4):49-54.
- BRASIL. 2005. Resolução RDC nº 269, de 22 de setembro de 2005. Aprovar o “Regulamento técnico sobre a ingestão diária recomendada (IDR) de proteína, vitaminas e minerais”. *Diário Oficial da União, Brasília, DF*.
- BRASIL. 2000. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Instrução Normativa Nº 1, de 7 de janeiro de 2000. Regulamento técnico geral para fixação dos padrões de identidade e qualidade para polpa e sucos de frutas. *Diário Oficial da União, Nº 6, Brasília, DF*.
- CAJAMARCA, S. M. N. et al. 2017. Efeito do ozônio na qualidade pós-colheita de morangos produzidos em sistema orgânico. *Boletim CEPPA* 35(2):1-12.
- CARDELLO, H. M. A. B.; CARDELLO, L. 1998. Teor de vitamina C, atividade de ascorbato oxidase e perfil sensorial de manga (*Mangifera indica* L.) variedade Haden, durante o amadurecimento. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 18(2):211-217.
- CASTRO, T. M. N. et al. 2015. Parâmetros de qualidade de polpas de frutas congeladas. *Revista Instituto Adolfo Lutz* 74(4):426-36.
- CHITARRA, M. I. F.; CHITARRA, A. B. 2005. Pós-colheita de frutas e hortaliças. 2 ed. Editora UFLA. Lavras, MG. 783p.
- CID, C.; ASTICISARARAN, I.; YBELLU, J. 1991. Modificaciones en el contenido de vitamina C em zumos naturales desde su elaboración hasta su posible consumo. *Alimentaria* 28:41-43.
- COHEN, K. O. 2006. Método para determinação de ácido ascórbico por espectrofotometria. Embrapa.
- CORY, H. et al. 2018. The Role of Polyphenols in Human Health and Food Systems: A Mini-Review. *Frontiers in Nutrition* 5(87): Published online, Sep 21.
- CAMPOS, A. F. L. et al. 2011. Identificação e análises dos fatores antinutricionais nas possíveis interações entre medicamentos e alimento/nutrientes em pacientes hospitalizados. *Einstein* 9(3):319-325.
- CARVALHO, C. R. L. et al. 1990. Análises químicas de alimentos. Campinas, SP, ITAL. 121p.
- CARVALHO, A. V.; MATTIETTO, R. A. de; BECKMAN, J. C. 2017. Estudo da estabilidade de polpas de frutas tropicais mistas congeladas utilizadas na formulação de bebidas. *Brazilian Journal Food Technology* 20:e2016023.
- CHAVES, M. C. V. et al. 2004. Caracterização físico-química de suco de acerola. *Revista de Biologia e Ciências da Terra [en linea]*. 4(2), [fecha de Consulta 14 de Mayo de 2020]. ISSN: 1519-5228. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=50040217>
- CREMASCO, J. P. G. et al. 2016. Qualidade pós-colheita de oito variedades de pêssego. *Comunicata Scientiae* 7(3):334-342.
- D’ABADIA, A. C. A. et al. 2020. Determination of the maturation stage and characteristics of the fruits of two populations of *Passiflora cincinnata* Mast. *Revista Caatinga* 33(2):349-360.
- DANIELI, F. et al. 2009. Determinação de vitamina C em amostras de suco de laranja *in natura* e amostras comerciais de suco de laranja pasteurizado e envasado em embalagem Tetra Pak. *Revista do Instituto de Ciência da Saúde* 27(4):361-365.

- FALLER, A. L. K.; FIALHO, E. 2009. Disponibilidade de polifenóis em frutas e hortaliças consumidas no Brasil. *Revista Saúde Pública* 43(2):211-218.
- FONSECA, L. R.; CARVALHO, N. B.; VIANA, P. A. 2021. Caracterizações físico-química e sensorial de estruturados da polpa concentrada de jaboticaba. *Brazilian Journal of Food Technology* 24:e2020115.
- FRANCIS, F. J. 1982. Analysis of anthocyanins. In: Markakis, P. (ed.). *Anthocyanins as food colors*. New York: Academic Press. pp.181-207.
- FLORI, J. E. et al. 2011. Cultivo do maracujá-do-mato. Disponível em: <HTTP://www.maracujado-mato.com.br>. Acesso em: 07 mai. 2020.
- GONÇALVES, A. S. 2017. Estabilidade da polpa de mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes) congelada e armazenada. Tese Doutorado. Lavras, UFL/DCA. 185p.
- GONÇALVES, G. A. S. et al. 2018. Tecnologia de fabricação de polpa de mangaba congelada. Universidade Federal de Lavras, UFLA, Lavras, MG. 15p.
- HUNTERLAB. 2008. Insight on color: CIE L* a* b* color scale. Reston, VA, USA.
- LARRAURI, J. A.; RUPÉREZ, P.; SAURACALIXTO, F. 1997. Effect of drying temperature on the stability of polyphenols and antioxidant activity of red grape pomace peels. *Journal Agriculture Food Chemistry* 45:1390-1393.
- LEE, S. K.; KADER, A. A. 2000. Pre-harvest and postharvest factors influencing vitamin C content of horticultural crops. *Postharvest Biology and Technology* 20:207-220.
- LOPES, T. J. et al. 2007. Antocianinas: uma breve revisão das características estruturais e da estabilidade. *Revista Brasileira de Agrociência* 13(3):291-297.
- MACEDO, J. A. B. 2001. Métodos laboratoriais de análise físico-químico e microbiológicas. Águas e águas. Juiz de Fora, MG. pp.1-52.
- MARTÍNEZ-FLÓREZ, S. et al. 2002. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición Hospitalaria* 6(17):271-278.
- MELÉNDEZ-MARTÍNEZ, A. J.; VICARIO, I. M.; HEREDIA, F. J. 2003. Application of tristimulus colorimetry to estimate the carotenoids content in ultrafrozen orange juices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51(25):7266-7270.
- MONTES, C. et al. 2005. Application of tristimulus colorimetry to optimize the extraction of anthocyanins from jaboticaba (*Myrcia jaboticaba* Berg). *Food Research International* 38(8-9):983-988.
- OBANDA, M.; OWUOR, P. O. 1997. Flavanol Composition and Caffeine Content of Green Leaf as Quality Potential Indicators of Kenyan Black Teas. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 74:209-215.
- PEREIRA, J. M. A. T. K. et al. 2006. Avaliação da qualidade físico-química, microbiológica e microscópica de polpas de frutas congeladas comercializadas na cidade de Viçosa-MG. *Alimentos e Nutrição* 17(4):437-42.
- SALGADO, S. M.; GUERRA, N. B.; MELO FILHO, A. B. 1999. Polpa de fruta congelada: efeito do processamento sobre o conteúdo de fibra alimentar. *Revista Nutrição* 12(3):303-308.
- SAMPAIO, C. R. P. 2015. Caracterização físico-química, capacidade antioxidante e compostos bioativos de frutos de murici vermelho (*Byrsonima ligustrifolia* A. Juss) em cinco estádios de maturação. Tese Doutorado. Curitiba, UFP/DTA. 102p.
- SANTOS, F. A. et al. 2004. Análise qualitativa das polpas congeladas de frutas produzidas pela SUFRUTS, MA. *Revista Higiene Alimentar* 18(119):14-22.
- SANTOS, E. F. et al. 2017. Quantificação de compostos bioativos em frutos de mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes) nativos de Alagoas. *Ciência Agrícola* 15(1):17-22.
- SANTOS, C. A. A.; COELHO, A. F. S.; CARREIRO, S. C. 2008. Microbiological evaluation of frozen fruit pulps. *Ciências e Tecnologia dos Alimentos* 28(4):913-915.
- SANTOS, J. R.; BOÊNO, J. A. 2016. Muffins isentos de glúten e lactose desenvolvidos com resíduo de

- polpa de graviola (*Annona muricata* L.). Revista de Agricultura Neotropical 3(3):42-51.
- SEBASTIANY, E.; REGO, E. R.; VITAL, M. J. S. 2010. Avaliação do processo produtivo de polpas de frutas congeladas. Revista do Instituto Adolfo Lutz 69(3):318-26.
- SINNECKER, P. et al. 2002. Relationship between color (instrumental and visual) and chlorophyll contents in soybean seeds during ripening. Journal of Agricultural and Food Chemistry 50(14):3961-3966.
- SILVA, M. G. G. et al. 2017. Atividade antioxidante e quantificação de compostos fenólicos bioativos da espécie do semiárido *bauhinia cheilantha* (bong.) steud. (2017). Anais... In: Encontro anual da Biofísica. Recife, PE. pp.96-97.
- SILVA, F. A. S. 2015. Software ASSISTAT. Universidade Federal de Campina Grande. INPI 0004051-2. Versão 7.7 Beta (pt), Campina Grande – PB – Brasil, Disponível em: <<http://www.assistat.com>>. Acesso em 08 ag. 2019.
- SIRQUEIRA, A. P. O. 2012. Uso de coberturas comestíveis na conservação pós-colheita de goiaba e maracujá-azedo. Dissertação Mestrado. Campo dos Goytacazes, RJ, UENF. 91p.
- TEIXEIRA, M.; MONTEIRO, M. 2006. Degradação da vitamina C em suco de frutas. Alimentos e Nutrição 17(2):219-227.
- VASCONCELOS, I. P.; SILVA, R. E. V.; COSTA, P. M. C.; RODRIGUES, L. J. 2021. Nutrition and bioactive potential of the noni fruit cultivated from the Mato Grosso State. Ciência Rural 51(2):e20200372.
- VIANNA-SILVA, T. 2010. Determinação da maturidade fisiológica de frutos de maracujazeiro amarelo colhidos na região norte do estado do Rio de Janeiro, Brasil. Revista Brasileira de Fruticultura 32(1):057-066.

ÁCIDO GIBERÉLICO NA GERMINAÇÃO DE SEMENTES E DESENVOLVIMENTO INICIAL DE PLÂNTULAS DE MAMOEIRO

Marcus Vinicius Sandoval Paixão, Rafaela Barreto Cazaroto Grobério, Ana Cecília Nepomuceno Hoffay, Angélica Couto Correa, Gustavo Miranda Cremonini

Instituto Federal de Ciência e Tecnologia do Espírito Santo - IFES Campus Santa Teresa, ES, Brasil., Santa Teresa, ES, 29660.000, mvspaixao@gmail.com; rafaelacazaroto@gmail.com; ceciliahoffayagro@gmail.com; angelicacoutocorrea@gmail.com; gustavom.cremonini@gmail.com

As sementes de mamão apresentam dormência pós-colheita dificultando a propagação. Métodos para superar a dormência destas sementes têm sido testados, com destaque para os reguladores de crescimento. Objetivou-se avaliar o efeito do ácido giberélico na germinação e desenvolvimento inicial de plântulas de mamoeiro. O experimento foi conduzido no Laboratório de Propagação de Plantas do Instituto Federal do Espírito Santo, Campus Santa Teresa com a variedade Formosa. As sementes foram imersas por 30 minutos em água pura como testemunha e em diferentes doses de ácido giberélico e submetidas aos tratamentos com solução de giberelina 1.000 mg L⁻¹, 2.000 mg L⁻¹, 3.000 mg L⁻¹, 4.000 mg L⁻¹, colocadas para germinar em papel Germitest[®], em câmara tipo B.O.D. a 25°C, luminosidade 12/12 horas. Durante 30 dias, foi avaliada a porcentagem de germinação; índice de velocidade de germinação; tempo médio de germinação. Após 60 dias do início da germinação da primeira semente, foram avaliadas: número de folhas; comprimento da raiz; altura da parte aérea; massa verde das folhas; massa seca das folhas; massa verde da raiz; massa seca da raiz, sendo selecionadas aleatoriamente para avaliação dez plantas por repetição em cada tratamento. O ácido giberélico respondeu positivamente na germinação das sementes e desenvolvimento das plântulas de mamoeiro, sendo que, a dosagem de GA3 2.000 mg L⁻¹ pode ser recomendada para a cultura.

Palavras-chave: Mamão, dormência, reguladores.

Giberelic acid in seed germination and initial development of papaya seedlings.

Papaya seeds have postharvest dormancy, making sexual propagation difficult. Methods to overcome the dormancy of these seeds have been tested, with emphasis on the use of growth regulators. The objective was to evaluate the effect of gibberellic acid on the germination and initial development of papaya seedlings. The experiment was conducted at the Plant Propagation Laboratory of the IFES Campus Santa Teresa with the beautiful variety. The seeds were immersed for 30 minutes in natural water and different doses of gibberellic acid, and submitted to treatments gibberellin solution 1,000 mg L⁻¹, 2,000 mg L⁻¹, 3,000 mg L⁻¹, 4,000 mg L⁻¹, placed to germinate on germitest paper, BOD chamber at 25°C, brightness 12/12 hours. For thirty days, the germination percentage was evaluated; germination speed index; average germination time. Sixty days after germination of the first seed, the following were evaluated: number of leaves; root length; aerial part height; green leaf mass; dry leaf mass; green root mass; dry root mass, with ten plants per replication being randomly selected for each treatment. Gibberellic acid responded positively in germination of seeds and development of papaya seedlings, and the dosage of GA3 2,000 mg L⁻¹ can be recommended for culture.

Key words: Papaya, numbness, regulators.

Introdução

O Brasil está entre os grandes produtores de mamão do mundo, tendo registrado em 2019 uma produção de 1.161.808 toneladas em uma área de 27.556 ha, sendo que os estados da Bahia e do Espírito Santo concentram a maior parte da produção brasileira (IBGE, 2019).

As sementes de mamão apresentam dormência pós-colheita dificultando a propagação sexuada. Alguns métodos para superar a dormência destas sementes têm sido testados, com destaque para o uso de baixa temperatura; envelhecimento acelerado; lavagem em água corrente; remoção da sarcotesta; aplicação de KNO₃, de hipoclorito de sódio, uso de reguladores de crescimento; dentre outros (Tokuhisa et al., 2007).

Se considerarmos que entre três a quatro anos os plantios de mamoeiro têm de ser renovados, a demanda por sementes passa a ter maior valor e sua qualidade passa a ser de grande importância para a melhoria da cultura no país.

Diversos são os fatores que controlam o processo de germinação, dentre eles os níveis endógenos de hormônios, responsáveis pelas alterações no estado fisiológico e bioquímico que levam na retomada do desenvolvimento embrionário, sendo que estas alterações são responsáveis pela ativação e síntese de enzimas hidrolíticas, quebrando as moléculas de reservas utilizadas para o crescimento do eixo embrionário (Marcos Filho, 2015). Desta forma, o processo de mobilização de reservas em sementes tem participação direta dos hormônios.

Para que o processo de germinação ocorra de forma mais uniforme e com maior percentual possível, têm-se alguns procedimentos que podem ser adotados nas sementes, como a identificação adequada de temperatura ambiente, a aplicação de reguladores vegetais (Ferrari et al., 2008), e o uso de técnicas para acelerar a embebição da semente.

Rodríguez et al. (2013) citam que a germinação da semente de mamão é considerada lenta e irregular, esta causada pela presença de sarcotesta nas sementes, assim como a existência de dormência associada a maturação e época de colheita dos frutos.

Substâncias inibidoras têm papel altamente relevante no processo de germinação das sementes (Manica, 1982). Embora tais substâncias inibidoras não

sejam totalmente identificadas pelos pesquisadores, atribui-se a elas a regulação da germinação, pois, estas substâncias podem estar presentes tanto na sarcotesta quanto na esclerotesta (Hoffay et al., 2018).

As giberelinas são sintetizadas principalmente no ápice caulinar e nas folhas jovens em desenvolvimento, assim como nos entrenós jovens e em crescimento ativo, atuando principalmente na quebra de dormência de sementes que requerem luz ou frio para a indução da germinação, enfraquecimento da camada do endosperma que envolve o embrião e restringe o seu crescimento, na produção de enzimas (á-amilase e outras enzimas hidrolíticas), na mobilização de reservas energéticas do endosperma e na ativação do crescimento vegetativo do embrião (Paixão, 2019).

A ação da giberelina está relacionada à síntese de enzimas envolvidas no enfraquecimento dos tegumentos, como endo- α -manases, sendo expansivas e de enzimas hidrolíticas de reserva nutritiva contida no endosperma, como á-amilase (Paixão, 2019). Esses eventos estão relacionados ao alongamento embrionário e à protrusão da radícula permitindo a quebra do amido e conseqüente liberação de energia e posteriormente a retomada do crescimento do embrião, gerando em seguida a protusão da radícula (Ferreira et al., 2005).

Na germinação das sementes temos hormônios que atuam como promotores e como inibidores. As giberelinas estão entre os promotores da germinação, estas atuam no crescimento vegetativo do embrião, mobilizando reservas e enfraquecendo o endosperma que cobre o embrião e bloqueia seu crescimento (Taiz et al., 2017). Encontrado em várias partes das plantas, como, raízes, folhas jovens, sementes em fase de germinação e nos frutos (Lavagnini et al., 2014), sua atuação está relacionada ao preparo, sendo importante a concentração, o número de aplicações, a época de aplicação e a espécie ou cultivar em uso (Wagner Júnior et al., 2012).

As giberelinas, como o ácido giberélico (GA₃), aumentam a elongação e divisão celular, o que é evidenciado pelo aumento do comprimento e do número de células em resposta à aplicação deste fitorregulador (Taiz e Zeiger, 2013).

A pesquisa foi realizada com o objetivo de avaliar o efeito do ácido giberélico na germinação e desenvolvimento inicial de plântulas de mamoeiro.

Material e Métodos

O experimento foi conduzido no Laboratório de Propagação de Plantas do Instituto Federal do Espírito Santo, Campus Santa Teresa. A variedade utilizada para o experimento foi à Formosa, sendo as sementes imersas por 30 minutos em água pura como testemunha e em diferentes doses de ácido giberélico, submetidas aos tratamentos com solução de giberelina 1.000 mg L⁻¹, 2.000 mg L⁻¹, 3.000 mg L⁻¹, 4.000 mg L⁻¹, colocadas para germinar em papel Germitest® umedecidas com 2,5 vezes o peso do papel, em câmara tipo B.O.D. a 25°C, luminosidade 12/12 horas.

O experimento foi preparado em delineamento inteiramente casualizado (DIC), com cinco tratamentos e quatro repetições, sendo que cada unidade experimental foi composta por 100 sementes.

Após a germinação da primeira semente e durante trinta dias, foi avaliada a porcentagem de germinação (G); índice de velocidade de germinação (IVG); tempo médio de germinação (TMG).

Após sessenta dias do início da germinação da primeira semente, foram avaliadas as variáveis: número de folhas (NF); comprimento da raiz (CR); altura da parte aérea (AP); massa verde das folhas (MVF); massa seca das folhas (MSF); massa verde da raiz (MVR); massa seca da raiz (MSR), sendo selecionadas aleatoriamente para avaliação dez plantas por repetição em cada tratamento.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância, atendendo pressuposições do modelo pelo teste de Shapiro-Wilk para verificação da normalidade e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade e análise de regressão para as variáveis que apresentaram significância, utilizando o programa R.

Resultados e Discussão

A germinação iniciou aos nove dias após a semeadura nos tratamentos com giberelina, sendo que na testemunha a germinação iniciou aos 24 dias. De acordo com a Tabela 1, o ácido giberélico teve influência na germinação da semente de mamão, com valores superiores a testemunha. As dosagens de 2.000 mg L⁻¹ e 3.000 mg L⁻¹ apresentaram valores estatisticamente superiores a testemunha, sendo que

o aumento da concentração de giberelina não atuou de forma positiva na germinação. As dosagens de 2.000 mg L⁻¹ e 3.000 mg L⁻¹ não apresentaram diferença estatística, porém as avaliações para a dosagem de 2.000 mg L⁻¹ foram sempre superiores numericamente.

Para a velocidade de germinação e tempo de germinação, a dosagem de 2000 mg L⁻¹ apresentou a maior velocidade e o menor tempo de germinação, porém sem diferença estatística significativa para as dosagens de 3.000 mg L⁻¹ e 4.000 mg L⁻¹ (Tabela 1).

Sousa et al. (2008) encontraram os melhores resultados com o uso de ácido giberélico a 50 e 750 mg L⁻¹ embebidos por 12 horas, em sementes de pinha sendo que, a baixa concentração de giberelina foi compensada pelo tempo de exposição da semente ao hormônio.

A testemunha apresentou baixa germinação (45%) em relação aos tratamentos com giberelina, semelhante ao encontrado por Zanotti et al. (2011) que encontraram médias de 43% de germinação, comprovando a existência de dormência nestas sementes.

Lopes et al. (2009) utilizando a imersão de sementes de frutos maduros não obtiveram germinação para sementes sem tratamento (G = 0%), sendo que as sementes que foram imersas em solução de giberelina 1.000 mg L⁻¹ promoveram melhor germinação (67,75%), semelhante ao encontrado neste trabalho (69%), com maior desenvolvimento das plântulas, porém estes autores não testaram dosagens maiores, o que poderia alterar os seus resultados.

De acordo com a análise de regressão (Figura 1), o valor ideal para a dosagem de giberelina tramita entre 2000 mg L⁻¹ e 3000 mg L⁻¹, considerando que estas dosagens são muito pequenas quando se realizou os

Tabela 1 - Germinação em sementes de mamão submetidas a diferentes doses de GA3

Tratamento	G (%)	IVG	TMG
Testemunha	45 b	0,565 c	24,330 b
GA3 1000 mg L ⁻¹	69 ab	0,940 b	20,901 b
GA3 2000 mg L ⁻¹	86 a	1,675 a	14,796 a
GA3 3000 mg L ⁻¹	85 a	1,671 a	15,021 a
GA3 4000 mg L ⁻¹	68 ab	1,415 a	14,965 a

Médias, seguidas das mesmas letras nas colunas são estatisticamente iguais pelo teste de Tukey em 5% de probabilidade. G = germinação; IVG = índice de velocidade de germinação; TMG = tempo médio de germinação.

tratamentos das sementes, permitindo considerar que a menor dosagem é economicamente a dosagem viável para a germinação de sementes de mamão, visto que também o IVG e TMG apresentaram os mesmos resultados (Figuras 2 e 3).

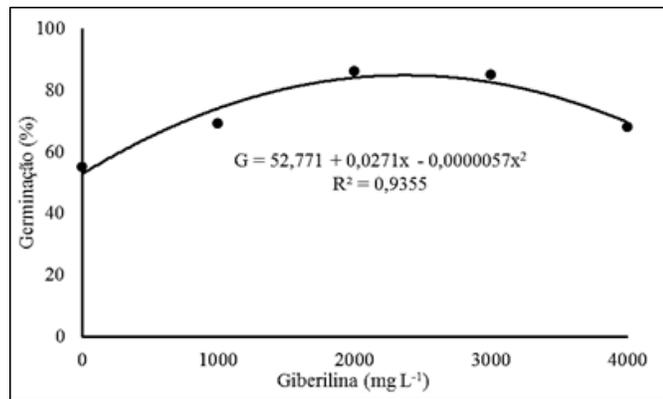


Figura 1 - Regressão para germinação (G).

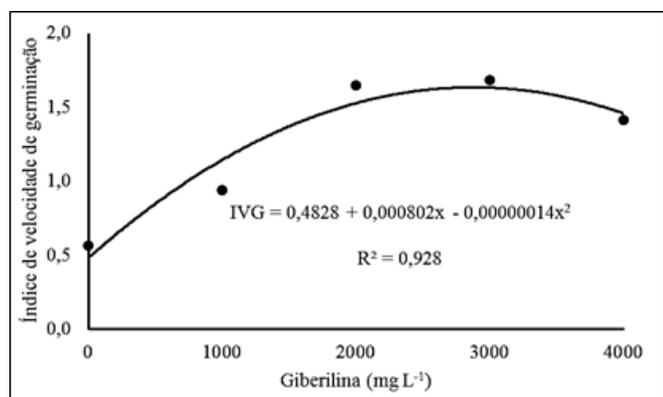


Figura 2 - Regressão para Índice de velocidade de germinação (IVG).

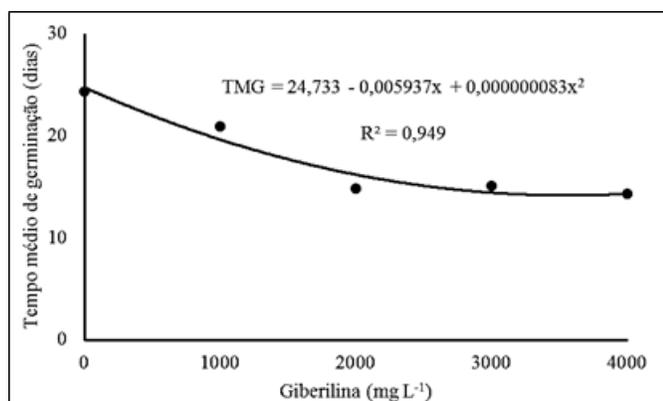


Figura 3 - Regressão tempo médio de germinação (TMG)

Os resultados observados no presente trabalho mostram que a semente de mamão possui dormência, porém, para que haja germinação é necessário que primeiro ocorra à síntese de GA3 no embrião, o que exige energia (ATP) oriunda de processos respiratórios e água para ativar a referida rota. Neste trabalho, o uso de giberelina apresentou melhoras na germinação, velocidade e tempo para germinar. A pesquisa mostra que imergir as mesmas em solução de giberelina por trinta minutos é o suficiente para reestimar o início do desenvolvimento do embrião, para aumentar a germinação, acelerar e diminuir o tempo de germinação.

De acordo com a Tabela 2 o ácido giberélico teve influência no desenvolvimento inicial das plântulas de mamoeiro, com valores superiores a testemunha. A dosagem de 2.000 mg L⁻¹ apresentou valores estatisticamente superiores a testemunha e aos demais tratamentos com giberelina, sendo que o aumento da concentração de giberelina não atuou de forma positiva na germinação.

A giberelina atua na fase de germinação das sementes melhorando o desenvolvimento inicial das plântulas, realçando o seu potencial (Lopes et al., 2009). A melhora no desenvolvimento está relacionada à ação da giberelina na produção que enzimas hidrolíticas, as quais quebram o amido e outras substâncias, permitindo a retomada do crescimento do eixo embrionário.

Sousa et al. (2008) encontraram os melhores resultados com o uso de ácido giberélico a 50 e 750 mg L⁻¹ embebidos por 12 horas, em sementes de pinha. Neste caso, a baixa concentração de giberelina foi compensada pelo tempo de exposição da semente ao hormônio.

Alguns autores também encontraram resultados positivos com uso de giberelina, Braun et al. (2010) com *Beta vulgaris* L.; Oliveira et al. (2010) com atemoia (*Annona cherimola* Mill. x *Annona squamosa* L.); Peixoto et al. (2011) com *Ricinus communis* L. e Silva et al. (2013) com *B. brizantha* "Marandu" e "MG 5", que observaram a quebra da dormência de sementes em diversas espécies vegetais tratadas com giberelinas.

Lopes et al. (2009) observaram que para a massa verde e para a massa seca de dez plântulas,

Tabela 2 – Desenvolvimento de plântulas de mamoeiro submetidas a diferentes doses de GA3

Tratamento	NF	AP	CR	MVF	MSF	MVR	MSR
Testemunha	1,80 b	4,31 c	4,83 b	0,029 b	0,004 d	0,021 c	0,004 b
GA3 1000 mg L ⁻¹	2,35 b	9,28 b	5,93 ab	0,078 a	0,016 b	0,041 b	0,008 b
GA3 2000 mg L ⁻¹	3,85 a	13,34 a	8,31 a	0,097 a	0,024 a	0,095 a	0,032 a
GA3 3000 mg L ⁻¹	2,39 b	11,11 ab	7,35 ab	0,085 a	0,018 b	0,043 b	0,010 b
GA3 4000 mg L ⁻¹	2,30 b	5,76 c	7,24 ab	0,040 b	0,010 c	0,039 b	0,008 b

Médias, seguidas das mesmas letras nas colunas são estatisticamente iguais pelo teste de Tukey em 5% de probabilidade. NF = número de folhas; AP = altura da planta (cm); CR = comprimento da raiz (cm); MVF = massa verde das folhas (g.pl⁻¹); MSF = massa seca das folhas (g.pl⁻¹); MVR = massa verde das raízes (g.pl⁻¹); MSR = massa seca das raízes (g.pl⁻¹).

houve diferença nas concentrações de GA3 de 500 mg L⁻¹ e 1.000 mg L⁻¹ e a testemunha, porém estas concentrações foram muito baixas em relação as concentrações utilizadas nesta pesquisa.

O teste de regressão apresentou dosagem ideal de giberelina próximo de 2.000 mg L⁻¹. Para todas as variáveis avaliadas em dosagens superiores, a tendência é de queda nos valores apurados, com perdas no desenvolvimento da plântula (Figuras 4 e 5).

O mesmo pode ser observado para a produção de massa foliar e massa das raízes, onde a regressão apresenta a tendência a perda de massa verde e massa seca das folhas, assim como a massa verde e massa seca das raízes, comprovando que valores superiores a 2.000 mg L⁻¹ são prejudiciais à produção de massa ocasionando a queda no desenvolvimento das plântulas de mamoeiro (Figuras 6 e 7).

Os dados observados no presente trabalho mostram que as sementes de mamão são sensíveis ao uso de giberelina de acordo com a dosagem e tempo de imersão das sementes. Neste estudo, o uso de giberelina apresentou melhoras na germinação e no

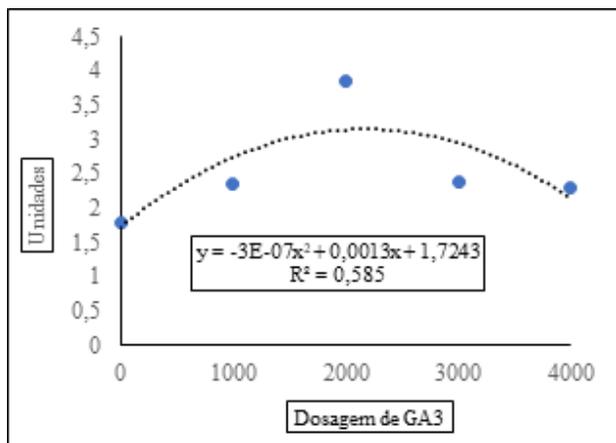


Figura 4 - Regressão para número de folhas.

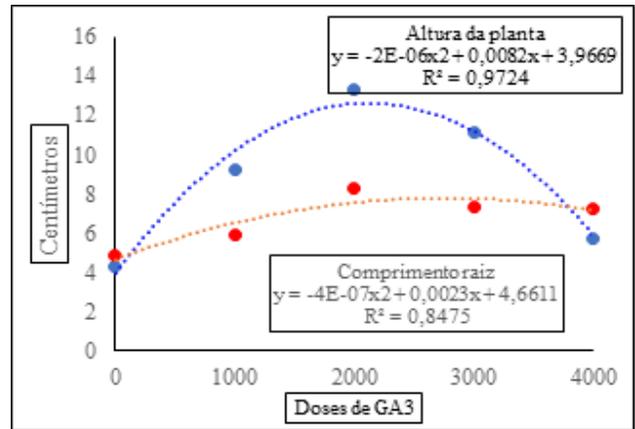


Figura 5 - Altura da planta e comprimento da raiz.

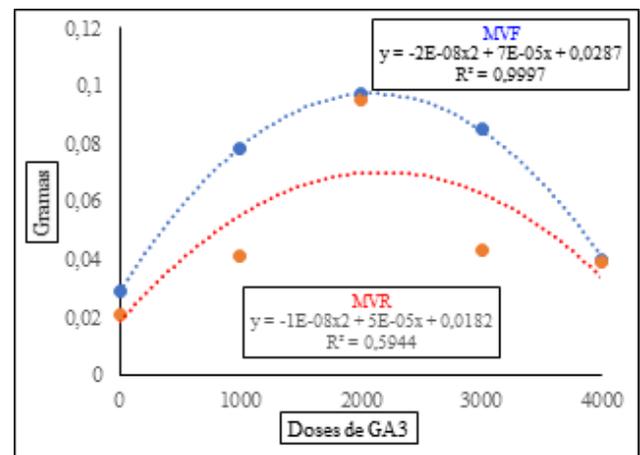


Figura 6 - Regressão para massa verde.

desenvolvimento inicial das plântulas, sugerindo que imergir as sementes em solução de giberelina por 30 minutos na dosagem de 2.000 mg L⁻¹ foi suficiente para reestimar o início do desenvolvimento do embrião, promovendo o alongamento celular e melhorar seu desenvolvimento inicial.

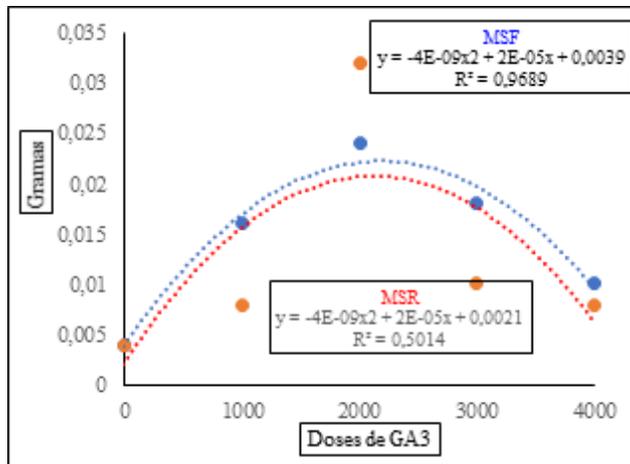


Figura 7 - Regressão para massa seca.

Conclusão

O ácido giberélico respondeu positivamente na germinação das sementes e desenvolvimento das plântulas de mamoeiro, sendo que, a utilização deste hormônio na dosagem de 2.000 mg L⁻¹ pode ser recomendada para a cultura.

Literatura Citada

- BRAUN, H. et al. 2010. Germinação *in vitro* de sementes de beterrabas tratadas com ácido giberélico em diferentes concentrações de sacarose no meio de cultura. *Semina: Ciências Agrárias* 31(3):539-546.
- FERRARI, T. B. et al. 2008. Germinação de sementes de maracujá-doce (*Passiflora alata* Curtis): Fases e efeito de reguladores vegetais. *Revista Biotemas* 21(3):65-74.
- FERREIRA, G. et al. 2005. Efeito de arilo na germinação de sementes de *Passiflora alata* Curtis em diferentes substratos e submetidas a tratamentos com giberelina. *Revista Brasileira de Fruticultura* 27(2):277-280.
- HOFFAY, A. C. N. et al. 2018. Ácido giberélico no desenvolvimento inicial de plântulas de mamoeiro. In: Simpósio do Papaya Brasileiro, 7. Anais...
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. Produção Agrícola Municipal, 2019. Disponível em: http://www.cnpmf.br/embrapa/Base_de_Dados/index_pdf/dados/brasil/mamao/b1_mamao.pdf
- LAVAGNINI, C. G. et al. 2014. Fisiologia Vegetal – Hormônio Giberelina. *Revista Científica Eletrônica de Agronomia (FAEF)* 25(1):48-52.
- LOPES, A. W. P. et al. 2009. Estádio de maturação do fruto e uso do ácido giberélico na germinação de sementes de mamoeiro. *Pesquisa Agropecuária Tropical* 39(4):278-284.
- MANICA, I. 1982. *Fruticultura Tropical 3: mamão*. São Paulo, SP, Ceres.
- MARCOS FILHO, J. 2015. *Fisiologia de sementes de plantas cultivadas*, 2 ed., Londrina, PR, ABRATES. 660p.
- OLIVEIRA, M. C. et al. 2010. Germinação de sementes de atemoia (*annona cherimola* Mill. x *a. squamosa* L.) cv “gefner” submetidas a tratamentos com ácido giberélico (GA3) e ethephon. *Revista Brasileira de Fruticultura* 32(2):544-554.
- PAIXÃO, M. V. S. 2019. *Propagação de plantas*. 2.ed. Santa Teresa: Ifes, 230p.
- PEIXOTO, C. P. et al. 2011. Ação da giberelina em sementes pré-embebidas de mamoneira. *Comunicata Scientiae* 2(2):70-75.
- RODRÍGUEZ, J. A. R. et al. 2013. Escarificación química de semilla de papaya. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 4(6):47-954.
- SILVA, A. B.; LANDGRAF, P. R. C.; MACHADO, G. W. O. 2013. Germinação de sementes de braquiária sob diferentes concentrações de giberelina. *Semina: Ciências Agrárias* 34(2):657-662.
- SOUSA, S. A. et al. 2008. Superação da dormência em sementes de pinha. *Caatinga (Brasil)* 21(4):118-121.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. 2013. *Fisiologia e desenvolvimento vegetal*. 5.ed. Artmed editora, Porto Alegre. 918p.
- TAIZ, L. et al. 2017. *Fisiologia e desenvolvimento vegetal*. 6.ed. Artmed editora, Porto Alegre. 888 p.
- TOKUHISA, D. et al. 2007. Tratamentos para superação da dormência em sementes de mamão. *Revista Brasileira de Sementes* 29(1):131-139.
- WAGNER JÚNIOR, A. et al. 2012. Influência do substrato e do ácido giberélico no desenvolvimento inicial do pessegueiro progênico 290. *Revista Brasileira de Agrociência (UFPEL)* 18:11-20.
- ZANOTTI, R. F. et al. 2011. Métodos para superação da dormência em sementes de mamão grupo formosa. In: Encontro Latino Americano de Iniciação Científica, 14, e Encontro Latino Americano de Pós-Graduação, 10. Anais... Paraíba, SE, Universidade do Vale do Paraíba. ●

REGISTRO DE BUPRESTIDAE (INSECTA: COLEOPTERA) COM POTENCIAL DANOSO EM PLANTIO COMERCIAL DE CUPUAÇUZEIRO, EM NOVA CALIFÓRNIA, RO

Rodrigo Souza Santos, Amauri Siviero

Embrapa Acre, Rod. BR 364, km 14, CP 321, 69900-970, Rio Branco, AC, Brasil. rodrigo.s.santos@embrapa.br; amauri.siviero@embrapa.br

O cupuaçuzeiro é uma planta com expressiva importância socioeconômica na região Amazônica e, dentre os fatores limitantes para seu cultivo estão os problemas fitossanitários. Nesse sentido, o objetivo desse trabalho é reportar a infestação de coleópteros da família Buprestidae em plantio comercial de cupuaçuzeiro, localizado no distrito de Nova Califórnia, RO. Os sintomas de plantas infestadas são desfolha (parcial ou total), ramos ressecados e presença de serragem na base do colo. Faz-se o primeiro registro de buprestídeos infestando plantio comercial de cupuaçuzeiro no estado de Rondônia, bem como evidencia-se o potencial danoso deste inseto-praga, o qual pode levar a planta à morte.

Palavras-chave: Amazônia, coleobroca, inseto xilófago, Malvaceae, *Theobroma grandiflorum*.

Record of Buprestidae (Insecta: Coleoptera) with harmful potential in a commercial cupuassu tree plantation, in Nova Califórnia, Rondônia state, Brazil.

The cupuassu is a plant with significant socioeconomic importance in the Amazon region and, among the limiting factors for its cultivation are the phytosanitary problems. In this sense, the aim of this work is to report the infestation of the Buprestidae family coleopterans in a commercial cupuassu tree plantation, located in the district of Nova Califórnia, Rondônia state, Brazil. The symptoms of infested plants are defoliation (partial or total), dry branches and the presence of sawdust at the base of the trunk. The first record of buprestids infesting commercial cupuassu tree planting in the state of Rondônia is made, as well as the harmful potential of this insect pest, which can lead the plant to death, is evidenced.

Key words: Amazon, coleborer, Malvaceae, xylophagous insect, *Theobroma grandiflorum*.

O cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Spreng.) K. Schum.) é uma árvore frutífera nativa da região Amazônica, pertencente à família Malvaceae, encontrado em estado silvestre na parte sul e sudeste da Amazônia Oriental e Noroeste do Estado do Maranhão. Essa planta está disseminada por toda bacia Amazônica, sendo esporadicamente encontrado em outros países como Colômbia, Venezuela, Equador e Costa Rica (Venturieri, Alves e Nogueira, 1985; Rocha Neto et al., 1999).

Os principais Estados brasileiros produtores de frutos são o Pará, Amazonas, Rondônia e Acre (Lopes et al., 1999). Os frutos são amplamente utilizados pela indústria alimentícia e de cosméticos, em virtude de suas propriedades sensoriais e químicas. A polpa é usada na fabricação de sorvete, néctar, doce, geleia, iogurte, licor, xarope e biscoito. As sementes também são empregadas na fabricação do “cupulate”, produto com características nutritivas similares às do chocolate (Araújo et al., 2007).

O cultivo do cupuaçuzeiro é de fácil manejo, apresentando importância social e econômica, como fonte de renda e de emprego para os produtores da região amazônica e cultivado geralmente em Sistemas Agroflorestais (SAF), pomares comerciais e caseiros (Lima-Primo et al., 2017). Por ser uma fruta em acesso no mercado nacional e internacional, houve uma expansão do cultivo e, conseqüentemente, o surgimento de problemas fitossanitários associados. Dentre estes, o coleóptero *Conotrachelus humeripictus* Fiedler (Coleoptera: Curculionidae) é considerado a praga-chave dessa cultura no Brasil (Silva et al., 2016). Contudo, outros insetos ocorrentes nesse cultivo também causam danos, destacando-se a lagarta desfolhadora, *Macrosoma tipulata* Hübner (Lepidoptera: Hedyllidae), o percevejo sugador *Monalonion annulipes* Signoret (Hemiptera: Miridae), a broca-do-ramo-terminal *Magulacra nigripennata* (Dognin) (Lepidoptera: Cossidae) e as brocas-do-ponteiro da muda e da planta adulta, *Demobarius* sp. e *Heilipus naevulus* Mann. (Coleoptera: Curculionidae), respectivamente (Trevisan, 1998; Silva et al., 2016; Santos et al., 2020).

Por ser um cultivo de caráter regional, ainda há carência do conhecimento acerca dos insetos associados, bem como de estudos sobre aspectos taxonômicos, biológicos, etológicos e de controle de

insetos e sua importância na cultura do cupuaçuzeiro. Nesse sentido, o objetivo do presente trabalho é reportar a infestação de inseto xilófago, causando danos a um cultivo comercial de cupuaçu, no estado de Rondônia.

Em março de 2019 foi realizada uma visita técnica a um plantio comercial de cupuaçuzeiro, localizado no sítio Ingazeiro (09°45'05,9"S; 66°41'31,1"O), distrito de Nova Califórnia, RO. Em caminhamento aleatório pelo plantio, foi observada desfolha (parcial ou total) e ressecamento de galhos (Figura 1) em várias plantas (algumas já mortas). Também foi relatado pelo produtor, uma considerável perda de produtividade nessa área, de aproximadamente 1 ha. As plantas não receberam nenhum tratamento fitossanitário desde seu plantio, apenas podas periódicas para evitar a ocorrência do fungo *Moniliophthora perniciosa* (Stahel), causador da doença conhecida vulgarmente por “vassoura-de-bruxa”.

Em uma vistoria na parte aérea e basal de plantas doentes, foi verificado uma exsudação de serragem no colo destas. Com auxílio de um facão, foi retirada uma secção da casca do tronco de uma planta atacada, onde foi verificada a presença de larvas de coleóptero xilófago (Figuras 2A e 2B). As larvas foram acondicionadas em frasco de vidro contendo álcool (70%) e levadas ao Laboratório de Entomologia da Embrapa Acre, em Rio Branco, AC, as quais foram examinadas sob microscópio estereoscópio.

Na tentativa de se capturar espécimes adultos, armadilhas de tecido tipo “voil” foram instaladas na base de três plantas com sintomas de ataque (Figuras 3A e 3B) visto que, mesmo em campo, pela morfologia externa das larvas foi possível determinar que se tratava de larvas buprestoides, conforme descrição dos trabalhos de Costa Lima (1953), Marques, Moreira e Marques (1997) e Hastir & Gaspar (2002). As fêmeas de buprestídeos depositam massas de ovos entre as rachaduras da casca, na região do colo de suas plantas hospedeiras (Garcia, 1998).

Em laboratório, foi possível confirmar que se tratava da fase imatura de inseto pertencente à família Buprestidae. As larvas de buprestídeos têm aspecto característico, apresentando morfologia externa que se assemelha a uma palmatória (Figura 2B). São ápodas ou providas de pernas extremamente pequenas, cabeça relativamente diminuta e



Figura 1. Aspecto de cupuaçuzeiro infestado por coleóptero xilófago, em Nova Califórnia, RO. (Crédito da foto: Amauri Siviero).



Figura 2. (A) Larva de Buprestidae no interior de secção longitudinal de caule de cupuaçuzeiro, com várias galerias evidentes. (B) Aspecto morfológico externo de larva de buprestídeo em detalhe (Crédito das fotos: Amauri Siviero).

parcialmente introduzida no protórax, o qual é consideravelmente alargado, achatado e com placas fortemente esclerosadas em ambas as faces. O abdome é alongado e subcilíndrico com metâmeros perfeitamente destacados. A larva da maioria das

espécies de buprestídeos são lignívoras (xilófagas), sendo coleobrocas caulinares e muitas delas de grande importância econômica (Costa Lima, 1953).

A família Buprestidae compreende coleópteros de tamanho variado, variando de até oito centímetros de



Figura 3. (A) Acomodação de tecido tipo "voil" no colo de cupuaçuzeiro atacado por buprestídeo. (B) Aspecto da armadilha após instalação. (Crédito das fotos: Amauri Siviero).

comprimento para *Euchroma gigantea* (L.), até poucos milímetros de comprimento, para espécies minadoras de folhas (Costa Lima, 1953). Segundo Iannuzzi, Maia e Vasconcelos (2006), a família Buprestidae é geralmente negligenciada em levantamentos faunísticos, embora possua representantes reconhecidamente considerados importantes pragas agrícolas.

Buprestídeos são besouros que apresentam a cabeça unida ao pronoto, antenas com onze artículos curtos, sendo o segundo o mais curto. O tórax geralmente é mais largo que longo, muito próximo aos élitros, formando um só bloco. Quanto ao dimorfismo sexual, varia de acordo com a espécie, mas está frequentemente relacionada à morfologia do último segmento abdominal (Hastir & Gaspar, 2002).

Esses coleópteros são comumente encontrados associados a espécies arbóreas e frutíferas e, cujo estágio larval abre galerias nos troncos das plantas hospedeiras, podendo atingir o status de praga em decorrência da sua alta capacidade reprodutiva e voracidade das larvas (Vichiato et al., 2014). Espécies da família Buprestidae já foram relatados infestando, por exemplo: figueiras [*Ficus carica* L., *Ficus doliaria* (Miq.) Mart. e *Ficus salzmanniana* (Miq.) Miq., Moraceae], abieiro [*Pouteria caimito* (Ruiz e Pav.) Radlk., Sapotaceae], camboatá [*Guarea trichilioides* L., Meliaceae], goiabeira [*Psidium*

guajava L., Myrtaceae], cajueiro [*Anacardium occidentale* L., Anacardiaceae], vinhático [*Plathymenia reticulata* Benth., Fabaceae], eucalipto [*Eucalyptus* spp., Myrtaceae] e munguba [*Pachira aquatica* Aubl., Bobacaceae] (Costa Lima, 1953; Berti Filho, 1981; Garcia, 1998; Gallo et al., 2002; Vichiato et al., 2014).

Segundo Garcia (1998), o ataque de buprestídeos é denunciado pelo desfolhamento da copa e pelo aspecto amarelado das folhas das plantas atacadas. Esses sintomas foram observados nas plantas de cupuaçuzeiro infestadas em Nova Califórnia, RO. Isto se dá pela perturbação ou destruição da integridade funcional do câmbio, responsável pela formação do xilema e floema (Barbosa & Wagner, 1989). Algumas espécies preferem a região do floema durante todo o período de seu desenvolvimento, bloqueando transversalmente o fuste entre a casca e a madeira. Atacam em grupo e, se forem suficientemente numerosos, podem matar árvores grandes durante uma geração (Marques, Moreira e Marques, 1997). Embora o número total de cupuaçuzeiros atacados não tenha sido contabilizado em toda a área de plantio, das seis plantas com sintomas de ataque, duas haviam morrido em virtude da infestação do inseto, demonstrando alta capacidade nociva desse inseto à cultura.

As armadilhas ficaram em campo por 30 dias e não capturaram nenhum coleóptero adulto, sugerindo

algumas hipóteses: 1. instalação tardia (após o ciclo biológico do inseto ter se completado), 2. insetos adultos conseguiram escapar da armadilha ou 3. tempo reduzido da armadilha em campo. Segundo Bondar (1922), para a maioria das espécies de buprestídeos a fase larval pode durar dois anos ou mais. Dessa forma, não foi possível a identificação em nível específico da espécie de buprestídeo associada ao cupuaçuzeiro em Nova Califórnia.

Buprestídeos já foram relatados associados ao cultivo de *T. grandiflorum* nos municípios de Humaitá, AM (Oliveira et al., 2018), Manaus, AM (Barbosa e Fonseca, 2002) e, em SAF contendo cupuaçuzeiro, em Mazagão, AP (Silva et al., 2010). Entretanto, em nenhuma dessas literaturas mencionadas os espécimes capturados foram identificados em nível de gênero e/ou, espécie, impedindo conhecer qual(is) espécie(s) de Buprestidae está(ão) associada(s) ao cultivo do cupuaçuzeiro no Brasil, sua distribuição geográfica, sazonalidade de ocorrência, bem como mencioná-la(s) no rol das pragas de importância econômica dessa cultura no país.

Não há nenhum produto fitossanitário registrado junto ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Mapa) para o controle de buprestídeos em cupuaçuzeiro, tampouco registros de inimigos naturais atuando como agentes de controle biológico desses coleópteros no Brasil. Contudo, alguns métodos de controle contra buprestídeos são preconizados na literatura, tais como cortar e descascar as plantas infestadas, antes que os adultos possam sair de suas câmaras pupais (Silva e Almeida, 1941), cair os troncos (Costa Lima, 1953) e a catação manual de insetos adultos (De Nadai, Anjos e Cordeiro, 2004).

Na vanguarda de métodos de controle, contra o ataque de insetos fitófagos e coleobrocas em essências florestais, estão as injeções de produtos fitossanitários diretamente no tronco de plantas infestadas, administradas com uso equipamento especial (e.g. injetor direto modelo ArborSystem SW100®). Esse método tem como principais vantagens: dano reduzido às plantas, ser eficiente e de longa duração (de dois a quatro anos por aplicação) e proporcionar maior segurança ambiental (o inseticida fica contido no interior da planta) (Gill et al., 1999; Smitley, Docola & Cox, 2010). Todavia, embora seja um método de controle promissor para espécies florestais, são

necessários estudos em espécies frutíferas, a fim de determinar se os frutos poderão conter resíduos do produto aplicado e qual o período de carência.

Pela expressão socioeconômica que o cupuaçuzeiro representa para a região Amazônica e, pelos danos causados pelo ataque de buprestídeos nessa malvacea, esforços de pesquisa devem ser envidados a fim de se identificar a(s) espécie(s) de Buprestidae associada(s) a esta cultura no Brasil, a sazonalidade de ataque desses coleópteros em regiões produtoras, a prospecção de inimigos naturais associados e, principalmente, métodos de controle eficientes e ecologicamente sustentáveis, a fim de mitigar os ataques desses insetos em plantios comerciais dessa fruteira no país.

Conclusões

Faz-se o primeiro registro de buprestídeo infestando plantação comercial de *Theobroma grandiflorum* no estado de Rondônia.

Buprestídeos podem causar mortalidade de plantas adultas e, conseqüentemente, alto impacto econômico à produção.

Literatura Citada

- ARAÚJO, A. C. et al. 2007. A cultura do cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum*) como alternativa de diversificação da região produtora de cacau da Bahia: um estudo de viabilidade financeira. In: Congresso da Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural, 45. Londrina, PR. Anais... Londrina, SOBER.
- BARBOSA, M. G. V.; FONSECA, C. R. V. 2002. Coleopteroфаuna visitante de *Theobroma grandiflorum* Schum. (Sterculiaceae) de uma plantação nos arredores de Manaus, Amazonas, Brasil. Acta Amazonica (Brasil) 32(1):83-100.
- BARBOSA, P.; WAGNER, M. R. 1989. Introduction to forest and shade tree insects. San Diego, Academic Press. 639p.
- BERTI FILHO, E. 1981. Insetos associados a plantações de espécies do gênero *Eucalyptus* nos Estados da Bahia, Espírito Santo, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais e São Paulo. Tese. Universidade de São

- Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, SP. 176p.
- BONDAR, G. 1922. Notas biológicas sobre alguns buprestídeos brasileiros do gênero *Colobogaster*. Revista do Museu Paulista (Brasil) 13:1267-1276.
- COSTA LIMA, A. M. da. 1953. Insetos do Brasil: Coleópteros – 2ª Parte. 8º Tomo. Rio de Janeiro, RJ, Escola Nacional de Agronomia, Série Didática, 10. 323p.
- DE NADAI, J.; ANJOS, N.; CORDEIRO, G. 2004. Catação manual no controle populacional de buprestídeos In: Simpósio de Iniciação Científica (SIC), 14; Mostra Científica da Pós-Graduação, 4; Simpósio de Extensão Universitária, 2. Viçosa, MG. Anais... Viçosa, UFV. pp.73.
- GALLO, D. et al. 2002. Entomologia agrícola. Piracicaba: FEALQ. 920p.
- GARCIA, A. H. 1998. Aspectos sobre a biologia de *Euchroma gigantea* (L., 1758) (Coleoptera – Buprestidae) em *Paqira aquatica* Aublet (Bombacaceae). Anais das Escolas de Agronomia e de Veterinária (Brasil) 28(1):69-73.
- GILL, S.; JEFFERSON, D. K.; REESER, R. M.; RAUPP, M. J. 1999. Use of soil and trunk injection of systemic insecticides to control lace bug on hawthorn. Journal of Arboriculture 25(1):38-42.
- HASTIR, P.; GASPAR, C. 2002. Les richards (Coleoptera - Buprestidae) de la faune de Belgique: éthologie, phénologie, classification et systématique. Notesfauniques de Gembloux, 47:3-40.
- IANNUZZI, L.; MAIA, A. C. D.; VASCONCELOS, S. D. 2006. Ocorrência e sazonalidade de coleópteros buprestídeos em uma região de Caatinga nordestina. Biociências (Brasil) 14(2):174-179.
- LIMA-PRIMO, H. E. et al. 2017. Técnicas para o cultivo do cupuaçuzeiro. Brasília, DF, Embrapa. 61p.
- LOPES, J. R. M.; LUZ, E. D. M. N.; BEZERRA, J. L. 1999. Situação atual do cupuaçuzeiro no sul da Bahia. Agrotrópica (Brasil) 11(3):181-186.
- MARQUES, E. J.; MOREIRA, A. F. C.; MARQUES, I. M. R. 1997. Coleópteros das famílias Buprestidae e Cerambycidae causadores de danos em espécies florestais arbóreas. Cadernos Ômega - Série Agronomia 8:71-84.
- OLIVEIRA, E. S. et al. 2018. Levantamento de coleópteros associados à cultura do cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Spreng.) K. Schum.) no município de Humaitá-AM. In: Dal Molin, A. et al. (eds.). Desafios e perspectivas para a Zoologia na América Latina: Congresso Brasileiro de Zoologia, 27, Foz do Iguaçu, PR. Anais... Foz do Iguaçu, SBZ. pp.102.
- ROCHANETO, O. G. et al. 1999. Cupuaçu. In: Principais produtos extrativos da Amazônia e seus coeficientes técnicos. Brasília: IBAMA. pp.24-40.
- SANTOS, R. S. et al. 2020. Infestation of *Magulacra nigripennata* Dognin (Lepidoptera: Cossidae) in a commercial cupuassu plantation in Nova Califórnia, Rondônia state, Brazil. EntomoBrasilis (Brasil) 13:e912.
- SILVA, A. A. G.; ALMEIDA, D. G. 1941. Entomologia florestal. Contribuição ao estudo das coleobrocas. Rio de Janeiro, RJ, Ministério da Agricultura. 100p.
- SILVA, N. M. et al. (eds.). Pragas agrícolas e florestais na Amazônia. Brasília, DF, Embrapa. pp.137-157.
- SILVA, R. A. et al. 2010. Comunidade de insetos em Sistema Agroflorestal de várzea em Mazagão, AP. In: Secretaria de Estado da Ciência e Tecnologia do Amapá. (Org.). Programa Primeiros Projetos/CNPq/SETEC. Macapá, Amapá, SETEC. pp.139-152.
- SMITLEY, D. R.; DOCCOLA, J. J.; COX, D. L. 2010. Multiple-year protection of Ash trees from emerald ash borer with a single trunk injection of emamectin benzoate, and single-year protection with and imidacloprid basal drench. Agriculture & Urban Forestry 36(5):206-211.
- TREVISAN, O. 1998. Dinâmica populacional de *Monalonion annulipes* Signoret, 1858 (Hemiptera: Miridae) em cacauzeiros em Ariquemes, RO. Tese Doutorado. Piracicaba, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo. 60p.
- VENTURIERI, G. A.; ALVES, M. L. B.; NOGUEIRA, M. Q. 1985. O Cultivo do cupuaçuzeiro. Campinas, PR, Informativo SBF. pp.15-17.
- VICHIATO, M. R. M. et al. 2014. Ocorrência de *Euchroma gigantea* (Coleoptera: Buprestidae) em Belo Horizonte, MG. Tecnologia & Ciência Agropecuária (Brasil) 8(5):7-11. ●

POLÍTICA EDITORIAL

A Revista Agrotrópica foi criada em 1971, sendo originalmente conhecida como Revista Theobroma. Por ter um caráter interdisciplinar, constitui-se num veículo para comunicação científica em várias áreas como: Biodiversidade, Ciências Agrárias, Ambientais, Veterinária, Zootecnia, Tecnologia de Alimentos, Geografia, Geociências, Socioeconomia, etc. A revista é publicada quadrimestralmente e está destinada a divulgação de trabalhos originais que têm contribuição real para o desenvolvimento agroecológico, ambiental e socioeconômico das Regiões Tropicais Úmidas.

A Revista Agrotrópica publica não apenas artigos científicos, como também notas científicas, revisões bibliográficas relevantes e de natureza crítica, todos em três idiomas: Português, Inglês e Espanhol. Publica também cartas endereçadas ao Editor sobre trabalhos publicados.

Os Autores são os responsáveis exclusivos pelo conteúdo do trabalho, todavia, o Editor, com a assessoria científica do Conselho Editorial da Revista, reserva-se o direito de sugerir ou solicitar modificações que considerarem necessárias.

Editor Chefe

EDITORIAL POLICY

The Agrotrópica Journal was created in 1971, being formerly known as Theobroma Journal. As having an interdisciplinary character, it constitutes in a vehicle for scientific communication in various areas as: Biodiversity, Agricultural Sciences, Environmental Science, Veterinary, Animal Science, Food Technology, Geography, Geosciences, Socioeconomics, etc. The journal is published every four months and is destined to dissemination of original scientific works that have real contributions to the development agroecological, environmental and socioeconomic of the tropical rain regions.

The Agrotrópica Journal publishes not only scientific papers, but also scientific notes, relevant bibliographical reviews and of critical nature, all in three idioms: Portuguese, English and Spanish. It also publishes letters to the editor about published works.

The authors are solely responsible for the content of the work, however, the Editor, with the scientific accessory of the Editorial Board, reserves the right of suggesting or requesting the changes that seem to be necessary.

Editor-in-Chief



**MINISTÉRIO DA
AGRICULTURA, PECUÁRIA
E ABASTECIMENTO**



**PÁTRIA AMADA
BRASIL**
GOVERNO FEDERAL