

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**FACULDADE DE AGRONOMIA**  
**AGR99006 - DEFESA DE TRABALHO DE CONCLUSÃO**

**TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**

**EZEQUIEL FIGUEIREDO DAWUD**

**0022085**

**DIAGNÓSTICO FITOSSANITÁRIO DE AMOSTRAS VEGETAIS IMPORTADAS**  
**NA EMPRESA AGRONÔMICA**

**PORTO ALEGRE, Maio de 2022.**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**

**FACULDADE DE AGRONOMIA**

**AGR99006 - DEFESA DE TRABALHO DE CONCLUSÃO**

**EZEQUIEL FIGUEIREDO DAWUD**

**0022085**

**DIAGNÓSTICO FITOSSANITÁRIO DE AMOSTRAS VEGETAIS IMPORTADAS  
NA EMPRESA AGRONÔMICA**

Supervisor de campo do Estágio: Biól. M.Sc Marisa Dalbosco

Orientador Acadêmico do Estágio: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Eng. Agr. Magnólia Aparecida Silva da Silva

**COMISSÃO DE AVALIAÇÃO**

Prof. Sergio Tomasini	Depto de Horticultura e Silvicultura (Coordenador)
Prof(a) Maitê de Moraes Vieira	Depto de Zootecnia
Prof. José Antônio Martinelli	Depto de Fitossanidade
Prof. Clesio Gianello	Depto de Solos
Prof. Pedro Selbach	Depto de Solos
Prof(a) Renata Pereira da Cruz	Depto de Plantas de Lavoura
Prof. Roberto Luis Weiler	Depto de Plantas Forrageiras e Agrometeorologia

PORTO ALEGRE, Maio de 2022.

## **AGRADECIMENTOS**

Antes de tudo devo pleno agradecimento ao EJA (Educação de Jovens e Adultos) pela possibilitação de conclusão do ensino médio, ao ENEM (O Exame Nacional do Ensino Médio) e SISU (Sistema de Seleção Unificada) por possibilitar o ingresso ao ensino superior de qualidade, em um país em que somente 17,4% da população com 25 anos ou mais têm formação superior concluída (UFMG, 2020), a UFRGS pela excelência no ensino e o Prae (Pró-Reitoria de Assuntos Estudantis) pelos auxílios prestados durante o período de graduação, que foram sem dúvida um marco para que eu chegasse até este momento.

A minha companheira de vida, Élis Heloisa de Oliveira Alves pelo apoio e paciência frente a tantos percalços que enfrentamos durante este período de graduação de ambos.

Aos meu colegas João Jaci Medeiros Junior, Henri Neis Gaiz, Marccone Balbuena Rebelo e Brandon Simon, pela parceria e apoio incondicional.

A minha orientadora e professora Magnólia Silva pela perspicácia em me ajudar na procura pelo estágio e pelos ensinamentos.

Aos professores excepcionais que eu pude ter o privilégio de conhecer Josué Sant'Ana, Luiza Redaelli, Simone M. Jahnke e Sergio L. V. Tomasini.

Por fim a minha excelentíssima mãe, Selma Catarina de Figueiredo, que apesar de tantos desafios, no âmbito de mãe solo, conseguiu criar e educar seus oito filhos, e até o presente momento três chegaram a concluir o ensino superior, verdadeiro sinônimo de guerreira, muito obrigado mãe.

## RESUMO

O trabalho de conclusão de curso foi baseado no estágio curricular obrigatório executado de 05/07/2021 a 13/09/2021 no laboratório Agronômica, empresa voltada ao diagnóstico fitossanitário, localizada em Porto Alegre, RS. Este trabalho tem como objetivo, relatar o acompanhamento das atividades da equipe da empresa, descrevendo a rotina para a análise de materiais de origem vegetal, observando as técnicas e métodos aplicados no diagnóstico de pragas. As principais atividades desenvolvidas dentro do processo de diagnóstico fitossanitário foram: de análise visual, averiguação das principais pragas, identificação e isolamento em diversas formas. Além disso, a partir de revisão bibliográfica o trabalho discutiu a importância da identificação de pragas, através de diagnóstico fitossanitário, para propagação e a introdução de pragas e detalhamento dos trâmites das barreiras fitossanitárias brasileiras. Assim, ao final conclui-se que as experiências e conhecimentos adquiridos durante o período de estágio consolidaram e possibilitaram o aprofundamento das várias áreas da formação agronômica no curso de Agronomia da UFRGS, envolvendo o reconhecimento da importância das barreiras fitossanitárias e da atuação de engenheiros agrônomos na área de diagnóstico laboratorial em empresas públicas e privadas, bem como a atuação na fiscalização agropecuária.

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Pág.</b>
Figura 1 - Fluxograma simplificado da trajetória de uma amostra no laboratório Agronômica. Porto Alegre, 2021.	<b>14</b>
Figura 2 - Imagem de pragas quarentenárias interceptadas no estágio: inseto adulto, ausente no território brasileiro, <i>Stegobium paniceum</i> (A) e, <i>Amaranthus palmeri</i> (B) presente. Agronômica. Porto Alegre, 2021.	<b>16</b>
Figura 3 - Análise visual de grãos em lupa de mesa (A), inspeção com microscópio estereoscópico de frutos de manga (B) e de resíduos de uva resultantes do peneiramento (C). Agronômica. Porto Alegre, 2021.	<b>17</b>
Figura 4 – Recipiente contendo solo submerso em água no Métodos Jenkins (A), liquidificador com material triturado no método Coolen & D’Herde (B) e inspeção em câmara de Peters (C). Agronômica. Porto Alegre, 2021.	<b>18</b>
Figura 5 – Placa de petri com colônia isolada de bactérias (A). Métodos de identificação de bactérias : complementar com inoculação de uma colônia isolada em um pedaço de tubérculo de batata (B), biológico com infiltração de uma solução em folha de tabaco (C) e bioquímicos: teste de KOH (D), oxidase (E) e catalase (F). Agronômica. Porto Alegre, 2021.	<b>19</b>
Figura 6 - Maceração de subamostra com pistilo (A), prensa hidráulica (B) e pistilo e gral com nitrogênio líquido (C). Agronômica. Porto Alegre, 2021.	<b>21</b>
Figura 7. Gel com amplificação de RT -PCR com resultados positivos para Tospovirus em solanáceas (A) e RT-qPCR para <i>Cucumber mosaic vírus</i> . Agronômica. Porto Alegre, 2021.	<b>23</b>
Figura 8 – Teste Blotter test para detecção de fungos patogênicos, com montagem do teste em caixa gerbox com sementes de milho (A), caixas gerbox em câmara de crescimento (B) e sementes de milho apresentando fungo após sete dias a 20±2°C (C). Agronômica. Porto Alegre, 2021.	<b>24</b>
Figura 9 - Copos com sementes de milho submersas em água deionizada (A), sementes passando pela mesa agitadora (B) material líquido resultante do processo de agitação (C), centrifugação do líquido vertido (D), adição de corante azul de Amann (E), deposição de duas gotas em lâmina (F) e avaliação em microscópio óptico (10-100x) (G). Agronômica. Porto Alegre, 2021.	<b>25</b>
Figura 10 - Metodologia de iscas de tecidos vegetais em: iscas de maçã vermelha (A), folhas de braquiária (B), rodela de cenoura (C) e brotos de rabanete (D). Agronômica. Porto Alegre, 2021.	<b>26</b>

Figura 11 - Homogeneização em quarteador (A), deposição em papel filtro (B), sementes distribuídas dentro dos rolos (C), sementes após 5 dias em germinador (E) e primeira contagem da análise de germinação (F). Agronômica. Porto Alegre, 2021. **28**

Figura 12 - Alguns materiais utilizados para o teste de envelhecimento acelerado (A), sementes de *Sorghum bicolor* em caixa gerbox (B) e acondicionamento em germinador por 48 horas a 41 °C (C). Agronômica. Porto Alegre, 2021. **28**

Figura 13 - Meios de cultivo prontos para serem autoclavados (A), autoclave em funcionamento (B). Agronômica. Porto Alegre, 2021. **29**

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>8</b>
<b>2. CARACTERIZAÇÃO DA INSTITUIÇÃO DE REALIZAÇÃO DO TRABALHO</b>	<b>9</b>
<b>3. REFERENCIAL TEÓRICO</b>	<b>9</b>
3.1 Barreiras fitossanitárias	10
3.2 Efeitos de pragas quarentenárias relatadas no Brasil	12
<b>4. ATIVIDADES REALIZADAS</b>	<b>13</b>
4.1 Fluxograma das amostras	14
4.2 Triagem	15
4.3 Nematologia	17
4.4 Bacteriologia	18
4.5 Biologia molecular/Virologia	21
4.6 Micologia	23
4.7 Qualidade de sementes	27
4.8 Preparo de materiais	29
<b>5. DISCUSSÃO</b>	<b>29</b>
<b>6. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	<b>32</b>
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>34</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Uma boa parte dos produtos agropecuários consumidos no Brasil é advindo da importação de outro país e, antes de chegar ao consumidor, tais produtos devem passar por diversas análises, com objetivo de comprovar sua sanidade e impedir a entrada de pragas. No caso de produtos vegetais, estes devem passar obrigatoriamente por diferentes processos analíticos, caracterizados como diagnóstico fitossanitário.

Estas análises são realizadas em laboratórios credenciados que auxiliam o MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento) na tomada de decisão, a partir de emissões de laudos de análises fitossanitárias, sendo tais procedimentos relevantes no impedimento de entrada de inúmeras pragas ainda não identificadas em território brasileiro.

O Agronômica - Laboratório de Diagnóstico Fitossanitário e Consultoria faz parte dos estabelecimentos oficiais e credenciados, que integram a rede nacional de laboratórios agropecuários do Mapa, e assim, possui a confiabilidade para realizar análises e emitir laudos fitossanitários.

O laboratório está localizado na avenida Ipiranga nº 7464/conjunto 1202 em Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil, local onde foi realizado o estágio entre os dias 05/07/2021 e 13/09/2021 com duração de 300 horas no total, sob supervisão da Biól. M.Sc Marisa Dalbosco .

O estágio teve como objetivo principal, possibilitar o aprendizado de técnicas e métodos utilizados para análises de diferentes amostras vegetais com o intuito de averiguar a presença de pragas quarentenárias.

As principais atividades que puderam ser desenvolvidas dentro do processo de diagnóstico fitossanitário foram de análise visual, averiguação das principais pragas, identificação e isolamento em diversas formas.

## **2. CARACTERIZAÇÃO DA INSTITUIÇÃO DE REALIZAÇÃO DO TRABALHO**

O estágio foi realizado na empresa Agronômica - Laboratório de Diagnóstico Fitossanitário e Consultoria, e teve como principal atividade o diagnóstico fitossanitário. Fundada em 2006 pelos Engenheiros Agrônomos Patrícia Teló e Valmir Duarte, a empresa teve como endereço inicial de sua sede a rua Ibanez André Pithan Souza, Porto Alegre, mas com o passar dos anos o laboratório cresceu e, em 2014 mudou-se para um ambiente que comportou sua expansão, localizado atualmente na Av. Ipiranga. A empresa já em 2018 ampliou suas atividades para uma filial em Foz do Iguaçu, Paraná.

O laboratório é credenciado pelo MAPA para análises de diagnóstico fitossanitário e de produtos de controle biológico para uso agrônomo. Acreditado pelo INMETRO com a ISO 17025, tem registro no Sipeagro (sistema integrado de produtos e estabelecimentos agropecuários) para análises em inoculantes N° RS-00159 e substratos, com também o registro Renasem RS-04435/2016 e 04436/2016 para análise de mudas e sementes (registro nacional de sementes e mudas). O laboratório também é certificado para realizar análises de batatas sementes (parâmetros de qualidade e sanidade), com inscrição/credenciamento n° RS-0687/2021 – LASO (Laboratório Oficial de Análise de Sementes).

A partir deste escopo citado acima, o laboratório tem a confiabilidade do MAPA para analisar amostras enviadas por fiscais federais agropecuários que cumprem a legislação de defesa sanitária vegetal, amostrando as cargas, e enviando para o laboratório com consentimento do importador ou exportador.

## **3. REFERENCIAL TEÓRICO**

O referencial teórico abordará como o Brasil procede em suas fronteiras para impedir que pragas adentrem em nosso território, conjuntamente com um breve relato histórico, de pragas importantes que causaram grandes impactos negativos para diversas culturas em diferentes épocas.

### 3.1 Barreiras fitossanitárias

Estima-se que no Brasil, cerca de 80% dos alimentos (espécies) consumidos têm origem exótica (EMBRAPA, 2021), assim sendo o Brasil desenvolveu ao longo de décadas um conjunto de legislações e acordos internacionais para o trânsito de plantas e produtos de origem vegetal, como exemplo a Comissão de Medidas Fitossanitárias (CMF), que se baseia na Convenção Internacional para Proteção dos Vegetais (CIPV), onde o Brasil é um dos signatários desde 1929 (FAO, 2022).

A CMF tem como objetivo impedir a propagação e a introdução de pragas, assim como promover medidas apropriadas para controlá-las. Além disso, também se encarrega de aprovar as Normas Internacionais de Medidas Fitossanitárias (NIMF's) que disponibiliza padrões, diretrizes e recomendações para a harmonização internacional das medidas fitossanitárias, a fim de facilitar o comércio e evitar barreiras injustificadas (FAO, 2006). Estabelecendo assim, regras para garantia da qualidade, segurança e conformidade desses produtos, bem como a avaliação do risco de disseminação de pragas que possam trazer danos aos cultivos em território brasileiro (BRASIL, 2017c).

O órgão público brasileiro que padroniza, classifica e determina os alimentos de origem vegetal, independente de seu fim é o MAPA, sendo o DIPOV (Departamento de Inspeção de Origem Vegetal) o responsável por classificar e certificar os produtos importados (BRASIL, 2017a).

Ainda no MAPA temos a Secretaria de Defesa Agropecuária (SDA) que é responsável pela regulamentação, implementação e execução de diversos sistemas, fundamentais para reduzir os riscos de introdução de pragas no Brasil. Já o VIGIAGRO (Vigilância Agropecuária Internacional), outro órgão do MAPA, controla qualquer local onde porventura possa ocorrer a entrada, a saída, o trânsito, a movimentação ou o depósito de produtos de interesse agropecuário, procedentes ou destinados ao exterior, atuando para prevenção e mitigação de riscos ao país, em especial à produção agropecuária e à saúde da população (BRASIL, 2017b; BRASIL, 2017c; BRASIL, 2022;).

Os produtos importados pelo Brasil devem seguir os padrões oficiais determinados por legislações específicas. Atualmente, mais de 80 tipos de alimentos e produtos vegetais estão classificados a partir de exigências de mercado ou por determinação do MAPA (BRASIL, 2017a).

Para a importação de produtos de origem vegetal, este tem que estar listado dentre as espécies vegetais, suas partes, produtos e subprodutos, na Lista de Produtos de Importação Autorizada (PVIA). No caso de o produto não constar na referida lista, será necessária solicitação ao Departamento de Sanidade Vegetal por meio de Análise de Risco de Pragas - ARP (BRASIL, 2017a; BRASIL, 2017b).

Ao chegar no território nacional, nos portos, aeroportos e postos de fronteira, o produto de origem vegetal deve passar por um posto da VIGIAGRO, para que o auditor fiscal agropecuário possa verificar a documentação, a permissão de importação, a origem e a existência de pragas de restrição que exigem análises laboratoriais. Após esta verificação é realizada a inspeção física e amostragem, para certificar o padrão de identidade e qualidade estabelecido pelo MAPA. A partir desta verificação o produto é amostrado e enviado para análise em laboratório oficial de análise, obedecidos os métodos e procedimentos estabelecidos, visando à comprovação de que estão dentro dos padrões de identidade e qualidade (BRASIL, 2017b; BRASIL, 2017c; BRASIL, 2019).

A amostragem é realizada pelo auditor fiscal federal agropecuário, procedendo com a coleta, obtendo amostra representativa, que é devidamente acondicionada, identificada e encaminhada para análise laboratorial, em um dos estabelecimentos oficiais e credenciados que integrem a rede nacional de laboratórios agropecuários do MAPA (BRASIL, 2017c).

O MAPA conta com nove laboratórios credenciados para diagnóstico fitossanitário, sendo Instituto Mineiro de Agropecuária (MG), Centro de Indexação de Vírus de MG (MG), Centro de Diagnóstico “Marcos Enrietii” (PR), Intecso (PR), Laboratório de Diagnóstico Fitossanitário – UFRRJ (RJ), Agrônoma - Laboratório de Diagnóstico Fitossanitário e Consultoria (RS), UNISC – Central Analítica (RS), Clínica Fitopatológica – Instituto Agrônomo (SP) e Instituto Biológico de São Paulo

(SP). Cada laboratório conta com um escopo de trabalho que pode ser completo, para todos os grupos de pragas (ácaro, inseto, semente de invasora, bactéria, fungo, vírus e nematoides) ou somente de algum(ns) grupo(s). No momento, dois laboratórios têm credenciamento para a realização de análises para todos os grupos de pragas, sendo a Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro - UFRRJ e Agrônômica (BRASIL, 2017d).

As análises realizadas nos laboratórios buscam avaliar se há presença de pragas quarentenárias que podem ser ausentes, ou seja, espécies que possuem potencial de causar danos ecológicos e econômicos e que ainda não foram relatadas em nosso país, ou, quando presentes, não se encontrem amplamente distribuídas, estando sob controle oficial (EMBRAPA, 2021).

Por essa razão, essas pragas são objeto de controle oficial, seja no emprego de medidas voltadas à prevenção de entrada no país, ou caso presente em dada área, na forma de medidas fitossanitárias para viabilizar a erradicação e controle para evitar sua dispersão. Estas pragas podem ser insetos, ácaros, nematoides, fungos, bactérias, fitoplasmas, vírus, viroides, plantas infestantes e parasitas (EMBRAPA, 2021; MARTINS, 2021).

### **3.2 Efeitos de pragas quarentenárias relatadas no Brasil**

As informações referentes a pragas introduzidas no território nacional são foco de levantamentos desde o início do século XX. Até meados da década de 1960, o número de intercepções de pragas era de em média uma por ano, sendo que após este período os relatos de intercepções foram ampliados de duas ao ano até a década de 1990 e após este período de quatro ao ano. Este incremento no número de pragas introduzidas em nosso território deveu-se ao aumento da área cultivada e o intenso investimento no agronegócio, movido pelas grandes transições entre países de pessoas e *commodities* agrícolas (EMBRAPA, 2021).

Dentre os insetos introduzidos no Brasil o bicudo do algodoeiro (*Anthonomus grandis*) em 1983, de origem Mexicana, foi um dos que mais causaram impacto na produção de algodão, pois induz a queda de botões florais, destruindo maçãs (frutos

do algodoeiro) e impedindo a formação de capulhos. Dentre os fatores de sucesso no estabelecimento desta praga destaca-se: sua alta taxa de disseminação, ausência de inimigos naturais e a dificuldade de controle, principalmente pelos pequenos agricultores, causando perdas de até 70% da produção (LEITE & CERQUEIRA, 2017).

Uma outra doença que ainda causa muitos danos é Huanglongbing ou *greening* (*Candidatus Liberibacter* spp.) de origem asiática. Esta doença de ocorrência nas espécies de citros foi identificada pela primeira vez em 2004 no Brasil. Esta bactéria causa queda prematura dos frutos em citros e é transmitida pelo psílideo (*Diaphorina citri*). O controle deste patógeno é realizado pela erradicação das plantas com os sintomas da doença, sendo que os prejuízos anuais podem chegar em torno de R\$ 50 milhões, com possível impacto mais severo por conta das perdas na exportação (GREENING, 2019; FUNDECITRUS, 2021).

Ainda na cultura dos citros, segundo Barbieri, Carvalho e Federizzi (1995), o vírus *Closterovirus*, chamado Citrus tristeza vírus (CTV) e causador da tristeza dos citros, foi devastador para a cultura no Brasil e em toda América Latina. Este vírus foi introduzido a partir da África na década de 1930, tendo sua disseminação rápida devido ao afídeo pulgão-preto-dos-citros (*Toxoptera citricida* Kirkaldy). Sabe-se que até meados do século passado, este vírus produziu o maior dano econômico até hoje registrado na citricultura mundial. Apenas no Brasil, a tristeza aniquilou mais de nove milhões de plantas naquela época (BORDIGNON *et al*, 2003).

A ferrugem-asiática (*Phakopsora pachyrhizi*) foi a doença fúngica introduzida em 2001, que causou danos severos à cultura da soja (*Glycine max*). Esta doença causou perdas de até 70% na produção e ainda segue causando impactos na cultura, sendo responsável por perdas em torno de US\$ 2 bilhões ao ano no cultivo desta *commodity* (EMBRAPA, 2021).

#### **4. ATIVIDADES REALIZADAS**

A organização das atividades do estágio buscou explorar todos os setores da área técnica do laboratório Agrônômica, tendo sido organizado um cronograma, com

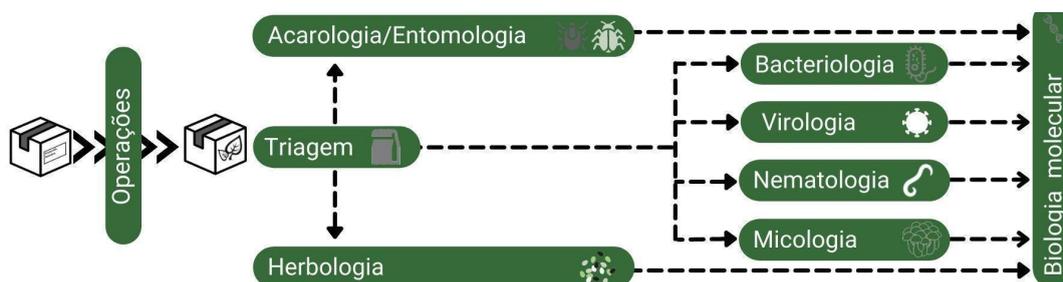
a divisão das atividades em um período de cinco dias em cada um dos sete setores de análises técnicas das amostras recebidas.

Assim sendo, o estágio iniciou-se pelo setor de triagem, e na sequência, os setores de nematologia, bacteriologia, virologia/biologia molecular, micologia, qualidade de sementes e o preparo de materiais, sendo este último responsável por dar apoio a aos outros setores.

#### 4.1 Fluxograma das amostras

O fluxograma seguido pelas amostras é apresentado na Figura 1. Os volumes são recebidos pelo setor de operações, onde é realizada uma conferência documental do material (amostra). Após a verificação é realizado o cadastro da amostra no SGA (Sistema de Gerenciamento do Agrônômica), e a partir deste registro, a amostra fica disponível para o setor de triagem para realização das primeiras análises e posterior divisão da amostra em subamostras para os demais setores solicitados. É possível observar o setor de herbologia, entomologia e acarologia próximo ao setor de triagem. O setor de biologia molecular está separado pois ele recebe amostras de todos os setores, ao passo que as análises via PCR e qPCR requeridos pelos outros setores, são executadas na biologia molecular.

Figura 1 - Fluxograma simplificado da trajetória de uma amostra no laboratório Agrônômica. Porto Alegre, 2021.



Fonte: O autor, 2022.

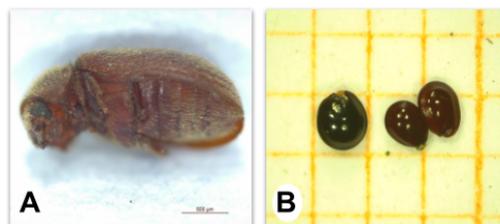
## 4.2 Triagem

As avaliações de produtos oriundos de importação passam obrigatoriamente pela triagem para averiguação da presença de alguma praga ou se há algo diferente do descrito pelo fiscal responsável pelo envio da amostra. Neste setor é normalmente avaliado a presença de sementes/grãos diferentes do informado, partículas de solo, estruturas de fungos (escleródios), insetos e ácaros (vivos/mortos).

As amostras recebidas no laboratório passam por este setor de forma integral, sendo abertas com o máximo cuidado e assepsia, para que possam ser analisadas e separadas em subamostras, sendo uma destas a contraprova, e outras para os demais setores exigidos pela legislação. A outra subamostra irá para averiguação de fungos, bactérias, nematoides, vírus fitoplasmas, nos setores que buscam avaliar a presença ou não das pragas de restrição exigidas, auxiliando o Mapa para a tomada de decisão sobre a entrada ou não do produto em nosso país.

Além de analisar e separar em subamostras, no setor de triagem é realizada a análise de sementes de plantas invasoras, ácaros e insetos, pois fazem parte deste outros três setores: herbologia, acarologia e entomologia. Durante o período de estágio no setor de triagem foi interceptada e indentificada duas pragas consideradas quarentenárias: uma ausente no território nacional, como no caso de *Stegobium paniceum* (FIGURA 2A) (BRASIL, 2018), encontrado em sementes de beterraba advindas da Itália, e outra praga quarentenária, porém já presente segundo a IN 38/2018, denominada *Amaranthus palmeri* (FIGURA 2B) (BRASIL, 2018b), encontrado em sementes de grama-bermuda (*Cynodon dactylon*) importadas dos Estados Unidos.

Figura 2 - Imagem de pragas quarentenárias interceptadas no estágio: inseto adulto, ausente no território brasileiro, *Stegobium paniceum* (A) e, *Amaranthus palmeri* (B) presente. Agronômica. Porto Alegre, 2021.



Fonte: O autor, 2022.

A primeira atividade desenvolvida na triagem foi a análise visual de todos os materiais através de lupa de mesa (8x), sendo os principais: substrato, solo, semente/grão, levedura, açúcar (subproduto), tabaco (folha e talo), algodão (pluma) e saco de juta, entre outros. Este tipo de análise é realizado inicialmente abrindo o material e dispondo-o em uma bandeja de fundo branca, com o auxílio da lupa de mesa onde este é observado, manuseando-o através da passagem, de forma gradual, de um lado a outro da bandeja, com auxílio de uma colher higienizada (FIGURA 3A).

Posteriormente partiu-se para outras análises com o auxílio de microscópio estereoscópio (10-40x), onde dependendo do material foi realizado lavagem e peneiramento com as peneiras em sequência 42 e 325 mesh, para que a coleta do material retido na malha mais fina seja e acondicionado em placa de petri com água.

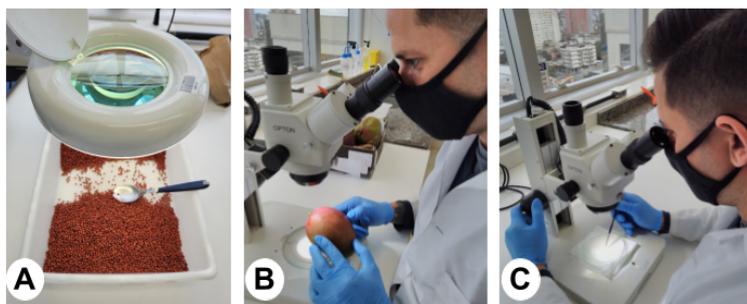
Os principais materiais analisados pelo método de inspeção visual em microscópio estereoscópio são: orquídeas, flores em vaso, mudas de videira, tubérculo de batata, cacau, semente pré germinada de dendezeiro, entre outros (FIGURA 3B), sendo que no caso de materiais importados, como de coqueiro anão, pêssigo, ameixa, dentre outros, estes passam por lavagem.

Os materiais e as placas com os resíduos do peneiramento passam por uma minuciosa inspeção no microscópio estereoscópico (10-40x) (FIGURA 3C), observando se há a presença de algum inseto ou ácaro. Em caso da identificação da presença de uma destas pragas, esta é imediatamente acondicionada em microtubo identificado e adicionado álcool 70%. No caso de o espécime possuir tamanho

diminuto, esta é montada em lâmina em meio de Hoyer, e a seguir identificada e mantida em estufa (50 a 60°C) até que o analista responsável faça a identificação sistemática da praga.

Por fim, todas as atividades desenvolvidas na triagem constituíram de análise minuciosa dos materiais recebidos, sempre retendo parte da amostra homogeneizada para contraprova, separando as demais subamostras devidamente acondicionadas em sua respectiva embalagem, como exemplo saco plástico, saco kraft e copo plástico.

Figura 3 - Análise visual de grãos em lupa de mesa (A), inspeção com microscópio estereoscópico de frutos de manga (B) e de resíduos de uva resultantes do peneiramento (C). Agrônômica. Porto Alegre, 2021.



Fonte: O autor, 2022.

### 4.3 Nematologia

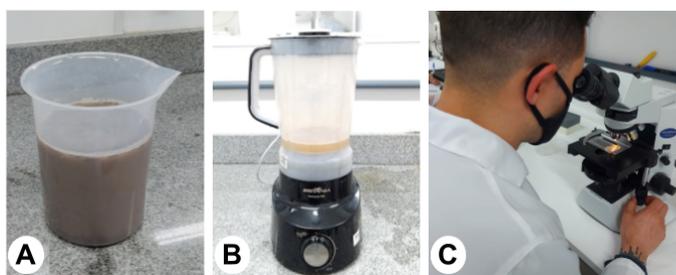
As análises dos materiais neste setor são realizadas pelo analista responsável em placa para contagem câmara de Peters (FIGURA 4C), por meio de microscópio estereoscópico, após isolamento do material que se dá em diversas etapas.

A extração de nematoides pode ser feita por dois métodos. O método de Coolen & D'Herde (FIGURA 4B) é realizado com a trituração do material com água em liquidificador em baixa rotação por 20 segundos. Este método é utilizado para raízes e grãos/sementes. Já o método Jenkins (FIGURA 4A) é utilizado para solos e substratos (100cm<sup>3</sup>), que são submersos em água dentro de jarra graduada (2 L) de polietileno, por 20 segundos.

Após esta etapa, a sequência é igual para ambos os métodos e é realizada

como se segue: peneiramento do conteúdo em duas peneiras 60 e 500 mesh. O material retido na malha mais fina é acondicionado em um tubo falcon, no qual é adicionado  $\pm 1 \text{ cm}^3$  de caulim para posterior centrifugação a 1800 rpm por 5min. Após, é realizado o descarte do líquido sobrenadante. Antes de passar novamente por centrifugação a 1800 rpm por um minuto é adicionado  $\pm 10 \text{ mL}$  de sacarose e homogeneizado. Na última etapa de preparo para a análise o material retido na peneira é acondicionado em um tubo falcon sob refrigeração, para posterior análise em câmara de Peters (FIGURA 4C).

Figura 4 – Recipiente contendo solo submerso em água no Métodos Jenkins (A), (B) liquidificador com material triturado no método Coolen & D'Herde e inspeção em câmara de Peters (C). Agrônômica. Porto Alegre, 2021.

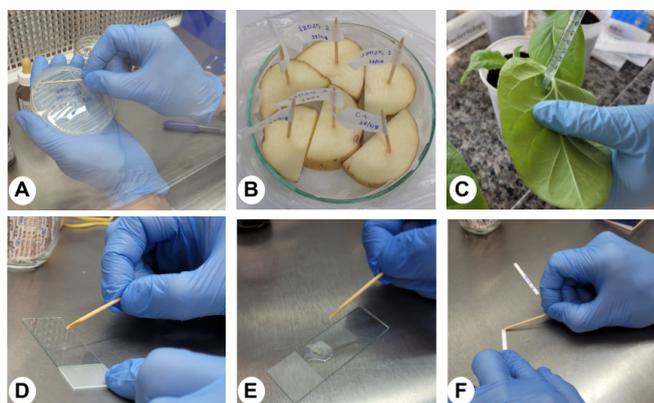


Fonte: O autor, 2022.

#### 4.4 Bacteriologia

Este setor busca averiguar a presença de determinada espécie de bactéria fitopatogênica através do isolamento em meio de cultura através de testes bioquímicos, biológicos e complementares (FIGURA 5). Os métodos usados possibilitam a identificação destes organismos, pois há uma grande variedade de características que definem cada gênero que podem ser visualizadas.

Figura 5 – Placa de petri com colônia isolada de bactérias (A). Métodos de identificação de bactérias : complementar com inoculação de uma colônia isolada em um pedaço de tubérculo de batata (B), biológico com infiltração de uma solução em folha de tabaco (C) e bioquímicos: teste de KOH (D), oxidase (E) e catalase (F). Agrônômica. Porto Alegre, 2021.



Fonte: O autor, 2022.

O isolamento da bactéria para posterior identificação é realizado de maneira rotineira no setor, e se dá através da agitação do material em uma solução salina. Após determinado período é coletado o material suspenso e, com auxílio da alça de repicagem em forma de estrias simples é distribuído em placa de petri contendo um meio de cultura. Este procedimento é realizado dentro de uma câmara de fluxo laminar e com uma lamparina para esterilizar a alça de coleta.

A placa de petri é vedada e acondicionada em estufa com temperatura de 28 ( $\pm 2$  °C) por dois a sete dias. Após o desenvolvimento da colônia isolada no meio (FIGURA 5A), se inicia uma análise visual, avaliando-se a pigmentação, elevação, tamanho, bordos, tipo de consistência e formato da colônia. Após a verificação de colônias típicas da bactéria de interesse são aplicados testes buscando avaliar se as características biológicas da bactéria isolada tem semelhança com as características já conhecidas da bactéria alvo.

Os métodos podem ser separados em bioquímicos, biológicos e complementares. Os testes de catalase, reação de KOH e oxidase, fazem parte dos métodos bioquímicos, sendo estes três normalmente executados conjuntamente em câmara de fluxo laminar. O método de catalase é realizado depositando uma gota de peróxido de hidrogênio em uma lâmina, em seguida com o auxílio de um palito esterilizado é depositado uma parte da colônia suspeita e, caso a reação formar

bolhas em 10 a 15 segundos o resultado é positivo (FIGURA 5E).

O método de reação de KOH busca aferir se a bactéria é GRAM negativa ou positiva, sendo este executado a partir da deposição de uma gota de KOH 3% em uma lâmina, com o auxílio de um palito esterilizado é depositado uma parte da colônia suspeita. Juntamente com este procedimento é realizada uma homogeneização em forma circular por 10 a 15 segundos. Após este período, se a mistura obtida aderir ao palito formando um fio, a bactéria é Gram negativa e se não ficar viscosa é positiva (FIGURA 5D).

O teste de oxidase é realizado retirando parte da colônia depositando-a sobre uma tira de plástico (Laborclin®), que deve estar sobre uma lâmina. Ao depositar parte da colônia sobre a superfície da tira (FIGURA 5E) deve-se esperar o resultado em até dois minutos e, caso apareça uma coloração violeta na ponta da tira, considera-se que é positiva para oxidase.

Para o método biológico é utilizado o teste de reação de hipersensibilidade, onde busca-se avaliar a patogenicidade da bactéria, a partir da inoculação em folha de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.). Para isto é realizada uma suspensão do inóculo que permanece por 18 a 24 h à  $28 \pm 2$  °C em em solução salina (NaCl 0,85 %) ou em tampão fosfato PBS (solução salina em tampão fosfato 0,1 M pH 7,0), seguindo em cultivo até que a suspensão obtida esteja nitidamente turva. Após, com auxílio de uma seringa (1,0 mL) é realizada a infiltração da suspensão bacteriana lentamente na parte abaxial do limbo foliar, próximo a nervura principal, da folha de tabaco (FIGURA 5C). Esta infiltração segue até que a tonalidade fique em um tom de verde mais escuro, consequência do encharcamento dos espaços intercelulares dos tecidos da folha. Após 24 horas é realizada a avaliação do resultado, sendo a reação positiva é interpretado como bactéria fitopatogênica, quando a perda de turgidez é seguida por necrose e dessecação do tecido na região infiltrada.

O teste de podridão mole faz parte do método complementar de avaliação de bactérias, buscando aferir se a mesma tem atividade pectolítica, ou seja, tem a capacidade de produzir substâncias responsáveis pela maceração dos tecidos vegetais e degradação da lamela média das células. Para este teste é utilizado

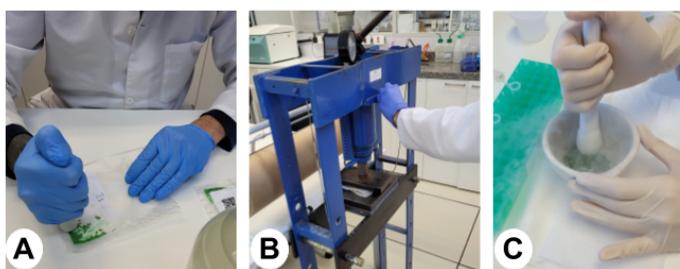
parte da colônia de interesse e uma suspensão da mesma, como descrito para o teste de reação de hipersensibilidade. No método, utiliza-se um palito esterilizado para a inoculação da suspensão em uma fatia de tubérculo higienizado (lavado e flambado) (FIGURA 5B), que fica em câmara úmida por 24 horas em temperatura de entre 25-28 °C. O resultado será positivo se ocorrer o aparecimento de podridão mole que indica reação positiva de atividade pectinolítica.

#### 4.5 Biologia molecular/Virologia

O setor de biologia molecular é responsável por processar amostras destinadas à análise de presença de vírus, além de receber amostras dos outros setores para realizar diferentes análises buscando confirmação de resultado para pragas, visto que as técnicas utilizadas podem validar via controle positivo diferentes agentes fitopatogênicos. A analista do setor de virologia é responsável por elaborar e analisar os procedimentos correspondentes do ensaio para determinar a praga.

O setor de triagem quando solicitado separa uma subamostra do material e o acondiciona em saco tipo extração para a biologia molecular. A primeira etapa executada pelo setor é a de maceração, que pode ser com pistilo (FIGURA 6A), com prensa hidráulica (FIGURA 6B ) ou com pistilo e gral com nitrogênio líquido (FIGURA 6C). Logo após, ao macerado é adicionado  $\pm 2$  mL de solução tampão de PVP (polivinilpirrolidona) com o auxílio de uma pipeta de Pasteur. Uma vez realizada a homogeneização da amostra, a solução é transferida para um microtubo.

Figura 6 - Maceração de subamostra com pistilo (A), prensa hidráulica (B) e pistilo e gral com nitrogênio líquido (C). Agrônômica. Porto Alegre, 2021.



Fonte: o autor, 2022.

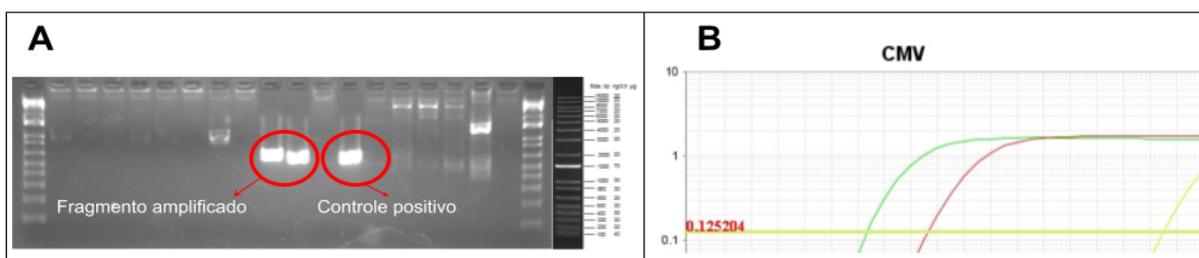
As próximas etapas foram somente observadas. A amostra preparada no microtubo é mantida em câmara de fluxo para proceder com a extração dos ácidos nucleicos (DNA e RNA) e, a partir de mistura destes a várias substâncias constituintes busca-se a replicação do material genético da praga de interesse na termociclagem. Para esta extração são utilizados Kits de extração como Promega®, Qiagen®, dentre outros. Após extração é realizado o preparo em câmara de exaustão da mistura para a reação de PCR nos termocicladores, sendo alguns exemplos dos componentes da mistura: *primers*, reagentes, sondas, enzima RT e água purificada. A mistura é posteriormente transferida para a sala de preparo onde o material é acondicionado em microtubos específicos para serem colocados nos termocicladores.

Foi possível realizar somente o acompanhamento com a analista do setor da seguinte etapa de manuseio da amostra: a verificação da ocorrência ou não da replicação dos ácidos nucleicos da praga alvo. Para ocorrer replicação é necessário passar pela termociclagem, que são ciclos de temperatura que variam com o tempo para desnaturação e anelamento dos primers ao material genético do agente de interesse. Há dois tipos de equipamentos que fazem este tipo de processo: o qPCR/RT-qPCR e PCR/RT-PCR. A diferença entre estes é que o qPCR/RT-qPCR disponibiliza o resultado em tempo real no monitor do equipamento, a partir da detecção ciclo a ciclo, possibilitando reconhecer a intensidade de fluorescência emitida em decorrência da amplificação da sequência de DNA de interesse.

Já no PCR/RT-PCR a amostra passa por três equipamentos até a disponibilização de uma imagem que possibilita que o analista interprete o resultado. O equipamento é um termociclador que faz acontecer a reação a partir de ciclos de temperatura no decorrer do tempo. Em seguida, realiza-se a transferência deste material termociclado para uma cuba de eletroforese com gel de agarose submetido a um campo elétrico que permite a migração ao polo positivo do gel e, por consequência a separação de macromoléculas, como DNA, RNA e proteínas. Para a leitura deste gel é necessário a utilização de um equipamento fotodocumentador que emite uma luz através do gel e assim captando esta imagem para posterior interpretação pelo analista.

No final dos processos foi possível acompanhar a análise dos resultados em RT-PCR para Tospovirus (FIGURA 7A), vírus comum em solanáceas, e o resultado em RT-qPCR para Cucumber mosaic virus (CMV) (FIGURA 7B) vírus com ampla gama de hospedeiros. Em ambas análises o resultado foi positivo.

Figura 7 - Gel com amplificação de RT -PCR com resultados positivos para Tospovirus em solanáceas (A) e RT-qPCR para *Cucumber mosaic vírus*. Agrônômica. Porto Alegre, 2021.



Fonte: O autor, 2022.

#### 4.6 Micologia

Este setor é responsável pela análise de fungos e oomicetos e, para tanto são utilizadas diversas técnicas de extração e análise, que são realizados em diversos tipos de materiais, tais como, solo/substrato/turfa, sementes/grãos, plantas ornamentais, gengibre, arroz. A seguir serão relatados os procedimentos acompanhados durante o estágio em um período de uma semana no setor de micologia.

Dentre os diversos procedimentos utilizados no referido setor, os que foram acompanhados são, Inspeção microscópica, Incubação em papel filtro (*blotter test*), análise da suspensão de lavagem das sementes e iscas em tecidos vegetais. A inspeção microscópica consiste em coletar parte do crescimento fúngico com uma agulha histológica, e depositá-lo sobre uma lâmina onde é adicionado corante azul de Amann buscando facilitar a observação em microscópio óptico (10-100x) das estruturas do fungo, e assim poder caracterizá-lo a nível de gênero e quando possível de espécie.

O *blotter test* é realizado através da deposição de sementes ou grãos sobre um papel filtro umedecido com água deionizada. Todo procedimento é desenvolvido

dentro de caixa gerbox asséptica e identificada (FIGURA 8A) com as quais são realizados diferentes números de repetições dependendo do tipo de cultura, porém o número de 400 sementes por teste não varia. As caixas gerbox montadas são mantidas na câmara de crescimento em prateleiras com iluminação fluorescente por 7 dias sob temperatura de  $20\pm 2^{\circ}\text{C}$  e submetidas a um fotoperíodo de 12/12h (FIGURA 8B). Após este período é realizada a avaliação em microscópio estereoscópico (10-45X), onde são observadas as estruturas que se desenvolveram sobre os grãos/sementes (FIGURA 8C). Quando necessário é realizada a montagem de parte da estrutura em lâmina adicionando corante azul de Amann, para a observação em microscópio óptico (10-100x).

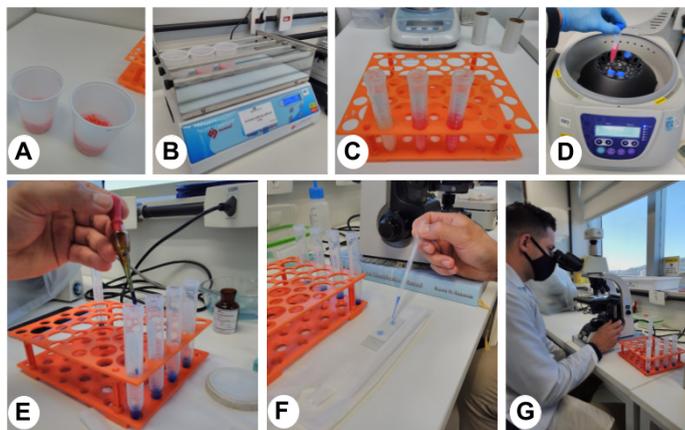
Figura 8 – Teste *Blotter test* para detecção de fungos patogênicos, com montagem do teste em caixa gerbox com sementes de milho (A), caixas gerbox em câmara de crescimento (B) e sementes de milho apresentando fungo após sete dias a  $20\pm 2^{\circ}\text{C}$  (C). Agrônômica. Porto Alegre, 2021.



Fonte: o autor, 2022.

Para a análise da suspensão de lavagem das sementes é necessário vários procedimentos buscando o isolamento das estruturas do fungo em água (Figura 9). De início, para cada amostra, são utilizadas 400 sementes divididas em quatro copos plásticos de 200mL e adicionada água deionizada até cobrir as sementes. Em seguida, os mesmos são submetidos a agitação em mesa agitadora por 10 minutos em 150 a 200 rpm, sendo o material vertido (aproximadamente 8 mL) em tubos de falcon (15 mL) e levados para a centrifugação por 15 min a 3.000 rpm. Para a avaliação dos sedimentos é adicionado uma gota de azul de Amann dentro do tubo falcon sendo posteriormente homogeneizado. Após, com auxílio de uma pipeta de Pasteur, o material é coletado e depositado (duas gotas) em lâmina para a avaliação das estruturas do fungo em microscópio óptico (10-100x).

Figura 9 - Copos com sementes de milho submersas em água deionizada (A), sementes passando pela mesa agitadora (B) material líquido resultante do processo de agitação (C), centrifugação do líquido vertido (D), adição de corante azul de Amann (E), deposição de duas gotas em lâmina (F) e avaliação em microscópio óptico (10-100x) (G). Agrônômica. Porto Alegre, 2021.



Fonte: o autor, 2022.

A metodologia de iscas em tecidos vegetais visa atrair o fungo para uma amostra vegetal contida em cada teste. Este procedimento é aplicado para amostras de solo, substrato e turfa, sendo que são utilizados vários tipos de materiais vegetais, pois devido a certas especificidades de cada gênero é possível realizar tal procedimento, e assim ter uma ferramenta que auxilie o analista nas análises. Dentre os diversos materiais utilizados para isca, no estágio foi possível acompanhar a montagem com uso dos seguintes materiais: frutos de maçã, folhas de braquiária, raízes de cenoura e plântulas de rabanete.

Para isca de maçã é necessário um fruto de maçã vermelha higienizada com álcool 70% e hipoclorito 1% e, com auxílio de uma lâmina são retirados três discos de aproximadamente 2 centímetros de diâmetro da polpa de área descascada onde é introduzido o material vegetal a ser testado. (FIGURA 10A). O fruto então é incubado em um saco plástico com a adição de um pedaço de algodão umedecido e mantidos na câmara de crescimento em prateleiras com iluminação fluorescente por sete dias com temperatura de  $20 \pm 2^\circ\text{C}$  e submetidos a um fotoperíodo de 12/12h. Este procedimento serve para o fungo do gênero *Fusarium* sp. e/ou oomicetos.

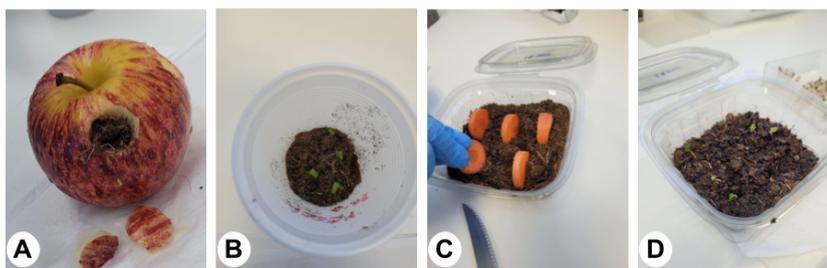
Para as iscas de braquiária são utilizados pequenos pedaços da folha, cerca de 1,0x1,0 cm. Após a separação dos pedaços é realizada a desinfecção destes

com imersão em álcool 70% por 30 segundos, e em seguida em hipoclorito de sódio por 1 minuto. Nessa desinfecção são realizadas três lavagens com água deionizada para proceder com o teste. Após o material a ser testado deve ser armazenado em copo descartável de 200mL e adicionado três partes de água para cada parte do material. Em seguida são adicionados 10 pedaços de folha ao copo e homogeneizado (FIGURA 10B) que é vedado com parafilme e mantidos na câmara de crescimento em prateleiras com iluminação fluorescente por sete dias com temperatura de  $20 \pm 2^\circ\text{C}$  e fotoperíodo de 12/12h. Este método é utilizado para a captura de esporângios de *Phytophthora*, *Pythium* e *Phytophthium*.

Para as iscas de cenoura são dispostas seis fatias com aproximadamente 0,5 cm de espessura sobre o substrato/solo/turfa umedecido com água deionizada, dentro de um recipiente do tipo Galvanotek® (FIGURA 10C). Após são incubadas até sete dias a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  com fotoperíodo de 12h/12h. O patógeno alvo deste tipo de isca é principalmente do gênero *Fusarium* sp.

Nas iscas de rabanete (*Raphanus sativus* L.) são utilizadas seis plântulas recentemente germinadas inserindo-as levemente dentro do substrato/solo/turfa umedecido com água deionizada, dentro de um recipiente do tipo Galvanotek® (FIGURA 9D). Após são incubadas por até sete dias a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  com fotoperíodo de 12h/12h. Se presente na amostra será possível observar o formato das hifas características de *Rhizoctonia solani*.

Figura 10 - Metodologia de iscas de tecidos vegetais em: iscas de maçã vermelha (A), folhas de braquiária (B), rodela de cenoura (C) e brotos de rabanete (D). Agronômica. Porto Alegre, 2021.



Fonte: o autor, 2022.

Todas iscas após o período de incubação passam por uma análise das estruturas em microscópio estereoscópico (10-45X), e quando necessário é realizado a montagem em lâmina com corante azul de Amann, para observação em microscópio óptico (10-100x) das estruturas do fungo.

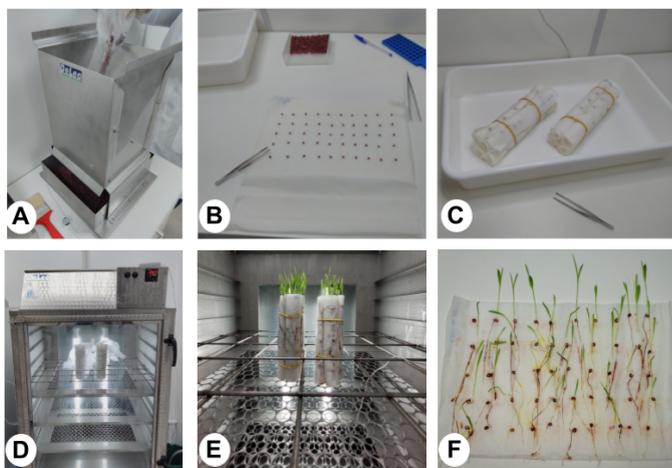
#### **4.7 Qualidade de sementes**

O setor de qualidade de sementes é uma área do laboratório Agronômica que recebe somente amostras para realização de análises como: análises de pureza, DOSN (determinação de outras sementes por número), peso por mil sementes, germinação, envelhecimento acelerado, 1ª contagem, TZ (teste de tetrazólio), TF (teste frio).

Durante o estágio, os testes que puderam ser acompanhados foram os de germinação e de envelhecimento acelerado, e as análises foram com *Sorghum bicolor*. Para todas técnicas utilizadas nas análises os procedimentos estavam de acordo com as regras para análise de sementes (BRASIL, 2009).

Para o teste de germinação foram utilizados 90 gramas de semente homogeneizadas em quarteador (FIGURA 11A), das quais utilizou-se 400 sementes por amostra, dispondo-as 50 sementes por rolo de papel filtro umedecido (FIGURAS 11 B e C) e levados para um germinador (modelo Mangelsdorf) à 25°C por 10 dias (FIGURA 11D). Após cinco dias foi realizada a primeira contagem das sementes considerando germinadas, aquelas que emitiram radícula e cotilédone (FIGURAS 11 E e F). Em seguida procedeu-se à contagem e retirada das sementes germinadas, sendo que os rolos foram devolvidos para o germinador por mais cinco dias, após este período foi realizada a última contagem em que foram avaliadas sementes normais, anormais e mortas. Sementes normais são consideradas as que germinaram, anormais são as que não formaram todas estruturas ou que formaram de maneira defeituosa, as mortas são as que não foram observadas mudanças e que não absorveram água e quando esmagadas demonstraram um aspecto farinhento.

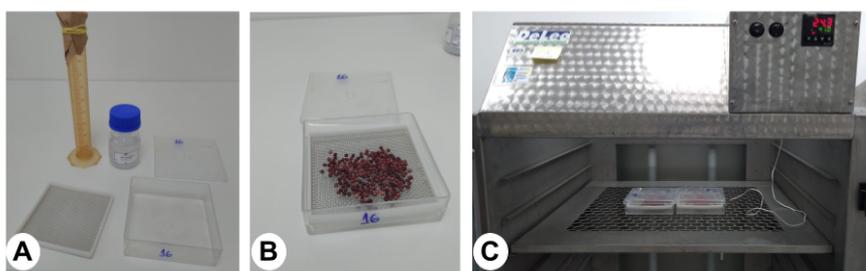
Figura 11 - Homogeneização em quarteador (A), deposição em papel filtro (B), sementes distribuídas dentro dos rolos (C), sementes após 5 dias em germinador (E) e primeira contagem da análise de germinação (F). Agrônômica. Porto Alegre, 2021.



Fonte: o autor, 2022.

A análise de envelhecimento precoce serve para predizer o potencial de armazenamento de sementes, para isto foi utilizado a mesma quantidade de sementes homogeneizadas do teste de germinação, as sementes foram colocadas dentro de uma caixa gerbox, que continha uma solução de 40 mL água + 16 g NaCl e uma grade para que as sementes não ficassem submersas no líquido (FIGURA 12B), a gerbox era fechada com a tampa e acondicionada no germinador (modelo Mangelsdorf) a 41°C por 48 horas (FIGURA 12C), após este período a gerbox é retirada, e as sementes são transferidas para de papéis filtro (umedecido) formando oito rolos com 50 sementes cada, para finalizar a análise, os rolos são mantidos no germinador por 5 dias a 25°C, no final deste período, são contabilizados somente as sementes normais.

Figura 12 - Alguns materiais utilizados para o teste de envelhecimento acelerado (A), sementes de *Sorghum bicolor* em caixa gerbox (B) e acondicionamento em germinador por 48 horas a 41 °C (C). Agrônômica. Porto Alegre, 2021.



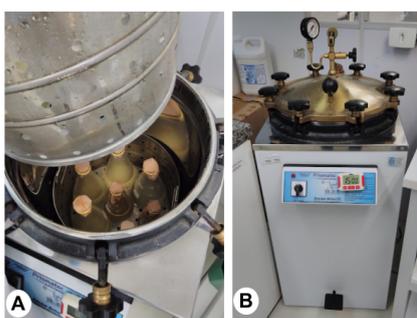
Fonte: o autor, 2022.

## 4.8 Preparo de materiais

O setor de preparo de materiais é responsável por dar apoio aos demais setores da área técnica do laboratório, recebendo demandas de materiais de outras áreas, possibilitando assim maior agilidade nas análises pela rápida disponibilização do material. As principais atividades realizadas no referido setor são de validação de insumos, controle e estoque de insumos, produção de soluções (solução tampão, meio de cultura, produção de alíquotas (primers, sondas e antissoros)), esterilização em autoclave (ponteira, tubo de ensaio, tubo falcon, papel filtro, dentre outros) e controle, manutenção e conservação de materiais de referência para validação de resultados.

Dentre as atividades desenvolvidas no preparo, as que puderam ser acompanhadas em sua totalidade foram somente as de autoclavagem, que consiste em eliminar contaminantes através de temperatura (121 a 124°C) e pressão (1 ATM), por um período que pode variar entre 15 a 30 minutos dependendo do material é contabilizado somente após o atingimento temperatura. (Figura 13).

Figura 13 - Meios de cultivo prontos para serem autoclavados (A), autoclave em funcionamento (B). Agronômica. Porto Alegre, 2021.



Fonte: o autor, 2022.

## 5. DISCUSSÃO

O estágio proporcionou a experiência de acompanhar o andamento das análises realizadas no laboratório Agronômica. Esta vivência evidencia a importância da utilização de diversas etapas que devem ser cumpridas dentro de um laboratório

de Diagnóstico Fitossanitário, traduzidas pelos vários setores da empresa como: herbologia, entomologia, acarologia, nematologia, micologia, bacteriologia, virologia/biologia molecular, análise de sementes e preparo. Além disso, verificou-se que os analistas responsáveis buscam, quando necessário, dados na literatura para complementar seus resultados.

Cada setor do laboratório utiliza diferentes metodologias para avaliar o patógeno alvo, sendo que as subamostras do mesmo material podem ser enviadas para um ou todos setores, isso depende da correlação do Ato Normativo com o país de origem e hospedeiro. Como exemplo: sementes de cenoura importadas da França, que passaram pelos setores de triagem para avaliar a presença de sementes de plantas invasoras como *Orobanche* spp. (IN 16/2015), e pelo setor de bacteriologia para avaliar a presença de *Candidatus Liberibacter solanacearum* (IN 39/2018), ambas pragas quarentenárias ausentes em território nacional.

Para avaliar se há a presença de *Candidatus Liberibacter solanacearum*, o setor de bacteriologia utiliza o método molecular, especificamente, a técnica de PCR em tempo real, para avaliar se a presença da praga, quando a amostra é de sementes de cenoura advindas de importação (CHITRAMPALAM; ASMA; HIDDINK, 2020). Para a confirmação de *Orobanche* sp., o analista responsável utiliza de um ou mais materiais de referência, como exemplo o *site* eflora.org, e para complementar a identificação é utilizado a técnica de PCR ou qPCR (MANEN, et al., 2004; EFLORA.ORG, 2022).

Segundo López *et al.* (2003), o diagnóstico fitossanitário refere-se à identificação do agente causal da doença, sendo que, para análises de rotina é imprescindível realizar análises buscando evitar falsos positivos ou negativos. Para isto deve-se lançar mão de técnicas com maior sensibilidade ao patógeno alvo, ou seja, uso de técnicas capazes de detectar a praga mesmo que pequenas quantidades na amostra e também em material vegetal assintomático. O Laboratório Agrônômica dispõe de técnicas com alta sensibilidade como PCR em tempo real, PCR convencional para patógenos específicos, como também técnicas tradicionais que permitem o crescimento de patógenos em meios de cultura, análises sanitárias

de sementes utilizando o *blotter test* e reação de hipersensibilidade de forma a comprovar a patogenicidade de bactérias.

A utilização de PCR em tempo real, permite chegar a um resultado em pouco tempo, podendo ser acompanhado ciclo a ciclo. Como o PCR convencional, o analista obtém uma detecção mais sensível, específica e confiável nas análises de patógenos vegetais. Esta técnica permite acompanhar os dados em tempo real, tornando o diagnóstico de patógenos ainda mais rápido e confiável (Capote *et al.*, 2009; López *et al.*, 2009).

O laboratório oferece o serviço de devolução de sobras, sendo possível que o importador solicite a devolução do material sobressalente, ou no caso de sementes básicas, somente 10% do total da amostra poderá ser retirado para análises, sendo o restante devolvido. Já no caso de amostra com sementes peletizadas, as análises realizadas não ficam autorizadas a lavagem ou destruição do pellet na totalidade da amostra, pois pode inviabilizar a sua comercialização. A partir disto não é possível aferir se há alguma semente que difere do informado pelo importador na amostra, tornando assim um risco de introdução de outras espécies.

Todas as metodologias acima discutidas têm como objetivo evitar a entrada de pragas em território brasileiro. De acordo com Amorim *et al.*, 2018, o MAPA regulamenta as instruções normativas que preconizam a entrada e disseminação de pragas quarentenárias ausentes (PQA) e presentes (PQP) a partir de medidas de controle baseadas na exclusão e erradicação, respectivamente, impedindo a entrada de pragas e controlando as já presentes, buscando mitigação e erradicação.

Apesar de todas essas medidas regulamentares, o trânsito de pessoas e produtos ainda é intenso em nossas fronteiras, portos e aeroportos, abrangendo uma área total de 25.000 km, sendo 15.000 km terrestres e 10.000 km marítimos (ANFFA Sindical, 2021). Além disso, a atuação dos fiscais federais em portos, aeroportos e fronteiras ainda é pouco abrangente na fiscalização de trânsito de pessoas, animais, transporte de plantas, frutos, sementes e restos de solo veículos de pragas. Logo, isso pode facilitar a entrada de pragas que podem ter potencial de danos severos em várias commodities agrícolas no Brasil (BOLÍVAR *et al.*, 2017;

ANFFA Sindical, 2021).

Durante o período de estágio no setor de triagem foi interceptado *Stegobium paniceum* (Coleoptera: Anobiidae) (FIGURA 2A) conhecido como gorgulho da farinha. A praga constitui um exemplo de uma lista de 700 pragas quarentenárias ausentes em território nacional (ANFFA Sindical, 2021). Com a interceptação desta praga, o laboratório evitou imensos danos à economia nacional, pois, esta é frequentemente encontrada em instalações de processamento de alimentos, silos de grãos e armazéns. Este inseto é considerado o mais destrutivo do mundo em produtos armazenados (KUCEROVA & STEJSKAL, 2010; LÜ, 2017).

No ano de 2021, o laboratório Agrônômica interceptou 54 pragas quarentenárias ausentes (PQA) e 27 pragas quarentenárias presentes (PQP). O que explica essa quantidade de PQP são os laudos de levantamentos oficiais emitidos para as Agências de Defesa Agropecuárias Estaduais que mantêm um controle periódico do zoneamento de várias pragas presentes.

As fiscalizações devem seguir, e cada vez mais minuciosas, visto que, a entrada de material vegetal segue uma tendência, pois as importações de produtos agropecuários cresceram 19% nos últimos dez anos, atingindo 10,7 milhões de toneladas, o que correspondeu a US \$4,1 bilhões, em 2020. Esses produtos importados pelo país tiveram origem em 99 países diferentes (ANFFA Sindical, 2021).

## **6. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

O Laboratório Agrônômica aplica procedimentos voltados à identificação de pragas diversas, a partir de técnicas e métodos específicos, assim sendo, pode-se acompanhar a aplicação de diferentes metodologias para detecção de insetos, ácaros, nematóides, vírus, bactérias, fungos e sementes de plantas invasoras, complementado o material visto em sala de aula no curso de Agronomia, porém de forma mais aplicada.

O estágio proporcionou o acompanhamento da rotina de trabalho intensa nos

diferentes setores da empresa. Rotina esta que é demonstrada pelo grande e diverso número de amostras recebidas diariamente, além do uso de várias técnicas complexas utilizadas para avaliar a presença de pragas.

As análises efetuadas no laboratório, são executadas para aferir se há ou não a praga na amostra analisada. Para isto foi imprescindível observar a importância da Comissão de Medidas Fitossanitárias (CMF) para uma relação de *compliance* entre países, buscando evitar a disseminação de pragas, e protegendo a soberania de suas econômicas, baseando suas regulamentações em medidas internacionais.

Por fim é de extrema relevância para o agronegócio nacional, o trabalho desenvolvido pelo Agrônomo, dada pela responsabilidade no diagnóstico de pragas, emitindo laudos técnicos para auxiliar o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento que auxiliam na tomada de decisão colaborando assim, para um diagnóstico fitossanitário mais assertivo e precoce, inibindo e mitigando a entrada de pragas, protegendo as lavouras e a biodiversidade natural de nosso país.

## REFERÊNCIAS

AMORIM, L.; REZENDE, J.; BERGAMIN FILHO, A. (ed.). **Manual de fitopatologia**. 5. ed. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, 2018. v. 1. 704 p.

ANFFA SINDICAL - SINDICATO NACIONAL DOS AUDITORES FISCAIS FEDERAIS AGROPECUÁRIOS. **Estudo sobre os Impactos da atuação dos auditores fiscais federais agropecuários sobre a produção agropecuária brasileira**. [Brasília, DF]: ANFFA - Sindicato Nacional dos Auditores Fiscais Federais Agropecuários, 2021. 131 p. Disponível em: [https://anffasindical.org.br/images/comunicacao/Cartilhas/Anffa\\_Sindical\\_relatorio\\_FGV-compactado.pdf](https://anffasindical.org.br/images/comunicacao/Cartilhas/Anffa_Sindical_relatorio_FGV-compactado.pdf). Acesso em: 31 jan. 2022.

BARBIERI, R. L.; CARVALHO, F. I. F.; FEDERIZZI, L. C. Importância, problemas e perspectivas do melhoramento visando resistência a viroses em plantas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 25, n. 3, p. 489-492, 1995. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/cr/a/D9G8ZnDdqJsrcPrhZsgkxJ/?format=pdf&lang=pt>. Acesso em: 1º jan. 2022.

BOLIVAR, P. *et al.* **Fronteiras do Brasil**: diagnóstico e agenda de pesquisa para política pública. Brasília, DF: IPEA, 2017. v. 2. 276 p. Disponível em: <http://repositorio.ipea.gov.br/handle/11058/7959>. Acesso em: 27 jan. 2022.

BORDIGNON, R. *et al.* A tristeza dos citros e suas implicações no melhoramento genético de porta-enxertos. **Bragantia**, v. 62, n. 3, p. 345–355, 2003.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Decreto nº 5.759, de 17 de abril de 2006. Promulga o texto revisto da Convenção Internacional para a Proteção dos Vegetais (CIVP), aprovado na 29ª Conferência da Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação - FAO, em 17 de novembro de 1997. **Diário Oficial da União: Seção 1**, Brasília, DF, 18 abr. 2006. Disponível em: <http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=visualizarAtoPortalMapa&chave=429385853>. Acesso em: 31 jan. 2022.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Brasília, DF: MAPA, 2009. 399 p. Disponível em: [https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/arquivos-publicacoes-insumos/2946\\_regras\\_analise\\_\\_sementes.pdf](https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/arquivos-publicacoes-insumos/2946_regras_analise__sementes.pdf). Acesso em: 31 dez. 2021.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Importação de produtos de origem vegetal**. Brasília, DF: MAPA, 2017a. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inspecao/produtos-vegetal/importacao>. Acesso em: 1º jan. 2022.

BRASIL. **Consulta de produtos de importação autorizada**. Brasília, DF: MAPA,

2017b. Disponível em:

<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/importacao-e-exportacao/importacao/consulta-de-produtos-de-importacao-autorizada>. Acesso em: 12 dez. 2021.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Manual do vigiagro**.

Brasília, DF: MAPA, 2017c. Disponível em:

<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/vigilancia-agropecuaria/manual-do-vigiagro>. Acesso em: 1º jan. 2022.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Diagnóstico**

**Fitossanitário**, Brasília, DF: MAPA, 2017d. Disponível em:

<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/laboratorios/credenciamento-e-laboratorios-credenciados/laboratorios-credenciados/diagnostico-fitossanitario/diagnostico-fitossanitario>. Acesso em: 24 abr. 2022.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº 39, de 1º de outubro de 2018a. **Diário Oficial da União: Seção 1**, Brasília, DF, n. 190, p. 11-14, 2 out. 2018a. Disponível em:

[https://www.in.gov.br/materia/-/asset\\_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/43460217/do1-2018-10-02-instrucao-normativa-n-39-de-1-de-outubro-de-2018-43460055](https://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/43460217/do1-2018-10-02-instrucao-normativa-n-39-de-1-de-outubro-de-2018-43460055).

Acesso em: 8 jan. 2022.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº 38, de 1º de outubro de 2018b. **Diário Oficial da União: Seção 1**, Brasília, DF, n. 190, p. 14, 2 out. 2018b. Disponível em:

[https://www.in.gov.br/materia/-/asset\\_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/43461167/do1-2018-10-02-instrucao-normativa-n-38-de-1-de-outubro-de-2018-43461024ao](https://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/43461167/do1-2018-10-02-instrucao-normativa-n-38-de-1-de-outubro-de-2018-43461024ao).

Acesso em: 8 jan. 2022.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº 12, de 28 de junho de 2019. **Diário Oficial da União: Seção 1**, Brasília, DF, n. 126, p. 2, 3 jul. 2019. Disponível em:

<https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/instrucao-normativa-n-12-de-28-de-junho-de-2019-187160162>. Acesso em: 21 fev. 2022.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Gabinete da Ministra. Instrução Normativa nº 25, de 7 de abril de 2020. **Diário Oficial da União: Seção 1**, Brasília, DF, n. 69, p. 9, 9 abr. 2020. Disponível em: <https://www.in.gov.br/web/dou>.

Acesso em: 12 dez. 2021.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Vegetal**. Brasília, DF: MAPA, 2022. Disponível em:

<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/internacional/portugues/importacao/vegetal/vegetal>. Acesso em: 10 jan. 2022

CAGED - CADASTRO GERAL DE EMPREGADOS E DESEMPREGADOS. Brasil

termina 2021 com 2,7 milhões de novas vagas de emprego. **Comunicado Técnico CAGED**, Brasília, DF, v. 3, p. 1-4, 3 fev. 2022. Disponível em: [https://www.cnabrazil.org.br/assets/arquivos/artigostecnicos/CT-CAGED\\_ED.-02.2022.pdf](https://www.cnabrazil.org.br/assets/arquivos/artigostecnicos/CT-CAGED_ED.-02.2022.pdf). Acesso em: 19 fev. 2022.

CAPOTE, N. *et al.* Direct sample preparation methods for the detection of Plum pox virus by real-time RT-PCR. **International Microbiology: The Official Journal of the Spanish Society for Microbiology**, Barcelona, v. 12, n. 1, p. 1–6, mar. 2009.

CHITRAMPALAM, P.; ASMA, M.; HIDDINK, G. Detection of *Candidatus Liberibacter solanacearum* on Carrot Seed by Seed Extract PCR, International seed federation. p. 46, jan. 2020.

COMAR, R. **ISO 17025 - o que é, como e porquê implementar**. [S. l.]: Templum, 13 jun. 2019. Disponível em: <https://certificacaoiso.com.br/iso-17025/>. Acesso em: 9 fev. 2022.

**EFLORA.ORG**, Flora do Missouri. Disponível em: [http://www.efloras.org/browse.aspx?flora\\_id=11&name\\_str=&btnSearch=Procurar](http://www.efloras.org/browse.aspx?flora_id=11&name_str=&btnSearch=Procurar). Acesso em: 25 de abr. 2022.

EMBRAPA - EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Quarantine pests**. Brasília, DF: Embrapa, [2021]. Disponível em: <https://www.embrapa.br/tema-pragas-quarentenarias/sobre-o-tema>. Acesso em: 16 dez. 2021.

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Phytosanitary principles for the protection of plants and the application of phytosanitary measures in international trade**. Rome: FAO, IPPC, 2006. (International Standards for Phytosanitary Measures, 1). Disponível em: <https://www.fao.org/3/j7483e/j7483e.pdf>. Acesso em: 30 jan. 2022

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Adopted standards (ISPMs)**. Rome: FAO, 2022. Disponível em: <https://www.ippc.int/en/core-activities/standards-setting/ispms/>. Acesso em: 30 jan. 2022.

FUNDECITRUS - FUNDO DE DEFESA DA CITRICULTURA. **Greening Huanglongbing**. Araraquara: Fundecitrus, [2022]. Disponível em: <https://www.fundecitrus.com.br/doencas/greening>. Acesso em: 21 fev. 2022.

GREENING: a doença sem cura que ameaça a produção de cítricos. [São Paulo]: **Canal Agro**, 25 out. 2019. Disponível em: <https://summitagro.estadao.com.br/noticias-do-campo/greening-doenca-ameaca-producao-citricos/>. Acesso em: 9 jan. 2022.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **LSPA -**

**Levantamento Sistemático da Produção Agrícola:** tabela 2 - área, produção e rendimento médio - confronto das safras de 2021 e das estimativas para 2022. Rio de Janeiro: IBGE, 2022. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria/9201-levantamento-sistematico-da-producao-agricola.html?=&t=resultados>. Acesso em: 16 fev. 2022.

KRETER, A. C.; PASTRE, R. Comércio exterior do agronegócio: balanço de 2021 e perspectivas para 2022. **Carta de Conjuntura**, Brasília, DF, n. 54, p. 1-17, 2022. Disponível em: [https://www.ipea.gov.br/portal/images/stories/PDFs/conjuntura/220116\\_nota\\_2\\_comercio\\_exterior\\_agro\\_2021.pdf](https://www.ipea.gov.br/portal/images/stories/PDFs/conjuntura/220116_nota_2_comercio_exterior_agro_2021.pdf). Acesso em 21 fev. 2022.

KUCEROVÁ, Z.; STEJSKAL, V. External egg morphology of two stored-product anobiids, *Stegobium paniceum* and *Lasioderma serricorne* (Coleoptera: Anobiidae). **Journal of Stored Products Research**, Oxford, v. 46, n. 3, p. 202–205, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jspr.2010.05.002>. Acesso em: 20 jan. 2022.

LEITE, G. L. D.; CERQUEIRA, V. M. **Pragas do algodoeiro**. [Montes Claros]: Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Agrárias. Insetário G. W. G. de Moraes, 2017. Disponível em: [https://halley.adm-serv.ufmg.br/ica/wp-content/uploads/2017/06/Pragas\\_do\\_algodoeiro.pdf](https://halley.adm-serv.ufmg.br/ica/wp-content/uploads/2017/06/Pragas_do_algodoeiro.pdf). Acesso em: 21 fev. 2022.

LÓPEZ, M. M. *et al.* Innovative tools for detection of plant pathogenic viruses and bacteria. **International Microbiology**, Berlin, v. 6. p. 233-243, 2003. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/13680391/>. Acesso em: 21 fev. 2022.

LÜ, J. Efeitos das altas temperaturas na mortalidade de *Stegobium paniceum* (L.) (Coleoptera: Anobiidae). **Journal of Food Protection**, Ames, v. 80, n. 9, p. 1557–1561, 2017.

MACHADO, G. C. **Agronegócio brasileiro:** importância e complexidade do setor. Piracicaba: CEPEA, ESALQ, USP, 2021. Disponível em: <https://www.cepea.esalq.usp.br/br/opiniao-cepea/agronegocio-brasileiro-importancia-e-complexidade-do-setor.aspx>. Acesso em: 9 jan. 2022.

MANEN, J. F., HABASHIA, C., JEANMONODA, D., PARK, J., SCHNEEWEISS, G. M. Phylogeny and intraspecific variability of holoparasitic Orobanchae (Orobanchaceae) inferred from plastid *rbcl* sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 33, 482-500, 2004.

MARTINS, M. B. **Pragas quarentenárias**. Cuiabá: INDEA - Instituto de Defesa Agropecuária de Mato Grosso, 2021. Disponível em: <http://www.indea.mt.gov.br/-/8523415-pragas-quarentenarias?ciclo=>. Acesso em: 1º jan. 2022.

UFMG – UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS. **Acesso cresce, mas desigualdade no ensino superior ainda desafia América Latina**. Belo Horizonte: UFMG, 17 nov. 2020. Disponível em: <https://ufmg.br/comunicacao/noticias/acesso-cresce-mas-desigualdade-no-ensino-superior-ainda-desafia-america-latina>. Acesso em: 9 jan. 2022.