

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

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Priscila de Carvalho Engel

00296933

“Estágio supervisionado no diagnóstico fitossanitário de produtos vegetais”

Porto Alegre, julho de 2023.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
CURSO DE AGRONOMIA

Estágio supervisionado no diagnóstico fitossanitário de produtos vegetais

Priscila de Carvalho Engel

00296933

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito para obtenção do Grau de Engenheira Agrônoma, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Supervisora de campo do Estágio: Biól. Ma. Marisa Dalbosco

Orientadora Acadêmica do Estágio: Profa. Dra. Luiza Rodrigues Redaelli

COMISSÃO DE AVALIAÇÃO

Profa. Renata Pereira da Cruz	Depto. Plantas de Lavoura (Coordenadora)
Prof. Aldo Merotto Junior	Depto. Plantas de Lavoura
Prof. Alexandre de Mello Kessler	Depto. de Zootecnia
Prof. Clesio Gianello	Depto. de Solos
Prof. Jose Antonio Martinelli	Depto. de Fitossanidade
Prof. Pedro Alberto Selbach	Depto. de Solos
Prof. Roberto Luis Weiler	Depto. de Plantas Forrageiras e Agrometeorologia
Prof. Sergio Tomasini	Depto. de Horticultura e Silvicultura

Porto Alegre, julho de 2023.

AGRADECIMENTOS

À minha família, pelo apoio, compreensão e constante incentivo ao longo da jornada acadêmica.

Aos professores, pela paciência, dedicação incansável e pelo conhecimento transmitido durante todo o curso.

À minha mãe, Adriana de Carvalho Engel, pelo incentivo à educação em todas as suas etapas, que foi um fator determinante para a minha busca pelo conhecimento e minha trajetória até aqui.

Ao Rodrigo Sampaio, pelo companheirismo durante todo o curso e por estar ao meu lado, compartilhando desafios e conquistas.

À professora Luiza Rodrigues Redaelli, pela orientação atenciosa tanto no meu trabalho quanto na minha vida pessoal.

Ao professor Josué Sant'Ana, pelo exemplo inspirador de profissionalismo e pela sua paixão pelo ensino.

Ao Laboratório Agrônomo, pela experiência proporcionada no estágio que foi enriquecedora, contribuindo para o meu crescimento profissional

Por fim, expresso minha gratidão à Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) por sua notável excelência no ensino, pesquisa e extensão.

RESUMO

O presente trabalho foi fundamentado no estágio curricular obrigatório requerido do curso de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. As atividades do estágio foram desenvolvidas na empresa Agronômica - Laboratório de Diagnóstico Fitossanitário e Consultoria, localizada em Porto Alegre, no período de 16/08/2022 a 15/02/2023. O objetivo deste documento é descrever as atividades realizadas durante o estágio, as quais desenvolveram-se no âmbito da análise de sanidade vegetal, como a detecção e posterior identificação de pragas presentes em amostras, com foco no setor de Bacteriologia. O estágio resultou em aprendizado nas várias áreas de atuação da empresa, correlacionados com a grande área de fitossanidade, abordada no curso de Agronomia.

LISTA DE FIGURAS

	Página
1. Amostra de sementes de milho (A) e recipientes onde foram alocadas as subamostras e contraprovas (B). Porto Alegre, 2022.	14
2. Etapas para preparo de amostra de tubérculos de batata para extração de nematoides pelo método Coolen & D'Herde: batatas parcialmente descascadas (A); amostra no copo do liquidificador (B); amostra depositada nas peneiras de 60 e 500 mesh (C); estruturas de nematoide visualizadas em microscópio óptico (D). Porto Alegre, 2022.	15
3. Assepsia de braquiária (A); homogeneização das iscas com a amostra (B); porções de cenoura utilizadas como isca (C); estruturas fúngicas visualizadas em microscópio óptico (D). Porto Alegre, 2022.	16
4. Amostras dispostas em copos na mesa agitadora (A); pesagem dos tubos contendo suspensão resultante da centrifugação das amostras (B); centrifugação das suspensões (C). Porto Alegre, 2022.	16
5. Amostra em graal pronta maceração (A); amostra macerada em nitrogênio líquido (B); amostras maceradas em tampão PVP e armazenadas em microtubo (C); maceração de amostras em tampão PVP (D); maceração de amostras em prensa hidráulica (E). Porto Alegre, 2022.	17
6. Preparação do gel de agarose com o DNA a ser analisado (A); gel após a eletroforese (B); resultado após a exposição a luz ultravioleta (C). Porto Alegre, 2022.	18
7. Gabarito utilizado para dispor as sementes no papel filtro (A); sementes de soja dispostas em papel filtro para germinação em rolo (B); sementes de nabo dispostas em papel filtro para germinação em Gerbox (C). Porto Alegre, 2022.	19
8. Materiais prontos para esterilização em autoclave: tubos (A); pistilos (B); provetas (C) e ponteiras (D). Porto Alegre, 2022.	20
9. Reagentes colocados em Erlenmeyer (A); homogeneização da mistura com barra magnética (B); autoclavagem de meio de cultura (C). Porto Alegre, 2022.	20
10. Semeadura de bactérias: método de repique em estrias (A, B e C); método de repique em tapete (D). Porto Alegre, 2022.	22
11. Inoculação das colônias bacterianas em folhas de tabaco (A); folha superior de tabaco evidenciando reação positiva de hipersensibilidade e inferior negativa (B). Porto Alegre, 2022.	23
12. Teste de patogenicidade em batata, seta indica controle positivo com podridão visível na batata (A); placa compartimentada do sistema Bactray (B). Porto Alegre, 2022.	24

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO	7
2. CARACTERIZAÇÃO DO LABORATÓRIO AGRONÔMICA	8
3. REFERENCIAL TEÓRICO	9
3.1. Barreiras fitossanitárias	9
3.2. Análises realizadas no setor de bacteriologia	11
4. ATIVIDADES REALIZADAS	13
4.1. Primeira etapa - introdução aos setores da empresa	13
4.1.1. Setor de operações	13
4.1.2. Setor de triagem	13
4.1.3. Setor de nematologia	14
4.1.4. Setor de micologia	15
4.1.5. Setor de biologia molecular e virologia	16
4.1.6. Setor de herbologia e laboratório de análise de sementes	18
4.1.7. Setor de preparo de materiais	19
4.1.8. Setor de bacteriologia	21
4.2. Segunda etapa - Setor de Bacteriologia	21
4.2.1. Método molecular	21
4.2.2. Métodos bioquímicos	21
4.2.3. Outras atividades	24
5. DISCUSSÃO	25
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	27
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	27

1. INTRODUÇÃO

O crescimento da produção agrícola brasileira, concomitante ao aumento da demanda mundial por estes produtos, coloca o Brasil entre um dos países que mais exportam mercadorias de origem vegetal no mundo. Todavia, o Brasil ainda não é autossuficiente em uma série de itens, importando alimentos ou que não produz ou cuja produção não corresponde à demanda do mercado interno. O material vegetal que entra ou sai do país pode carregar consigo pragas de diferentes naturezas como plantas, animais ou agentes patogênicos, os quais têm potencial de serem nocivos a cultivos agrícolas tanto no Brasil como no exterior.

Visando não colocar em risco a sanidade dos cultivos, tanto nacionais como internacionais, pela disseminação de pragas, um conjunto de medidas têm o propósito de proteger a agricultura brasileira contra a entrada, estabelecimento e disseminação desses agentes e propiciar o comércio seguro de produtos agrícolas. Para a liberação da circulação, entrada ou saída no país, de mercadorias de origem vegetal há necessidade de análises do material e subsequente emissão de laudos, os quais são feitos em laboratórios credenciados junto ao MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento), sendo o laboratório Agrônômica um dos estabelecimentos oficiais credenciados.

A escolha do local de estágio teve como foco complementar a formação acadêmica e obter experiência na área de Fitossanidade, uma das grandes áreas do curso de Agronomia, bem como entender na prática como funcionam processos que envolvem a circulação de produtos vegetais. Sendo assim, o estágio ocorreu na empresa Agrônômica - Laboratório de Diagnóstico Fitossanitário e Consultoria, localizada em Porto Alegre, no período de 16/08/2022 a 15/02/2023, com carga horária semanal de 30 horas.

O estágio teve como objetivo principal a obtenção de aprendizado e experiência no campo do diagnóstico fitossanitário, envolvendo a aplicação de variadas técnicas para analisar diferentes amostras vegetais, patógenos e pragas, cada um apresentando suas particularidades. Durante esse período, as principais atividades desempenhadas consistiram na preparação das amostras para análise por biologia molecular e no apoio aos processos de análise por métodos bioquímicos. Esse estágio proporcionou uma valiosa oportunidade para o desenvolvimento de habilidades práticas e aprofundamento de conhecimentos na identificação e avaliação de problemas fitossanitários, contribuindo para uma compreensão mais ampla das complexidades envolvidas no campo da fitossanidade.

2. CARACTERIZAÇÃO DO LABORATÓRIO AGRONÔMICA

O Laboratório Agronômica é uma empresa privada, fundada em 2006 pelos sócios Eng^a. Agr^a. M. Sc. Patrícia de Souza Teló e Eng. Agr. PhD Valmir Duarte, que uniram seus empreendimentos, sendo eles, respectivamente, a Agronômica - Consultoria e Clínica Vegetal e o Laboratório de Diagnóstico Fitossanitário da UFRGS. O laboratório realiza análises de identificação de vírus, viroides, fungos, oomicetos, procariontes, nematoides, ácaros, insetos e sementes de espécies invasoras em plantas e subprodutos vegetais.

Desde sua criação em 2006, a empresa obteve seu credenciamento junto ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), possibilitando atender demandas por ensaios dos programas e controles oficiais não atendidas pelos laboratórios do próprio MAPA. O Agronômica possui Acreditação (requisito para obtenção do credenciamento junto ao MAPA), seguindo normas ABNT NBR ISO/IEC 17025 (Requisitos Gerais para a Competência de Laboratórios de Ensaio e Calibração), emitidos pela Coordenação-Geral de Acreditação do Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial – CGCRE/Inmetro. A Acreditação é obtida a partir de avaliação do sistema de gestão da qualidade, prevendo confirmação de desempenho, estimativa da incerteza, rastreabilidade, validação de métodos, confiabilidade e unificação dos procedimentos laboratoriais, tornando ensaios e calibrações padronizados.

Para análise de inoculantes, produtos de controle biológico e substratos, o laboratório possui certificado de cadastro no SIPEAGRO (Sistema Integrado de Produtos e Estabelecimentos Agropecuários), que é um sistema utilizado pelo MAPA para registro e cadastro de estabelecimentos onde se acompanham processos administrativos de fiscalização.

No escopo da empresa também há serviços de análises de sementes e mudas, para isso ela possui credenciamento no RENASEM (Registro Nacional de Sementes e Mudas) como Laboratório de Análise de Sementes (LAS), Laboratório de Análise de Mudas e Laboratório Oficial de Análise de Sementes (LASO) para teste de parâmetros de qualidade e sanidade de sementes, mudas e batata semente.

Além do diagnóstico fitossanitário, a empresa também presta outros serviços como avaliação de eficácia de Tratamento de Sementes, caracterização de pragas, análise físico-química e microbiológica do açúcar, eficácia e praticabilidade agronômica, cursos, treinamentos, depósito e comercialização de agentes biológicos. Sendo que para o depósito e comercialização desses agentes foi criada uma coleção de nome Santa Veronica Giuliani

(SVG), com estrutura para preservar bactérias e fungos fitopatogênicos, nematoides, insetos, sementes e microrganismos de controle biológico.

Atualmente a Matriz do Laboratório Agrônômica é situada na cidade de Porto Alegre (RS) e possui uma filial, desde 2008, na cidade de Foz do Iguaçu (PR) que realiza o diagnóstico fitossanitário em frutos importados. No ano de 2022 o Laboratório Agrônômica foi adquirido pelo Grupo Cotecna, empresa suíça que conta com mais de 100 escritórios em cerca de 50 países. A empresa, atualmente, é uma das líderes mundiais nos serviços de teste, inspeção e certificação, com uma rede de laboratórios que oferecem serviços para os setores da Agricultura, Segurança Alimentar, Governo e Comércio, Minerais e metais e Bens de consumo.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1. Barreiras fitossanitárias

Perdas diretas de rendimento causadas por patógenos, animais e plantas invasoras variam entre 20 a 40% da produtividade agrícola. As perdas causadas por pragas e patógenos ainda podem ocorrer de forma indireta com consequências de curto a longo prazo (SAVARY *et al.*, 2012).

Nos anos 1930 houve intensificação do comércio internacional e com a finalização da segunda guerra mundial, os países realinharam suas relações criando a Organização Mundial do Comércio (OMC) e seus organismos de regulamentação como o Comitê Internacional de Sanidade Vegetal, criado no âmbito da Convenção Internacional de Proteção dos Vegetais (*International Plant Protection Convention*), fundado em 1952, sendo o Brasil um de seus membros fundadores (CANTANHEDE, 2021).

As medidas fitossanitárias visam proteger a sanidade vegetal por meio de normas, procedimentos e controles aplicados ao comércio internacional de produtos agrícolas, garantindo inocuidade de mercadorias vegetais consumidas internamente e exportadas, promovendo a proteção do território nacional contra pragas e doenças. Para tal, no âmbito da Organização Mundial do Comércio (OMC), negociou-se o Acordo sobre Medidas Sanitárias e Fitossanitárias, devendo ter como referência padrões estabelecidos pelas Organizações Internacionais mencionadas no acordo SPS (*Sanitary and Phytosanitary measures*): como o Codex Alimentarius, a Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) e a Convenção Internacional de Proteção dos Vegetais (CIPV) (BRASIL, 2017).

Há exigências fitossanitárias para que ocorra trânsito internacional de produtos agrícolas, formando um conjunto de normas que visam evitar a entrada, contaminação e disseminação de pragas e doenças por meio da prevenção, controle de trânsito, análise de riscos

de pragas, erradicação entre outras. As normas estabelecidas e acordadas com outras nações facilitam o comércio seguro de produtos agrícolas (BRASIL, 2023c).

No Brasil, a Portaria nº 177 de 16 de junho de 2021, estabelece os procedimentos e critérios para Certificação Fitossanitária na importação de vegetais e a emissão do Certificado Fitossanitário (CF) e Certificado Fitossanitário de Reexportação (CFR) na exportação, sendo este um documento oficial, em papel ou equivalente emitido eletronicamente, que atesta, de acordo com os modelos e regras estabelecidas, que o envio cumpre os requisitos fitossanitários estabelecidos pela Organização Nacional de Proteção Fitossanitária (ONPF) do país importador (BRASIL, 2021).

Para importações, o determinador do padrão oficial para a classificação de alimentos e produtos de origem vegetal é o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), coordenado e fiscalizado pelo Departamento de Inspeção de Origem Vegetal (DIPOV), o qual classifica e certifica os produtos importados. O órgão do DIPOV responsável pela fiscalização de estabelecimentos que preparam, embalam e comercializam produtos é a Coordenação Geral de Qualidade Vegetal (CGQV) (BRASIL, 2023b).

Atualmente, para diagnóstico fitossanitário, o MAPA conta com dez laboratórios credenciados, distribuídos em cinco estados, sendo eles: Instituto Mineiro de Agropecuária(MG), Centro de Indexação de Vírus de Minas Gerais localizado no Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras (MG), Agência de Defesa Agropecuária do Paraná (ADAPAR) (PR), Intecso Soluções e Inovações em Agronegócios Ltda (PR), Laboratório de Diagnóstico Fitossanitário da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (RJ), Agronômica Laboratório de Diagnóstico Fitossanitário Ltda EPP (RS), Associação Pró-ensino em Santa Cruz do Sul (RS), Clínica Fitopatológica (Instituto Agronômico) da Secretaria de Agricultura e Abastecimento (SP), Instituto Biológico de São Paulo da Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo (SP), Laboratório Agrobiol Consultoria e Assessoria ao Agronegócio Ltda (SP). (BRASIL, 2023a)

As espécies vegetais só podem ser importadas se estiverem na Lista de Produtos de Importação Autorizada (PVIA), caso contrário, é necessária a Análise de Risco de Pragas (ARP) para observação dos requisitos fitossanitários (BRASIL, 2020). Esta análise é feita através da avaliação de evidências biológicas, científicas e econômicas, estabelecendo-se a regulamentação e o grau de exigências de medidas fitossanitárias requeridas para a contenção (FAO, 2022). Atualmente, há um compêndio com legislação específica para 80 tipos de alimentos e produtos vegetais (BRASIL, 2019).

De acordo com a *Food and Agriculture Organization of the United Nations* - FAO (2022), o termo "praga" refere-se a qualquer espécie, linhagem ou biótipo de planta, animal ou agente patogênico prejudicial às culturas ou produtos vegetais. Já o termo "praga quarentenária" refere-se a um organismo de potencial importância econômica para uma área ameaçada, podendo estar ausente ou, se presente, sem ampla distribuição e estar sob controle oficial.

Estabeleceu-se também na CIPV que os países deverão elaborar e atualizar listas de pragas regulamentadas, com seus nomes científicos e deixá-las disponíveis para caso de solicitação. Assim, todos os países membros da Convenção fizeram suas listas de pragas quarentenárias de seu interesse. Porém, em alguns casos as listas contêm centenas ou milhares de pragas, surgindo a necessidade de priorizar as consideradas mais importantes para direcionar esforços a elas (FIDELIS *et al.*, 2019).

A Portaria SDA/MAPA nº 617, de 12 de junho de 2022 lista as Pragas Quarentenárias Ausentes - PQA do Brasil, com quase 800 espécies, entre elas cerca de 30 espécies de ácaros, 330 de insetos, 140 de fungos, quatro de moluscos, 53 de nematoides, 44 de bactérias, 73 de vírus e viroides e 89 de plantas invasoras e parasitas. (BRASIL, 2022) Dessas espécies, a Secretaria de Defesa Agropecuária, juntamente com a Embrapa fizeram a lista de hierarquia, usando o método *Analytic Hierarchy Process*, levando em conta os diferentes riscos para cada praga e determinando a priorização de 20 espécies (FIDELIS *et al.*, 2019).

3.2. Análises realizadas no setor de bacteriologia

A acreditação na ISO/IEC implica no reconhecimento global da competência técnica de um laboratório, sendo o Manual da Qualidade, o documento base nos ensaios realizados. A implementação de normas regulatórias facilita a troca de informações entre laboratórios de diferentes países, permitindo que eles operem em mercados cada vez mais exigentes, garantindo a qualidade final do sistema proposto (GOMES & SABAINI, 2011).

Na detecção e identificação de bactérias fitopatogênicas, empregam-se diversas técnicas baseadas em princípios distintos, que são utilizadas como ferramentas diagnósticas. Essas técnicas abrangem áreas como microscopia, morfologia e disposição das células, sorologia, ferramentas bioquímicas, fisiológicas, nutricionais, moleculares e propagação de culturas (SHARMA & SINGH, 2019).

Bactérias fitopatogênicas podem ser isoladas em meios de cultura seletivos para evitar o crescimento de bactérias saprófitas ou contaminantes ou em meios que possuem algum

componente específico que pode ser degradado apenas pelas bactérias visadas (SCALA *et al.*, 2018).

A detecção e identificação de bactérias em sementes, no entanto, nem sempre é possível usando meios de cultivo. Os meios semisseletivos são os mais eficientes nesse processo, porém, para muitos patógenos, esses não foram ainda desenvolvidos, sendo necessário, nessas situações, recorrer a métodos moleculares (STEILMANN *et al.*, 2019).

Os testes de coloração de gram, KOH, oxidase, catalase e outros, juntamente com a caracterização morfológica e molecular do patógeno foram utilizados para separação de cinco isolados de bactérias coletadas de tomateiro, identificadas como *Ralstonia solanacearum* (SHARMA & SINGH, 2019).

Ao identificar bactérias, é necessário um processo investigativo, caracterizando o organismo sob diferentes aspectos. Na identificação de *Pantoea ananatis* em sementes de diferentes genótipos de milho, Mamede & Tebaldi (2020) repicaram colônias suspeitas e cultivaram em meio de cultura 523, com posterior caracterização bioquímica e fisiológica. Neste estudo, todos os dez isolados foram caracterizados como gram negativos, fermentação da glicose, colônias amarelas em meio YDC, oxidase negativa, catalase positiva, arginina dihidrolase positiva, produção de ácidos a partir do inositol, sorbitol, sacarose, D-arabinose positivos, motilidade positivo, liquefação da gelatina positivo, crescimento a 37 °C positivo e reação de hipersensibilidade ao tabaco positivo.

Para identificação de colônias suspeitas de *Pseudomonas* spp., isoladas de sementes de trigo, Raab (2014) purificou as colônias em meio de cultura 523 e identificou fazendo-se testes bioquímicos, fisiológicos e de patogenicidade, bem como a utilizou kits comerciais como o Kit Bactray e o sistema de identificação Biolog GEN III Micro-Plate™. Segundo o autor, formaram-se três grupos com características semelhantes, todas do gênero *Pseudomonas* e um dos grupos formado por 67% das amostras, foi identificado como da espécie *P. fuscovaginae* pela reação positiva para oxidase e dihidrolase de arginina, reação positiva para hipersensibilidade em plantas de tabaco e incapacidade de usar 2-ketogluconato e produzir ácido a partir de inositol.

Espécies do gênero ‘*Candidatus Liberibacter*’ como ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’, ‘*Candidatus Liberibacter africanus*’ e ‘*Candidatus Liberibacter americanus*’, são associadas com a doença mais grave da citricultura, o huanglongbing (HLB) e ‘*Candidatus Liberibacter solanacearum*’ é relacionado a doença “Zebra chip” em batatas. Essas bactérias ainda não são cultiváveis e sua identificação é feita por método molecular, usando protocolos

de PCR e para maior especificidade foi desenvolvido um protocolo quantitativo de qPCR baseado na sonda TaqMan, detectando de forma mais específica e sensível que protocolos convencionais de PCR (CHAVES *et al.*, 2023).

4. ATIVIDADES REALIZADAS

O estágio foi desenvolvido em duas etapas. A primeira teve o objetivo de apresentar os diferentes setores que compõem a empresa e as atividades desenvolvidas em cada um. Assim, nesta etapa, que teve um caráter introdutório, houve permanência por uma semana em cada um dos setores: operações, triagem, nematologia, micologia, bacteriologia, biologia molecular e laboratório de sementes. Já a segunda etapa do estágio se concentrou exclusivamente no setor de bacteriologia, com uma abordagem mais aprofundada sobre os processos que ocorrem nesse setor. As atividades desenvolvidas em cada uma das etapas do estágio estão descritas a seguir.

4.1. Primeira etapa - introdução aos setores da empresa

No início da primeira etapa do estágio, foi feita uma apresentação sobre o funcionamento de todos os setores da área técnica da empresa e elaborado um cronograma que previa permanência de cinco dias em cada setor, com o objetivo geral de conhecer a organização de cada local, desde a chegada das amostras até a execução dos ensaios, assim como outras particularidades de cada setor.

4.1.1. Setor de operações

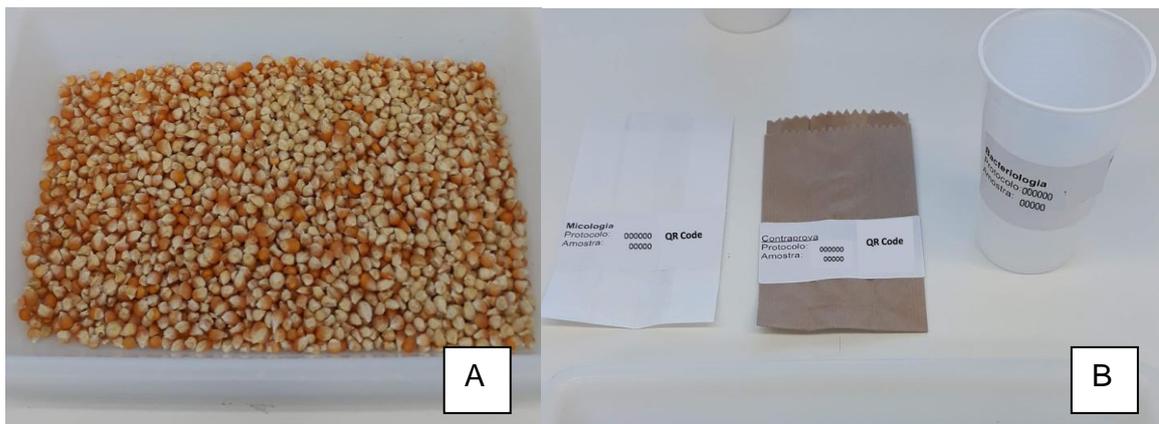
Neste setor, foi realizado o acompanhamento das atividades que consistiam em receber as amostras que chegavam via correio ou transportadora, abrir os pacotes, verificar o material vegetal, o número de amostras, conferir os documentos necessários e as informações relevantes. Posteriormente, procedia-se o cadastramento e a identificação das amostras no Sistema de Gerenciamento do Agrônômica (SGA), que a seguir eram encaminhadas para o setor de triagem.

4.1.2. Setor de triagem

No setor de triagem a amostra recebida passava pela inspeção visual de acordo com as especificações do sistema para verificar a presença de sementes de plantas invasoras, insetos, ácaros, partículas de solo ou estruturas de fungos. Para isso, as amostras são cuidadosamente

abertas e alocadas em bandejas previamente limpas com álcool 70%, seguida de inspeção visual. Caso fossem detectadas impurezas na amostra, o material encontrado era preparado e encaminhado ao setor responsável pela identificação do agente. Após a inspeção, a amostra era dividida em subamostras com etiquetas nomeadas de acordo com o setor em que iria ser analisada, além de uma subamostra como contraprova (Fig. 1).

Figura 1 - Amostra de sementes de milho (A) e recipientes onde foram alocadas as subamostras e contraprova (B). Porto Alegre, 2022.

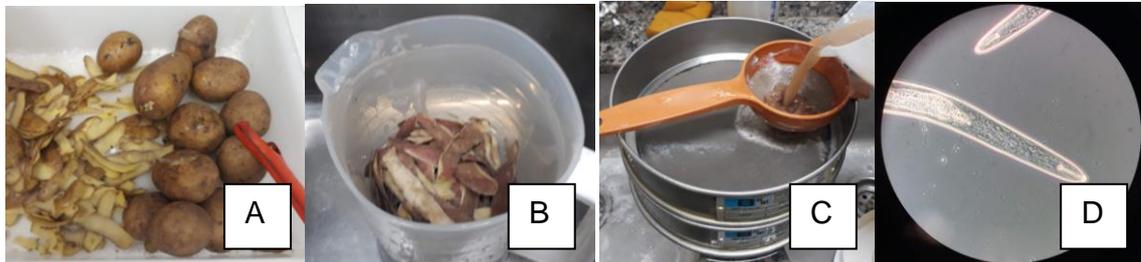


Fonte: A autora, 2022.

4.1.3. Setor de nematologia

Na nematologia foi feita a extração e o acompanhamento da identificação de nematoides. Dois métodos foram utilizados, no método de Coolen & D'Herde, a amostra vegetal (raízes, grãos e sementes), no exemplo tubérculos de batata (Fig. 2A), foram trituradas com água em um liquidificador por cerca de 20 segundos (Fig. 2B). Já no método de Jenkins, usado para solos e substratos, o material é submerso em água por 20 segundos. Após as etapas de trituração ou de submersão, a amostra é peneirada em peneiras de 60 e 500 mesh (Fig. 2C) e o resíduo retido na malha mais fina é alocado em um tubo Falcon com água, onde é adicionado 1 cm³ de caulim, e então centrifugado a 1800 rpm por 5 minutos. O líquido sobrenadante é descartado e adiciona-se 10 mL de sacarose à amostra, que é homogeneizada e novamente centrifugada a 1800 rpm por 1 minuto. A amostra extraída é armazenada em refrigerador até o momento da análise, que é feita por contagem e identificação dos nematoides em uma câmara de Peters, com o uso de um microscópio óptico (Fig. 2D).

Figura 2 - Etapas para preparo de amostra de tubérculos de batata para extração de nematoides pelo método Coolen & D'Herde: batatas parcialmente descascadas (A); amostra no copo do liquidificador (B); amostra depositada nas peneiras de 60 e 500 mesh (C); estruturas de nematoide visualizadas em microscópio óptico (D). Porto Alegre, 2022.



Fonte: A autora, 2022.

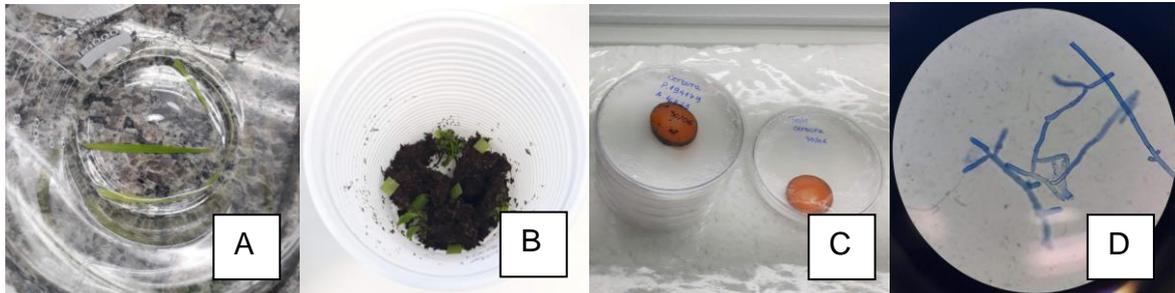
4.1.4. Setor de micologia

No setor de micologia foram processadas amostras empregando três métodos para obtenção de estruturas que permitissem a identificação de fungos: método de incubação em Gerbox (*blotter test*), o uso de iscas biológicas e o de suspensão de lavagem. Além disso, houve acompanhamento da identificação de fungos utilizando microscópio óptico.

O método de *blotter test* consiste na incubação de 400 sementes ou grãos em caixas Gerbox contendo papel filtro umedecido com água deionizada. As caixas eram posteriormente alocadas em câmara de crescimento com fotoperíodo e temperatura controlados, por aproximadamente sete dias. Ao final do período, as amostras eram observadas em um microscópio estereoscópico para verificar as estruturas que se desenvolveram. Em seguida, foi realizada a montagem de amostras em lâminas com corante azul de Amann, para a posterior análise em microscópio óptico.

No método de uso de iscas biológicas, foram empregados pedaços de folhas de braquiária com cerca de 1 cm², os quais foram desinfetados por imersão em álcool 70% por 30 segundos, hipoclorito de sódio por um minuto e três lavagens em água deionizada autoclavada (Fig. 3A). Em seguida, essas folhas foram adicionadas a um copo de 200 mL e homogeneizadas com o material a ser testado (Fig. 3B). O copo foi vedado com parafilme e mantido em câmara de crescimento com fotoperíodo e temperatura controlados. Além da confecção das iscas de braquiária, também foram utilizadas iscas de cenoura (Fig. 3C) e maçã. Após o período de incubação, as estruturas que cresceram nas iscas foram analisadas e montadas em lâmina com corante azul de Amann para observação em microscópio óptico (Fig. 3D).

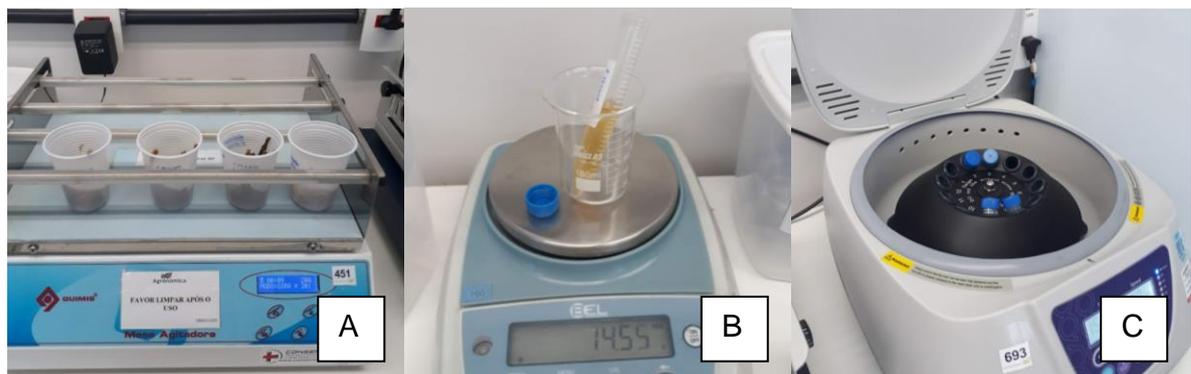
Figura 3 - Assepsia de braquiária (A); homogeneização das iscas com a amostra (B); porções de cenoura utilizadas como isca (C); estruturas fúngicas visualizadas em microscópio óptico (D). Porto Alegre, 2022.



Fonte: A autora, 2022.

Na técnica de suspensão de lavagem, o objetivo é recuperar fungos que estão na superfície do material vegetal. Para isso, a amostra foi colocada em copos de 200 mL, adicionando-se água deionizada estéril. Em seguida, os copos foram colocados em uma mesa agitadora por 10 minutos a 200 rpm (Fig. 4A). A suspensão resultante foi transferida para tubos Falcon de 14 mL (Fig. 4B) e centrifugada a 3000 rpm por 15 minutos (Fig. 4C). Após a centrifugação, os pellets formados foram armazenados em geladeira até o momento da avaliação, quando o material foi depositado em lâmina para a identificação das estruturas do fungo em microscópio óptico.

Figura 4 - Amostras dispostas em copos na mesa agitadora (A); pesagem dos tubos contendo suspensão resultante da centrifugação das amostras (B); centrifugação das suspensões (C). Porto Alegre, 2022.



Fonte: A autora, 2022.

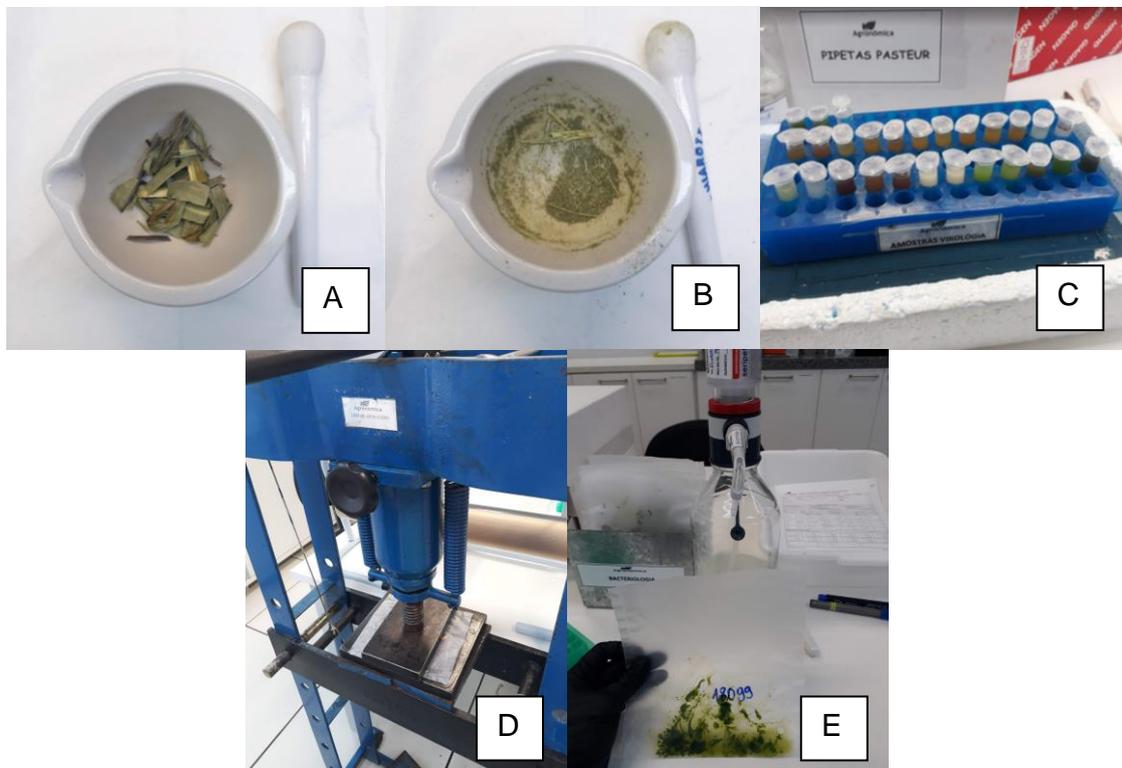
4.1.5. Setor de biologia molecular e virologia

O setor de biologia molecular e virologia é responsável pelo processamento de amostras destinadas à análise da presença de vírus e viroides, mas também recebe materiais de outros setores, para análises que exigem rapidez ou a confirmação de resultados para certas pragas

utilizando técnicas de biologia molecular. Neste setor foi executada a etapa de maceração das amostras e a observação do processo de extração de DNA ou RNA.

A maceração e a extração das amostras foram realizadas utilizando nitrogênio líquido e um gral e pistilo para triturar a amostra (Fig. 5A e B), seguido pelo armazenamento do material em microtubos no freezer. A maceração em nitrogênio líquido permite que as amostras congelem rapidamente, minimizando a degradação de proteínas e ácidos nucleicos. Outro método de processar a amostra é através do uso do tampão PVP, no qual o material vegetal foi triturado em uma prensa hidráulica (Fig. 5D) ou em gral e pistilo, adicionado o tampão e homogeneizado (Fig. 5E) e armazenamento em microtubos (Fig. 5C) na geladeira. O PVP é um polímero que pode se ligar às proteínas, evitando a desnaturação ou a ligação com outras moléculas durante a extração. Ambas as técnicas são utilizadas para minimizar a degradação das moléculas biológicas e manter a sua integridade durante o processo de extração de DNA ou RNA.

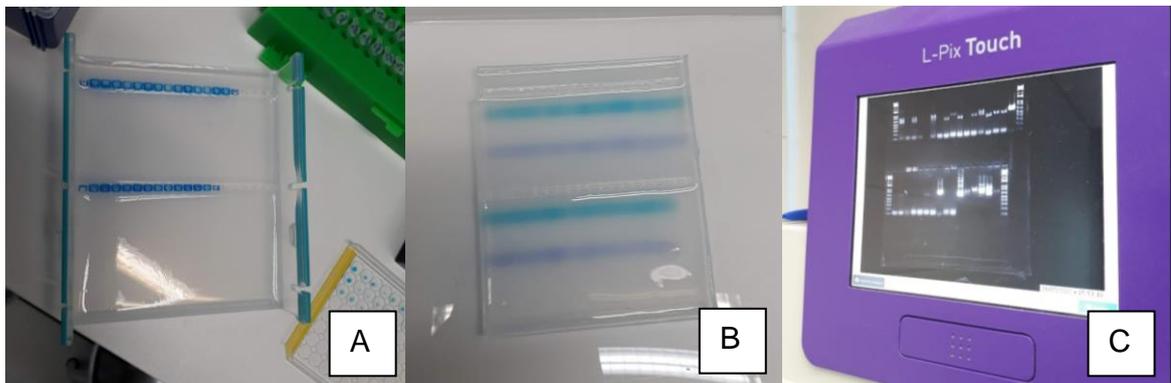
Figura 5 - Amostra em gral pronta maceração (A); amostra macerada em nitrogênio líquido (B); amostras maceradas em tampão PVP e armazenadas em microtubo (C); maceração de amostras em tampão PVP (D); maceração de amostras em prensa hidráulica (E). Porto Alegre, 2022.



Fonte: A autora, 2022.

Após a maceração das amostras, acompanhou-se o processo de extração de DNA ou RNA utilizando os kits Promega® e Qiagen® em uma cabine de fluxo laminar. Em seguida, as amostras foram transferidas para uma sala separada, onde foi preparado o mix contendo enzimas, primer, sonda MgCl₂ e tampão. O mix foi utilizado posteriormente na replicação do material genético nos termocicladores para realização do qPCR/RT-qPCR ou PCR/RT-PCR. O qPCR/RT-qPCR permite a visualização em tempo real dos resultados a cada ciclo, possibilitando a detecção da intensidade de fluorescência emitida durante a amplificação da sequência de DNA de interesse. Para o PCR/RT-PCR, além da termociclagem também foi acompanhada a técnica de eletroforese em gel de agarose, que é utilizada para a identificação de espécies. Inicialmente, preparou-se o gel com "poços" onde foram adicionados os DNAs com corante, juntamente com um marcador de peso molecular nos poços das pontas (Fig. 6A). Em seguida, o gel foi inserido na cuba de eletroforese, a qual foi ajustada nas condições de voltagem e tempo adequados para as amostras. Após a conclusão da eletroforese, o gel foi retirado (Fig. 6B) e colocado sob luz ultravioleta para visualização das bandas de DNA (Fig. 6C), permitindo a determinação dos tamanhos dos fragmentos de DNA analisados por meio da comparação com o marcador de peso molecular.

Figura 6 - Preparação do gel de agarose com o DNA a ser analisado (A); gel após a eletroforese (B); resultado após a exposição à luz ultravioleta (C). Porto Alegre, 2022.



Fonte: A autora, 2022.

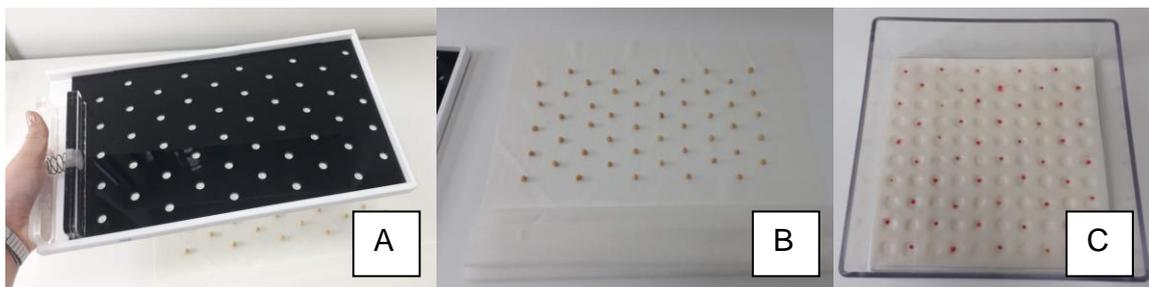
4.1.6. Setor de herbologia e laboratório de análise de sementes

No setor de herbologia acompanhou-se a análise de sementes invasoras advindas das amostras que foram triadas, por meio da identificação visual por morfologia e, quando necessário, enviando o material para identificação por biologia molecular.

No laboratório de análise de sementes, realizaram-se testes de tetrazólio, em sementes de azevém, e testes de germinação em soja e nabo. O de tetrazólio permite identificar danos no embrião. Para isso, as sementes de azevém foram pré-umedecidas e cortadas longitudinalmente para expor o embrião e as partes internas da semente, as quais foram imersas em solução de tetrazólio a 0,5% por 4 a 6 horas sob temperatura controlada de 30 °C, de acordo com a RAS (Regras para Análise de Sementes) (BRASIL, 2009). Embora não tenha sido possível o acompanhamento da avaliação das amostras, a responsável técnica pelo setor mostrou imagens de como as sementes ficam e explicou como é feita a interpretação e classificação das sementes quanto à sua viabilidade.

Foi também realizado teste de germinação de soja, no qual foram utilizadas 400 sementes por amostra. Seguindo o gabarito para disposição das sementes (Fig. 7A), foram dispostas 50 sementes/porção de papel filtro (Fig. 7B), previamente umedecido. Após, o papel foi enrolado e levado para um germinador com temperatura controlada. No teste de germinação de nabo foram utilizadas 400 sementes dispostas em papel filtro umedecido, alocado em caixa Gerbox, colocando 50 sementes por caixa (Fig. 7C). Não houve acompanhamento da avaliação das amostras.

Figura 7 - Gabarito utilizado para dispor as sementes no papel filtro (A); sementes de soja dispostas em papel filtro para germinação em rolo (B); sementes de nabo dispostas em papel filtro para germinação em Gerbox (C). Porto Alegre, 2022.



Fonte: A autora, 2022.

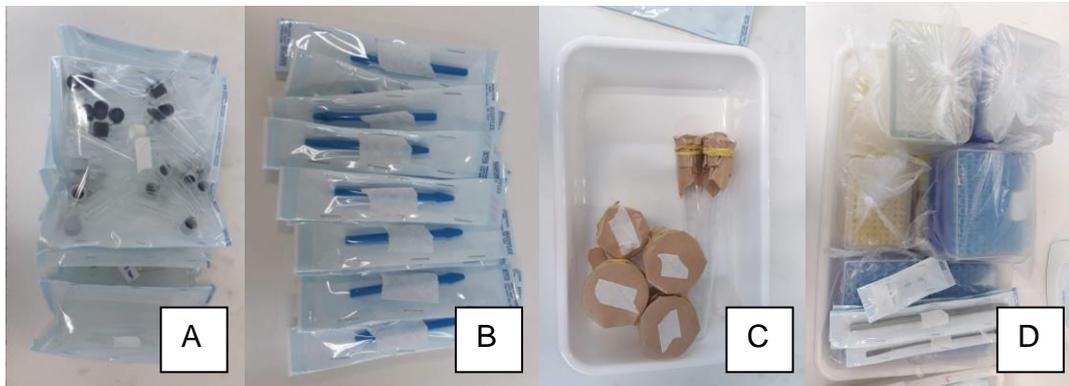
4.1.7. Setor de preparo de materiais

O setor de preparo de materiais é responsável por dar suporte aos demais setores da área técnica. Nele são realizadas validações de insumos, controle e estoque de materiais, esterilização de equipamentos em autoclave, produção de soluções utilizadas nos ensaios, separação de alíquotas de produtos e manutenção e conservação da coleção de agentes biológicos SVG, bem como de materiais de referência para validação de resultados.

Neste setor realizou-se a preparação de materiais para a autoclavagem, lavando vidrarias

e colocando fitas ou alocando-os em embalagens específicas com indicadores de esterilização para confirmar se a autoclavagem foi efetiva (Fig. 8).

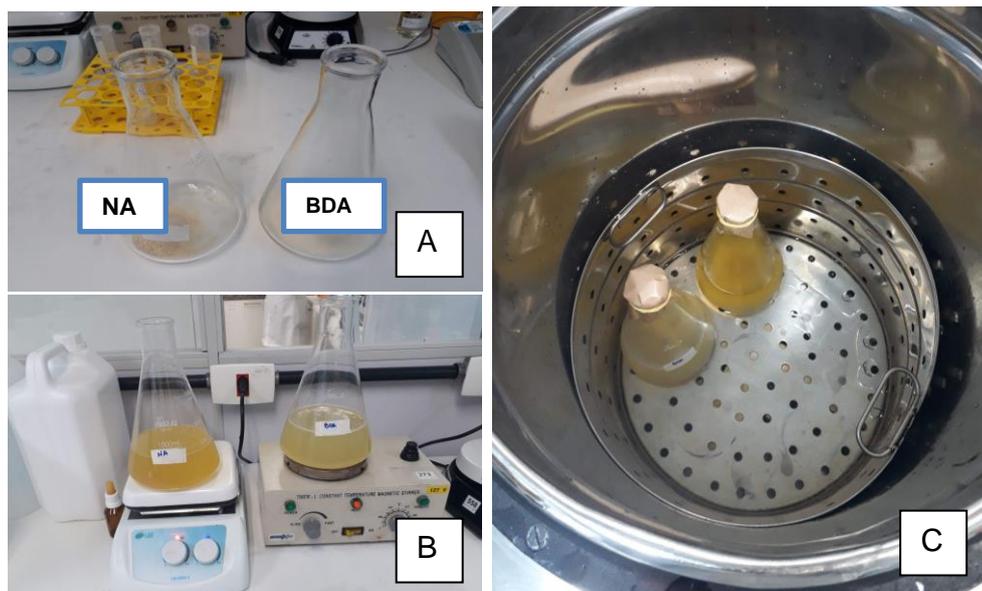
Figura 8 - Materiais prontos para esterilização em autoclave: tubos (A); pistilos (B); provetas (C) e ponteiros (D). Porto Alegre, 2022.



Fonte: A autora, 2022.

Também foi realizado o preparo de meios de cultura NA (Nutriente Ágar) e BDA (Batata-Dextrose-Ágar), (Fig. 9 A), ambos utilizados para o crescimento de bactérias e fungos. Posteriormente os meios foram homogeneizados com barra magnética (Fig. 9B) e posteriormente esterilizados em autoclave (Fig. 9C). Os meios, ainda quentes, foram vertidos em placas de Petri em câmara de fluxo laminar para o cultivo dos agentes biológicos.

Figura 9 - Reagentes colocados em Erlenmeyer (A); homogeneização da mistura com barra magnética (B); autoclavagem de meio de cultura (C). Porto Alegre, 2022.



Fonte: A autora, 2022.

4.1.8. Setor de bacteriologia

Neste setor foi desenvolvida a segunda parte do estágio, desta forma a permanência neste foi por um período maior que nos demais e será descrita no item 4.2.

4.2. Segunda etapa - Setor de Bacteriologia

No setor de bacteriologia, foram realizados o isolamento, cultivo, análise por métodos bioquímicos e envio de amostras para biologia molecular.

4.2.1. Método molecular

Neste método as amostras são preparadas previamente para análise no setor de biologia molecular fazendo-se a maceração e a extração das amostras como descrito no item 4.1.5.

4.2.2. Métodos bioquímicos

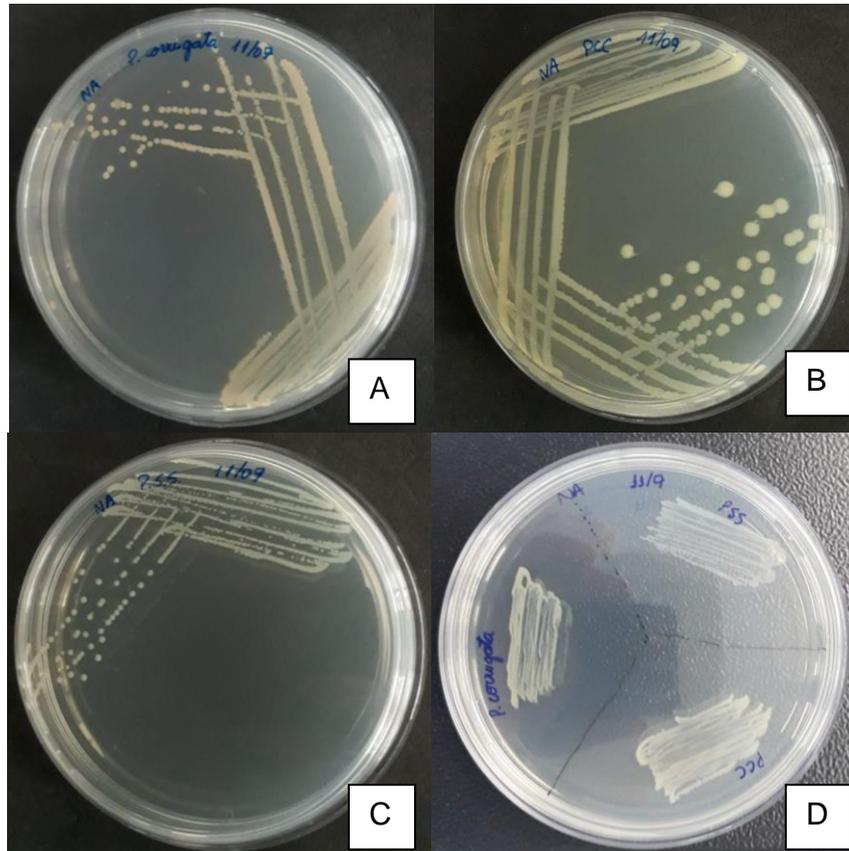
Para chegar até a confirmação por método molecular, são empregados protocolos específicos para isolamento e cultivo de cada espécie bacteriana. Por exemplo, para isolar *Pantoea ananatis* em sementes de milho, pesam-se 50 gramas de sementes que são alocadas em um copo de 500 mL. Em seguida, em fluxo laminar, adiciona-se solução salina até cobrir a amostra que é tampada com papel alumínio, agitada em mesa agitadora por uma hora. O líquido resultante é, então, depositado em estrias (técnica de semeadura representada na (Figs. 10 A, B e C), em meio de cultivo específico para o crescimento e visualização da morfologia de colônias dessa espécie bacteriana. Nesse caso, a solução salina, juntamente com a agitação, auxilia a soltar as bactérias aderidas à superfície das sementes, tornando-as disponíveis no líquido.

Após o crescimento das bactérias no meio de cultivo, é feita avaliação das amostras e caso haja uma colônia com morfologia semelhante às não desejáveis, é feito o repique em tapete da colônia isolada (Fig. 10D) e os testes básicos para confirmação. Esses testes realizados são os de Gram, Catalase e Oxidase. No caso de os resultados dos testes serem iguais às características de alguma espécie não desejável, é feita uma suspensão da bactéria, a qual é encaminhada ao setor de Biologia Molecular para análise (conforme descrito no item 4.1.5).

O teste de Gram é empregado para diferenciar grupos de bactérias Gram-positivas (parede celular espessa) e Gram-negativas (parede celular fina). Para o teste, numa lâmina adiciona-se uma gota de KOH a 3% sobre a amostra (uma porção da colônia suspeita) e com um palito autoclavado é feita a homogeneização do conteúdo levantando o palito até que se forme, ou não, um fio resultante do rompimento da célula de bactérias tipo Gram-negativo que

liberam seu conteúdo, tornando o líquido mais viscoso. No caso de a amostra não se tornar viscosa, considera-se que a bactéria é do tipo Gram-positiva.

Figura 10 - Semeadura de bactérias: método de repique em estrias (A, B e C); método de repique em tapete (D). Porto Alegre, 2022.



Fonte: A autora, 2022.

O teste de Catalase é utilizado para identificar se a bactéria possui a enzima catalase em sua composição. A enzima é responsável pela quebra do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em água (H_2O) e oxigênio (O_2). Para fazer o teste é depositada em lâmina uma porção da bactéria isolada em cultura pura e sobre esta é adicionada uma gota do peróxido de hidrogênio, caso a bactéria produza catalase haverá a formação de bolhas de oxigênio, indicando que o peróxido de hidrogênio foi quebrado. Se não houver a formação de bolhas, considera-se que a bactéria é catalase negativa.

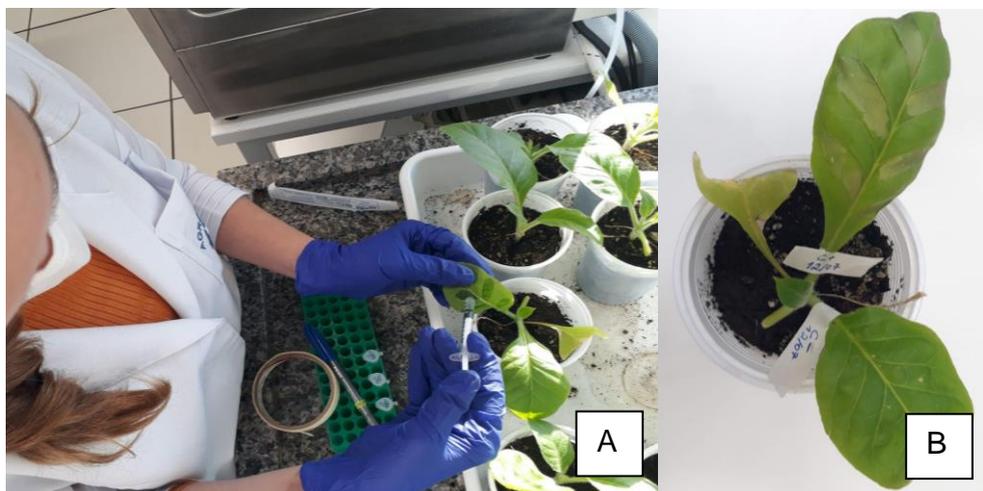
O teste de Oxidase é usado para identificar bactérias que possuem a enzima citocromo oxidase em sua membrana celular. Para este é utilizada uma fita com reagente oxidante e sobre esta é adicionada uma porção da colônia isolada, que ao entrar em contato com a enzima

presente em algumas bactérias produz uma mudança de cor, sendo então a bactéria positiva para a enzima citocromo oxidase.

Para auxiliar na investigação de alguns tipos de bactérias, também são utilizados outros testes bioquímicos como de reação de hipersensibilidade do tabaco, teste de patogenicidade em batata, Levano ou mesmo kits comerciais de testes biológicos como o Kit Bactray, o sistema de identificação Biolog, entre outros.

A reação de hipersensibilidade em folhas de tabaco ocorre por uma reação da defesa de plantas contra a infecção por patógenos, servindo então como um teste de patogenicidade. Durante a reação a planta produz espécies reativas de oxigênio como defesa e acaba danificando suas próprias células. Para este teste, foi usada uma suspensão com uma porção da colônia de interesse diluída em 1 mL de água deionizada esterilizada, um controle em branco somente com água e um controle positivo conhecido. Com o auxílio de uma seringa, as suspensões foram injetadas nas folhas de forma intercalada entre suas nervuras (Fig. 11A), e após 24 horas foram feitas as avaliações das folhas (Fig. 11B).

Figura 11 - Inoculação das colônias bacterianas em folhas de tabaco (A); folha superior de tabaco evidenciando reação positiva de hipersensibilidade e inferior negativa (B). Porto Alegre, 2022.



Fonte: A autora, 2022.

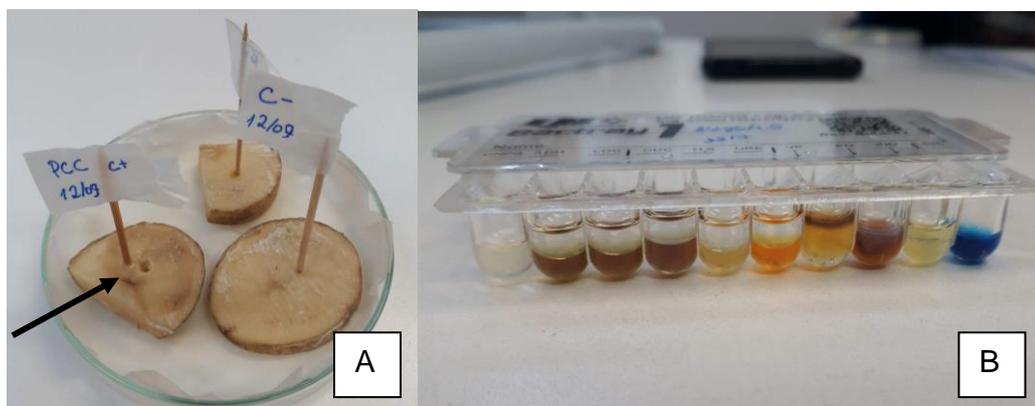
O teste de Levano é feito em meio de cultivo específico contendo levana, onde a colônia é repicada e incubada em estufa a 28 °C para identificar se a bactéria produz o polissacarídeo levana (como as fitobactérias do gênero *Erwinia*) ou não.

Para realizar o teste de patogenicidade em batata foram usadas fatias de batatas cortadas em fluxo laminar e alocadas em câmara úmida com um palito contendo uma porção da colônia de interesse, um controle em branco e um controle positivo conhecido. A câmara foi incubada

em estufa a 28 °C e avaliada depois de 24 horas, sendo considerado teste positivo quando observa-se podridão no local onde o palito com a colônia foi espetado (Fig. 12A).

O BacTray é um sistema para identificação e classificação de bactérias que usa técnicas bioquímicas, enzimáticas e moleculares. O kit tem uma placa compartimentada com diferentes meios de cultura e reagentes (Fig. 12B) onde as colônias são incubadas e são avaliadas as reações enzimáticas e crescimento bacteriano de acordo com as instruções do kit.

Figura 12 - Teste de patogenicidade em batata, seta indica controle positivo com podridão visível na batata (A); placa compartimentada do sistema BacTray (B). Porto Alegre, 2022.



Fonte: A autora, 2022.

4.2.3. Outras atividades

Além do processamento das amostras, também foram realizadas atividades periódicas de descarte de resíduos, como o de perfurocortantes em caixas coletoras específicas, o de resíduos líquidos em bombonas com o conteúdo identificado, o de contaminados em sacos específicos para a empresa responsável pela coleta e o de pilhas e eletrônicos em locais adequados, entre outros.

Foi realizado, semanalmente, o controle microbiológico do ambiente no setor de bacteriologia, expondo placas de Petri com meio BDA e NA em pontos específicos das salas por 15 minutos e posteriormente armazenadas em estufa a 28 °C. Após três e sete dias, as placas de NA e BDA, respectivamente, foram avaliadas para registro e a contagem de colônias.

Uma atividade obrigatória na empresa são os treinamentos de uso de equipamentos do setor de bacteriologia como centrífugas, pipetas, fluxo laminar, prensa hidráulica, homogeneizador tipo *stomacher*, estufas, mesas agitadoras, banho ultrassônico, refrigeradores, entre outros. Também periodicamente são realizadas a limpeza de forma adequada de cada tipo de equipamento e o controle desta atividade.

Ainda houve treinamentos da área de Boas Práticas de Laboratório, promovendo a segurança, qualidade e eficiência no ambiente laboratorial abordando temas como a segurança no manuseio de agentes químicos e biológicos, boas práticas de higiene, uso de equipamentos de proteção individual, armazenamento e descarte de materiais.

5. DISCUSSÃO

De acordo com o Centro de Estudo Avançados em Economia Aplicada da Esalq/UPS, o setor do agronegócio foi responsável por 24,8% do Produto Interno Bruto no ano de 2022. Além da importância econômica, também se destaca a social com a geração de empregos e a promoção da saúde, inter-relacionando a saúde humana, animal, ambiental e a vegetal, reforçando a importância das barreiras fitossanitárias para o controle da disseminação de doenças de plantas.

As análises fitossanitárias, como as feitas no Laboratório Agrônômica, são essenciais para proteger a agricultura contra doenças e pragas que causam perdas de rendimento na produção agrícola. Barreiras fitossanitárias, como quarentenas e inspeções rigorosas, previnem a introdução e disseminação desses organismos prejudiciais (GINDRI *et al.*, 2020).

O MAPA é responsável pela fiscalização e inspeção de produtos vegetais importados para garantir a ausência de riscos sanitários no país. Já em nível estadual, a responsabilidade é das Agências Estaduais. No Brasil, existem 10 laboratórios credenciados pelo MAPA, distribuídos em somente cinco estados, localizados nas regiões Sul, Centro-Oeste e Sudeste. A cooperação entre o MAPA e as Agências Estaduais é fundamental para proteger a saúde das plantas, a integridade da produção agrícola e a segurança dos consumidores.

Em 2018 entrou em vigor a nova versão no Manual VIGIAGRO (BRASIL, 2018), onde constam regras, procedimentos operacionais de controle e fiscalização utilizados nas operações de comércio e trânsito internacional de produtos agropecuários atualizados com novas Instruções Normativas. Um aspecto importante é a qualidade do material vegetal que chega para análise, bem como a coleta amostral para análise deve ser adequada. De acordo com o Manual do VIGIAGRO (BRASIL, 2018), é obrigação do detentor do produto promover as condições necessárias para a amostragem, sendo as amostras transportadas e acondicionadas em embalagens apropriadas com a devida identificação. Da mesma forma, o procedimento de coleta e o tamanho da amostra deverão obedecer às disposições estabelecidas em instruções específicas. Durante o estágio observou-se que algumas amostras que vinham de locais mais

distantes, pelo tempo de deslocamento, chegavam em estado inadequado de conservação, o que poderia comprometer algumas análises.

Como descrito no item 4, Atividades desenvolvidas, os diferentes setores do laboratório utilizam diversas técnicas para detecção e identificação de pragas alvo, recebendo assim, de acordo com as normativas, subamostras, que podem ser coletadas e acondicionadas de formas variadas, como por exemplo, tecidos vegetais macerados cuja amostra deve vir em sacos de extração de ELISA ou sementes que devem ser colocadas em copos descartáveis pois passam por mesa agitadora. Assim, a padronização de ensaios e a elaboração de protocolos confiáveis para a detecção de organismos é essencial para a rotina de laboratório e para que o processo seja mais ágil. Uma atenção especial deve ser tomada para processos que possam ser feitos de forma conjunta, por exemplo, a coleta comum de uma amostra para análise molecular de diferentes patógenos.

Em análises que exigem rapidez, como na liberação de laudos de produtos perecíveis, a utilização de PCR em tempo real pode ser uma boa aliada pois permite chegar ao resultado em pouco tempo com a mesma sensibilidade e confiabilidade que o PCR convencional, tornando o diagnóstico de patógenos mais rápido (CHAVES *et al.*, 2023).

Nos diferentes setores da empresa observou-se o cumprimento das normas ABNT NBR ISO/IEC 17025. Aos setores eram atribuídas responsabilidades gerais e específicas para estar de acordo com as normatizações. Cada setor possuía seus documentos de Protocolo Operacional, bem como instruções técnicas de análises já validadas. O setor de Sistema de Gestão faz regularmente a calibração de equipamentos e a reposição de equipamentos em calibração, verificação de documentos, formulários e procedimentos necessários como ensaios intra e interlaboratoriais para alinhamento e a discussão e desenvolvimento das melhores técnicas disponíveis para as análises. Cada setor tem a responsabilidade da verificação diária da temperatura de equipamentos, aferimento de balanças, controle microbiológico do ambiente e de equipamentos e limpeza periódica de equipamentos.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Durante o estágio foi possível observar os avanços em testes visando a agilidade e precisão dos ensaios, como a padronização da quantidade de DNA em amostras de diferentes protocolos analisados por método molecular, e elaboração de protocolo para análise de três pragas em uma só reação de PCR.

Um ponto relevante e determinante para os resultados das análises processadas pelo laboratório é a qualidade das amostras que chegam, sendo necessário um reforço contínuo de orientação do modo de recolhimento e envio das mesmas, visando que a qualidade do material seja apropriada e que os resultados dos ensaios sejam mais precisos.

Na rotina de laboratório, além da agilidade e rapidez, os ensaios devem ser feitos com muita atenção e cuidado, pois os detalhes são importantes. Além dos procedimentos de manuseio das amostras, os registros também devem ser feitos com cautela pois eles irão garantir a rastreabilidade das amostras.

O diagnóstico fitossanitário é de suma importância para a prevenção da introdução e disseminação de pragas e doenças quarentenárias, que podem causar sérios danos aos cultivos e ao ambiente. Através da detecção precoce e da implementação de medidas de quarentena, é possível evitar a entrada e a disseminação desses organismos indesejáveis, protegendo a agricultura e o meio ambiente.

A conclusão do estágio foi uma experiência enriquecedora e essencial para consolidar os conhecimentos adquiridos ao longo do curso com a oportunidade de aplicar de forma prática aprendizados, especialmente no que diz respeito à sanidade vegetal, um pilar fundamental para o agronegócio brasileiro.

A rotina dinâmica do laboratório, com um grande fluxo de amostras, proporcionou aprendizado na gestão do tempo e na organização das tarefas. O uso de sistemas de gestão foi fundamental para lidar com a demanda constante, permitindo uma maior eficiência no processamento das amostras e na manutenção de registros precisos.

A auditoria realizada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento foi uma oportunidade de compreender a importância do cumprimento rigoroso das regulamentações e padrões de qualidade.

Durante o estágio, houve contato com uma variedade de materiais vegetais, ampliando o entendimento sobre a diversidade das culturas brasileiras e os desafios enfrentados na preservação de sua sanidade. Foi evidente o papel crucial da área de sanidade vegetal na sustentabilidade e no sucesso do agronegócio do país.

Em resumo, o estágio proporcionou uma experiência prática valiosa, permitindo a aplicação dos conhecimentos teóricos, aprimorando habilidades e destacando a relevância da área de sanidade vegetal para o agronegócio brasileiro. A oportunidade de trabalhar em um ambiente de alta demanda e de conformidade com regulamentações rigorosas me preparou para futuros desafios e reforçou minha paixão pela agricultura e suas complexidades.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRASIL. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Vegetal (CGQV). **Consolidação das legislações da Qualidade Vegetal e dos Regulamentos Técnicos de produtos vegetais, subprodutos e resíduos de valor econômico.** Brasília, DF. 2019. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inspecao/produtos-vegetal/legislacao-de-produtos-origem-vegetal/normativos-cgqv/compendio-qualidade-vegetal.pdf>. Acesso em: 12 jun 2023.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Consulta de Produtos de Importação Autorizada.** Brasília, DF. 2020. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/importacao-e-exportacao/importacao/consulta-de-produtos-de-importacao-autorizada>. Acesso em: 12 jun 2023.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Diagnóstico fitossanitário. *In: Laboratórios Credenciados.* Brasília, DF. 2023a. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/lfda/laboratorios-credenciados/laboratorios-credenciados/diagnostico-fitossanitario/diagnostico-fitossanitario>. Acesso em: 12 jun 2023.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Importação de Produtos Vegetais.** Brasília, DF. 2023b. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inspecao/produtos-vegetal/importacao-dipov/importacao-de-produtos-vegetais>. Acesso em: 13 maio 2023.

BRASIL. **Instrução Normativa 39, de 27 de novembro de 2017.** Manual do Vigiagro, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária, 32 p, Brasília, 2018. Disponível em: https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/vigilancia-agropecuaria/arquivos/copy2_of_MANUAL.pdf/view. Acesso em: 16 jun 2023.

BRASIL. Portaria nº 177, de 16 de junho de 2021. Estabelece os procedimentos e critérios para certificação fitossanitária na exportação e na importação de vegetais, partes de vegetais, produtos de origem vegetal e outros artigos regulamentados. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 22 jun. 2021. Seção 1, p. 4.

BRASIL. Anexo da Portaria SDA/MAPA nº 617, de 12 de julho de 2022. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Pragas Quarentenárias Ausentes - PQA. **Diário Oficial da União** Brasília, DF, 12 jul. 2022. Seção 1, p. 9-13.

BRASIL. **Regras para Análise de Sementes.** Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília, DF: Mapa/ACS, 2009. 399p.

BRASIL. **Sanidade vegetal.** *In:* Exigências fitossanitárias. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Brasília, DF. 2023c. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/sanidade-animal-e-vegetal/sanidade-vegetal>. Acesso em: 12 maio 2023.

BRASIL. **Barreiras Sanitárias e Fitosanitárias.** *In:* Barreiras ao Comércio. Ministério das Relações Exteriores. Brasília, DF. 2017. Disponível em: <https://www.gov.br/mre/pt-br/assuntos/politica-externa-comercial-e-economica/barreiras-ao-comercio/barreiras-sanitarias-e-fitossanitarias>. Acesso em: 12 maio 2023.

CANTANHEDE, A. G. G. **ETAPAS E REQUISITOS PARA A CERTIFICAÇÃO FITOSSANITÁRIA DE PRODUTOS VEGETAIS DESTINADOS AO MERCADO INTERNACIONAL**. 2021. Dissertação. Mestrado Profissional em Defesa Sanitária Vegetal. Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, 2021. Disponível em: <https://www.locus.ufv.br/handle/123456789/29258>. Acesso em: 15 maio 2023.

CHAVES, M.Q.G.; MORÁN, F.; BARBÉ, S.; BERTOLINI, E.; ROSA, F.S.; NOALES, E. M. A new and accurate qPCR protocol to detect plant pathogenic bacteria of the genus ‘*Candidatus Liberibacter*’ in plants and insects. **Scientific Reports** n 13, 3338 (2023). <https://doi.org/10.1038/s41598-023-30345-0>

FAO. **Glossary of phytosanitary terms**. ISPM n°5. Roma, Itália, 2022.

FIDELIS, E. G.; LOHMANN, T. R.; SILVA, M. L. da; PARIZZI, P.; BARBOSA, F. F. L. (ed.). **Priorização de pragas quarentenárias ausentes no Brasil**. Brasília, DF: Embrapa, 2018. 510 p. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1108710/priorizacao-de-pragas-quarentenarias-ausentes-no-brasil>. Acesso em: 21 maio 2023.

GINDRI, D. M.; MOREIRA, P. A. B.; VERISSIMO, M. A. A. **Sanidade vegetal: uma estratégia global para eliminar a fome, reduzir a pobreza, proteger o meio ambiente e estimular o desenvolvimento econômico sustentável**. 1. ed. Florianópolis: CIDASC, 2020. 486 p.: il.; color.

GOMES, A. de P. G.; SABAINI, P. S. **Comparação de requisitos para a gestão de qualidade em laboratórios segundo NBR ISO/IEC 17025 e Boas Práticas de Laboratório (BPL)**. Brasília, DF: Embrapa Agroenergia, 2011. 8 p. (Embrapa Agroenergia. Circular técnica, 009).

MAMEDE, M. C.; TEBALDI, N. D. (2020). Detecção de *Pantoea ananatis* em sementes de milho. **Summa Phytopathologica**, 46(1), 36–40. <https://doi.org/10.1590/0100-5405/198561>

RAAB, M. **Detecção e identificação de *Pseudomonas* spp. em sementes de trigo**. 2014. Dissertação. Mestrado em Agronomia. Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2014.

SAVARY, S.; FICKE, A.; AUBERTOT, J. N.; HOLLIE, C. Crop losses due to diseases and their implications for global food production losses and food security. **Food Security**. 2012;4:519–537. <https://doi.org/10.1007/s12571-012-0200-5>

SCALA, V.; PUCCI, N.; LORETI, S. The diagnosis of plant pathogenic bacteria: a state of art. **Frontiers in Bioscience** (Elite Ed) 2018, 10(3), 449–460. <https://doi.org/10.2741/E832>

SHARMA, D.; SINGH, Y. Characterization of *Ralstonia solanacearum* isolates using biochemical, cultural, molecular methods and pathogenicity tests. **J Pharmacogn Phytochem** 2019;8(4):2884-2889. Disponível em: <https://www.phytojournal.com/archives/2019/vol8issue4/PartAU/8-4-392-512.pdf>. Acesso em: 04 jun 2023.

STEILMANN, P.; DENARDIN, N. D.; RAAB, M.; MENEZES, A. C.; DESTEFANO, S. A. L. DETECÇÃO, QUANTIFICAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE FITOBACTÉRIAS EM SEMENTES DE TRIGO. **Nativa**, [S. l.], v. 7, n. 4, p. 349-355, 2019. DOI: 10.31413/nativa.v7i4.6710. Disponível em: <https://periodicoscientificos.ufmt.br/ojs/index.php/nativa/article/view/6710>. Acesso em: 29 maio. 2023.