

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA - CAMPUS CURITIBANOS

ALEXANDRE FRANÇA PIRES

**ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE PLANTAS MEDICINAIS SOBRE O
DESENVOLVIMENTO DE *Fusarium graminearum* E *Fusarium verticillioides*
ISOLADOS DE GRÃOS DE MILHO**

CURITIBANOS - SC

JUNHO/2013

ALEXANDRE FRANÇA PIRES

**ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE PLANTAS MEDICINAIS SOBRE O
DESENVOLVIMENTO DE *Fusarium graminearum* E *Fusarium verticillioides*
ISOLADOS DE GRÃOS DE MILHO**

Projeto de pesquisa apresentado a Universidade Federal de Santa Catarina – Campus Curitibanos, sob orientação da Prof.^a Dr.^a Adriana Terumi Itako e Prof.^a Lillian Kelly Granemann como requisito para elaboração da monografia de conclusão de curso.

CURITIBANOS - SC

JUNHO/2013

RESUMO

O milho (*Zea mays*) é uma gramínea pertencente à família Poaceae e essa espécie ocupa grande parte das atividades agropecuárias no Brasil. O manejo inadequado da cultura pode ocasionar o aumento das doenças como, por exemplo, *Fusarium verticillioides* e *Fusarium graminearum*. Atualmente, o uso intensivo de formulados químicos para controle de doenças vem causando danos à saúde humana e danos ambientais. Com isso, vem se estudando métodos alternativos de controle que teve por objetivo controlar doenças e pragas, mas sem ter o mesmo efeito problemático dos defensivos agrícolas. A busca de substitutos para estes produtos sintéticos, tem se encontrado nas plantas medicinais que podem ser uma alternativa de interesse econômico e ecológico bastante promissor. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antifúngica *in vitro* dos extratos brutos de plantas medicinais *Allium sativum*, *Senecio brasiliensis*, *Baccharis trimera* e *Rosmarinus officinalis* sobre o desenvolvimento de *Fusarium graminearum* e *Fusarium verticillioides* e o efeito desses extratos sobre a germinação e desenvolvimento de plântulas de milho. Os resultados a serem obtidos com o desenvolvimento do projeto fornecerão o conhecimento dos potenciais efeitos fungitóxicos dos extratos aquosos das plantas medicinais sobre o desenvolvimento dos fungos *Fusarium graminearum* e *Fusarium verticillioides*. A proposta do projeto será oferecida para pequenos produtores interessados em produzir produtos orgânicos. Resultando em alimentos mais saudáveis, maior produtividade, aumento da renda do produtor e menor risco de contaminação do meio ambiente.

Palavras-chave: *Fusarium graminearum*, *Fusarium verticillioides*, milho, Extratos Brutos Aquosos e Controle Alternativo.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	5
2. JUSTIFICATIVA.....	6
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	7
3.1. Cultura do Milho	7
3.2. Fungos Fitopatogênicos: <i>Fusarium graminearum</i> e <i>Fusarium verticillioides</i>	8
3.3. Controle de espécies do gênero <i>Fusarium</i>	10
3.4. Métodos alternativos de controle de doenças em plantas.....	11
3.5. Plantas medicinais no controle de fitopatógenos	12
4. OBJETIVOS	14
4.1. Objetivo Geral	14
4.2. Objetivos Específicos.....	14
5. METODOLOGIA	15
5.1. Obtenção dos fungos <i>Fusarium graminearum</i> e <i>Fusarium verticillioides</i>	15
5.2. Obtenção dos EBA (Extratos Brutos Aquosos)	15
5.3. Avaliação do crescimento micelial.....	15
5.4. Contagem e avaliação da germinação dos conídios	16
5.5. Avaliação da germinação das sementes inoculadas artificialmente com <i>F. graminearum</i> e <i>F. verticillioides</i> tratadas com extratos vegetais.....	17
5.6. Avaliação do desenvolvimento de plântulas a partir de sementes inoculadas artificialmente com <i>Fusarium graminearum</i> e <i>Fusarium verticillioides</i> tratadas com extratos vegetais.....	18
6. RESULTADOS ESPERADOS	19
7. CRONOGRAMA	20
8. ORÇAMENTO	21
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	23
ANEXO A - Produtos derivados do milho ou que contêm seus componentes isolados ou transformados industrialmente.....	26

1. INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays*) é uma gramínea pertencente à família Poaceae e essa espécie ocupa grande parte das atividades agropecuárias rurais, por ser a mais produzida. O aumento de sistemas de plantio direto, a ampliação do uso de sistemas de irrigação e as utilizações de espécie suscetíveis podem estar relacionados com o aumento das doenças na cultura do milho.

Como exemplo de espécies de fungo mais amplamente distribuído na cultura do milho pode-se citar as espécies de *Fusarium verticillioides* e *Fusarium graminearum*. Essas espécies causam diversos problemas como morte de plântulas, podridão de espiga, podridão de colmo, podendo levar a reduções na produtividade e na qualidade dos grãos. Além de essas espécies causarem danos na planta, também podem causar intoxicação alimentar em animais e seres humanos, através de micotoxinas como a fumonisina.

Há praticamente meio século, vem se utilizado defensivos químicos para o controle de pragas e doenças. O uso excessivo desses formulados vem causando através dos tempos danos à saúde humana e danos ambientais. Os métodos de controle alternativo têm o objetivo de controlar doenças e pragas, sem ter o mesmo efeito problemático dos defensivos agrícolas.

Um dos métodos que vem sendo utilizado é a exploração de compostos provenientes de extratos brutos ou óleos essenciais de plantas medicinais que podem induzir a resistência de plantas como podem também ter um efeito tóxico sobre o patógeno.

2. JUSTIFICATIVA

Nos últimos anos, o controle das doenças na agricultura tem aumentado intensivamente, sendo realizado basicamente através do emprego de defensivos agrícolas, que geram altos custos e riscos ambientais (desequilíbrio ecológico) e toxicológicos (elevada concentração nos alimentos). Também tem se verificado que o uso intenso desses defensivos tem aumentado a resistência de fitopatógenos, pragas e plantas daninhas a certos agrotóxicos.

A busca de substitutos para estes produtos sintéticos, tem encontrado nas plantas medicinais uma alternativa de interesse econômico e ecológico bastante promissor. O uso de extratos vegetais e óleos essenciais, por exemplo, têm sido fonte de inúmeras pesquisas que comprovam sua eficácia. E o emprego desses extratos e óleos essenciais pode ser uma forma mais sustentável para o uso em pequenas propriedades rurais.

Atualmente, tem se verificado poucos estudos sobre o uso do método de controle alternativo através de plantas medicinais sobre os fitopatógenos *Fusarium graminearum* e *Fusarium verticillioides*, os quais podem ocasionar grandes perdas em áreas produtoras de grãos e também problemas relacionados com a intoxicação alimentar por animais e seres humanos através das micotoxinas sintetizadas por ambos os fungos. Além de produzir micotoxinas estes fitopatógenos causam reduções no rendimento de grãos, redução do poder germinativo e do vigor das sementes.

Diante disso, o intuito deste projeto é de avaliar as propriedades fungitóxicas de plantas encontradas na região de Curitibanos – Santa Catarina como o Alecrim (*Rosmarinus officinalis*), Alho (*Allium sativum*), Carqueja (*Baccharis trimera*) e Maria-mole (*Senecio brasiliensis*) sobre desenvolvimento *in vitro* dos fungos fitopatogênicos *Fusarium graminearum* e *Fusarium verticillioides* e no controle desses fungos na cultura do milho.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. Cultura do Milho

O milho é uma gramínea pertencente à família Poaceae e sua espécie é a *Zea mays* L. Todos os milhos cultivados estão incluídos nessa única espécie, e pertencem à tribo Maydeae, que possui sete gêneros, dos quais dois são nativos do hemisfério ocidental (*Zea* e *Tripsacum*) e cinco da Ásia. (MAGALHÃES; SOUZA, 2013)

A cultura do milho ocupa a posição de destaque entre as atividades agropecuárias rurais do Brasil, por ser a mais frequente nas propriedades rurais e por seu valor de produção. De acordo com o levantamento da Conab (2013), o Brasil possui o correspondente a 15,6 milhões de hectares de área plantada de milho, o maior estado de área de plantada é o estado de Mato Grosso que apresenta uma área de 3,3 milhões de hectares; o Estado de Santa Catarina apresenta 500 mil hectares de área de plantada. Em relação à produção, o Brasil produziu até Abril/2013 77,4 milhões de toneladas, em função do aumento da área plantada em alguns estados. O maior produtor de milho no Brasil é o estado de Paraná que esse ano se espera produzir 18,8 milhões de toneladas de milho e o estado de Santa Catarina se espera a produção de 3,3 milhões de toneladas.

O milho é considerado um alimento energético para as dietas humana e animal, devido à sua composição de altas concentrações de carboidratos (amido) e lipídeos (óleo). O óleo de milho possui uma composição de ácidos graxos, que na qual tem importância na dieta humana que ajuda na prevenção de doenças cardiovasculares e o no combate ao colesterol sérico elevado. Outro importante aspecto dos lipídeos no milho está relacionado ao conteúdo dos tocoferóis (vitamina E) e dos carotenóides. Essas substâncias são importantes na coloração da carne de aves e gema dos ovos, propriedades de importância comercial na cadeia produtiva de aves. (PAES, 2006)

Segundo Paes (2006) as utilizações do milho no mundo vão desde a alimentação humana e animal e estendendo as indústrias químicas, farmacêuticas, de papéis, têxtil, entre outras de aplicação ainda mais nobres, no Anexo A, mostra as principais produtos derivados do milho.

Além do milho comum também existem as populações crioulas, também conhecidas como raças locais ou *landraces*, essas raças comparadas ao milho comercial é menos produtivo, mas essas variedades apresentam teores nutricionais melhores como também

variabilidade genética, resistentes e adaptadas ao ambiente de origem. (SANDRI; TOFANELLI, 2008)

Com a expansão da cultura do milho para novas áreas também houve contribuição para o aumento do potencial de inóculo de patógenos. A utilização do sistema plantio direto, associado ao seu manejo incorreto, ou seja, sem levar em consideração a necessidade de se associar a prática de rotação de culturas, também contribuíram para o aumento na incidência e severidade de doenças, principalmente doenças fúngicas. Além desses fatores, a ampliação do uso de sistemas de irrigação, as aberturas de novas áreas e as utilizações de genótipos suscetíveis também podem estar relacionadas ao aumento da severidade das doenças na cultura do milho. (CRUZ et al., 2011)

3.2. Fungos Fitopatogênicos: *Fusarium graminearum* e *Fusarium verticillioides*

Nos últimos anos tem se tornado evidente o fato de uma variedade milho recém-lançada estar infectada por doenças no início do cultivo. Muitas dessas doenças são transmitidas pelas próprias sementes que podem carregar consigo fungos e bactérias que reduzem a germinação e provocam a formação de plântulas debilitadas, praticamente inviáveis. Como consequência há prejuízos quanto à qualidade e quantidade do produto colhido. (TOLEDO; MARCOS FILHO, 1977)

Segundo Hirooka (2000) e BERND, (2006) o *Fusarium* spp. é um gênero de fungos amplamente disseminado em plantas nativas e cultivadas, mas a importância se deve à atuação como patógeno primário de milho a nível cosmopolita, sendo responsável pela perda econômica de centenas de milhões de dólares.

Segundo Leslie e Summerell (2006), um estudo realizado pela *American Phytopathological Society* (APS) revelou que existem entre 81 a 101 plantas de interesse econômico estão associadas ao gênero de *Fusarium* spp..

Os fungos do gênero *Fusarium* são conhecidos como um dos maiores problemas na agricultura e, se encontram entre os mais importantes patógenos de plantas do mundo. Grãos infectados com *Fusarium* spp. diminui a qualidade e o valor econômico, além de contribuir para perdas nutricionais da semente, induzindo doenças e redução da performance em humanos e animais. (BERND, 2006)

Segundo Munkvold (2003 *apud* KUNEH JÚNIOR et al., 2013), as principais e mais importantes espécies do gênero *Fusarium* da cultura do milho são conhecidos como *Fusarium verticillioides* e *Fusarium graminearum*. Essas espécies causam diversos problemas como podridão radicular, morte de plântulas, podridão de espiga, podridão de colmo, podendo levar a reduções na produtividade e qualidade de grãos em todo o mundo. Munkvold & Desjardins (1997 *apud* KUNEH JÚNIOR et al., 2013) descreve que ambas as espécies são capazes de produzir micotoxinas, sendo que as fumonisinas são mais comumente associadas com *F. verticillioides* e desoxinivalenol (DON) e nivalenol (NIV), do grupo tricoteceno do tipo B, com *F. graminearum*.

As principais características morfológicas do *F. graminearum*, são colônias que crescem rapidamente e produzem quantidades relativamente grandes de micélio que variam de branca a uma coloração de laranja pálida. Os macroconídios são relativamente delgados, em forma de foice e de paredes quase em linha reta, com presença de 5 a 6-septos. O *F. graminearum* não apresenta microconídios. (LESLIE & SUMMERELL, 2006)

O *F. verticillioides* apresentam inicialmente culturas de micélio de coloração branca, mas pode desenvolver pigmentos violetas ou alaranjado com a idade. Os macroconídios podem ser raros em alguns isolados e microconídios são ovais em forma de taco com uma base achatada não apresentando septos. (LESLIE & SUMMERELL, 2006)

Segundo Norred e Voss (1994 *apud* FIGUEIRA et al., 2003) um dos principais problemas dos fungos do gênero *Fusarium* é a micotoxina fumonisina. A fumonisina causa perdas econômicas na avicultura, suinocultura e equinocultura, além de provável dano à saúde humana.

Segundo Marasas et al. (1998 *apud* FIGUEIRA et al., 2003), a fumonisina causa diversas enfermidades em equinos, principalmente é comum apresentar leucoencefalomalácia com alta letalidade e mortalidade, primeiramente demonstrada pela administração intravenosa de FB₁.

Segundo Dilkin et al. (2004) suínos que consomem pelo menos 30 mg de FB₁.kg⁻¹ na ração apresentam edema pulmonar após 20 dias, culminando com a morte dos suínos intoxicados e diminuição da conversão alimentar e ganho de peso. Os órgãos mais atingidos são o pulmão, o fígado e o coração.

Marijanovic et al. (1991 *apud* FIGUEIRA et al., 2003), relata que em aves a fumonisina pode causar diarreia, perda de peso/desenvolvimento corporal, aumento hepático e imunossupressão.

Estudos realizados pela IARC (*International Agency for Research on Cancer*) citam que em locais na África do Sul e China, onde houve ingestão de alimentos contaminados com fumonisina, pessoas apresentaram câncer no esôfago. (IARC, 2013)

3.3. Controle de espécies do gênero *Fusarium*

A agricultura é praticada pela humanidade há mais de dez mil anos, e o uso intensivo de defensivos agrícolas para o controle de doenças das lavouras existe há pouco mais de meio século. Diversas políticas foram implementadas em todo o mundo para expandir e assegurar este mercado. A pesquisa agropecuária voltou-se para o desenvolvimento de sementes selecionadas para responder a aplicações de adubos químicos e defensivos em sistemas de monoculturas altamente mecanizados. (LONDRES, 2011)

Nos últimos anos, a sociedade vem se preocupando com o uso intensivo e indiscriminado de produtos químicos que causam diversos problemas ao meio ambiente e ao homem, como a contaminação de águas, solos, animais e alimentos; a intoxicação de agricultores; a eliminação de microrganismos responsáveis pela degradação da matéria orgânica ou de organismos utilizados em programas de controle biológico. Também se verifica uma crescente resistência de fitopatógenos, pragas e plantas daninhas a produtos químicos. (SPADOTTO et al., 2004; LONDRES, 2011)

Segundo Pereira (1986 *apud* VON PINHO et al., 1995) menciona os formulados com o princípio ativo captana como os produtos mais amplamente utilizados pelas empresas produtoras no tratamento de sementes de milho para controle de doenças do gênero *Fusarium*.

Os fungicidas com o princípio ativo captana são classificados como produtos extremamente tóxicos (GRISOLIA, 2005). Reuber (1989 *apud* GRISOLIA, 2005) avaliou o potencial carcinogênico desse produto em ratos e camundongos, como resultado do experimento observou-se aparecimento de tumores benignos e malignos, tanto em doses baixas como em altas. De acordo com Grisolia (2005), devido ao problema carcinogênico, os fungicidas com esse princípio ativo deveriam ser proibidos para a venda e produção no território brasileiro.

3.4. Métodos alternativos de controle de doenças em plantas

Segundo Bettiol (2013), a criação de métodos alternativos para o controle de doenças de plantas tem por finalidade oferecer alternativas para se diminuir a dependência dos defensivos agrícolas e contribuir para uma prática de uma agricultura que seja mais adequada às novas exigências de qualidade ambiental e de qualidade de vida da sociedade moderna.

Segundo Venzon, Júnior e Pallini (2006), o controle alternativo pode ser entendido como a integração de medidas ambientais, visando à redução de doenças e ao aumento da produção, da produtividade e da qualidade dos produtos agrícolas. Existem diversos tipos métodos alternativos de controles dentre eles o controle biológico, físico, resistência genética, etc.

Atualmente, um dos métodos que vem crescendo e se expandindo comercialmente é o método alternativo de controle biológico. Segundo Grigoletti Júnior, Santos e Auer (2000, pg. 2), descrevem o controle biológico como:

O controle biológico visa manter, através de certas práticas, um equilíbrio no agroecossistema, de modo que o hospedeiro, na presença do patógeno, não sofra danos significativos, em função da ação controladora dos organismos não patogênicos do sistema.

Um estudo realizado por Louzada et al. (2009), avaliou-se o controle biológico com *Trichoderma* spp. sobre o fungo do gênero *Fusarium* spp., foram realizados testes com 230 espécies de *Trichoderma* somente 50 espécies inibiram o crescimento do o fungo do gênero *Fusarium*. O controle ocorreu através do enrolamento das hifas do *Fusarium* por *Trichoderma* causando uma interação de competição desses microrganismos, causando inibição.

Outro método de controle comum é pelo método físico, que envolve processos como a refrigeração, solarização, radiação e outros. Segundo Tanaka (2001), experimento realizado com *Fusarium moniliforme* (sin. *Fusarium verticillioides*) através do armazenamento em câmara fria e outra em temperatura ambiente. Resultou eficiência no controle físico em baixas temperaturas, em relação ao outro tratamento. Mas não ocorreu eliminação total dos patógenos em baixas temperaturas, esse controle físico diminui o seu crescimento e disseminação.

O controle alternativo pelo uso das plantas medicinais no controle de doenças, consiste no uso de extrato bruto ou óleo essencial obtidos a partir destas plantas na qual apresentam

ação fungitóxica, inibindo o crescimento micelial e a germinação de esporos, quanto pela indução de fitoalexinas, indicando a presença de composto(s) com característica de elicitor(es). (STANGARLIN et al., 1999; SCHWAN-ESTRADA e STANGARLIN, 2005)

Dentre todos os métodos alternativos de controle, a utilização de extratos e óleos essenciais de plantas medicinais pode ser uma opção viável, em relação do ponto de vista econômico e principalmente ambiental. (RODRIGUES et al., 2006)

3.5. Plantas medicinais no controle de fitopatógenos

Segundo a OMS (1998 *apud* VEIGA JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005), define as plantas medicinais como todo e qualquer vegetal que possui, em um ou mais órgãos, substâncias que podem ser utilizadas com fins terapêuticos. As plantas com fins medicinais são amplamente utilizadas para tratamento, cura e prevenção de doenças e são uma das mais antigas formas de prática medicinal da humanidade.

As plantas medicinais produzem grande quantidade de substâncias biologicamente ativas, ou seja, substâncias que influenciam de alguma maneira na alteração metabólica de um determinado organismo. Essas substâncias podem ter de três atividades, do ponto de vista fitossanitário: pode ter atividade antimicrobiana, onde vai ocorrer a inibição do crescimento micelial, da germinação de esporos ou pela multiplicação das bactérias ou outros fitopatógenos; atividade de induzir a resistência, pois existem moléculas bioativas capazes de induzir ou ativar os mecanismos de defesa da planta; e também os chamados “bioestimulantes” do crescimento da planta. (STADNIK; TALAMINI, 2004)

Pesquisas relacionadas ao uso de extratos e/ou óleos essenciais tem demonstrado a viabilidade de utilizar este produto natural para o controle de doenças de plantas. Extratos como o de arruda (*Ruta graveolens*), carqueja (*Baccharis trimera*) e alfavaca (*Ocimum basilicum*) tiveram efeitos significativos na inibição do desenvolvimento de *Sclerotinia rofsii*, *Alternaria alternata*, *Rhizoctonia solani*, *Phytophthora* sp. e *Colletotrichum graminicola* (STANGARLIN et al., 1999).

Raja e Kurucheve (1998) e Singh e Rai (2000) verificaram que o extrato de cúrcuma inibiu o crescimento micelial de *Fusarium udum* (Berk.) Wollenw e a germinação *in vitro* de escleródios de *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid, respectivamente.

Itako et al. (2008) utilizando as plantas medicinais *Artemisia camphorata*, *Cymbopogon citratus* e *Rosmarinus officinalis* no controle fúngico de *Alternaria solani* causador da doença pinta preta no tomateiro, verificaram *in vitro* que com o aumento das concentrações de extratos brutos aquosos ocorreu diminuição da esporulação e germinação dos conídios.

Bonett et al. (2012), descreve que o óleo essencial extraído *B. trimera*, apresentou capacidade de inibir 100% o crescimento do *Colletotrichum gloeosporioides*, mostrando eficiência na inibição do crescimento.

Uma espécie de planta largamente utilizada e estudada na terapêutica humana e que apresenta resultados promissores também como produto fitossanitário natural é o alho (*Allium sativum*). A extração das substâncias do bulbo do alho especialmente a alicina ativa ações de inseticida, repelente, bactericida, fungicida e nematicida do extrato de alho. (STADNIK; TALAMINI, 2004)

Um estudo relata a influência de diferentes concentrações de extratos de alho (*A. sativum*) e Capim-santo (*Cymbopogon citratus*) no crescimento vegetativo de *Fusarium proliferatum*, se observou diferenças na velocidade do crescimento e no diâmetro máximo das colônias. (SOUZA; ARAÚJO; NASCIMENTO, 2007)

Em trabalhos *in vitro* o extrato bruto aquoso de *R. officinalis* também conhecido popularmente como alecrim, apresentou 54% de inibição sobre o crescimento de *Exserohilum turcicum*. (SCAPIN et al., 2010)

A idéia geral do controle alternativo utilizando plantas medicinais é a utilização de óleos essenciais ou do extrato bruto, podendo ser considerada uma tecnologia viável para pequenos produtores rurais, ou para aqueles interessados no cultivo orgânico. Além disso, o agricultor terá a sua disposição as plantas medicinais que poderão ser comercializadas ou utilizadas com outras finalidades. (STANGARLIN et al., 1999)

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo Geral

Avaliar a atividade antifúngica *in vitro* dos extratos brutos de plantas medicinais *Allium sativum*, *Senecio brasiliensis*, *Baccharis trimera* e *Rosmarinus officinalis* sobre o desenvolvimento de *Fusarium graminearum* e *Fusarium verticillioides* e o efeito desses extratos sobre a germinação e desenvolvimento de plântulas de milho.

4.2. Objetivos Específicos

- Avaliar crescimento micelial em meio de cultura dos fungos, em diferentes concentrações dos extratos de *Allium sativum*, *Senecio brasiliensis*, *Baccharis trimera* e *Rosmarinus officinalis*.
- Avaliar a germinação e a esporulação dos conídios de *Fusarium graminearum* e *Fusarium verticillioides*;
- Avaliar a germinação de sementes de milho inoculadas artificialmente com *Fusarium verticillioides* e *Fusarium graminearum* tratadas com os extratos das plantas medicinais;
- Avaliar o desenvolvimento de sintomas de *Fusarium graminearum* e *Fusarium verticillioides* em plântulas de milho

5. METODOLOGIA

5.1. Obtenção dos fungos *Fusarium graminearum* e *Fusarium verticillioides*

O isolado fúngico de *Fusarium graminearum* será obtido da Universidade Estadual de Santa Catarina- UDESC, no Departamento de Fitopatologia pelo Professor Dr. Ricardo Trezzi Casa. Após a obtenção do isolado, o mesmo será cultivado em meio de cultura BDA e mantido a 25^oC e fotoperíodo de 12 horas.

O isolado fúngico de *Fusarium verticillioides* será obtido de grãos de milho cedido do Projeto de Identificação e Resgate de Sementes Crioulas na região Serrana de Santa Catarina coordenado pelo Professor Dr. Lírío Luiz Dal Vesco. Os grãos de milho que apresentarem sinais de presença de *Fusarium verticillioides* serão submetidos a isolamento do patógeno. Após a obtenção do isolado, o mesmo será cultivado em meio de cultura BDA e mantido a 25^oC e fotoperíodo de 12 horas.

5.2. Obtenção dos EBA (Extratos Brutos Aquosos)

O Alho (*Allium sativum*) será adquirido de áreas produtoras da região de Curitiba-SC. Já as plantas de Maria-Mole (*Senecio brasiliensis*), Alecrim (*Rosmarinus officinalis*) e Carqueja (*Baccharis trimera*) serão obtidas da Horta de Plantas Medicinais localizado na Universidade Federal de Santa Catarina – Campus Curitiba.

Folhas frescas das plantas medicinais e os bulbilhos serão triturados em caldo de batata por 3 min. em liquidificador, separadamente. Os homogenatos resultantes serão filtrados em gaze e autoclavados, obtendo-se o extrato aquoso bruto. Cada extrato bruto será testado individualmente, nas concentrações de 0, 10, 20 e 30 %.

5.3. Avaliação do crescimento micelial

Os extratos brutos serão incorporados ao meio de cultura nas devidas concentrações e distribuídos em placa de Petri. Após a sua solidificação, um disco de micélio (5 mm de diâmetro) de *F.graminearum* e de *F. verticillioides*, com 10 dias de idade, será repicado para o centro de cada placa, que serão vedadas e incubadas em câmara de crescimento.

As avaliações serão realizadas diariamente, através da medição do diâmetro das colônias previamente marcadas na parte externa do fundo das placas (média de duas medidas

diametralmente opostas), cada placa corresponderá a uma repetição. As medidas serão efetuadas, até que o tratamento controle crecça por todo o diâmetro da placa. Para o cálculo da porcentagem de inibição do crescimento (PIC) micelial será utilizada a fórmula descrita por Bastos (1997).

O delineamento experimental será inteiramente casualizado (DIC) no esquema fatorial 4 x 4 (quatro plantas medicinais e quatro doses) e quatro repetições. Cada parcela será constituída por uma placa de Petri. Os dados serão submetidos à análise de variância, e em seguida, análise de regressão para as doses a 5% de probabilidade.

5.4. Contagem e avaliação da germinação dos conídios

A avaliação de esporulação dos conídios de *F. graminearum* e *F. verticillioides* será feita utilizando a câmara de Neubauer. (ALFENAS; MAFIA, 2007)

A contagem será feita via uma suspensão de conídios obtidos das placas de Petri do experimento da avaliação do crescimento micelial. Serão adicionados 20 mL de água destilada nas colônias, em seguida a colônia será raspada com ajuda da alça de Drigalski e a suspensão será filtrada em gaze. A contagem dos conídios será realizada em câmara de Neubauer com auxílio de um microscópio óptico.

Para realização da avaliação da germinação de conídios, serão adicionadas 80 µL desta solução (obtida anteriormente) em pocinhos na Placa de ELISA e incubadas sob luz constante à temperatura de 24°C por um período de 12 horas. A germinação será paralisada com 20 µL de corante azul de algodão.

A avaliação será feita seguindo o mesmo procedimento para avaliação de conídios através da câmara de Neubauer, através da observação ao microscópio ótico com aumento de 400 vezes e contagem de 100 esporos por repetição, totalizando 400 esporos por tratamento. Serão contados conídios germinados aqueles que apresentaram qualquer emissão de tubo germinativo.

O delineamento experimental será inteiramente casualizado (DIC) no esquema fatorial 4 x 4 (quatro plantas medicinais e quatro doses) e quatro repetições. Cada parcela será constituída por uma placa de Petri. Os dados serão submetidos à análise de variância, e em seguida, análise de regressão para as doses a 5% de probabilidade.

5.5. Avaliação da germinação das sementes inoculadas artificialmente com *F. graminearum* e *F. verticillioides* tratadas com extratos vegetais

As sementes que serão utilizadas para avaliação de germinação serão obtidas no Campo Experimental da Universidade Federal de Santa Catarina – Campus Curitibanos, as sementes de milho usadas não receberão nenhum tipo de tratamento químico para não haver nenhuma alteração dos dados.

A avaliação de germinação das sementes será feita por dois métodos, o primeiro método as sementes serão desinfestadas em solução de hipoclorito de sódio 1% por 5 minutos e depois serão embebidas com suspensão de conídios de *Fusarium graminearum* e *Fusarium verticillioides* (10^6 conídios /mL). Em seguida, será feita o umedecimento de papel filtro com os extratos das plantas medicinais, as sementes serão acondicionados em gerbox contendo o papel filtro com cada extrato de planta medicinal. Os gerbox serão incubados em câmara de crescimento com fotoperíodo de 12 horas, temperatura 25 °C. A avaliação será realizada sete dias após a incubação, as sementes serão observados sob microscópio estereoscópio e óptico, para determinação da incidência dos fungos.

No segundo método as sementes serão desinfestadas em solução de hipoclorito de sódio 1% por 5 minutos e tratadas nos diferentes extratos e respectivas concentrações, com subsequente imersão na suspensão de conídios de *F. graminearum* e separadamente com *F. verticillioides* (10^6 conídios /mL). Após os tratamentos das sementes será realizado o teste padrão de germinação, onde quatro amostras (repetições) de 50 sementes, por tratamento, serão semeadas, igualmente espaçadas, sobre duas folhas de papel tipo germitest, as quais foram embebidas em água destilada. As sementes serão cobertas com mais uma folha do papel também umedecido e devidamente enrolado e armazenado em sacos plásticos transparentes. Em seguida serão colocados na câmara crescimento, com temperatura de 25°C e com fotoperíodo de 12 horas. As contagens de sementes germinadas e mortas foram realizadas no 3° e 7° dias (BRASIL, 1992).

O delineamento experimental será inteiramente casualizado (DIC) no esquema fatorial 4 x 4 (quatro plantas medicinais e quatro doses) e quatro repetições. Os dados serão submetidos à análise de variância, e em seguida, análise de regressão para as doses a 5% de probabilidade.

5.6. Avaliação do desenvolvimento de plântulas a partir de sementes inoculadas artificialmente com *Fusarium graminearum* e *Fusarium verticillioides* tratadas com extratos vegetais

Para a avaliação do desenvolvimento de plântulas, as sementes de milho serão desinfestadas em solução de hipoclorito de sódio 1% por 5 minutos, tratadas com os extratos vegetais com cada concentração, conforme descrito no item 5.5., e inoculadas artificialmente com *F.graminearum* e *F. verticillioides*.

As sementes de milho serão semeadas em substrato esterilizado, em vasos plásticos de volume de 3 litros e sendo plantadas 3 sementes por vaso. O número de vasos para cada tratamento será de cinco vasos, serão feitos orifícios de 1cm de profundidade, para se colocar as sementes.

Para a obtenção dos dados do desenvolvimento de plântulas será realizado o acompanhamento diário para verificação da emergência e a ocorrência de tombamento, apodrecimento do colmo e a morte das plântulas.

O delineamento experimental será inteiramente casualizado (DIC) no esquema fatorial 4 x 4 (quatro plantas medicinais e quatro doses) e quatro repetições. Os dados serão submetidos à análise de variância, e em seguida, análise de regressão para as doses a 5% de probabilidade.

6. RESULTADOS ESPERADOS

Os resultados a serem obtidos com o desenvolvimento do projeto fornecerão o conhecimento dos potenciais efeitos fungitóxicos dos extratos aquosos das plantas medicinais sobre o desenvolvimento dos fungos *Fusarium graminearum* e *Fusarium verticillioides*.

Além de permitir a aquisição de conhecimentos sobre os efeitos positivos das plantas medicinais, os resultados podem contribuir para a manutenção do equilíbrio ambiental e de uma agricultura mais sustentável. Que irão ajudar positivamente na redução de perdas na produção agrícola, redução de problemas relacionados à intoxicação alimentar, causado pelos fitopatógenos e principalmente redução na contaminação das águas subterrâneas e superficiais, da atmosfera e dos solos.

Se os extratos apresentarem resultados eficientes de efeito fungitóxico sobre *Fusarium graminearum* e *Fusarium verticillioides*, a metodologia do projeto será oferecida para pequenos produtores interessados em produzir produtos orgânicos. Resultando em alimentos mais saudáveis, maior produtividade, aumento da renda do produtor e menor risco de contaminação do meio ambiente.

7. CRONOGRAMA

	Meses					
	1	2	3	4	5	6
Revisão Bibliográfica	X	X	X	X	X	X
Obtenção dos Isolados Fungico de <i>Fusarium graminearum</i>	X					
Isolamento de <i>Fusarium verticillioides</i>	X					
Preparação dos Extratos Brutos Aquosos (EBA)		X				
Avaliação do crescimento micelial		X				
Contagem da esporulação de conídios			X			
Contagem de germinação de conídios			X			
Avaliação de germinação de sementes de milho				X		
Avaliação de sintomas em plântulas de milho					X	
Análise de dados e redação do trabalho final					X	X
Publicação do Trabalho						X

8. ORÇAMENTO

Discriminação	Quantidade	Valor Unitário	Valor Total
Material de Consumo			
Substrato	5	R\$ 50,00	R\$ 250,00
Vasos plásticos de 3 L	100	R\$ 3,00	R\$ 300,00
<i>Reagentes</i>			
Batata Dextrose Agar	3	R\$ 140,00	R\$ 420,00
Dextrose	2	R\$ 50,00	R\$ 100,00
Agar Bacteriológico	1	R\$ 238,00	R\$ 238,00
Hipoclorito de Sódio	2	R\$ 22,00	R\$ 44,00
Álcool Etilico Absoluto	10	R\$ 10,45	R\$ 104,50
Corante Azul de Algodão	3	R\$ 19,96	R\$ 59,88
<i>Vidrarias</i>			
Alça de Drigalsky	2	R\$ 2,10	R\$ 4,20
Becker de 250 mL	10	R\$ 4,90	R\$ 49,00
Becker de 50 mL	10	R\$ 4,20	R\$ 42,00
Caixa de Laminas para Microscopia	1	R\$ 8,76	R\$ 8,76
Caixa de Lamínulas para Microscopia	1	R\$ 4,70	R\$ 4,70
Câmara de Neubauer	2	R\$ 150,00	R\$ 300,00
Erlenmeyer graduado 1 L	4	R\$ 16,93	R\$ 67,72
Erlenmeyer graduado 250 mL	20	R\$ 6,00	R\$ 120,00
Lamparina de vidro	2	R\$ 15,00	R\$ 30,00
Placas de Petri	200	R\$ 3,00	R\$ 600,00
Proveta graduada de 100 mL	2	R\$ 9,83	R\$ 19,66
Proveta graduada de 50 mL	4	R\$ 8,73	R\$ 34,92
<i>Diversos</i>			
Algodão	1	R\$ 12,00	R\$ 12,00
Caixa de Fósforos	2	R\$ 3,31	R\$ 6,62
Caixa plástica Gerbox	100	R\$ 12,30	R\$ 1.230,00
Caneta Esferográfica	4	R\$ 0,90	R\$ 3,60
Caneta Marcadora Plástico e Vidro	4	R\$ 1,80	R\$ 7,20
Compressa de Gaze	1	R\$ 31,25	R\$ 31,25
Funil de Plástico	3	R\$ 2,83	R\$ 8,49
Luvas de látex sem pó (tamanho G)	1	R\$ 19,00	R\$ 19,00
Resma de Papel A4	1	R\$ 12,90	R\$ 12,90
Papel de Alumínio	1	R\$ 8,44	R\$ 8,44
Papel Filtro Qualitativo	1	R\$ 47,40	R\$ 47,40
Papel Germitest	1	R\$ 288,00	R\$ 288,00
Parafilm	1	R\$ 124,28	R\$ 124,28

Peneira	2	R\$ 6,00	R\$ 12,00
Pipeta de Pasteur 3 mL	1	R\$ 25,84	R\$ 25,84
Placas de Elisa de 96 poços	50	R\$ 8,00	R\$ 400,00
Ponteira 0 – 200 µL	1	R\$ 8,80	R\$ 8,80
Ponteira 100 – 1000 µL	1	R\$ 64,80	R\$ 64,80
Saco Plástico Transparente	1	R\$ 14,60	R\$ 14,60
Total do Material de Consumo			R\$ 5.122,56
Material Permanente			
Alça bacteriológica	2	R\$ 118,13	R\$ 236,26
Bandeja de 8 L	4	R\$ 5,46	R\$ 21,84
Cabo de Kolle	2	R\$ 23,86	R\$ 47,72
Câmara de Fluxo Laminar	1	R\$ 11.200,00	R\$ 11.200,00
Câmara Incubadora BOD	2	R\$ 5.995,00	R\$ 11.990,00
Contador Manual de Volumes	2	R\$ 48,59	R\$ 97,18
Espátula	2	R\$ 8,66	R\$ 17,32
Micropipeta automática 10 – 100 µL	2	R\$ 110,00	R\$ 220,00
Micropipeta automática 100 – 1000 µL	2	R\$ 110,00	R\$ 220,00
Microscópio biológico	2	R\$ 5.800,00	R\$ 11.600,00
Microscópio estereoscópio	1	R\$ 1.499,00	R\$ 1.499,00
Total do Material Permanente			R\$ 37.149,32
Inscrição em Eventos	1	R\$ 1,00	R\$ 500,00
Total Geral			R\$ 42.771,88

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALFENAS, Acelino Couto; MAFIA, Reginaldo Gonçalves (Ed.). **Métodos em Fitopatologia**. Viçosa: Editora Ufv, 2007. 382 p.
- BASTOS, Cléber Novais. Efeito do óleo de *Piper aduncum* sobre *Crinipelis* e outros fungos fitopatogênicos. **Fitopatologia Brasileira**, [s.i.], v. 22, n. 3, p.441-443, 1997.
- BERND, Luciana Pereira. **Modelagem com ênfase no crescimento de *Fusarium verticillioides* e produção de fumonisinas na perda da qualidade de milho**. 2006. 143 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2006.
- BETTIOL, Wagner. **Controle alternativo**. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/agricultura_e_meio_ambiente/arvore/CONTAG01_23_299200692526.html>. Acesso em: 01 jun. 2013.
- BONETT, Lucimar Pereira et al. Extrato etanólico de representantes de cinco famílias de plantas e óleo essencial da família Asteraceae sobre o fungo *Colletotrichum gloeosporioides* coletados de frutos de mamoeiro (*Carica papaya* L.). **Revista Brasileira de Agroecologia**, [s.i.], v. 7, n. 3, p.116-125, 2012.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária. Departamento de Produção Vegetal, Divisão de Sementes e Mudanças. **REGRAS PARA ANÁLISES DE SEMENTES (RAS)**. Programa Brasileiro de Qualidade e Produtividade (PBQP). Brasília: Coordenação de Laboratório Vegetal, SNDA/DNDV/CLAV, 1992. 365 p.
- CONAB. **Acompanhamento da Safra Brasileira: grãos, sétimo levantamento**, abril 2013. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13_04_09_10_27_26_boletim_graos_abril_2013.pdf>. Acesso em: 30 abr. 2013.
- CRUZ, José Carlos et al. (Ed.). **Milho: O produtor pergunta, a Embrapa responde**. Brasília: Embrapa, 2011. 338 p.
- DILKIN, Paulo et al. Intoxicação experimental de suínos por fumonisinas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 1, p.175-181, fev. 2004.
- FIGUEIRA, Edson Luiz Zangrando et al. Milho: Riscos associados à contaminação por *Fusarium verticillioides* e fumonisinas. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 24, n. 2, p.359-378, 2003.
- GRIGOLETTI JÚNIOR, Albino; SANTOS, Álvaro Figueredo Dos; AUER, Celso Garcia. Perspectivas do uso do controle biológico contra doenças florestais. **Floresta**, [s.i.], n. , p.155-165, 2000.

- GRISOLIA, Cesar Koppe. **Agrotóxicos: mutações, reprodução e câncer**. Brasília: Universidade de Brasília, 2005. 392 p.
- IARC. **Fumonisina** B1. Disponível em: <<http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol82/mono82-7B.pdf>>. Acesso em: 31 maio 2013.
- ITAKO, Adriana T. et al. Atividade antifúngica e proteção do tomateiro por extratos de plantas medicinais. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 33, n. 3, p.241-244, jun. 2008.
- KUHNEM JÚNIOR, Paulo Roberto et al. Características patogênicas de isolados do complexo *Fusarium graminearum* e de *Fusarium verticillioides* em sementes e plântulas de milho. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 43, n. 4, p.583-588, abr. 2013.
- LESLIE, John F.; SUMMERELL, Brett A.. **The Fusarium Laboratory Manual**. Ames: Blackwell Publishing, 2006.
- LONDRES, Flavia. **Agrotóxicos no Brasil: um guia para ação em defesa da vida**. Rio De Janeiro: Assessoria e Serviços A Projetos em Agricultura Alternativa, 2011. 190 p.
- LOUZADA, Gisele Angélica de Souza et al. Potencial antagônico de *Trichoderma* spp. originários de diferentes agroecossistemas contra *Sclerotinia sclerotiorum* e *Fusarium solani*. **Biota Neotropica**, Campinas, v. 9, n. 3, p.145-149, 2009.
- MAGALHÃES, Paulo César; SOUZA, Thiago Corrêa de. **Cultivo do Milho: Ecofisiologia**. Disponível em: <http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/milho_8_ed/ecofisiologia.html>. Acesso em: 30 abr. 2013.
- PAES, Maria Cristina Dias. Aspectos Físicos, Químicos e Tecnológicos do Grão de Milho. **Circular Técnica**, Sete Lagoas, v. 75, p.1-6, 2006.
- RAJA, J.; KURUCHEVE, V.. Influence of plant extracts and buffalo urine on the growth and sclerotial germination of *Macrophomina phaseolina*. **Indian Phytopathology**, [s.i.], v. 51, n. 1, p.102-103, 1998.
- RODRIGUES, Edvirgem et al. Avaliação da atividade antifúngica de extratos de gengibre e eucalipto in vitro e em fibras de bananeira infectadas com *Helminthosporium* sp. **Acta Scientiarum. Agronomy**, Maringá, v. 28, n. 1, p.123-127, 2006.
- SANDRI, César Augusto; TOFANELLI, Mauro Brasil Dias. Milho Crioulo: Uma alternativa de rentabilidade no campo. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 38, n. 1, p.59-61, 2008.
- SCAPIN, C.R. et al. Fungitoxidade in vitro de extratos vegetais sobre *Exserohilum turcicum* (Pass) Leonard & Suggs. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 12, n. 1, p.57-61, 2010.

- SCHWAN-ESTRADA, Katia Regina Freitas; STANGARLIN, José Renato. Extratos e óleos essenciais de plantas medicinais na indução de resistência. In: CAVALCANTI, Leonardo Sousa et al. **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba: Fealq, 2005. Cap. 5, p. 125-138.
- SINGH, Rajesh; RAI, Bharat. Antifungal potential of some higher plants against *Fusarium udum* causing wilt disease of *Cajanus cajan*. **Microbios** **2000**, [s.i.], v. 102, n. 403, p.165-173, 1998.
- SOUZA, Anne E. F.; ARAÚJO, Egberto; NASCIMENTO, Luciana C.. Atividade Antifúngica de Extratos de Alho e Capim-Santo sobre o Desenvolvimento de *Fusarium proliferatum* Isolado de Grãos de Milho. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 32, n. 6, p.465-471, dez. 2007.
- SPADOTTO, Claudio A. et al. Monitoramento do risco ambiental de agrotóxicos: princípios e recomendações. **Embrapa Meio Ambiente**, Jaguariúna, p.1-24, 2004.
- STADNIK, Marciel J.; TALAMINI, Viviane. Extratos vegetais e de algas no controle de doenças de plantas. In: STADNIK, Marciel J.; TALAMINI, Viviane (Comp.). **Manejo Ecológico de Doenças de Plantas**. Florianópolis: CCA/UFSC, 2004. Cap. 4, p. 45-62.
- STANGARLIN, José Renato et al. Plantas Mediciniais: Plantas Mediciniais e Controle Alternativo de Fitopatógenos. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, [s.i.], n. , p.16-21, 1999.
- TANAKA, Maria A. S.. Sobrevivência de *Fusarium moniliforme* em sementes de milho mantidas em duas condições de armazenamento. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 26, n. 1, p.60-64, 2001.
- TOLEDO, Francisco Ferraz de; MARCOS FILHO, Júlio. **Manual das sementes: tecnologia da produção**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1977. 224 p.
- VEIGA JUNIOR, Valdir F.; PINTO, Angelo C.; MACIEL, Maria Aparecida M.. Plantas Mediciniais: Cura Segura?. **Química Nova**, São Paulo, v. 28, n. 3, p.519-528, jun. 2005.
- VENZON, Madelaine; PAULA JÚNIOR, Trazilbo José de; PALLINI, Angelo. **Controle alternativo de pragas e doenças**. Viçosa: Epamig, 2006.
- VON PINHO, Edila Vilela R. et al. Efeitos do tratamento fungicida sobre a qualidade sanitária e fisiológica de sementes de Milho (*Zea mays* L.). **Revista Brasileira de Sentes**, [s.i.], v. 17, n. 1, p.23-28, 1995.

ANEXO A - Produtos derivados do milho ou que contêm seus componentes isolados ou transformados industrialmente.

Acetato de cálcio e magnésio	Cerveja	Herbicida natural	Polidor para sapatos
Adesivos (colas, pastas, mucilagens, gomas, etc)	Chiclete de goma	Inseticidas	Pós para sobremesas
Álcoois etílico e butílico	Coberturas em madeira, papel e metal	logurtes	Produtos de chocolates
Alimentos congelados	Combustível (etanol)	Ketchup	Produtos farmacêuticos
Alimentos para bebê	Copos e pratos de papel	Lápis de cor e de cera	Produtos maltados
Alumínio	Cosméticos	Licorice	Queijos ou requeijões cremosos
Amido e glucose (mais de 40 tipos)	Couro acabado	Maioneses	Ração animal e alimentos para animais de estimação
Antibióticos (penicilina)	Crems de barbear	Manteiga de amendoim	Refrigerantes
Asbestos para materiais de condicionamento térmico	Dextrose (utilizada desde soluções intravenosas a coberturas para bolos)	Manufatura de papéis	Salgadinhos tipo chips, tortillas e outros
Aspirina e outros medicamentos	Escurecedor de couro	Margarinas	Tacos e tortillas
Automóveis (volante, estofamento, cabeça do cilindro, pneus, acabamento de borrachas sintéticas)	Explosivos – fogos de artifício	Molhos para saladas	Tecidos e gomas
Balas e confeitos	Farinhas ou fubás de milho	Mostarda preparada	Tinta latex
Batata chips	Fibra de vidro	Óleo comestível	Tinta para máquinas de etiquetas de preço
Baterias para veículos	Filmes fotográficos	Pães e biscoitos	Vegetais enlatados
Bebidas gasosas	Fraldas descartáveis	Papéis de parede	Whisky
Cafés e chás instantâneos	Frutose seca e xaropes (usados em refrigerantes, misturas alimentícias, etc)	Papéis e papelões, (corrugados e laminados)	Xaropes
Carpets, tapetes.	Geléias e doces em conserva	Pasta de dentes	
Carreadores de cor em papéis, tecidos e tinta para impressão	Giz para quadro negro	Pigmentos	

Fonte: PAES, 2006