

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

AGR99006 - DEFESA DE TRABALHO DE CONCLUSÃO

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

**Thais Cristina da Silva Sousa
00219312**

**DIAGNÓSTICO FITOSSANITÁRIO NO COMÉRCIO INTERNACIONAL DE
PRODUTOS VEGETAIS**

Porto Alegre, setembro de 2016.

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

AGR99006 - DEFESA DE TRABALHO DE CONCLUSÃO

**Thais Cristina da Silva Sousa
00219312**

**DIAGNÓSTICO FITOSSANITÁRIO NO COMÉRCIO INTERNACIONAL DE
PRODUTOS VEGETAIS**

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

Orientador acadêmico do estágio: Prof. Dr. Eng. Agr. Josué Sant'Ana

COMISSÃO DE AVALIAÇÃO

Prof. Alberto Vasconcellos Inda Junior (Departamento de Solos)

Profa. Beatriz Maria Fedrizzi (Departamento de Horticultura e Silvicultura)

Profa. Carine Simioni (Departamento de Plantas Forrageiras e Agrometeorologia)

Prof. Fabio Kessler Dal Soglio (Departamento de Fitossanidade)

Profa. Mari Lourdes Bernardi (Departamento de Zootecnia)

Prof. Samuel Cordeiro Vitor Martins (Departamento de Plantas de Lavoura)

Porto Alegre, setembro de 2016.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primariamente a meu Deus, Jeová, por ter me dado a dádiva da vida e todas as oportunidades que eu tive até então.

Ao meu pai Gilmar e a minha mãe Rosângela, bem como a minha irmã Thaynam, que desde o início desta jornada me deram força, coragem e condições financeiras para que eu pudesse chegar a finalizar este curso.

Ao meu namorado Mateus que desde o início do curso tem sido companheiro, amoroso e paciente.

Ao Eng. Agr. Valmir Duarte por ter me dado a oportunidade de estagiar na sua empresa, a qual é uma das melhores do Brasil no ramo de diagnóstico fitossanitário e também a coordenadora do laboratório Marisa Dalbosco, o meu singelo e verdadeiro agradecimento por toda a ajuda e por jamais ter negado auxílio, mesmo nos momentos de intensas tarefas, sem contar o exemplo profissional e humano que ela mostrou ter.

Aos diversos professores do curso de agronomia que me transmitiram vários conhecimentos e valores, especialmente os professores Claudimar Fior e Josué Sant'Ana, os quais me deram a oportunidade de ter uma experiência na área da pesquisa e me orientaram da melhor forma possível.

Aos meus amigos e companheiros de curso: Marino, Luciano, Victoria e Yara, pela ótima convivência, pelos dias de estudos juntos e pela excelência nos trabalhos realizados em grupo.

RESUMO

A defesa do trabalho de conclusão do curso foi baseada no estágio curricular obrigatório do curso de Agronomia realizado na empresa Agronômica Diagnóstico Fitossanitário e Consultoria, localizada em Porto Alegre, RS. O objetivo principal foi obter conhecimentos na área de defesa sanitária vegetal, bem como aprender técnicas laboratoriais para o diagnóstico de pragas. As atividades executadas englobaram a realização e o acompanhamento de análises feitas no setor técnico da empresa, que visavam à detecção de pragas em produtos e subprodutos de origem vegetal. De modo geral o estágio se mostrou amplo, enriquecedor e fundamental para formação de um profissional qualificado.

LISTA DE FIGURAS

		Página
1	Pragas exóticas introduzidas no território brasileiro e que são atualmente o principal problema fitossanitário nas lavouras, são eles: Bicudo-do-algodoeiro (A), Ferrugem-asiatica-da-soja (B) e Helicoverpa armigera (C).	11
2	Fluxograma do percurso das amostras no laboratório.....	13
3	Presença de <i>Sitophilus zeamays</i> em amostra de grãos de milho.....	14
4	Esclerócios de fungo presentes em amostra de sementes de Brachiaria.....	15
5	Montagem do “Blotter test” com amostra de sementes de melão.....	16
6	Isca de cenoura em amostra de subtrato para verificar a presença de <i>Rhizoctonia solani</i> (A) e iscas de folhas de citros para detecção de oomicetos (B).....	16
7	Emaranhado de hifas, observado em microscópio ótico, de <i>Rhizoctonia solani</i> presentes na amostra de folhas de alecrim. Os círculos vermelhos destacam a formação do ângulo reto nas hifas.....	18
8	Método de Coolen d'herde. Amostra de sementes de milho tratadas sendo trituradas em liquidificador (A) e posteriormente peneiradas (B).....	19
9	Colônias bacterianas obtidas a partir do método de isolamento em meio de cultura.....	20
10	Etapas para a realização do método de biologia molecular. Prensa hidráulica utilizada para macerar as amostras de sementes e grãos (A) e extrato obtido a partir da prensagem da amostra (B).....	21

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO.....	7
2 CARACTERIZAÇÃO DA EMPRESA AGRONÔMICA.....	8
3 REFERÊNCIAL TEÓRICO.....	9
3.1 Ingresso de pragas no território brasileiro.....	9
3.2 Defesa sanitária vegetal no Brasil.....	10
3.3 Diagnóstico fitossanitário.....	11
4 ATIVIDADES REALIZADAS.....	13
4.1 Percursos das amostras no laboratório.....	13
4.1.1 Setor de triagem I e II.....	13
4.1.2 Setor de micologia.....	15
4.1.3 Setor de nematologia.....	18
4.1.4 Setor de bacteriologia.....	19
4.1.5 Setor de biologia molecular/virologia.....	21
5 DISCUSSÕES.....	23
5.1 Métodos utilizados.....	23
5.2 Defesa sanitária vegetal.....	23
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	26
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	27

1. INTRODUÇÃO

Dentre todas as áreas que a Agronomia abrange, a temática da defesa fitossanitária vegetal foi escolhida devido ao interesse em aprofundar os conhecimentos adquiridos na área da Fitossanidade ao longo da graduação e também para entender melhor os trâmites legais envolvidos na comercialização internacional de produtos agrícolas, especificamente aqueles relacionados à Defesa Sanitária Vegetal.

A agricultura brasileira encontra-se cada vez mais inserida no mercado internacional e a implicação disso na futura atuação do Engenheiro Agrônomo são fatores adicionais que levaram a escolha do local do estágio. Além disso, a experiência de trabalhar em uma empresa privada e ter uma vivência fora da vida acadêmica foi outra motivação.

O presente trabalho de conclusão de curso discorre sobre o estágio curricular obrigatório realizado na empresa Agronômica Laboratório de Diagnóstico Fitossanitário e Consultoria, nos períodos de 04 de janeiro a 01 maio de 2016, sob orientação da Bióloga M.Sc. Marisa Dalbosco, totalizando 300h de atividades.

Neste relatório estão descritas as atividades mais relevantes, as quais abrangem as principais análises de detecção de pragas realizadas nos cinco setores técnicos da empresa. O trabalho também aborda uma breve contextualização da agricultura brasileira e da defesa sanitária vegetal, bem como, a importância do diagnóstico fitossanitário para a agricultura.

2. CARACTERIZAÇÃO DA EMPRESA AGRONÔMICA

O laboratório de Diagnóstico Fitossanitário e Consultoria - Agronômica surgiu da fusão de dois empreendimentos, os quais foram: o Laboratório de Diagnóstico Fitossanitário da UFRGS, coordenado pelo Eng. Agr. Valmir Duarte e da Agronômica - consultoria e clínica vegetal, coordenado pela Eng^o. Agr. Patrícia de Sousa Teló. A empresa iniciou suas atividades no dia 2 de março de 2006 após ser credenciado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), em Porto Alegre, RS.

Inicialmente o laboratório foi instalado na Rua Ibanez André Pithan, 139, Bairro Itu-Sabará, Porto Alegre, RS. Sendo que em 2005 ocorreu o processo de adequação do prédio da empresa para realização de diagnósticos fitossanitários, ajustando a estrutura, equipamentos e pessoal às normas estabelecidas pela ISO/IEC 17025, segundo os padrões internacionais e a auditoria pelo MAPA.

Em 2008 obteve-se a autorização do MAPA para a instalação de uma extensão do laboratório no município de São Borja, RS no Porto Aduaneiro, o qual visa atender diagnósticos fitossanitários de frutas importadas, estando este atualmente em atividade.

Com a garantia de um serviço de qualidade, com resultados confiáveis, a Agronômica criou novos clientes em todos os estados do país e aumentou sua equipe de 3 para mais de 30 funcionários. O crescimento da empresa viabilizou a procura por um novo espaço, que se concretizou em novembro de 2014, com a ocupação do 12^o andar de um edifício comercial, localizado na Avenida Ipiranga, 7464, Bairro Jardim Botânico, Porto Alegre, RS.

A empresa Agronômica atua como laboratório responsável na detecção e determinação de pragas, previstas em acordos bilaterais para adoção de medidas fitossanitárias no trânsito internacional de commodities agrícolas. O seu principal cliente é o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) que, por meio dos seus fiscais federais agropecuários, cumprem a legislação de defesa sanitária vegetal e fazem a interação com empresas importadoras e exportadoras de produtos e subprodutos agrícolas.

Para o melhor desempenho no seu funcionamento a empresa segue alguns princípios como: manter o sigilo sob os produtos, ter um manual de ética, sempre inovar, fazer o trabalho em menor tempo possível, atender o sistema com eficiência, confiabilidade e atender a legislação pertinente com qualidade.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Ingresso de pragas no território brasileiro

Nos últimos 50 anos, o agronegócio tem tido uma importância expressiva na economia brasileira, sendo o responsável por um quarto do Produto Interno Bruto (PIB) e por mais da metade das exportações. Entre o período de 1993 a 2013 houve o crescimento acelerado da produção e do comércio exterior agropecuário. As exportações pularam de US\$ 15,9 bilhões para US\$ 99,9 bilhões e, da mesma forma, o valor em importações também aumentou de US\$ 4,1 bilhões para US\$ 16,4 bilhões (MAPA, 2016). A balança comercial brasileira tem sido positiva devido principalmente ao setor primário, com destaque a produção e a exportação de soja, café, cana-de-açúcar, frutas, etc. (FIESP, 2016).

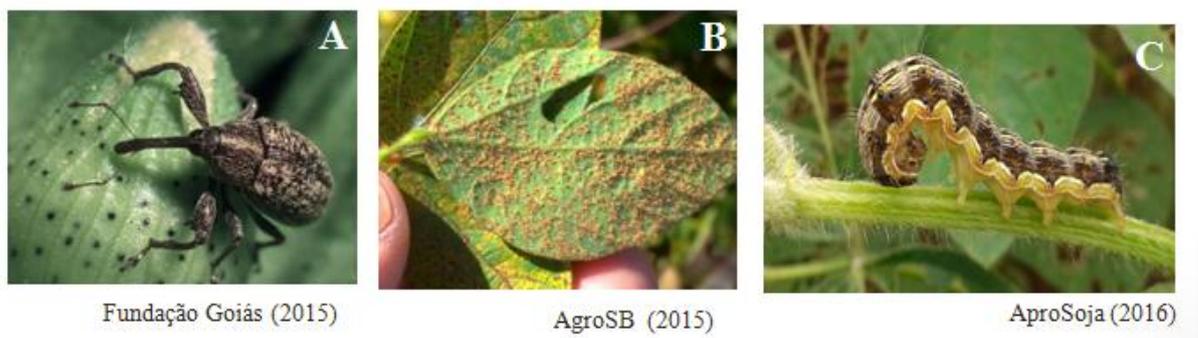
Com o intenso trânsito de produtos vegetais entrando no Brasil, a agricultura fica vulnerável ao ingresso e estabelecimento de novas pragas, o que pode representar um cenário destrutivo na competitividade agrícola, visto ser este o setor que tem maior contribuição para o desenvolvimento social e econômico do país. Nos últimos 10 anos pelo menos 35 novas espécies de pragas foram constatadas em território brasileiro. Na atualidade, aproximadamente 500 espécies de pragas quarentenárias apresentam potencial para causar grandes danos à agricultura no Brasil (EMBRAPA, 2016a).

Algumas espécies de pragas, que atualmente são problemas comuns nas lavouras brasileiras, em um passado relativamente recente, não existiam no Brasil. Como exemplo, o *Anthonomus grandis* Boheman (Coleoptera: Curculionidae) (Figura 1A), conhecido como bicudo-do-algodoeiro, não era registrado no Brasil até 1983 (HABIB & FERNADES, 1983), no entanto, atualmente este tem sido o principal problema fitossanitário para os produtores de algodão (AZAMBUJA & DEGRANDE, 2014). Já em 2002 foi detectada pela primeira vez a espécie *Phakopsora pachyrhizi*, fungo que é o agente causal da ferrugem-asiática-da-soja (REIS *et al.*, 2002) (Figura 1B), sendo que na safra 2003/2004 tal doença causou enormes perdas na sojicultura nacional. Segundo Yorinori & Lazzanori (2004), a redução na produção foi de 4,6 milhões de toneladas, o que correspondeu a mais de um bilhão de dólares em prejuízo.

Mais recentemente, vimos os esforços dos produtores para minimizar os efeitos devastadores às nossas lavouras, causados pela lagarta *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) (figura 1C). Tal praga até 2013 não havia sido registrada no continente americano, sendo no Brasil considerada praga quarentenária ausente, porém no

referido ano, espécimes do inseto foram detectadas em lavouras de soja no estado de Goiás e Bahia e em lavoura de algodão no Mato Grosso (CAZEPAK *et al.*, 2013).

Figura 1. Pragas exóticas introduzidas no território brasileiro e que são atualmente o principal problema fitossanitário nas lavouras, são eles: Bicudo-do-algodoeiro (A), Ferrugem-asiatica-da-soja (B) e *Helicoverpa armigera* (C).



O estabelecimento de novas pragas agrícolas não só prejudicam o produtor, mas também o consumidor, que sofre com aumento dos preços e o meio ambiente, que sofre com o desequilíbrio. Nem mesmo as empresas de defensivos agrícolas são beneficiadas, visto que existe uma complexidade natural que torna inviável o lançamento imediato de um produto para as novas pragas (DAHER, 2015).

3.2 Defesa sanitária vegetal no Brasil

Para um país defender suas fronteiras da entrada de novas pragas, ele tem que formular estratégias de defesa vegetal, que consiste em ações que visam diminuir a probabilidade de ocorrência de eventos indesejáveis (introdução de pragas), bem como propor ações para minimizar seus impactos, com o objetivo final de assegurar a manutenção da estabilidade fitossanitária de nossa agricultura (SILVA *et al.*, 2015).

A criação de um sistema de defesa vegetal no Brasil remonta o ano de 1934, quando foi editado o Decreto 24.114, de 12 de abril de 1934, que criou normas para a exportação e importação de vegetais e suas partes, levando em conta medidas necessárias para vigilância, erradicação, tratamento, inspeção, pontos de ingresso e egresso, quarentena, etc. (BRASIL, 1934). Essa legislação teve constante complementação por meio de legislações posteriores (RANGEL, 2015).

Cada país possui uma Organização Nacional de Proteção Fitossanitária (ONPF), a qual é responsável pela regulamentação fitossanitária e pela fiscalização. No Brasil esta é representada pelo Departamento de Sanidade Vegetal (DSV), que é vinculado ao MAPA. As

principais atribuições do DSV são: certificação fitossanitária, regulamentação de pragas, vigilância e controle, caracterização de áreas, capacitação e habilitação de profissionais e a realização do estudo de Análises de Risco de Pragas (ARPs) (BRASIL, 2005a).

A análise de Risco de Pragas pode ser definida como “o processo de avaliação biológica ou outra evidência científica e econômica para determinar se um organismo é uma praga, se ela deve ser regulamentada e a intensidade de quaisquer medidas fitossanitárias a serem adotadas contra ela” (CIPV, 2009).

Conforme a Instrução Normativa N° 6, de maio de 2005, deve ser realizado prévia de ARP em produtos e subprodutos vegetais importados, quando: estes nunca antes tiverem sido importados pelo Brasil; o uso proposto é diferente; a origem é diferente ou quando a importação do produto tenha sido anterior a 12 de agosto de 1997 (BRASIL, 2005b). A partir da ARP são identificadas e regulamentadas as pragas quarentenárias, além disso, durante os estudos de risco são fornecidos subsídios para elaboração de planos de contingência a serem realizados em caso de eventual detecção. A ARP é uma importante ferramenta para o comércio justo entre os países, permitindo exportações, bem como, protegendo agroecossistemas do local de destino contra a possível entrada de pragas (STANCIOLI & SGAYMA, 2015).

3.3 Diagnóstico fitossanitário

A defesa sanitária vegetal é um sistema composto por vários agentes, sendo alguns responsáveis pela determinação de normas que regem as atividades e outros pelo cumprimento e fiscalização de tais normas, como é o caso dos laboratórios de diagnósticos fitossanitários (DUARTE & TELÓ, 2015). Os Laboratórios de Diagnósticos Fitossanitários (LDFs) podem ser de entidades públicas ou privadas, que podem exercer a importante atividade de diagnóstico de pragas vegetais, mediante o credenciamento junto ao Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Para obter tal credenciamento, o laboratório tem que ser regido pela norma ISO/IEC 17.025, ter uma equipe profissional qualificada e investir em tecnologia atualizada. Compete aos LDFs fazer análise de vegetais e suas partes que são destinados à importação, exportação, trânsito interno, qualidade e clínica (DUARTE & TELÓ, 2015).

Na **importação** de produtos vegetais, a inspeção e fiscalização do trânsito internacional de vegetais é de responsabilidade do Sistema de Vigilância Agropecuária Internacional (Vigiagro), vinculada à Secretaria de Defesa Vegetal (SDV). A fiscalização é

realizada em portos, aeroportos internacionais, postos de fronteiras e aduanas especiais. Quando o material que é importado chega a um posto do Vigiagro, este é inspecionado por um Fiscal Federal Agropecuário (FFA), que verifica a documentação, a permissão de importação, a origem e se existem pragas de restrição que exigem análises laboratoriais. Em caso positivo, o FFA coleta a amostra, lacra, identifica e entrega-a para o responsável pela importação da carga, para tal encaminhar ao LDF. Durante o tempo em que as análises são realizadas, o importador é proibido de distribuir o material (DUARTE & TELÓ, 2015).

Em relação à certificação e inspeção de produtos vegetais para a **exportação**, devem ser levados em conta os requisitos fitossanitários aprovados pela Organização Nacional de Proteção Fitossanitária (ONPF) do país de destino do produto, tais informações podem ser obtidas no DSV (DUARTE & TELÓ, 2015). No caso de exportações para países do Mercosul devem ser notados os requisitos fitossanitários conforme a categoria de risco, determinados na Instrução Normativa 23, de 2 agosto de 2004 (BRASIL, 2004). A exportação depende da expedição de um certificado fitossanitário do MAPA, através de um FFA, sendo este baseado no “*Import Permit*” que se trata de um documento em que constam as exigências do país que está importando. No caso de haver restrição de pragas que precisem de análises laboratoriais, o FFA deverá coletar amostra, fechá-la, identificá-la e entregar ao interessado, o qual é o responsável do envio das mesmas para o LDF (DUARTE & TELÓ, 2015).

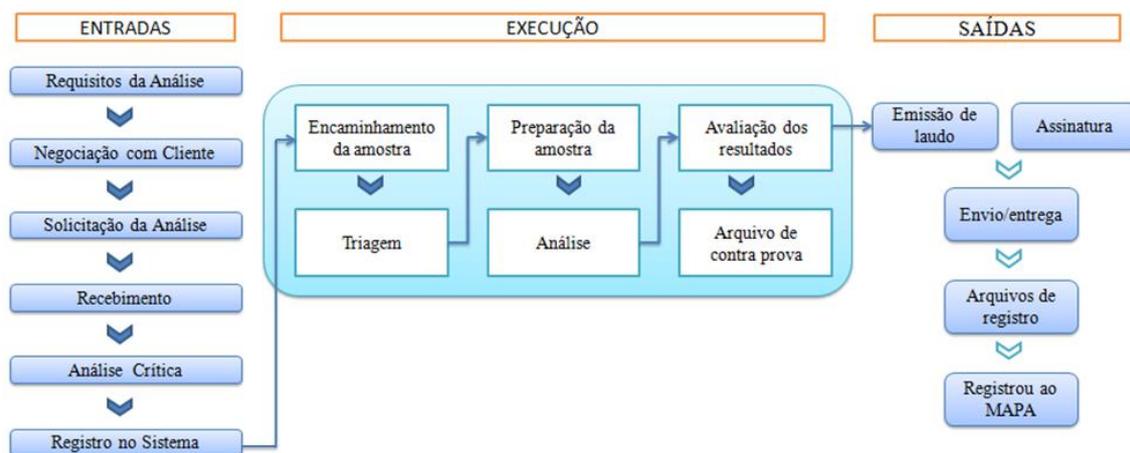
O diagnóstico fitossanitário também é exigido no **trânsito interno** de produtos vegetais, por meio do Certificado Fitossanitário de Reexportação (CFR), do Certificado Fitossanitário de Origem (CFO), do Certificado Fitossanitário de Origem Consolidado (CFOC) e da Permissão de Trânsito de Vegetais (PTV). Os LDFs também tem competência para certificar a **qualidade** sanitária de sementes e mudas, como também fazer a parte **clínica**, que consiste em um serviço de diagnóstico fitossanitário buscado por agricultores, extensionistas e outros interessados para saber a causa de um problema em plantas, podendo ser doença ou injúria (DUARTE & TELÓ, 2015).

4. ATIVIDADES REALIZADAS

As atividades do estágio foram realizadas segundo um programa de qualificação que a empresa Agronômica propôs, que consistia em passar aproximadamente duas semanas em cada setor técnico. Deveria ser lido o protocolo de operação padrão do setor e então serem desempenhadas as atividades do mesmo.

Inicialmente foi realizada a reunião de análise crítica, que teve por objetivo passar aos analistas a demanda de materiais que entraram naquele dia e quais as análises requeridas. Após esta reunião, as amostras foram liberadas para o setor de triagem e em seguida distribuídas para os respectivos setores técnicos, tais como: micologia, nematologia, bacteriologia e biologia molecular/virologia. O percurso realizado pela amostra dentro da empresa desde a entrada até a emissão do laudo final pode ser observado na Figura 2.

Figura 2. Fluxograma dos percursos das amostras no laboratório.



Fonte: Adaptado Thais C. S. Sousa, Empresa agronômica, 2015.

4.1 Percursos das Amostras no Laboratório

4.1.1 Setor de triagem I e II

A primeira etapa após a amostra passar pela análise crítica é o setor de triagem. Conforme a classificação do material, ele pode ir para a triagem I ou II. Para a triagem I são destinadas amostras secas, como sementes, grãos, substratos, leveduras, farelos. O objetivo é a detecção de sementes de invasoras, materiais de propagação vegetativa, esclerócios de fungos, insetos e ácaros em diferentes produtos e subprodutos vegetais. A triagem é realizada manualmente com auxílio de uma lupa de mesa, peneiras e microscópio estereoscópico.

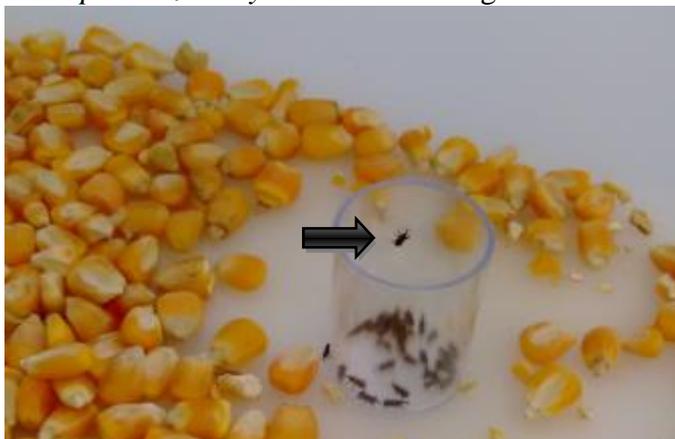
Na triagem II, são analisados produtos vegetais como: tubérculos, rizomas, bulbos de espécies ornamentais, mudas e frutas. O objetivo das análises é a detecção de ácaros e insetos. Esta pode ser realizada através de análise direta da amostra em microscópio estereoscópico, análises morfológicas e comparação com chaves taxonômicas, montagem de lâminas para microscópio e dissecação de genitálias, o qual é usado principalmente para determinação de insetos da ordem Lepidoptera.

Após a triagem das amostras, são separadas alíquotas destas, as quais são destinadas aos devidos setores, onde serão realizadas as análises conforme determinado na reunião de análise crítica. Também é separada uma alíquota da amostra que serve de contraprova, esta é armazenada por seis meses após a emissão do laudo em câmara seca, no caso de amostras secas como sementes e grãos.

As amostras mais recorrentes durante o período do estágio, em ambas as triagens, destinadas à exportação, foram sementes de pastagem (azevém, brachiaria, *Panicum* spp.), sementes de milho, grãos de soja, plumas de algodão, folhas de tabaco, grãos de arroz. Para importação, as amostras mais recorrentes foram: sementes de diversas hortaliças, substratos (turfa, vermiculita, casca de arroz), frutas (pêssego, ameixa, kiwi, maçã, uva), rizoma de almeirão, mudas de eucaliptos, tubérculos de batata, entre outros.

Em grãos de armazenamento foram encontradas espécies como *Sitophilus zeamays* (Coleoptera: Curculionidae) (Figura 3), *Sitophilus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae), *Cryptolestes ferrugineus* (Coleoptera: Silvanidae); em folhas de tabaco *Lasioderma serricorne* (Coleoptera: Anobiidae); em sementes de azevém, a presença de sementes de invasoras de *Vulpia muralis* e *Echium plantagineum* e sementes de Brachiaria com presença de esclerócios de fungo (Figura 4).

Figura 3. Presença de *Sitophilus zeamays* em amostra de grãos de milho.



Fonte: Thais Sousa

Figura 4. Esclerócios de fungo presentes em amostra de sementes de Brachiaria.



Fonte: Thais Sousa

Na triagem II, as pragas mais presentes foram o ácaro *Brevipalpus phoenicis*, em diversas frutas oriundas de importação, bem como larvas de *Bradysia difformis*, em mudas de antúrio, lírio e outras ornamentais vindas de importação. Também era recorrente o envio, pelos fiscais federais agropecuários, de insetos conservados em álcool que foram encontrados em cargas de produtos vegetais, para a identificação no laboratório. Esse fato era frequente em cargas procedentes de países como Colômbia, China, Índia e outros países do sudeste da Ásia.

4.1.2 Setor de micologia

Para a detecção de fungos fitopatogênicos, três tipos de ensaios principais eram realizados, sendo estes o “Blotter test”, o preparo de iscas e a suspensão de lavagem.

O “Blotter test” é utilizado para determinar a presença de fungos fitopatogênicos em grãos e sementes diversas. O ensaio consiste em colocar em uma Gerbox limpa e esterilizada com papel filtro umedecido, sementes da amostra (50 a 100 sementes/ Gerbox), variando conforme o tamanho da semente, sendo que, o total avaliado deve ser de 400 sementes (Figura 5). Após, as sementes eram colocadas em uma sala incubadora (7 a 10 dias), sendo dispostas sob lâmpadas de luz fluorescente branca, à distância de 30-40 cm, com temperatura e umidade relativa do ar controladas.

Figura 5. Montagem do “Blotter test” com amostra de sementes de melão.



Fonte: Thais Sousa

Também era realizado o “Blotter test modificado” que consistia em submeter as sementes ao congelamento durante um período. As caixas Gerbox com as sementes eram mantidas em sala incubadora pelo período inicial de 24 horas sob temperatura de $20 \pm 2^\circ \text{C}$, em seguida, em congelador (-20°C) por 24 horas e por fim retornavam à incubadora sob luz fluorescente branca, tal como descrito anteriormente, por mais 5 dias. Esta técnica era utilizada para sementes de gramíneas, objetivando evitar a germinação das mesmas.

As principais amostras destinadas ao “Blotter tests” durante o período do estágio foram: diversas sementes de hortaliças importadas (alface, cenoura, melão, pimentão e outras) e sementes de milho e de pastagens para exportação.

O preparo de iscas é direcionado para amostras de substratos, raízes e folhas, a fim de detectar fungos e oomicetos. A ideia é colocar as amostras em um meio específico para o desenvolvimento de certos fungos. Para a detecção de *Rhizoctonia solani* a isca utilizada era cenoura (Figura 6A), para a detecção de oomicetos como *Pytium* e *Phytophthora*, por exemplo, a amostra era colocada junto à maçã vermelha ou citros (Figura 6B), já para detectar-se *Chalara elegans* usou-se iscas de semente de rabanete.

Figura 6. Isca de cenoura em amostra de subtrato para verificar a presença de *Rhizoctonia solani* (A) e iscas de folhas de citros para detecção de oomicetos (B)



Fonte: Thais Sousa

As iscas, após serem preparadas, ficavam sete dias em câmara de crescimento com umidade e temperatura controlada, no escuro, para favorecer o desenvolvimento do patógeno, quando presente. As amostras mais frequentes destinadas ao teste de isca foram: amostras de substratos (casca de arroz carbonizada, vermiculita, turfa, solo), rizomas de almeirão, mudas de orquídeas e outras plantas ornamentais importadas.

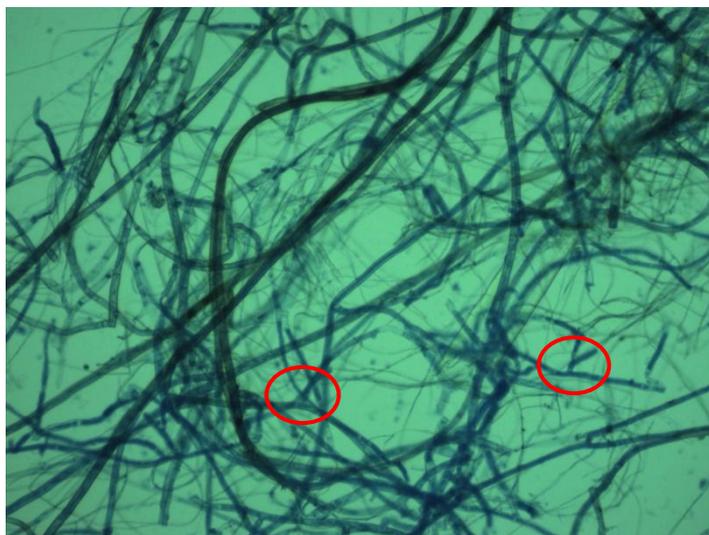
O último ensaio, chamado de suspensão de lavagem, foi utilizado para identificar a presença de fungos que estão na parte externa das sementes e não se desenvolvem em incubação (Blotter test) ou também para outros materiais como plumas de algodão. Alguns exemplo de fungos que podem ser detectados através deste método são: oídios, míldios e ferrugens.

O procedimento consiste em colocar aproximadamente 100 sementes/grãos da amostra em um copo plástico de 200 ml e preenchê-lo com água deionizada até cobrir a massa de grão, em seguida deixa-se os copos em mesa agitadora a 200 rotações por minuto (rpm) por 10 minutos. A etapa seguinte consiste em retirar a água do copo e coloca-lá em tubo Falcon de 15 ml para então centrifugar a amostra por 15 minutos a uma velocidade de 3000 rpm. Na ponta do tubo Falcon se depositam sedimentos que formam um pellet, este era analisado em microscópio óptico, para a possível observação de alguma estrutura fúngica.

Amostras de arroz, milho, sementes de brachiaria e girassol, plumas de algodão eram frequentes para realização desse método, ambos destinados à exportação. No algodão e no arroz, buscava-se detectar a presença de *Microcyclus ulei* que é um fungo agente causal da doença conhecida como “mal-das-folhas-da-seringueira”, sendo assim, difícil de estar presente em tais amostras, porém como essa é uma praga quarentenária para o país que estava importando o produto, se fazia necessária a realização da análise.

Além dos três métodos de detecção de fungos fitopatogênicos citados acima, também era realizado no laboratório, de forma menos recorrente, a análise clínica de vegetais. Durante a passagem pelo setor de micologia, um caso de análise clínica verificado, foi de uma amostra de folhas de alecrim - *Rosmarinus officinalis*, trazidas por um produtor, que apresentavam folhas escurecidas e murchas. A partir dos sintomas visuais e do preparo de uma lâmina com os micélios presentes na amostra observadas em microscópio óptico foi identificado o fungo como sendo *Rhizoctonia solani*. As hifas apresentam septos transversais, formando ramificações em ângulo reto (Figura 7).

Figura 7. Emaranhado de hifas, observado em microscópio óptico, de *Rhizoctonia solani* presentes na amostra de folhas de alecrim. Os círculos vermelhos destacam a formação do ângulo reto nas hifas.



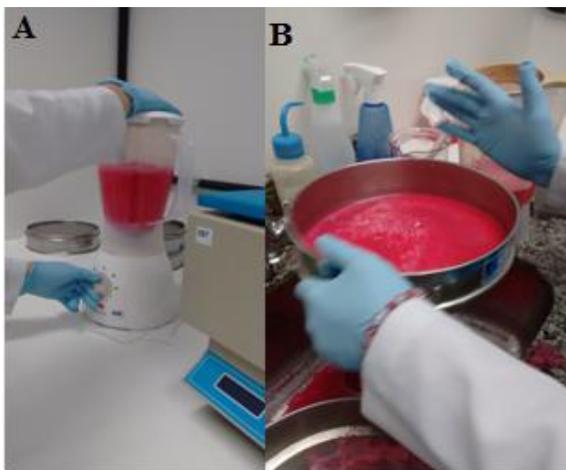
Fonte: Marisa Dalbosco, 2016

4.1.3 Setor de nematologia

Para a detecção de nematoides fitopatogênicos em amostras são utilizados principalmente dois métodos, sendo eles: o de Coolen d'herde e o de Jenkins. O primeiro é mais usado para amostras de sementes de milho, hortaliças, pastagens, flores e grãos de arroz, enquanto que o segundo é mais utilizado para amostras de substratos, solos e soja.

O método de Coolen d'herde consiste em triturar as sementes da amostra em liquidificador (Figura 8A) e então passar a mistura por peneira de 60 mesh (Figura 8B) sobre uma de 500 mesh. Posteriormente é separado o resíduo que sobrou na peneira de 500 mesh, o qual é misturado com caulim (tem função de limpar a amostra) e centrifugado por 5 minutos a 1800 rpm. Em seguida, deve-se retirar o sobrenadante e no conteúdo restante, adicionar sacarose (tem a função de separar os nematoides da água pela densidade) e novamente centrifugar, mas desta vez por apenas um minuto. Posteriormente, se deve verter o líquido sobrenadante sobre peneira de 500 mesh. Por fim, recolher os possíveis nematoides que devem estar retidos na peneira para análise em microscópio óptico.

Figura 8. Método de Coolen d'herde. Amostra de sementes de milho tratadas sendo trituradas em liquidificador (A) e posteriormente peneiradas (B).



Fonte: Thais Sousa

No método de Jenkins coloca-se a amostra em um Becker e preenche-se toda a amostra com água e deixar-se repousar por 5 minutos. Após isso, verter-se a amostra com água em uma peneira de 42 mesh sobre uma de 500 mesh, então procede-se os mesmos passos do método de Coolen d'herde.

Por vezes nas amostras eram encontrados nematoides de vida livre que vivem no solo e nas águas (alimentam-se de algas, fungos, bactérias) não sendo fitopatogênicos. Em uma amostra de sementes de brachiaria destinada à exportação foi encontrada uma espécie de nematoide fitopatogênico de restrição para o país importador, chamado de *Aphelenchoides besseyi*. Alguns países que possuem restrição na importação de sementes forrageiras com a presença desta espécie são Guatemala e Honduras.

4.1.4 Setor de bacteriologia

Para a detecção de bactérias fitopatogênicas os métodos mais utilizados são: isolamento em meio de cultura, métodos bioquímicos e métodos biológicos.

O isolamento em meio de cultura é o método mais recorrente no setor. A primeira etapa deste ensaio é fazer a lavagem, que consiste em colocar a amostra em um copo com solução salina e agitar em mesa agitadora (200 rpm) por duas horas. Após esta etapa, com auxílio de uma alça de platina, se pega um pouco da solução e se semeia em forma de estrias no meio de cultivo em placas de Petri, a fim de conseguir a formação de colônias isoladas (Figura 9). Depois de realizada a semeadura, as placas de Petri são colocadas em estufas para proporcionar condições ideais para o crescimento bacteriano. Para cada bactéria que se deseja verificar presente na amostra, usa-se um meio seletivo que favoreça o crescimento da mesma.

Figura 9. Colônias bacterianas obtidas a partir no método do isolamento em meio de cultura.



Fonte: Thais Sousa

O método do isolamento, de modo geral, é realizado em amostras de sementes de diversas hortaliças e sementes de azévem oriundas de importação, bem como, sementes de forrageiras, milho, grãos de arroz beneficiados, entre outros, destinados à exportação.

Os métodos bioquímicos são usados para ajudar na identificação das colônias bacterianas que foram conseguidas a partir do método de isolamento. Da mesma forma que existem chaves taxonômicas para a identificação de insetos, existem chaves para a identificação de bactérias. Os testes bioquímicos dão características que auxiliam na identificação destes organismos. Também são realizados testes de coloração de Gram, teste de catalase e teste de oxidase.

Por último, um dos métodos biológicos utilizados foi o de patogenicidade, que tem por objetivo verificar se a bactéria encontrada na amostra é a mesma que o analista supunha ser, associando um determinado sintoma a um patógeno particular. O método consiste em primariamente obter colônias puras da bactéria encontrada na amostra e, a partir destas, preparar uma suspensão de inóculo.

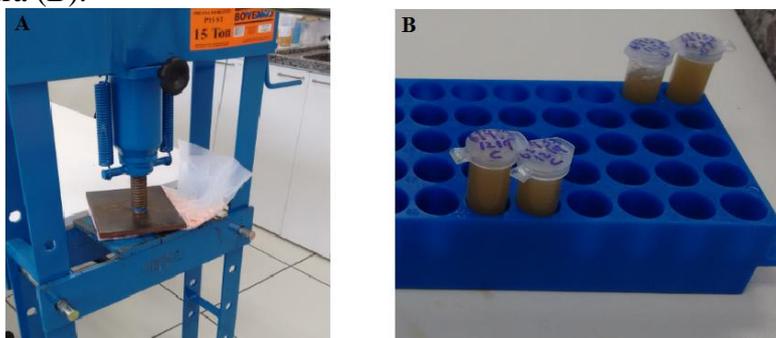
O inóculo deve ser inoculado em plantas jovens e sadias que precisam ser mantidas por 24 horas em câmara úmida e após esse período avaliar se apareceram os sintomas típicos daquela bactéria, isolando novamente a mesma. Esse método pode ser observado em uma amostra de sementes de tomate, em que, a partir da suspensão bacteriana obtida da amostra, inoculou-se mudas de tomate, para verificar a patogenicidade da mesma, suspeitando-se que era *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*.

4.1.5 Setor de biologia molecular/virologia

Para identificação de vírus, duas técnicas são mais utilizadas no laboratório, são elas: a de biologia molecular e o método sorológico, chamado Elisa. Quase 90% das amostras são analisadas pelo método de biologia molecular, que consiste na técnica de PCR e RT-PCR. Este método também é usado para a detecção de fungos e bactérias que possuam *primers*. Os *primers* são pequenas fitas de DNA que se ligam por complementaridade ao início da sequência de DNA que se quer multiplicar.

A primeira etapa para a realização do método de biologia molecular é fazer a maceração da amostra. Para sementes e grãos, em geral, se utiliza uma prensa hidráulica (Figura 10A), enquanto que para amostras de tecidos vegetais (folhas, raízes, ramos) e também micélios de fungo, usa-se nitrogênio líquido. Após o extrato da amostra ficar pronto (Figura 10B), é extraído o DNA do mesmo com o uso de um kit específico, no caso, era muito usado o kit Promega®. Em uma sala livre de DNA, faz-se o preparo do Mix, que é composto pelo Primer/Sonda, enzima (Ataque Polimerase para DNA e se for RNA Transcriptase Reversa + Ataque Polimerase), $MgCl_2$ e tampão. Em seguida o DNA que foi extraído da amostra é misturado com o Mix, e então a mistura vai para o termociclador juntamente com um controle positivo (é uma amostra com a presença do vírus que se quer saber se existe na amostra a ser analisada) e com o controle negativo (amostra livre de vírus, geralmente usa-se água ultra-pura).

Figura 10. Etapas para a realização do método de biologia molecular. Prensa hidráulica, utilizada para macerar as amostras de sementes e grãos (A) e extrato obtido a partir da prensagem da amostra (B).



Fonte: Thais Sousa

O laboratório dispõe de dois modelos de termociclador em Tempo Real. Um é destinado a reações de PCR (detecção de bactérias e fungos) e outro para reações de RT-PCR (detecção de vírus). O PCR em tempo real realiza a quantificação de ácidos nucleicos das

amostras de maneira precisa e com maior reprodutividade, visto que determina valores durante a fase exponencial da reação. Ligado ao termociclador há um computador com software que serve para a aquisição dos dados e análise final.

O laboratório também possui dois termocicladores convencionais, que funcionam por eletroforese em gel de agarose. Estes dão apenas resultados qualitativos, ou seja, se tem ou não a presença de determinado patógeno. Um termociclador é destinado para análises de PCR (detectar fungos e bactérias) e outro destinado para a análise de RT-PCR (detecção de vírus).

As amostras mais recorrentes durante o período passado no setor de virologia/biologia molecular foram grão de soja e milho, como também sementes de milho. A soja era principalmente destinada à exportação para China, algumas das análises requeridas eram para a detecção dos vírus: Arabis Mosaic Vírus (ARMV), Southern Bean Mosaic Virus (SBMV), Tobacco Ringspot Virus (TRSV) e Tomato Severe Rugose Virus (ToSRV).

Em relação as amostras de grãos e sementes de milho que eram destinados à exportação, as principais análises requeridas foram para a detecção das pragas: High Plain Virus (HPV), a bactéria *Pantoea stewartii* e o fungo *Stenocarpella maydis*.

5. DISCUSSÃO

5.1 Métodos utilizados

Os testes de sanidade vegetal devem fornecer informações confiáveis acerca da qualidade sanitária do material que está sendo avaliado. Todos os métodos de análises realizados no laboratório eram feitos conforme descrito no Protocolo de Operação Padrão (POP), elaborado pelo analista responsável de cada setor. Os protocolos continham as informações de condução dos métodos, sendo estes baseados em referências de artigos, periódicos, livros, etc.

Fazendo uma comparação sobre a metodologia usada na realização das análises que foram acompanhadas no decorrer do estágio com algumas referências do assunto, percebe-se que, a grande maioria dos procedimentos realizados coincidiram com o que a literatura mencionava. No entanto, alguns métodos apresentam margem para algumas discussões.

Uma das principais análises realizadas no laboratório, o “Blotter test”, é de uso rotineiro, visto que este preenche os requisitos de rapidez, simplicidade, baixo custo e permite o levantamento de diversos fungos associados a vários tipos de sementes. A forma como foi realizado o teste no laboratório está de acordo os procedimentos previamente citados (MAPA, 2009; GUIMARÃES *et al.*, 2010). Porém, esse teste possui algumas limitações como a inibição de fungos de crescimento mais lento pelos de crescimento mais rápido ou a maior contaminação com fungos saprófitos, como exemplo o *Rhizopus spp* e *Mucor sp*, que podem dificultar a análise. No último caso, o uso da desinfestação superficial das sementes com solução de hipoclorito de sódio a 1,05%, é uma alternativa para eliminar boa parte dos fungos saprófitos, facilitando a análise (HENNING, 2005).

No setor de nematologia, como foram citados, os principais métodos usados para a detecção de nematoides são o de Coolen d'herde e o de Jenkins, o que confere com outras literaturas (MAPA, 2009; FERRAZ *et al.*, 2012). No entanto, uma forma de identificação de nematoides que pode vir a ser usada pelo laboratório é a análise molecular, por meio da técnica de PCR, sendo esta uma alternativa rápida e de baixo custo (CORDEIRO *et al.*, 2008).

5.2 Defesa sanitária vegetal

Como já foi abordado neste trabalho, o Brasil se caracteriza como uma grande potência na produção agropecuária, sendo este, atualmente, um dos maiores exportadores

mundiais de alimentos e fibras (MAPA, 2016). Contudo, também foi visto que, com o aumento das transações comerciais, os países tem deixado suas fronteiras vulneráveis ao ingresso de novas pragas. Mesmo existindo no Brasil um sistema de Defesa Sanitária Vegetal que remonta a década de trinta e que vem se atualizando constantemente, isso não tem sido suficiente para evitar a entrada de novas pragas em nosso território (EMBRAPA, 2016a). Existem alguns “gargalos” relacionados a este tema que precisam ser mencionados e discutidos, para que sejamos mais críticos em relação às medidas de Defesa Sanitária Vegetal.

Inicialmente podemos dizer que, no geral, no Brasil há plantações praticamente o ano inteiro. Há culturas em que o plantio inicia-se em outubro e que são sucedidas por safrinhas e depois por plantios irrigados, sendo muitos destes cultivos hospedeiros de pragas em comum, ou seja, existem ambientes no nosso país para o estabelecimento de todo o tipo de praga durante todo o ano. Além disso, o Brasil não é favorecido pela presença de barreiras naturais como é o caso do Chile (cordilheira dos Andes) e da Austrália (continente-ilha). O Brasil faz fronteira com 10 países, são mais de 15,5 mil km de extensão, sendo uma parte formada por linha seca, outra ao longo de rios, lagos e canais. Estudos apontam que pelo menos 221 espécies que não estão presentes no Brasil podem vir de outros países da América do Sul (SAGAYAMA *et al.*, 2015).

Segundo levantamento da Embrapa Gestão Territorial (2016b) foram detectadas 364 possíveis vias de ingresso terrestre de pragas vindas de países vizinhos, em cruzamentos da fronteira com estradas e rodovias e 26 locais na região da fronteira suscetível de ingresso de pragas por meio de embarcações. A região Norte do país, atualmente, é o maior ponto de acesso das pragas quarentenárias, sendo Roraima, o estado que apresenta maior número de registro. As principais razões para esse fato são, o alto fluxo de pessoal e mercadorias nas fronteiras, bem como, a falta de fiscalização e pessoal habilitado para identificação de espécies. Algo semelhante acontece com um trecho da fronteira do estado do Mato Grosso com a Bolívia, que é catalogado como um dos pontos mais suscetíveis ao ingresso de pragas, devido a grandes áreas de cultivo próximo a rodovias, hidrovias ou ferrovias nas fronteiras com o país vizinho e sem postos de controle do Sistema de Vigilância Agropecuária Internacional (Vigiagro).

A partir das referidas informações fica explícito que falta priorizar ações de vigilância fitossanitária nos principais pontos de entrada de pragas no Brasil, que são as fronteiras. É necessário também aumentar o número de fiscais agropecuários qualificados, sejam eles federais ou terceirizados, bem como aumentar o número de estabelecimentos credenciados

junto ao MAPA para fazer análises de diagnóstico fitossanitário. Atualmente existem dez laboratórios oficiais do MAPA (Laboratório Nacional Agropecuário - LANAGRO), sendo apenas seis credenciados pelo MAPA, ambos localizados na região sul e centro-oeste do país (RS, PR, SP, MG e GO) (BRIOSO, 2016). É importante frisar que o Laboratório Agrônômica possui o maior escopo de atuação, são mais de 500 espécies diferentes que podem ser determinadas, nenhum dos outros laboratório se aproxima desse escopo. Sendo assim, são necessários mais laboratórios modelos, como o Agrônômica, localizados mais próximos da região norte do país, a fim de suprir a demanda que essa região tem.

Uma ferramenta que pode auxiliar na fiscalização das fronteiras é o uso de dados georreferenciados e ferramentas de Sistemas de Informações Geográficas (SIG). O SIG é um eficiente instrumento na aquisição e estruturação de dados territoriais, permitindo o tratamento, integração e análise de inumeráveis fontes de dados, bem como simulações destes e espacialização dos dados geográficos através da produção de mapas temáticos. Isso facilitaria e agilizaria a realização de análises, otimizando a execução de programas de prevenção, controle e erradicação das pragas vegetais.

Outro fator que favorece a entrada de pragas exóticas no Brasil é o intenso trânsito de pessoas, veículos e produtos que vem crescendo muito nos últimos 30 anos. Os brasileiros estão viajando mais, o Brasil tem sido palco de vários eventos como a Copa do Mundo de Futebol, Olimpíadas e shows de rock. O fluxo de pessoas é muito grande para a agência de defesa sanitária vegetal dar conta de fiscalizar tudo. Por esta razão, se faz necessário políticas de conscientização para brasileiros e estrangeiros, salientando a importância que a sanidade vegetal tem para a sociedade.

Entende-se que muito precisa ser feito em nossa Defesa Sanitária Vegetal, a fim de evitar a disseminação de pragas exóticas em nosso território, desde maior fiscalização das fronteiras, maior número de fiscais agropecuários e laboratórios credenciados, uso de tecnologias de SIG, até a conscientização da população a respeito desta temática. Por fim, é necessário racionalizar e aperfeiçoar as ações de vigilância fitossanitária, considerando a distribuição e a dinâmica da agricultura no território e ao longo do tempo.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O Agronômica se mostrou uma empresa bastante qualificada. Isso é o que se espera de uma empresa que trabalha em um ramo que exige muita seriedade, visto a importância que os diagnósticos fitossanitários têm na proteção de nossas fronteiras agrícolas. É marcante a busca contínua por melhorias na gestão de qualidade e isso é exemplificado com a certificação à empresa na ISO/ IEC 17025/2005 que é uma norma que estabelece um padrão internacional e único para comprovar a competência de laboratórios para a realização de ensaios e/ou calibração e amostragem, dando assim, mais garantia ao cliente de que os resultados obtidos são verídicos. A rapidez dos serviços prestados também pode ser apontada como um ponto positivo. Na empresa existe a opção da análise express, que é realizada para a detecção de alguns patógenos através da técnica de PCR. O resultado da análise é emitido 24 horas após a entrada da amostra no laboratório.

Eventuais problemas que foram detectados no decorrer de alguns ensaios realizados não foram ocultados, mas sim encontrados os motivos dos problemas, para que então eles fossem sanados. Da mesma forma, quando foram detectadas pragas quarentenárias, ou pragas de restrição para países importadores, tais pragas foram oficialmente comunicadas ao MAPA, tanto para amostras oficiais como para não oficiais. O treinamento dos funcionários se dá de forma constante. Cada funcionário passa por um programa de qualificação, o qual propõe que o funcionário passe a acompanhar atividades realizadas em outros setores no qual não trabalha, para então se inteirar das outras atividades que estão sendo realizadas no laboratório.

O estágio me proporcionou maior conhecimento e vivência na área da defesa fitossanitária relacionada ao contexto do mercado internacional de alimentos. Os ensaios e análises que acompanhei no laboratório me fizeram lembrar muitos dos conhecimentos que em teoria me foram passados no decorrer da graduação, mas que na prática foram pouco vistos. Outro ponto positivo foi a ótima convivência com a equipe técnica, que me acolheu e me passou vários conhecimentos importantes, mesmo em períodos de grande fluxo de trabalho. E, por fim, foi bom saber como é a rotina dentro de uma empresa e pensar em um leque de oportunidades profissionais que futuramente possa vir a ter.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AZAMBUJA, R & DEGRANDE, P. E. Trinta anos do bicudo-do-algodoeiro no Brasil. **Instituto Biológico**. São Paulo, v. 81, n. 4, p. 377- 410, 2014.

BRASIL; Poder Executivo do Brasil. Decreto N° 24.114, de 12 de abril de 1934. Fica aprovado o regulamento da Sanitária Vegetal que com esta baixa, assinado pelo Ministro de Estado dos Negócios da Agricultura e referendado pelos da Fazenda, das Relações Exteriores e da Viação e Obras Públicas. **Diário Oficial da União**, Seção 1, Página 8514. Brasília, DF, 1934.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa N° 23, de agosto de 2004. Adota o Standart 3.7 Requisitos Fitossanitários Harmonizados por Categoria de Risco para Ingresso de Produtos Vegetais, 2ª revisão, anexo a esta Instrução Normativa. **Diário Oficial da União**, Seção 1, Página 27, Brasília, DF, 2004.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa N°9, de março de 2005. Atribui ao Departamento de Sanidade Vegetal – DSV as responsabilidades e funções à Organização Nacional de Proteção Fitossanitária – ONPF do Brasil, conforme estabelecido no Art. IV da Convenção Internacional de Proteção dos Vegetais. **Diário Oficial da União**, Seção 1, Página 30. Brasília, DF, 2005a.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa N° 6, de 16 de maio de 2005. Condicionar a importação de espécies vegetais, suas partes, produtos e subprodutos à publicação dos requisitos fitossanitários específicos no Diário Oficial da União, estabelecidos por meio de Análise de Risco de Pragas- ARP. **Diário Oficial da União**, Seção 1, Página 5. Brasília, DF, 2005b.

BRIOSO, P. S. T. Laboratório Oficial de Diagnóstico Fitossanitário (L.O.D.F.). Rede Nacional de Laboratórios Agropecuários do Sistema Unificado de Atenção à Sanidade Agropecuária (SUASA/ MAPA). Criada em 2014. Disponível em: <<http://www.fito2009.com/fitop/labmapa.html/>>. Acesso em: 08 de Setembro de 2016.

CIPV. **Normas Internacionais para Medidas Fitossanitárias n. 05 – Glossário de Termos Fitossanitário**. Roma: FAO, 2009. P 7. Disponível em: <http://abcsem.com.br/upload/arquivos/NIMF_05_2009.pdf> Acesso em: 07 de setembro, 2016.

CORDEIRO, M. C. R.; GOULART, A. M. C.; COSTA, A. M & SHARMA, R. D. **Identificação Molecular de Nematóides de Galhas, *Meloidogyne* spp.** Planaltina, DF:

Embrapa Serrado, 2008. 20p. (Boletim de pesquisa e desenvolvimento/ Embrapa Serrado, ISSN 1676-918 X : 219)

CZEPAK, C.; ALBERNAZ, K.C.; VIVAN, L.M.; GUIMARÃES, H.O.; CARVALHAIS, T. Primeiro registro de ocorrência de *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v.43, p.110-113, 2013.

DAHER, E. Uma Questão de Soberania Nacional. In: **Defesa Vegetal – Fundamentos, Ferramentas, Políticas e Perspectiva**. Belo Horizonte: Sugayama, Lopes-da-Silva, Ribeiro & Rangel. 2015. p XI - XII.

DUARTE, V & TELÓ, P. S. Diagnóstico Fitossanitário no Contexto da Defesa Sanitária Vegetal. In: **Defesa Vegetal – Fundamentos, Ferramentas, Políticas e Perspectiva**. Belo Horizonte: Sugayama, Lopes-da-Silva, Ribeiro & Rangel. 2015. p 127- 135.

EMBRAPA- Empresa Brasileira de Pesquisa Agrícola. **Pragas Quarentenárias: potenciais invasoras que ameaçam nossas lavouras**. 2016a Disponível em:< <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/11264643/pragas-quarentenarias-potenciais-invasoras-que-ameacam-nossas-lavouras>.> Acesso em: 05 de agosto 2016.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuária. **Inteligência territorial identifica áreas suscetíveis**. 2016b. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/11266477/inteligencia-territorial-identifica-areas-suscetiveis>.> Acesso em: 07 de setembro de 2016.

FIESP. **Balança comercial brasileira do agronegócio**. Disponível em: <<http://www.fiesp.com.br/indices-pesquisas-e-publicacoes/balanca-comercial/>>. Acesso em: 21 de julho. 2016.

FERRAZ, L. C. C. B.; MONTEIRO, A. R. & INOMOTO, M. M. **Método de extração de nematoides de amostras de solo e raízes**. 2012. Disponível em: <<http://nematologia.com.br/wp-content/uploads/2012/08/mextra.pdf>.> Acesso em: 11 de setembro de 2016.

GUIMARÃES, I. C. O.; PEREIRA, J.; CORNÉLIO, V. M. O.; BATISTA, L. R.; EVANGELISTA, R. M & FERREIRA, E. B. Comparação de metodologias para detecção de fungos em arroz irradiado. **Rev Inst Adolfo Lutz**. São Paulo, 2010; 69(2):194-200.

HABIB, M.E.M.; FERNANDES, W. D. *Anthonomus gradis* Boheman (Curculionidae) já esta na lavoura algodoeira do Brasil. **Revista de Agricultura**, v. 58, p74, 1983.

HENNING, A. A. **Patologia e tratamento de sementes: noções gerais/** Ademir Assis Henning. 2. Ed. – Londrina: Embrapa Soja, 2005. 52p.

MAPA. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Manual de análise sanitária de sementes/** Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília: MAPA/ACS, 2009. 200p.

MAPA- Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Agropecuária Brasileira – Avanços e conquistas.** Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/AGROPECUARIA%20BRASILEIRA_AVANÇOS%20E%20CONQUISTAS%202015_2016.pdf> . Acesso em: 19 de julho, 2016.

RANGEL, L. E. D. Política Fitossanitária Brasileira. *Defesa Vegetal – Fundamentos, Ferramentas, Políticas e Perspectiva.* Belo Horizonte: Sugayama, Lopes-da-Silva, Ribeiro & Rangel. 2015. p 16-26.

REIS, E. M; CASA, R. T; MICHELI, C. **Ocorrência de epidemia da ferrugem da soja no Rio Grande do Sul na safra 2001/2002.** In XXXV CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA 2002, Recife. p. 198.

VALLE. B & BICHO, G. G. A nova norma para laboratório de ensaio e calibração. *Revista Metrologia Instrumentação - Laboratórios & Controle de Processos*, Ano I, nº 5, abril de 2001.

YORINORI, J. T.; LAZZAROTTO, J. J. **Situação da ferrugem asiática da soja no Brasil e na América do Sul.** Londrina: Embrapa soja, 2004. 27 p. (Documento 236)

SILVA, M. L.; SILVA, S. X. B.; SUGAYAMA, R. L.; RANGEL, E. P.; RIBEIRO, C. L. Defesa vegetal: conceito, escopo e importância estratégica. In: **Defesa Vegetal – Fundamentos, Ferramentas, Políticas e Perspectiva.** Belo Horizonte: Sugayama, Lopes-da-Silva, Ribeiro & Rangel. 2015. p 6-7.

STANCIOLI, A. R & SUGAYAMA, R. L.; Análise de Risco de Pragas. In: **Defesa Vegetal – Fundamentos, Ferramentas, Políticas e Perspectiva.** Belo Horizonte: Sugayama, Lopes-da-Silva, Ribeiro & Rangel. 2015. p 165- 183.

SUGAYAMA, R. L.; IEDE, E. T.; STANCIOLI, A. R.; ALVES, G. A.; OLIVEIRA, I. M.; DIAS, J. A. Ameaças Fitossanitárias. In: **Defesa Vegetal – Fundamentos, Ferramentas, Políticas e Perspectiva.** Belo Horizonte: Sugayama, Lopes-da-Silva, Ribeiro & Rangel. 2015. p 449-472.