



ANA YELI MORALES HERNÁNDEZ

**COMPOSTO ORGÂNICO INOCULADO COM *Beijerinckia indica* E
Cunninghamella elegans NA BIOFERTILIZAÇÃO E MANEJO DE ANTRACNOSE
EM PIMENTEIRA**

TERESINA – PI

2019

ANA YELI MORALES HERNÁNDEZ

**COMPOSTO ORGÂNICO INOCULADO COM *Beijerinckia indica* E
Cunninghamella elegans NA BIOFERTILIZAÇÃO E MANEJO DE ANTRACNOSE
EM PIMENTEIRA**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal do Piauí, como
parte das exigências do Programa de
Pós-Graduação em Agronomia-
Agricultura Tropical, para obtenção do
título de Mestre em Ciências.

Orientador

Prof. Dr. Francisco de Alcântara Neto

Coorientador

Prof. Dr. Jadson Emanuel Lopes Antunes

Teresina-PI

2019

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Setorial do Centro de Ciências Agrárias
Serviço de Processamento Técnico

M828c Morales Hernández, Ana Yeli

Composto orgânico inoculado com *Beijerinckia indica* e
Cunninghamella elegans na biofertilização e manejo de
antracnose em *Capsicum* spp., *Colletotrichum* sp. em pimenteira.
/ Ana Yeli Morales Hernández – 2020.
55 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Piauí,
Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Teresina, 2020.
Orientação: Prof. Dr. Francisco de Alcântara Neto

1. *Capsicum* spp., 2. *Colletotrichum* sp. 3. Bactérias
diazotróficas 4. Acumulo de nutrientes I.Título

CDD 635.643

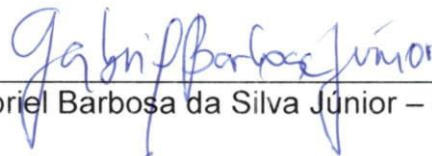
ANA YELI MORALES HERNÁNDEZ

Composto orgânico inoculado com *Beijerinckia indica* e *Cunninghamella elegans* na biofertilização e manejo de Antracnose em pimenteira

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Piauí, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia-Agricultura Tropical, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

APROVADA em 08 de outubro de 2019.

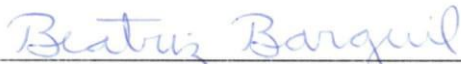
Comissão Julgadora:



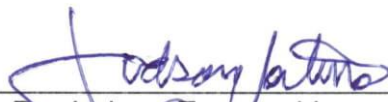
Prof. Dr. Gabriel Barbosa da Silva Júnior – CCA/UFPI



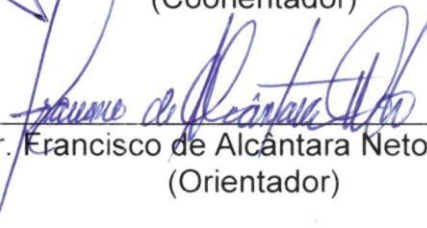
Prof. Dr. Ricardo Silva de Sousa – CCA/UFPI



Profa. Dra. Beatriz Meireles Barguil – UESPI



Prof. Dr. Jadson Emanuel Lopes Antunes – PNP/UFPI
(Coorientador)



Prof. Dr. Francisco de Alcântara Neto – CCA/UFPI
(Orientador)

TERESINA-PI

2019

Para minha avó Esperanza Solís Argüello (in memoriam) que me ensinou como me reerguer diante das adversidades da vida. Saudade eterna;

A minha família pelo apoio incondicional.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, acima de qualquer coisa, por me manter firme nas dificuldades, dando-me o conforto e a sabedoria para enfrentar meus obstáculos.

Ao Conselho Nacional de Ciência e Tecnologia (CONACYT), pela concessão da bolsa durante todo o período de realização deste mestrado.

À Universidade Federal do Piauí (UFPI), pela qualidade no ensino e ao Programa de Pós-graduação em Agronomia – Agricultura Tropical, em especial aos professores do programa pelos ensinamentos transmitidos.

Ao Programa de Melhoramento Genético de Cana-de-Açúcar pela disponibilização do espaço físico e suporte na presente pesquisa.

Ao Prof. Dr. Francisco de Alcântara Neto, pelas orientações, por acreditar e incentivar a produção deste trabalho, além dos seus ensinamentos e paciência.

Ao Prof. Dr. Ademir Sergio Ferreira de Araújo, pela coorientação e apoio nesta pesquisa.

Ao Prof. Dr. Jadson Emanuel Lopes Antunes, pela coorientação na execução da pesquisa.

Ao Prof. Dr. Maruzanete Pereira de Melo, pelas indispensáveis contribuições na finalização do trabalho.

Ao Prof. Dr. Edson Cavalcanti da Silva Filho, pela orientação e sugestões para a realização do trabalho.

À Leudimar Aires Pereira, pela orientação na redação científica.

A todos os meus familiares, principalmente a meu pai Eloy Morales, minha mãe Elizabeth Hernandez, e meus irmãos Ruth Nereyda Morales, Luis Alberto Morales, Jaqueline Morales e Ismael Morales, pelo incentivo e por entender as vezes em que não pude estar presente.

Por fim, a todos que direta ou indiretamente colaboraram para o término do presente trabalho.

Meus sinceros agradecimentos

“A Inovação guiada por pequenos agricultores, adaptado às circunstâncias locais e sustentável para a economia e o meio ambiente será necessário para garantir a segurança alimentar no futuro.”

Bill Gates

RESUMO

COMPOSTO ORGÂNICO INOCULADO COM *Beijerinckia indica* E *Cunninghamella elegans* NA BIOFERTILIZAÇÃO E MANEJO DE ANTRACNOSE EM PIMENTEIRA

A interação entre bactérias diazotróficas e plantas têm sido alvo de diversos estudos, visto que atuam diretamente no metabolismo das plantas fornecendo substâncias pouco disponíveis, seja fixando nitrogênio atmosférico, solubilizando fosfatos, produzindo fitohormônios importantes na regulação do crescimento ou realizando controle biológico de fitopatógenos. Neste contexto, este trabalho foi conduzido em três etapas com o objetivo de avaliar a fonte orgânica que, ao ser inoculada com bactéria diazotrófica de vida livre (*Beijerinckia indica*) e adição da massa micelial do fungo *Cunninghamella elegans*, propicia maior aporte de nutrientes em plantas de pimenta e, a partir de diferentes doses de quitosana fúngica e comercial, avaliar o controle da antracnose em frutos de pimenta causada por *Colletotrichum* sp. Na primeira etapa, durante 65 dias, os tratamentos consistiram de três fontes orgânicas (EB= esterco bovino; HM= húmus de minhoca e TF= torta de filtro de cana-de-açúcar) individualmente e em misturas. Os tratamentos foram submetidos às análises de quantificação de N, P, K, Ca, Mg, carbono orgânico e matéria orgânica. Em uma segunda etapa, conduzida em casa de vegetação, procedeu-se a avaliação de plantas de pimenta durante um ciclo de cultivo de 120 dias, utilizando o EB, definido como melhor fonte orgânica na etapa anterior. Os tratamentos consistiram de cinco doses (0, 20, 40, 60 e 80 kg ha⁻¹) de EB contendo *B. indica* e o fungo *C. elegans*. Como controle comparativo do controle da resistência, foi utilizado o produto comercial contendo *Bacillus subtilis* - isolado AP-3. Na terceira etapa, foi extraída a quitina e quitosana do fungo *C. elegans*, confirmada por espectroscopia (FTIR), as quais foram utilizadas para o ensaio de inoculação para avaliar a severidade do *Colletotrichum* sp em frutos de pimenta. A adubação orgânica com uso de esterco bovino inoculado com bactéria diazotrófica de vida livre e *Cunninghamella elegans*, incrementa a disponibilidade de nutrientes, principalmente de N, K e indiretamente aumenta a disponibilidade de Ca e Mg. O esterco bovino na dose de 80 g kg⁻¹ promove maior comprimento de raízes e maior acúmulo de nutrientes na parte aérea das plantas de pimenta. A quitosana oriunda de *C. elegans* tem efeitos significativos na redução de severidade de *Colletotrichum* sp.

Palavras-chave: *Capsicum* spp., *Colletotrichum* sp., bactérias diazotróficas, acúmulo de nutrientes.

ABSTRACT

ORGANIC COMPOUND INOCULATED WITH *Beijerinckia indica* And *Cunninghamella elegans* IN BIOFERTILIZATION AND MANAGEMENT OF ANTHRACNOSE IN PEPPER

The interaction between diazotrophic bacteria and plants has been the target of several studies, since they act directly on plant metabolism by supplying little available substances, either by fixing atmospheric nitrogen, solubilizing phosphates, producing phytohormones important in the regulation. growth or biological control of phytopathogens. In this context, this work was conducted in three stages with the objective of evaluating, from different organic sources inoculated with free-living diazotrophic bacteria (*Beijerinckia indica*) and addition of the mycelial mass of the fungus *Cunninghamella elegans*, which provides the largest contribution of nutrients in pepper plants and from different doses of fungal and commercial chitosan evaluate the control of anthracnose in pepper fruits caused by *Colletotrichum* sp. in the first stage, for 65 days, the treatments consisted of three organic sources (EB = cattle manure; MH = earthworm humus and TF = sugarcane filter cake) in different proportions, individually and in mixtures. The treatments were subjected to analysis of quantification of N, P, K, Ca, Mg, organic carbon and organic matter. In a second stage, conducted under greenhouse conditions, pepper plants were evaluated during a 120 day cultivation cycle, using EB, defined as the best organic source in the previous stage. The treatments consisted of five doses (0, 20, 40, 60 and 80 kg ha⁻¹) of EB containing *B. indica* and the fungus *C. elegans*. As a comparative control of resistance control, the commercial product containing *Bacillus subtilis* - AP-3 isolate was used. In the third stage, the chitin and chitosan were extracted from the *C. elegans* fungus, confirmed by spectroscopy (FTIR), which were used for the inoculation assay to evaluate the severity of the *Colletotrichum* sp in pepper fruits. Organic fertilization using cattle manure inoculated with free-living diazotrophic bacteria and *Cunninghamella elegans* increases nutrient availability, especially of N, K and indirectly increases Ca and Mg availability. The 80 g kg⁻¹ cattle manure promotes longer root length and higher nutrient accumulation of pepper plants. Chitosan from *C. elegans* has significant effects on reducing severity of *Colletotrichum* sp.

Keywords: *Capsicum* spp., *Colletotrichum* sp., diazotrophic bacteria, nutrient accumulation.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Características químicas do solo, na profundidade de 0-20 m, utilizado nesta etapa experimental. Teresina, PI. 2018 23

Tabela 2 Teores de nutrientes, C.O; M.O e C/N nas fontes orgânicas utilizadas na condução do experimento, na fase inicial (sem inoculação e fonte de carboidrato) e aos 65 dias quando utilizado o melão de cana e quando inoculado com *Beijerinckia indica* e *Cunninghamella elegans*. Teresina, PI. 2019 32

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Representação esquemática da estrutura química primária da quitina e da quitosana. 19
- Figura 2** Distribuição dos tratamentos dispostos em vasos de polietileno, com três repetições, no Laboratório de Produção Vegetal. Teresina, PI. 2018. 21
- Figura 3** Inoculante bacteriano NFB 10001 (*B. indica*) (A); Inoculante fúngico *C. elegans* (B). Teresina, PI. 2018. 22
- Figura 4** Visão simplificada da disposição das unidades experimentais em casa de vegetação, Teresina, PI. 2019. 24
- Figura 5** Cultivo do fungo *C. elegans* em frascos de Erlenmeyer (A); biomassa coletada seca a 50 °C (B); massa micelial macerada com almofariz e pistilo de porcelana (C). Teresina, PI. 2019. 25
- Figura 6** Separação da fração insolúvel em álcali (A); separação de quitina por centrifugação (B); precipitação da quitosana (C). Teresina, PI. 2019. 26
- Figura 7** Inoculação pelo método do palito utilizando micélio do *Colletotrichum. sp* (A); medição do disco contendo micélio do *Colletotrichum. sp* no fruto de pimenta (B). Teresina, PI. 2019. 29
- Figura 8** Regressão referente ao acúmulo de NPK na parte aérea (PA) e raiz (RA) de pimenteiras submetidas a diferentes doses de esterco bovino (EB), após 120 dias de cultivo. * Significativo ($P \leq 0,05$)..... 33
- Figura 9** Resposta do número de folhas por plantas (NFP), altura de planta (AP), diâmetro do caule (DC) e teor de clorofila (TCF), aos 60 e 120 dias, à doses de esterco bovino. * Significativo ($P \leq 0,05$). 34
- Figura 10** Altura da planta (AP) após 120 dias do plantio. (A) T5 *Bacillus subtilis* vs T4 (80 g kg⁻¹ EB) (B) T6 (0 g kg⁻¹ EB) vs T4 (80 g kg⁻¹ EB); (C) T6 (0 g kg⁻¹ EB) vs T5 (*Bacillus subtilis*); (D) T6 (0 g kg⁻¹ EB) vs T1 (20 g kg⁻¹)..... 35
- Figura 11** Número de frutos (NF); comprimento do fruto (CF) e peso do fruto de pimentas (PF) em função de diferentes doses de esterco bovino (EB), após 120 dias de cultivo. * Significativo ($P \leq 0,05$). 36
- Figura 12** Matéria seca da parte aérea (MSA) e da raiz (MSR); comprimento de raiz (CR); volume de raiz de pimenteiras (VR) em função de diferentes doses de esterco bovino (EB), após 120 dias de cultivo. * Significativo ($P \leq 0,05$)..... 37
- Figura 13** Comprimento de raiz de plantas de pimentas em função de diferentes doses de esterco bovino aplicadas em plantas de pimenta. Teresina, PI. 2019 38

Figura 14 Espectro de FTIR da quitina fúngica (A), quitosana fúngica (B) e comparação entre quitosana padrão (Polymar) e quitosana fúngica (C)..	39
Figura 15 Severidade do <i>Colletotrichum</i> sp em frutos controle.....	40
Figura 16 Severidade do <i>Colletotrichum</i> sp em frutos feridos após exposição à diferentes concentrações de quitosana de <i>Cunninghamella elegans</i> (A) quitosana comercial (B). Teresina, PI. 2019.....	42
Figura 17 Sintomas de antracnose em frutos feridos (A) e não feridos (B); frutos sem ferimentos inoculados com o método de suspensão conidial (C); frutos inoculados com o método disco (B). Teresina, PI. 2019.....	43
Figura 18 Efeito das doses de quitosana fúngica (QF) sobre a severidade aos sete dias após inoculação pelo método do palito (MP) e método de suspensão de esporos (MS) (A), efeito das doses de quitosana sobre a severidade após sete dias de inoculado (B), efeito das doses de quitosana sobre a severidade após 10 dias de inoculado (C).* Significativo ($P \leq 0,05$)...	44
Figura 19 Sintomas de antracnose em frutos com ferimento (A); Colonização interna do fruto inoculados com o método do palito (B). Teresina, PI. 2019	45

SUMÁRIO

	Pág.
RESUMO.....	vi
ABSTRACT	vii
LISTA DE TABELAS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
1 INTRODUÇÃO.....	12
2 REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1 A cultura da pimenta.....	14
2.2 Bactérias diazotróficas de vida livre para disponibilizar nutrientes	15
2.3 Doença pós-colheita da cultura da pimenta: Antracnose	16
2.4 Medidas de controle da antracnose em pimenta.....	17
2.5 Uso da quitina e quitosana na agricultura	19
3 MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1 Etapa 1 - Avaliação de fontes orgânicas no aporte de nutrientes.....	21
3.2 Etapa 2 – Avaliação biométrica e produtiva de plantas de pimenta submetidas a diferentes doses de composto orgânico.....	23
3.3 Etapa 3 - Extração e avaliação da quitosana a partir de isolados de <i>C. elegans</i> na proteção de frutos de pimenta isolados com <i>Colletotrichum</i> sp.....	25
3.3.1 Extração de quitina e quitosana.....	25
3.3.2 Preparo da solução de quitosana	26
3.3.3 Caracterização da quitosana por Espectroscopia na região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)	26
3.3.4 Ensaio de inoculação.....	27
3.4 Análise estatística.....	29
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
4.1 Avaliação de fontes orgânicas no aporte de nutrientes.....	30
4.2 Condução da fase experimental em casa de vegetação	32
4.3 Biomassa e extração de quitina e quitosana de isolado de <i>Cunninghamella elegans</i> no controle de <i>Colletotrichum</i> sp	38
4.3.1 Extração e caracterização de quitosana	38
4.3.2 Severidade de antracnose em frutos de pimenta	40
CONCLUSÕES.....	46
REFÊRENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47

1 INTRODUÇÃO

A grande diversidade de pimentas (*Capsicum* spp.) no Brasil, associada à utilização *in natura* ou processada na forma de molhos, conservas e desidratadas, representa uma importante parcela do mercado agrícola brasileiro, particularmente voltada à agricultura familiar onde seu cultivo é mais expressivo (FERRAZ et al., 2016).

A pimenteira é uma planta bastante exigente quanto às características químicas e físicas do meio de cultivo, tornando-se necessário o uso de fertilizantes minerais para garantir o crescimento vigoroso e rendimento produtivo. No entanto, a utilização desses fertilizantes pelos agricultores de baixa renda se torna limitada em virtude dos elevados preços, além de serem bastante agressivos ao solo por conterem nitratos e fosfatos em sua composição (SANCHEZ, 2002; OLIVEIRA, 2014). Neste sentido, uma alternativa viável é a utilização de biofertilizantes oriundos da digestão aeróbica de fontes orgânicas, como forma de reduzir os custos de produção e proporcionar benefícios ambientais (reciclagem de resíduos biodegradáveis) e agrícola (incorporação de nutrientes e matéria orgânica ao solo) (KIEHL, 1993; COUTINHO et al., 2006).

Além da adubação com fertilizantes orgânicos, outra alternativa seria a utilização de microrganismos benéficos, como fungos e bactérias, que possam disponibilizar nutrientes necessários ao crescimento e desenvolvimento das plantas. Dentro desse contexto, o potencial de algumas bactérias de vida livre, como as pertencentes ao gênero *Beijerinckia* tem sido verificado atuando diretamente no metabolismo das plantas e fornecendo substâncias pouco disponíveis no solo, seja fixando nitrogênio atmosférico, solubilizando fosfatos e/ou produzindo fitohormônios importantes na regulação do crescimento (OLIVEIRA et al., 2017; ETMINANI ;HARIGHI, 2018). Trabalhando com composto de minhoca como fonte orgânica, Lima et al. (2010) verificaram que o enriquecimento do composto utilizando o isolado *B. indica* apresentou maiores incrementos de nitrogênio com apenas 34 dias de incubação, reforçando a importância desse método para uso como insumo agrícola.

Algumas pesquisas têm demonstrado que a quitina pode ser utilizada no aporte de nutrientes para o solo, visto que apresenta grupos amínicos em sua composição (BERGER, 2010; FELIX, 2011). Além disso, estudos conduzidos por Stamford et al. (2017) demonstraram que a inoculação do fungo *Cunninghamella elegans* em fontes orgânicas apresenta a capacidade de inibir o crescimento micelial de alguns fungos

fitopatogênicos, através da quitosana fúngica liberada. De acordo com Sotelo-Boyás et al. (2015), a composição da quitosana oriunda de *C. elegans* inclui substâncias ativas (terpenóides, ésteres, aldeídos e compostos fenólicos) com propriedades antibacterianas e antifúngicas. Além de outras características favoráveis à inibição do desenvolvimento de microrganismo, possui grau de desacetilação em torno de 70 a 90%, e peso molecular médio de $1-2 \times 10^5$ Daltons (PHILIBERT et al., 2017).

A quitosana é um polissacarídeo natural de origem animal, extraída por meio da desacetilação alcalina da quitina, encontrada no exoesqueleto de insetos ou crustáceos e da parede celular de fungo (PEREIRA et al., 2019). O rendimento de quitosana por unidade de massa micelial extraída da quitina presente na parede celular do fungo *C. elegans* é em média 2,14 g/L, com grau médio de desacetilação de 75,25% (SANTOS et al., 2013; PHILIBERT; LEE; FABIEN, 2017).

Entre as diversas doenças fúngicas que acometem às culturas agrícolas, a antracnose tem se destacado causando prejuízos significativos na pimenteira. Essa doença, causada por um complexo de espécies do gênero *Colletotrichum* sp, é considerada o oitavo grupo mais importante de fungos fitopatogênicos do mundo, de acordo com a percepção científica e importância econômica (DEAN et al., 2012).

Neste sentido, essa pesquisa teve como objetivo avaliar diferentes fontes orgânicas inoculadas com bactérias diazotróficas de vida livre NFB 10001 (*Beijerinckia indica*) e adição da massa micelial do fungo *Cunninghamella elegans*, na disponibilização de nutrientes para plantas de pimenta e no manejo da antracnose causada por *Colletotrichum* sp, em frutos de pimenta, a partir de diferentes doses de quitosana fúngica e comercial.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A cultura da pimenta

As pimentas (*Capsicum* spp.) são vegetais pertencentes à família Solanaceae, originárias das regiões tropicais americanas, que apresentam grande variabilidade quanto às características de aparência externa, tamanho, formato, cores e pungência (BOSLAND, 1999). Das 35 espécies do gênero *Capsicum* spp., apenas cinco delas são domesticadas e cultivadas: *C. annuum*, *C. baccatum*, *C. chinense*, *C. frutescens* e *C. pubescens* (CARRIZO et al., 2016; PASQUALE; KUMAR, 2019).

A pimenteira é uma planta com ampla formação de ramificações laterais, porte arbustivo e que pode atingir até 1,20 m de altura, tendo a possibilidade de tornar-se perene (FILGUEIRA, 2008). Os frutos tipo baga possuem, em sua maioria, sabor pungente característico, que varia entre as espécies, devido à presença do alcalóide capsaicina na placenta, embora também existam pimentas doces (REIFSCHNEIDER, 2015).

De acordo com dados da FAO (2016), a produção mundial de pimenta fresca naquele ano foi de aproximadamente 31 milhões de toneladas, tendo como maiores produtores, no ano de 2013, a China (15,8 milhões de toneladas), México (2,3 milhões de toneladas), Turquia (2,2 milhões de toneladas) e Indonésia (1,72 milhões de toneladas). Neste contexto, estima-se que existam no Brasil aproximadamente 5 mil hectares cultivados com pimenta, com produção de 75 mil toneladas, sendo as regiões sudeste e centro-oeste as principais áreas de cultivo no país (PINHEIRO et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2017a).

Considerado o condimento picante mais importante do mundo, o mercado de pimentas hortícolas do gênero *Capsicum* representa um segmento com potencial de crescimento em todos os continentes, sendo consumido por 1/4 da população mundial (CARVALHO et al., 2008), principalmente na forma de condimentos, *in natura* ou processada na forma de molhos, conservas e especiarias desidratadas (MOREIRA et al., 2006).

O cultivo de pimenta apresenta grande importância socioeconômica devido sua rentabilidade, principalmente quando se agrega valor comercial ao produto final, para a agricultura familiar onde seu cultivo é mais expressivo. Todavia, o desempenho produtivo e a rentabilidade da cultura dependem de uma série de fatores que incluem

desde às condições edafoclimáticas, material genético, qualidade da semente e manejo da cultura (OLIVEIRA et al., 2017).

2.2 Bactérias diazotróficas de vida livre para disponibilizar nutrientes

A produtividade das culturas pode ser melhorada com uso de fertilizantes minerais solúveis, especialmente aqueles que fornecem nitrogênio, fósforo e potássio. No entanto, os custos de produção com esses fertilizantes são elevados e crescentes em relação à quantidade de nutrientes disponíveis às plantas, aumentando possíveis danos ambientais associados à dependência de recursos não renováveis para a nutrição das plantas (SILVA et al., 2016; STAMFORD et al., 2017).

Diversos estudos com biofertilizantes oriundos da digestão anaeróbica de compostos orgânicos (esterco de animais, materiais vegetais e sais minerais) têm sido realizados para substituir os fertilizantes minerais, proporcionando benefício ambiental (reciclagem de resíduos biodegradáveis) e agrícola (incorporação de nutrientes e matéria orgânica ao solo) (KIEHL, 1993).

De acordo com Zaccardelli et al. (2018), o uso de compostos orgânicos, apresenta-se como alternativa na obtenção de características físicas e químicas favoráveis à nutrição e desenvolvimento das plantas. Weckner et al. (2018) relata que a aplicação de biofertilizantes melhora as propriedades físicas, químicas e biológicas do solo, contribuindo para o suprimento equilibrado de macro e micronutrientes, pela fixação biológica de nitrogênio, solubilização de fosfato e potássio, com liberação de substâncias que regulam o crescimento das plantas e a biodegradação da matéria orgânica no solo.

Devido ao seu papel na formação de proteínas, ácidos nucléicos e outros componentes necessários para o desenvolvimento da planta, o nitrogênio constitui-se no principal macronutriente utilizado pelas plantas (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Neste sentido, a fixação biológica de nitrogênio (FBN) é um dos processos biológicos importantes para disponibilizar esse nutriente à planta, especialmente quando há interação simbiótica entre bactérias leguminosas e rizóbios, bactérias diazotróficas associativas dos gêneros *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Gluconacetobacter*, *Burkholderia* e outras (BALDANI et al. 1997). As bactérias diazotróficas de vida livre e associativas têm maior capacidade de melhorar o N total no ecossistema do solo, fixando cerca de 50 a 200 kg N ha⁻¹ ano⁻¹ e 30 a 80 kg N ha⁻¹ ano⁻¹, respectivamente

e vai depender da cultura. Dessa forma, as bactérias diazotróficas podem ser utilizadas como alternativa para o enriquecimento de N, especialmente quando usadas associadas com fontes orgânicas (STAMFORD et al., 2017).

A interação entre bactérias diazotróficas e plantas têm sido objeto de vários estudos que envolvem a promoção do crescimento, visto que atuam diretamente no metabolismo das plantas fornecendo substâncias pouco disponíveis, fixando nitrogênio atmosférico, solubilizando fosfatos, produzindo importantes hormônios na regulação do crescimento ou realizando biocontrole de patógenos (STAMFORD et al., 2017; ETMINANI; HARIGHI, 2018).

2.3 Doença pós-colheita da cultura da pimenta: Antracnose

As plantas estão expostas a vários patógenos no ambiente de cultivo, os quais podem causar danos significativos e, conseqüentemente, perdas na produção em virtude do estresse sofrido pelas plantas. No cultivo de *Capsicum* podem-se observar doenças causadas por bactérias, vírus, fungos e nematoides que afetam diretamente o funcionamento fisiológico que resultam de interações complexas com o patógeno (ALI et al., 2016; JIMÉNEZ, 2018).

Entre as diversas doenças causadas por fungos e que acarretam prejuízos na pimenteira está a antracnose causada por espécies do gênero *Colletotrichum*, considerado o oitavo genero de fungos fitopatogênicos mais importante do mundo (DEAN et al., 2012). Dentre as espécies mais relatadas na literatura, encontram-se *C. capsici* (Syd.) Butler and Bisby, *C. acutatum* (Simmonds), *C. dematium*, *C. coccodes* (Wallr.) S. Hughes e *C. gloeosporioides* (Penz & Sacc.) (SAXENA et al., 2016). No nordeste do Brasil, cinco espécies de *Colletotrichum* foram obtidas em frutos de pimentas e pimentão, evidenciando a importancia deste grupo de patogeno nestas espécies olerícolas (SILVA et al., 2016).

Em *Capsicum* spp, na maioria dos casos, as infecções fúngicas pós-colheita ocorrem quando conídios do acérvulo ou microescleródios são respingados por irrigação ou durante precipitações. Além disso, as condições úmidas agravam a taxa de infecção, já que o fungo prospera melhor nessas condições. Os conídios aderem-se à superfície dos frutos e começam a germinar, desenvolvendo uma estrutura especializada chamada de apressório que facilita a penetração mecânica na epiderme do fruto (ALI et al., 2016). Nesta fase, a infecção fúngica pode permanecer inativa até

a maturação e senescência do fruto, em virtude da colonização biotrófica do fungo (PRUSKY; LICHTER, 2007).

A temperatura possui grande influência no desenvolvimento do fungo, tanto em seu crescimento micelial, esporulação e germinação de conídios, quanto na coloração das colônias (MAIA et al., 2011). Temperaturas em torno de 27 °C e umidade elevada (média de 80%) são condições ideais ao desenvolvimento da antracnose (ROBERTS et al., 2001). Nestas circunstâncias, a antracnose é altamente destrutiva e pode causar perdas de até 100% na produção de frutos (KUROZAWA; PAVAN, 2005).

Os sintomas de antracnose em pimenteiras podem se expressar tanto em folhas, caules ou em frutos, normalmente em formato de lesões deprimidas circulares ou irregulares, com manchas necróticas, secas ou encharcadas e de coloração parda, podendo ocorrer durante o desenvolvimento da cultura ou na pós-colheita dos frutos (BLACK; GREGERSEN, 1991; DAMM et al., 2012). Nos estágios mais avançados da infecção, as lesões são cobertas por anéis concêntricos de acérvulos com coloração salmão (KIM et al., 1999). A principal fase da doença é quando afeta os frutos, onde a lesão é mais típica e destrutiva, apresentando formato circular com borda elevada e de diferentes tamanhos, com anéis concêntricos de acérvulos que podem afetar todo o fruto e torná-lo impróprio para o mercado (MANANDHAR et al., 1995; TÖFOLI et al., 2015).

2.4 Medidas de controle da antracnose em pimenta

O controle de patógenos nos sistemas agrícolas mundial é baseado principalmente no uso de agrotóxicos (CARVALHO, 2017), tornando-se componente importante no manejo agrícola (FAO, 2012). No entanto, este sistema agrícola é extremamente problemático para o meio ambiente, principalmente por interferir no equilíbrio dos ecossistemas e provocar efeitos sobre as mudanças climáticas e na perda da diversidade biológica (ONU, 2017).

Segundo Rotem; Palti; Kranz (1980), os três princípios que fundamentam o controle cultural são: a) supressão do aumento e/ou destruição do inoculo existente; b) escape das culturas ao ataque potencial do patógeno e; c) regulação do crescimento da planta direcionado à menor suscetibilidade. O potencial de controle cultural, ou por práticas culturais, está diretamente relacionado com a oportunidade de manipulação das condições de crescimento das plantas.

Diversas práticas culturais têm sido usadas como pré-requisitos para controle da antracnose em pimentão pós-colheita, devido à etiologia especial do patógeno. Essas medidas de precaução são implementadas para minimizar a taxa de infecção e reduzir a pressão de infecção mesmo antes dos frutos estarem maduros e colhidos (ALI et al., 2016).

As principais práticas no controle da antracnose em *Capsicum* spp. consistem no uso de mudas ou sementes saudáveis, utilizar irrigação por gotejamento, evitar plantar em áreas com histórico da doença, realizar rotação de culturas que não sejam hospedeiras alternativas a *Colletotrichum* sp a cada 2 a 3 anos, eliminar restos de cultura da área e plantas invasoras hospedeiras, além de realizar adubação equilibrada (THAN et al., 2008).

No entanto, devido à adoção contínua de fungicidas químicos por longos períodos no controle de outras doenças podem desencadear estirpes resistentes, tornando os fungicidas ineficazes, além de não poder ser usado no manejo pós-colheita devido ao risco da agregação ao fruto e resquícios dos resíduos químicos tóxicos ao organismo humano, podendo provocar sérios problemas de saúde (STAUB, 1991). Além disso, os incrementos dos custos, a perda de eficiência de alguns produtos e os problemas ambientais advindos, indicam a necessidade da adoção de práticas mais sustentáveis de manejo.

A utilização de agentes alternativos de controle representa uma tática promissora para redução do uso de agrotóxicos (RIBEIRO et al., 2016). Nesse sentido, os fungos *Rhizopus arrhizus*, *Cunninghamella elegans* e *Muco hiemalis* (Ordem Mucorales, Classe Zygomycetes) são considerados de alto interesse econômico e científico, por apresentarem quitina em suas paredes celulares, um polissacarídeo do qual pode ser extraído outro polissacarídeo chamado quitosana (ANDRADE et al., 2015; STAMFORD et al., 2017).

El Ghaouth et al., 1997 propôs que o revestimento de quitosana atua como barreira limitando a penetração do fungo, e estimulando as reações estruturais de defesa, como a formação de protuberâncias hemisféricas ao longo das paredes das células hospedeiras, espessamento da parede celular e oclusão de muitos espaços intercelulares com material fibrilar no espécimen da pimenta.

Estudos mais recentes mostraram que frutos de abacateiro 'Hass' pulverizados com quitosana reduziu 67% da severidade de *Colletotrichum gloeosporioides*, mantendo a qualidade do fruto (KALEDA, 2018).

2.5 Uso da quitina e quitosana na agricultura

A quitina é um biopolímero formado por unidades monoméricas repetidas de β -(1-4)-N-acetil-D-glucosamina, considerado o segundo polissacarídeo natural mais abundante (depois da celulose) (PHILIBERT; LEE; FABIEN, 2017). A quitosana é copolímero constituído de unidades de D-glucosamina e N-acetilglucosamina, por meio de ligações β -(1 \rightarrow 4), derivado da desacetilação parcial da quitina (MORENO et al., 2017; WU et al., 2018; PEREIRA et al., 2019) (Figura 1). A capacidade de solubilizar-se em ácidos orgânicos e o grau médio de acetilação são as principais características que diferenciam a quitosana em relação à quitina (CÂNDIDA et al., 2017).

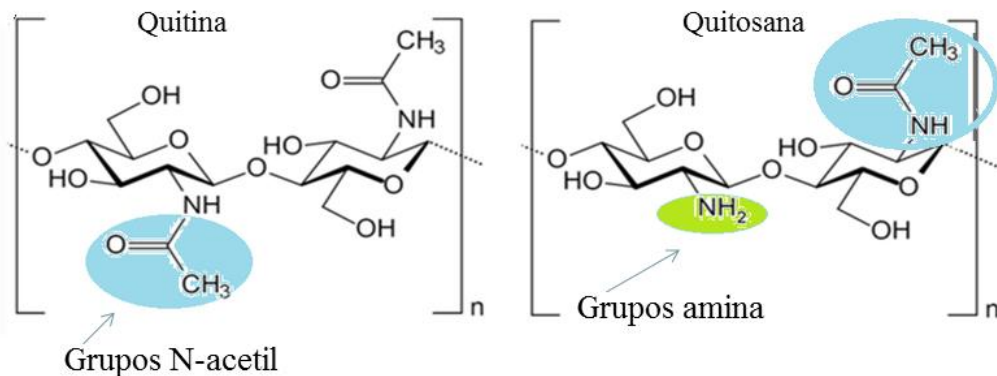


Figura 1 Representação esquemática da estrutura química primária da quitina e da quitosana.

A quitina é um polissacarídeo encontrado em ampla gama de fontes naturais, como concha de crustáceos, exoesqueleto de insetos e na parede celular de fungos (STAMFORD, 2007; CÂNDIDA et al., 2017).

A quitosana é extensamente estudada devido ao seu potencial promissor nas áreas farmacêuticas, biomédicas, alimentícias e na agricultura, porém apresenta propriedades peculiares, tais como: biodegradabilidade, biocompatibilidade, bioatividade, permeabilidade seletiva, ação polieletrólita, quelação, propriedades de troca iônica, atividade antitumoral e antimicrobiana (MORENO et al., 2017; BATISTA, 2018; DANG et al., 2018)

Os fungos da classe Zygomycetos, divisão Zygomycotina e, mais especificamente da ordem Mucorales possuem maiores quantidades deste polímero, sendo utilizados para estabelecer a otimização da extração de quitosana fúngica (BERGER et al., 2009). Em valores, as propriedades físico-químicas da quitosana

como grau de N-desacetilação, estão em torno de 60 a 100% (GAVHANE et al., 2013). A parede celular do fungo *Cunninghamella* sp. é composta principalmente por uma rede de moléculas interconectadas constituídas por proteínas, glucanas, quitina, lipídios e polifosfatos (BATISTA et al., 2018).

A utilização da biomassa fúngica para extração destes biopolímeros apresenta vantagens como: independência de fatores sazonais, produção em larga escala, extração simultânea de quitina e quitosana e com baixo custo, além de evitar reações alérgicas a proteínas de crustáceos, viabilizando a comercialização deste polímero (CÂNDIDA et al., 2017).

Na agricultura orgânica e sustentável a quitosana têm ganhado especial atenção em função da proteção fitossanitária, onde compostos orgânicos inoculados com fungos *Cunninghamella elegans*, que contêm quitina na sua biomassa, pode ser transformada em quitosana, atuando na proteção da planta contra fitopatógenos, além de favorecer no aumento da disponibilidade de nutrientes (ANDRADE et al., 2015; SILVA et al., 2016).

O grande potencial da quitosana no prolongamento da vida útil e controle de doenças em frutas tais como morangos, pêssegos, mamões e uvas têm sido comprovados em diversos trabalhos. Stamford et al. (2017) relatam que a quitina e a quitosana favorecem o crescimento das plantas devido à introdução de maior quantidade de nitrogênio e melhoria de defesa contra patógenos microbianos sendo, portanto, uma alternativa importante na produção de bioprotetores. Resultados apresentados por Oliveira et al. (2014) demonstrou efeito positivo no revestimento de uva (*Vitis labrusca* L.) com quitosana extraída do fungo *C. elegans*, o qual impediu o crescimento de fungos fitopatogênicos.

Stamford et al. (2015) registraram uma patente no Brasil descrevendo as habilidades de biofertilizante e bioprotetor da quitosana fúngica. Esta quitosana foi associada a biofertilizante misto (fosfato e potássio, juntamente com enxofre e inoculo de bactérias *Acidithiobacillus*), resultando em produto com alto efeito fertilizante e protetor contra microrganismos fitopatogênicos presentes no solo.

O interesse comercial das aplicações de quitosana aumentou nas últimas três décadas, contudo, a literatura relata diferentes atividades biológicas da quitosana fúngica na área agrícola e biotecnológica, como um produto com grande potencial no controle de microrganismos fitopatogênicos na proteção de frutos pós-colheita (BATISTA et al., 2018).

3. MATERIAL E MÉTODOS

O procedimento experimental desenvolvido no presente estudo foi realizado, em três etapas distintas, no período de janeiro 2018 a setembro de 2019, nas dependências da sede do Programa de Melhoramento Genético de Cana-de-Açúcar (PMGCA) vinculado ao Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal do Piauí (UFPI), em Teresina – PI.

3.1 Etapa 1 - Avaliação de fontes orgânicas no aporte de nutrientes

Este experimento foi instalado em delineamento inteiramente casualizado, com três repetições, constituído por três fontes orgânicas: esterco bovino (EB); húmus de minhoca (HM) e torta de filtro de cana-de-açúcar (TF), provenientes do Departamento de Zootecnia/UFPI; Agroterra e Usina Comvap, respectivamente.

O experimento consistiu de sete tratamentos correspondentes às três fontes orgânicas dispostas, individualmente e em mistura, em diferentes proporções: **(T1)** - 4 litros EB; **(T2)** - 4 litros HM; **(T3)** - 4 litros TF; **(T4)** - 2 litros HM + 2 litros TF; **(T5)** - 2 litros HM + 2 litros EB; **(T6)** - 2 litros EB + 2 litros TF; **(T7)** - 1,4 litros HM + 1,4 litros EB + 1,4 litros TF. Cada unidade experimental (Figura 2) foi representada por vasos de polietileno (tipo jardineira), com capacidade para 13 litros, mais um controle para cada tratamento (sem *Beijerinckia indica* e sem *Cunninghamella elegans*).

Cada tratamento foi inoculado com bactéria diazotrófica de vida livre (*B. indica*), como fonte enriquecedora de nitrogênio e outros nutrientes, e da massa micelial do fungo *C. elegans*, cedidas pelo Núcleo de Fixação Biológica do Nitrogênio da UFRPE.



Figura 2 Distribuição dos tratamentos dispostos em vasos de polietileno, com três repetições, no Laboratório de Produção Vegetal do PMGCA. Teresina, PI. 2018.

Visando a produção de inoculante, a bactéria 10001 (*B. indica*), foi cultivada em meio líquido TSB-50% (Tryptic Soy Broth), por cinco dias em mesa agitadora tipo

shaker (220 rpm e temperatura de 28 °C). Após o turvamento do meio de cultivo, foi realizado a leitura em espectrofotômetro a 560 nm de absorvância (0,8 a 1UA, sendo a padronização da concentração para as bactérias em 10^8 UFC mL⁻¹).

Em cada vaso, contendo as proporções dos substratos, foram adicionados 150 mL de melação de cana-de-açúcar, como fonte de carboidrato (energia) e, em seguida, 140 mL do inoculante bacteriano (Figura 3). O controle da umidade foi realizado através da adição de 200 mL de água destilada semanalmente, revolvendo o substrato até homogeneizá-lo.

Os tratamentos inoculados com a bactéria diazotrófica, tiveram seu pH monitorados semanalmente, por um período de 35 dias após a inoculação, visando o acompanhamento da mineralização de cada fonte orgânica (tratamentos). Após esse período, cada tratamento recebeu a adição de 150 mL do inoculante fúngico *C. elegans* cultivado (durante 5 dias em mesa agitadora tipo shaker à 120 rpm a temperatura de 30 °C) em meio batata dextrose (BD) (Figura 3). Cada vaso contendo *C. elegans* passou 30 dias em incubação, visando o enriquecimento dos substratos com quitina liberada pelo fungo, sendo também o pH monitorado semanalmente durante todo esse período.



Figura 3 Inoculante bacteriano NFB 10001 (*B. indica*) (A) e Inoculante fúngico *C. elegans* (B) utilizados nesta etapa. Teresina, PI. 2018.

Após 65 dias do início do experimento, os tratamentos presentes nos vasos foram submetidos às análises iniciais, sendo enviadas amostras de cada tratamento para o Laboratório de Bioquímica do Solo, no Departamento de Tecnologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco, Campus Dois Irmãos, em Recife-PE,

visando à quantificação dos teores de N, P, K, Ca, e Mg, para definir o tratamento com maior aporte de nutrientes para compor as etapas posteriores.

3.2 Etapa 2 – Avaliação biométrica e produtiva de plantas de pimenta submetidas a diferentes doses de composto orgânico

Definido o tratamento que propiciou maior aporte de nutrientes (etapa 1), procedeu-se à segunda etapa experimental, realizada em condições de casa de vegetação. O experimento foi delineado de forma inteiramente casualizada, com quatro repetições, sendo os tratamentos constituídos de cinco doses (0, 20, 40, 60 e 80 kg ha⁻¹) da fonte orgânica com maior aporte de nutrientes, definida na etapa anterior.

As unidades experimentais foram compostas por vasos de polietileno com cinco litros de capacidade, com cada unidade contendo quatro litros de solo para receber os tratamentos. O solo utilizado na preparação dos tratamentos foi coletado na camada superficial (0,0-0,20 m), em área próxima ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Agricultura Tropical da UFPI, em Teresina, sendo a amostra composta enviada para análise física e química em laboratório especializado da UFPI (Tabela 1).

Tabela 1 Características químicas do solo, na profundidade de 0-20 m, utilizado nesta etapa experimental. Teresina, PI. 2018

Solo	Características Químicas								M.O. g kg ⁻¹
	pH	Al	Ca	Mg	K	V %	T	P	
	H ₂ O	-----cmol _c dm ⁻³ -----						-----mg dm ⁻³ -----	
0,0-0,20 m	7,0	0,00	1,97	0,65	3,44	6,07	6,07	578	12,0

pH- em água (1:2,5); P- fósforo disponível (Mehlich 1); K- potássio disponível; Ca- cálcio; Mg- magnésio; Al- alumínio; MO- matéria orgânica. Laboratório de solos do CPCE/UFPI. Bom Jesus, PI

A área escolhida apresenta histórico de uso agrícola, não havendo necessidade de correção da acidez do solo pelos valores de saturação por bases (6,07) e pH (7,0) estarem dentro da faixa recomendada para a cultura que, de acordo com Carvalho (2008), estão entre 5,5 e 7,0 pH.

Em cada unidade experimental foram semeadas seis sementes da variedade pimenta doce (sweet banana pepper), cujo ciclo de cultivo varia de 120 a 150 dias

(Figura 4). Após 15 dias da emergência das plântulas foi realizado o desbaste, deixando apenas uma planta por vaso.



Figura 4 Visão simplificada da disposição das unidades experimentais em casa de vegetação, Teresina, PI. 2019.

Os parâmetros avaliados em cada unidade experimental foram:

- a) Diâmetro do caule – quantificado (mm) aos 60 e 120 dias após o plantio, com auxílio de um paquímetro digital, a 5 cm do solo, em todas as plantas de cada parcela.
- b) Altura de planta aos 60 e 120 dias após o plantio – medida em centímetros, determinada a partir do nível do solo até o ápice do broto terminal nas plantas de cada parcela.
- c) Comprimento do fruto aos 60 e 120 dias após o plantio – medida em milímetro, com auxílio de paquímetro digital, a partir da inserção do pedúnculo à extremidade do fruto.
- d) Peso dos frutos frescos – medida em gramas do fruto de pimenta, quantificado em balança digital.
- e) Número de frutos por parcela – número total de frutos por parcela, obtidos na colheita, ao final do experimento.
- f) Peso da massa seca da parte aérea e da raiz - medida em gramas, quantificado em balança digital.
- g) Comprimento da parte aérea e da raiz – medida em milímetro, com auxílio de paquímetro digital;
- h) Volume da raiz (cm³) – quantificado pelo deslocamento da coluna de água em proveta graduada, ou seja, colocando-se as raízes, após lavagem, em proveta contendo um volume conhecido de água. De forma que por diferença, obteve-se a resposta direta do volume de raízes, pela equivalência de unidades (1 mL = 1 cm³).

i) Medição de clorofila foi feita aos 60 e 120 dias, utilizando o medidor eletrônico de clorofila (ClorofiLOG modelo CFL 1030). Através de relações de absorção de diferentes frequências, determina-se o Índice de Clorofila ICF (Índice de clorofila Falker), levando em consideração a presença de clorofilas A e B (FALKER, 2008).

3.3 Etapa 3 - Extração e avaliação da quitosana a partir de isolados de *C. elegans* na proteção de frutos de pimenta isolados com *Colletotrichum* sp.

3.3.1 Extração de quitina e quitosana

Nesta etapa, para o cultivo do fungo *C. elegans* foram utilizados frascos de Erlenmeyer de 500 mL, contendo 250 mL do meio YPD (*Yeast Peptone Dextrose*) (CÂNDIDA et al., 2017). Procedeu-se a incubação durante 120 horas a 28 °C, sob agitação orbital constante de 100 rpm em mesa agitadora. A biomassa coletada e filtrada foi submetida a processo de secagem em estufa a 50 °C, por 48 horas. Em seguida, a massa micelial seca foi macerada com o auxílio de almofariz e pistilo de porcelana (Figura 5).



Figura 5 Cultivo do fungo *C. elegans* em frascos de Erlenmeyer (A); biomassa coletada seca a 50 °C (B); massa micelial macerada com almofariz e pistilo de porcelana (C). Teresina, PI. 2019.

O processo geral envolveu a desproteíntização com 2% m/v de solução de hidróxido de sódio (NaOH) (30:1 v/m, 90 °C, 2 h), a separação da fração insolúvel em álcali (FIA) por centrifugação (4000 rpm, 15 min) e a extração de quitosana a partir da FIA sob refluxo (ácido acético a 10% v/v, 40:1 v/m, 60 °C, 6 h). Em seguida, realizou-se a separação da quitina (precipitado) da quitosana (sobrenadante) por centrifugação (4000 rpm, 15 min) (Figura 6). A quitina foi lavada com água destilada por

centrifugação até chegar no pH neutro e a solução contendo a quitosana (sobrenadante) foi para pH 9,0 com NaOH a 4 Mol, ocorrendo a precipitação da quitosana (FRANCO et al., 2004).

Posteriormente, esse biopolímero foi submetido a lavagens sucessivas com água, etanol e acetona, e colocado para secar à temperatura de 20 °C. Por fim, procedeu-se à caracterização de quitina e quitosana quanto às suas características químicas.



Figura 6 Separação da fração insolúvel em álcali (A); separação de quitina por centrifugação (B); precipitação da quitosana (C). Teresina, PI. 2019.

3.3.2 Preparo da solução de quitosana

A solução de quitosana foi preparada utilizando 990 mL de água destilada, 10 mL ácido acético glacial a 1% (v/v) para preparação das soluções nas concentrações 0,5, 10, 20 e 30 mg mL⁻¹ da quitosana fúngica. Em seguida, realizou-se a correção do pH de cada solução para 6,0 utilizando solução de NaOH 10 moles L⁻¹. Para o auxílio da dissolução da quitosana, as soluções foram preparadas sob agitação constante em agitador de mesa. O produto comercial utilizado como controle foi a quitosana em pó Polymar[®] nas mesmas concentrações, obtida junto à Polymar Indústria e Comércio Ltda.

3.3.3 Caracterização da quitosana por Espectroscopia na região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros de FTIR da quitosana padrão (Polymar 78% grau de desacetilação) e da quitosana fúngica foram registrados com pastilhas de KBr em

espectroscópio na região do infravermelho com transformada de Fourier (Vertex 70, BRUKER), com módulo VCD (PMA 50, Bruker), com varreduras na região de 600 cm⁻¹ a 4000 cm⁻¹ com resolução de 4 cm⁻¹.

A porcentagem do grau de desacetilação (GD) da quitosana foi verificada conforme método utilizado por Mello et al. (2006), com uso dos espectros do FTIR na região de comprimento de onda 1.655 cm⁻¹ e 3.450 cm⁻¹, calculado usando a equação 1 proposta por Domszy et al. (1978):

$$GD = 100 - \left[\left(\frac{A_{1665}}{A_{3450}} \right) \right] \times \frac{100}{1,33} \quad (\text{Equação 1})$$

Em que A_{1665} e A_{3450} são valores de absorbâncias obtidos na região de comprimento de onda de 1655 cm⁻¹ referente à banda amida-I (relacionado a medida do grupo N-acetil) e 3450 cm⁻¹ da banda hidroxil (como medida padrão para diferenças na concentração de quitosana em pó). O fator 1,33 corresponde ao valor da razão A_{1665}/A_{3450} para quitosana totalmente N-acetilada. Assumiu-se que o valor dessa razão era zero para a quitosana totalmente desacetilada.

3.4 Ensaio de inoculação

O experimento foi realizado utilizando o isolado de *Colletotrichum* sp. obtido de frutos de pimenta (vermelho maduro de *C. annuum*) oriundos da Nova Ceasa, Teresina, Piauí. O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado, com quatro repetições, sendo os tratamentos constituídos de cinco doses (0,5, 10, 20 e 30 mg mL⁻¹ de quitosana fúngica) mais um controle com a quitosana comercial.

Os frutos maduros foram acondicionados em caixas plásticas e transportados ao Laboratório de Produção Vegetal do PMGCA, onde se realizou a seleção de acordo com a uniformidade da cor, tamanho e ausência de injúrias, visando a padronização dos frutos utilizados no ensaio. Os frutos foram lavados com água e detergente neutro, desinfetados e deixados à temperatura ambiente para secagem.

O isolado de *Colletotrichum* sp. foi cultivado em meio de cultura BDA (Dextrose Batata Agar), em placas de Petri incubadas em BOD a temperatura de 25 °C e fotoperíodo de 12 h. Após a esporulação, com auxílio de pipeta, foi transferido 1 mL de água destilada sobre o micélio e as placas foram incubadas em geladeira durante 3 h.

A suspensão de esporos foi preparada a partir de culturas de *Colletotrichum* sp. com sete dias de incubação, adicionando-se 10 mL de água destilada esterilizada em cada cultura, raspando os micélios das placas e filtrando-os através de duas camadas de pano de musselina. Foram utilizados 64 frutos (quatro frutos por concentração), os quais foram submersos em solução de quitosana fúngica (soluções nas concentrações 0,5; 10; 20 e 30 mg mL⁻¹ da quitosana fúngica) por 5 minutos e colocados dentro de recipientes plástico desinfetados. Após 24 horas, a suspensão conidial (1 ×10⁶ conídios mL⁻¹) do isolado foi inoculado nos frutos em cada grupo (com ferimento na epiderme e sem ferimento). O mesmo procedimento foi realizado para a quitosana comercial.

A inoculação do patógeno, no grupo de frutos com ferimento, se deu através de um ferimento realizado na epiderme (a 2 cm do pedúnculo), utilizando-se uma agulha até atingir 1 mm de profundidade. Posteriormente, foi colocado 6 µl de suspensão conidial sobre a epiderme ferida. No caso dos frutos sem ferimento, foram colocados 6µL de suspensão de conídios na superfície do fruto a 2 cm do pedúnculo. As testemunhas foram tratadas com 6 µL de água destilada estéril. Os recipientes de plástico foram fechados e mantidos em ambiente úmido (utilizando algodão umedecido) e incubados à temperatura ambiente (em torno de 27 °C). A partir de 72 horas, o tamanho das lesões foi quantificado com paquímetro digital por um período de doze dias, conforme metodologia descrita por Montri et al. (2009). Aos 6, 9 e 12 dias a incidência da antracnose foi determinada pela ausência ou presença de sintomas, sendo determinada através do número de frutos afetados por repetição. A severidade da doença (SD) foi calculada de acordo com a equação 2:

$$SD = \frac{\text{Comprimento da lesão} \times 100}{\text{Comprimento do fruto}} \quad (\text{Equação 2})$$

O comprimento do fruto para pontuar os diferentes níveis de severidade foi utilizada a escala de severidade da antracnose em frutos de pimentão infectados por *Colletotrichum* sp. (MONTRI et al., 2009). Esses valores foram expressos em porcentagem por tratamento.

Foram realizados dois ensaios complementares para mensurar a severidade, nas mesmas concentrações de quitosana e suspensão do fungo do experimento anterior. A primeira foi realizada em grupo de fruto de pimenta com ferimento (ferida

com 1,19 mm diâmetro), utilizando-se palito contendo o micélio do fungo (Verzignassi et al., 2004) (Figura 7A). Na segunda avaliação foi depositado um disco com 7 dias de cultivo de 5,86 mm de diâmetro a 2 cm do pedúnculo sobre o fruto sem ferimento, revestidos por quitosana nas mesmas concentrações anteriores (Figura 7B). Para quantificar a área lesionada foram realizadas medições no sétimo e décimo dia, utilizando um paquímetro digital.

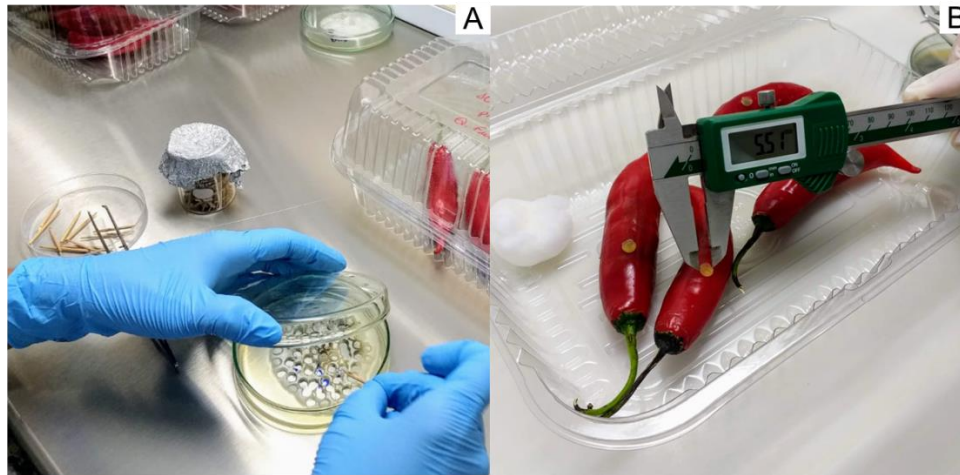


Figura 7 Inoculação pelo método do palito utilizando micélio do *Colletotrichum* sp (A); medição do disco contendo micélio do *Colletotrichum* sp no fruto de pimenta (B). Teresina, PI, 2019.

3.4 Análises estatísticas

Os dados referentes aos caracteres avaliados da etapa 1 e 2 foram submetidos às análises de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Essas análises foram realizadas com auxílio do software SigmaPlot 12.0.

Os dados foram submetidos aos testes preliminares para verificação da normalidade e homogeneidade de variância dos mesmos, através dos testes de Lilliefors e teste de Bartlett, respectivamente. Após verificação destes pressupostos, se realizou a ANOVA e, em seguida, o teste de médias (Tukey) para os tratamentos qualitativos. Para os tratamentos quantitativos, foi realizada a análise de variância com regressão polinomial. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o software estatístico SAS versão 9.2 (SAS Institute 2011) e SigmaPlot 12.0.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Avaliação de fontes orgânicas no aporte de nutrientes

Os resultados das análises químicas iniciais das fontes orgânicas utilizadas, apresentados na Tabela 2, demonstram que as proporções compostas por esterco bovino (EB) e torta de filtro de cana-de-açúcar (TF) e em mistura apresentam reflexos importantes sobre os teores N ($14,39 \text{ g kg}^{-1}$); P ($15,82 \text{ g kg}^{-1}$) e K ($3,98 \text{ g kg}^{-1}$), embora os teores de P, Ca e Mg não tenham sido superior a outras fontes orgânicas, o maior quantitativo de matéria orgânica (63, 27), torna o EB uma fonte importante.

O aumento do teor de matéria orgânica no solo favorece a maior ciclagem de nutrientes das camadas mais profundas (MATIAS et al., 2012). Além disso, o aumento do conteúdo de carbono orgânico do solo possibilita a melhoria da capacidade de retenção de nutrientes por meio do aumento da capacidade de troca catiônica (CTC) e da formação de complexos organominerais (GLASER et al., 2002).

Considerando as fontes orgânicas após 65 dias de incubação (com uso de melaço de cana e com inoculação de *B. indica* e *C. elegans*), em relação à condição inicial dessas fontes (Tabela 2), observa-se maior incremento de Nitrogênio quando do uso de *B. indica* e *C. elegans*, demonstrando o potencial desses microorganismos em fixar N. Estes resultados são similares aos encontrados por Stamford et al. (2014) que, avaliando o rendimento de uva e a disponibilidade de nutrientes do solo sob a aplicação de fertilizantes biológicos, com adição de quitosana fúngica, verificaram incrementos de N ($18,06 \text{ g kg}^{-1}$) na mistura com o composto de minhoca inoculado com bactérias diazotróficas de vida livre.

Em relação ao teor de P (g kg^{-1}) avaliados ao final do período de incubação, foi observado que houve maior incremento deste nutriente nos tratamentos com TF, EB e EB+TF, com teores médios de 21,67 (T3); 15,59 (T6) e $10,50 \text{ g kg}^{-1}$ (T1), respectivamente. Resultados similares foram relatados por Oliveira et al. (2015), mostrando eficiência no incremento de P em substratos orgânicos avaliando o uso de biofertilizantes em mistura com torta de filtro, inoculados com bactérias diazotróficas de vida livre (NFB 1001).

Tabela 2 Teores de nutrientes, C.O; M.O e C/N nas fontes orgânicas utilizadas na condução do experimento, na fase inicial (sem inoculação e fonte de carboidrato) e aos 65 dias quando utilizado o melaço de cana e quando inoculado com *Beijerinckia indica* e *Cunninghamella elegans*. Teresina, PI. 2019

Nutriente (g kg ⁻¹)	Fontes orgânicas (sem inoculação e sem carboidrato*) inicial						
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
	(EB)	(HM)	(TF)	(HM+TF)	(HM+EB)	(EB+TF)	(HM+EB+TF)
N	14,39	6,45	10,32	9,57	10,15	13,65	9,30
P	9,81	2,95	15,82	11,76	5,74	11,76	9,81
K	3,98	2,90	0,55	2,40	3,13	1,44	2,44
Ca	1,30	2,44	2,46	3,18	2,80	2,44	3,08
Mg	0,73	0,95	0,93	0,97	1,10	1,02	1,15
C- Orgânico	24,83	8,85	10,04	9,19	10,67	14,54	11,39
Mat. Orgânica	63,27	25,67	28,48	26,49	29,97	39,06	31,66
Relação C/N	13/1	12/1	9/1	10/1	9/1	10/1	9/1
Fontes orgânicas com melaço de cana-de-açúcar após 65 dias							
N	16,56	5,87	10,93	9,32	10,59	12,49	10,05
P	7,38	3,69	20,63	8,59	4,81	15,34	12,07
K	3,36	2,39	0,71	1,79	3,83	2,86	3,44
Ca	0,88	2,00	3,66	2,84	2,84	4,30	3,50
Mg	3,38	1,03	1,02	0,91	1,87	1,60	1,21
C- Orgânico	23,26	9,40	10,72	9,71	12,52	11,91	11,76
Mat. Orgânica	59,59	26,98	30,08	27,71	34,32	32,87	32,87
Relação C/N	16/1	15/1	10/1	10/1	12/1	9/1	13/1
Fontes orgânicas inoculadas com <i>B. indica</i> e <i>C. elegans</i> após 65 dias							
N	18,06	7,66	10,27	10,88	12,02	15,00	12,49
P	10,50	3,88	21,67	9,19	8,82	15,59	8,51
K	4,39	3,44	0,78	2,36	3,48	1,36	3,29
Ca	10,52	1,92	3,32	2,86	2,74	8,76	3,72
Mg	3,52	1,63	1,03	0,93	1,83	1,67	1,46
C- Orgânico	20,36	11,15	9,63	11,37	12,40	12,95	12,51
Mat. Orgânica	52,76	31,10	27,51	31,60	34,04	35,32	34,29
Relação C/N	11/1	19/1	9/1	10/1	12/1	10/1	12/1

EB – Esterco bovino; HM – húmus de minhoca; TF – Torta de filtro de cana-de-açúcar. * Melaço de cana-de-açúcar como fonte de carboidrato.

O tratamento T1 (EB) inoculado com *B. indica* e *C. elegans*, no período de 65 dias, promoveu respostas mais proeminentes quanto ao aporte de N (18,06 g kg⁻¹), K (4,39 g kg⁻¹), Ca (10,52 g kg⁻¹) e Mg (3,52 g kg⁻¹). O aumento de Ca nos substratos foi provavelmente devido a mineralização da matéria orgânica por microorganismos nativos presente neste substrato (bactérias e fungos) e também da grande quantidade

de matéria orgânica utilizada no composto, aumentando a disponibilidade de nutrientes, principalmente de N e C através da decomposição e mineralização. Efeitos positivos no aumento de Ca foram relatados por Stamford et al. (2011), usando diferentes tratamentos de fertilização inoculados no solo (biofertilizante misto, biofertilizante de rochas e fertilizante solúvel) no cultivo de uvas.

O teor de Mg trocável do T1 contribuiu significativamente para o incremento desse nutriente em relação aos demais tratamentos. Em tanto aos valores de carbono e matéria orgânica para os tratamentos inoculados, foi verificada uma diminuição no conteúdo de COT e MO nos tratamentos comparado com o composto sem inoculação (testemunha), sendo relacionado à degradação da matéria orgânica pela atividade microbiana, já que estes utilizam a mesma como fonte de energia para completar o ciclo de vida (MACHADO et al., 2012).

Os resultados demonstram que a inoculação do esterco bovino com bactérias diazotróficas de vida livre e *C. elegans* promove melhores aportes de nitrogênio e potássio, seguidos de fósforo, cálcio e magnésio.

4.2 Condução da fase experimental em casa de vegetação

Conforme verificado nas análises de solo e do teor da parte aérea e raiz, observou-se resposta linear para os teores de N, P e K disponíveis na parte aérea (PA) e raiz (RA) das plantas coletadas após 120 dias, demonstrando que o aumento das doses de esterco bovino propicia também o aumento de NPK. No entanto, o acúmulo de NPK foi mais pronunciado na parte aérea do que na raiz de pimenteira (Figura 8).

Observa-se o comportamento similar do acúmulo de N e K na parte aérea e raiz, com incrementos de 0,128 g kg⁻¹ N e 0,127 g kg⁻¹ K (parte aérea) e 0,071 g kg⁻¹ N e 0,076 g kg⁻¹ K (raiz) (Figura 8). Uma vez presente, o potássio estimula o aproveitamento do nitrogênio em teores favoráveis e atuam de forma mais rápida no metabolismo das plantas, promovendo maior crescimento e desenvolvimento. Este resultado é concordante com aqueles obtidos por Araújo et al. (2005) em pimentão (*C. annum*), que observaram que o esterco bovino, aplicado de forma isolada ou associado a matéria orgânica, se apresenta como boa alternativa para o crescimento das plantas.

O fósforo foi o nutriente menos acumulado tanto na parte aérea como na raiz das plantas, com incrementos de $0,070 \text{ g kg}^{-1}$ e $0,025 \text{ g kg}^{-1}$ na PA e RA respectivamente.

De acordo com Weckner et al. (2018) a disponibilidade de nutrientes da adubação orgânica com uso de biofertilizantes exerce inúmeras funções nos vegetais, mostrando-se eficiente no crescimento e desenvolvimento das mudas de pimenta de cheiro. Os biofertilizantes à base de esterco bovino são muito ricos em nitrogênio e potássio, onde o potássio quando disponível às plantas exerce papel fundamental na síntese de proteínas, carboidratos, açúcares e ácidos orgânicos, estando todas essas características relacionadas com o desenvolvimento da planta e a produção.

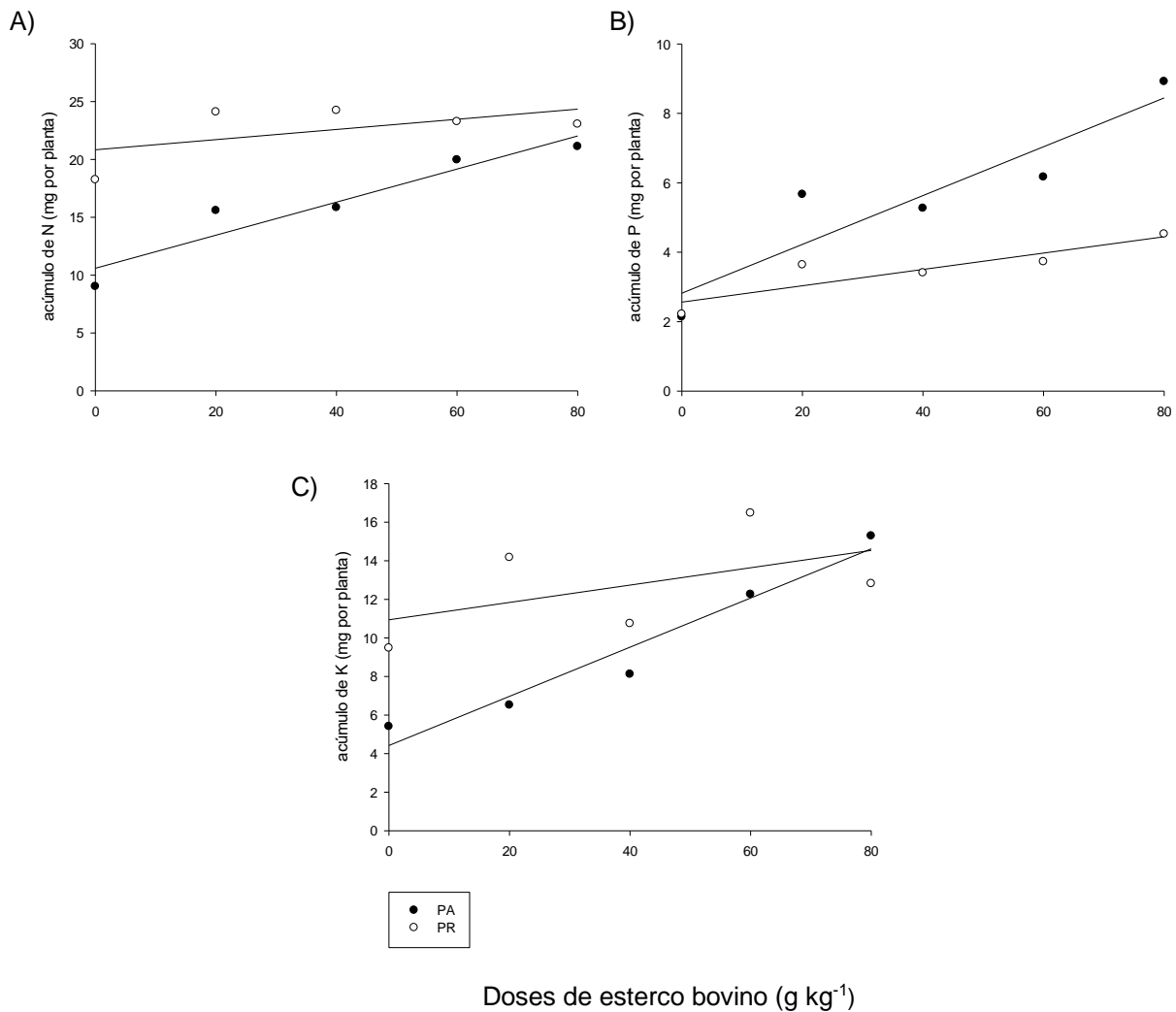


Figura 8 Regressão referente ao acúmulo de NPK na parte aérea (PA) e raiz (RA) de pimenteiras submetidas a diferentes doses de esterco bovino (EB), após 120 dias de cultivo. * Significativo ($P \leq 0,05$).

A importância do esterco bovino em pimenteira pode ser observada na Figura 9, onde verifica-se aumento significativo no número de folhas por planta (NFP), altura de planta (AP), diâmetro de caule (DC) e teor de clorofila (TCF), com o aumento das doses desse composto orgânico.

Quanto ao NFP, observa-se maior incremento aos 120 dias comparativamente quando se avaliou aos 60 dias, demonstrando que mesmo a pimenteira tendo um ciclo de 120 dias, a planta continuou a produzir novas folhas.

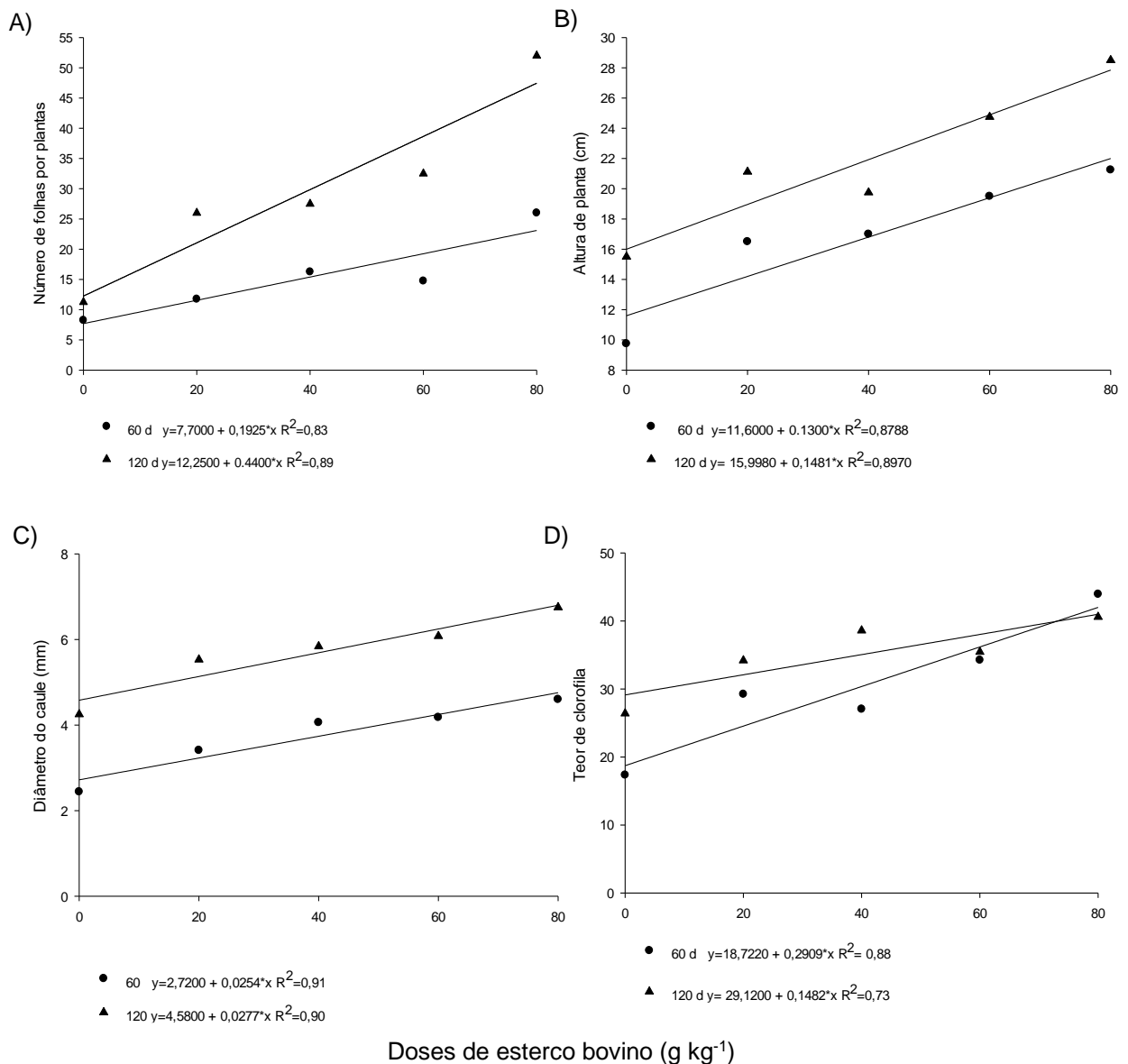


Figura 9 Resposta do número de folhas por plantas (NFP), altura de planta (AP), diâmetro do caule (DC) e teor de clorofila (TCF), aos 60 e 120 dias, às doses de esterco bovino. * Significativo ($P \leq 0,05$).

Na Figura 10 é demonstrado o comportamento das plantas de pimenteira submetidas ao tratamento T5, com *Bacillus subtilis* (produto comercial utilizado como controle) e T6 (tratamento testemunha), onde verifica-se que a inoculação do esterco bovino (composto orgânico) com *B. indica* e *C. elegans* foi superior a estes tratamentos controles, em todas as doses utilizadas. Este resultado permite inferir que houve influência dos microorganismos no desenvolvimento vegetativo das pimentas.

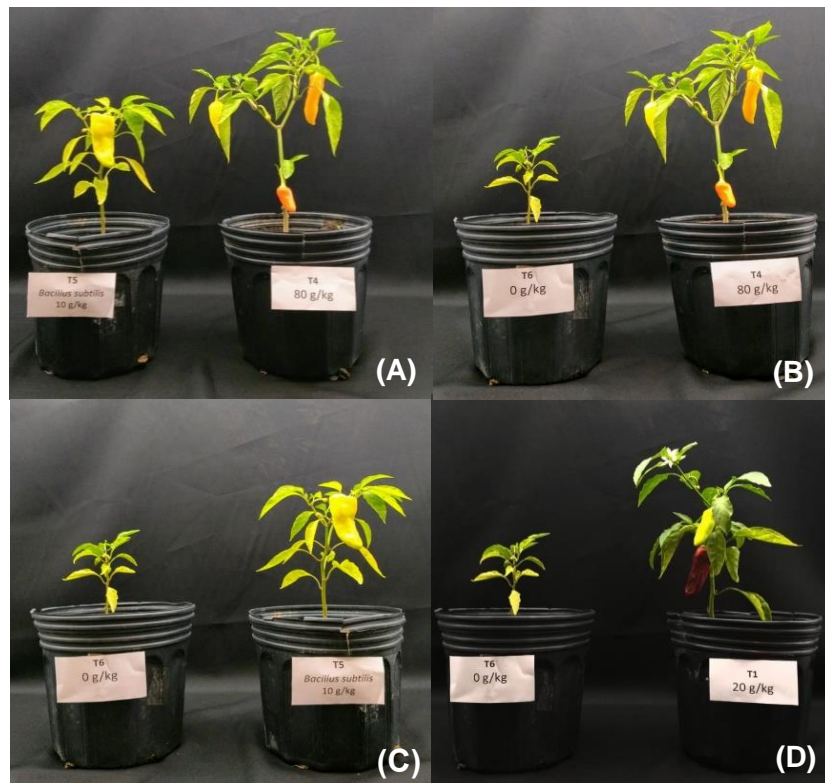


Figura 10 Altura da planta (AP) após 120 dias do plantio. (A) T5 *Bacillus subtilis* vs T4 (80 g kg⁻¹ EB) (B) T6 (0 g kg⁻¹ EB) vs T4 (80 g kg⁻¹ EB); (C) T6 (0 g kg⁻¹ EB) vs T5 (*Bacillus subtilis*); (D) T6 (0 g kg⁻¹ EB) vs T1 (20 g kg⁻¹).

O aumento da produção de frutos, como também o aumento do seu comprimento e peso observado na Figura 11, deve-se à maior disponibilidade de nutrientes (N, P, K, Ca e Mg) fornecido pelo esterco bovino, capazes de suprir as necessidades nutricionais das plantas. Filgueira (2000) relata que o fornecimento adequado de nutrientes como nitrogênio, associado a outros fatores, expandem a área fotossintética, assegurando o desenvolvimento das plantas pelo crescimento vegetativo e elevando o potencial produtivo da cultura.

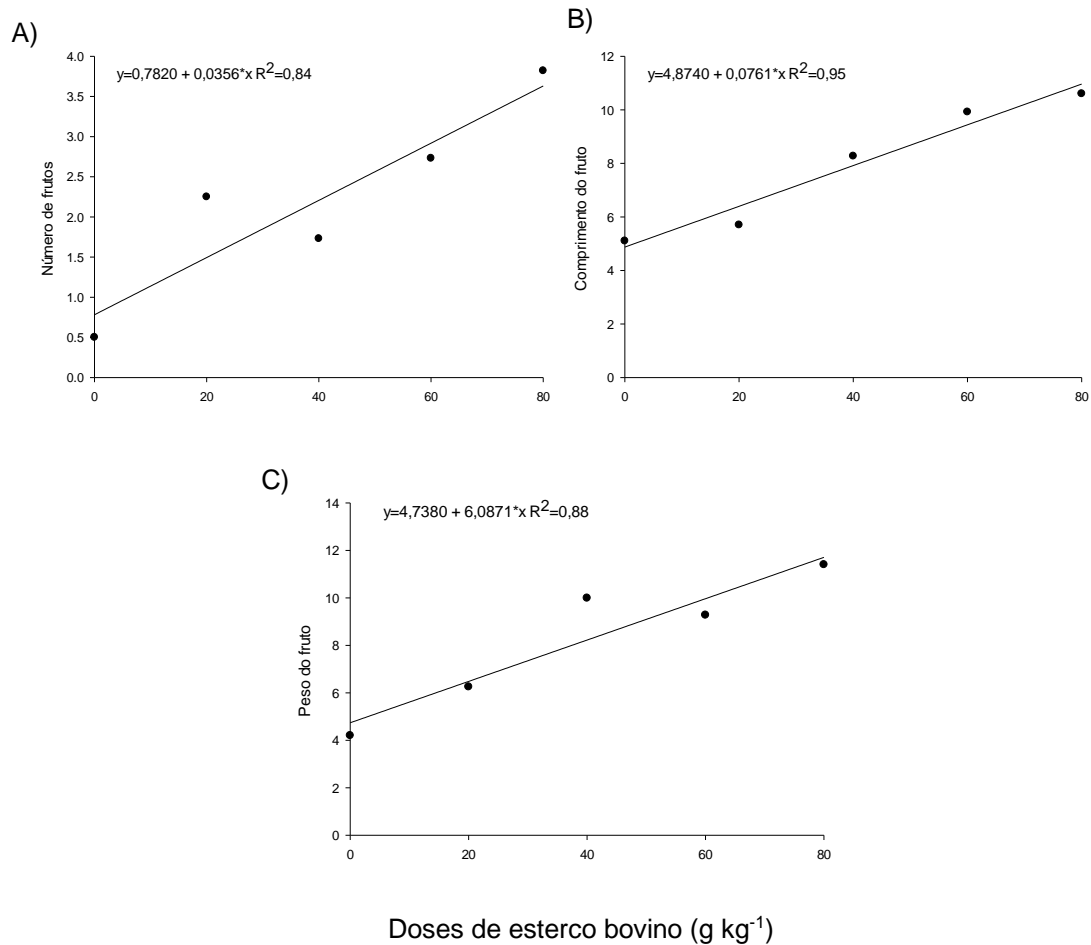


Figura 11 Número de frutos (NF); comprimento do fruto (CF) e peso do fruto de pimentas (PF) em função de diferentes doses de esterco bovino (EB), após 120 dias de cultivo. * Significativo ($P \leq 0,05$).

Dados semelhantes foram obtidos por Araújo et al. (2007), onde concluíram que o biofertilizante bovino, aplicado de forma isolada ou associado com material orgânico, pode ser utilizado como alternativa para fertilização não convencional no pimentão.

O esterco bovino promoveu resultados satisfatórios para as variáveis de matéria seca parte área (MSA); raiz (MSR); comprimento de raiz (CR); volume de raiz (VR), onde que as mesmas apresentaram diferença significativa pelo de método de regressão (Figura 12). A matéria seca da raiz dos tratamentos inoculados foi superior ao tratamento controle, os resultados diferiram dos achados de Araújo et al. (2010), que observaram maior MSR em tratamentos coinoculados com *Bacillus subtilis*. Oliveira et al. (2015), constatou que as plantas adubadas com esterco bovino obtiveram maior altura e maior produção de massa seca; e as plantas cultivadas no

ambiente protegido pela malha azul tiveram maior altura, massa seca de raiz e massa seca total.

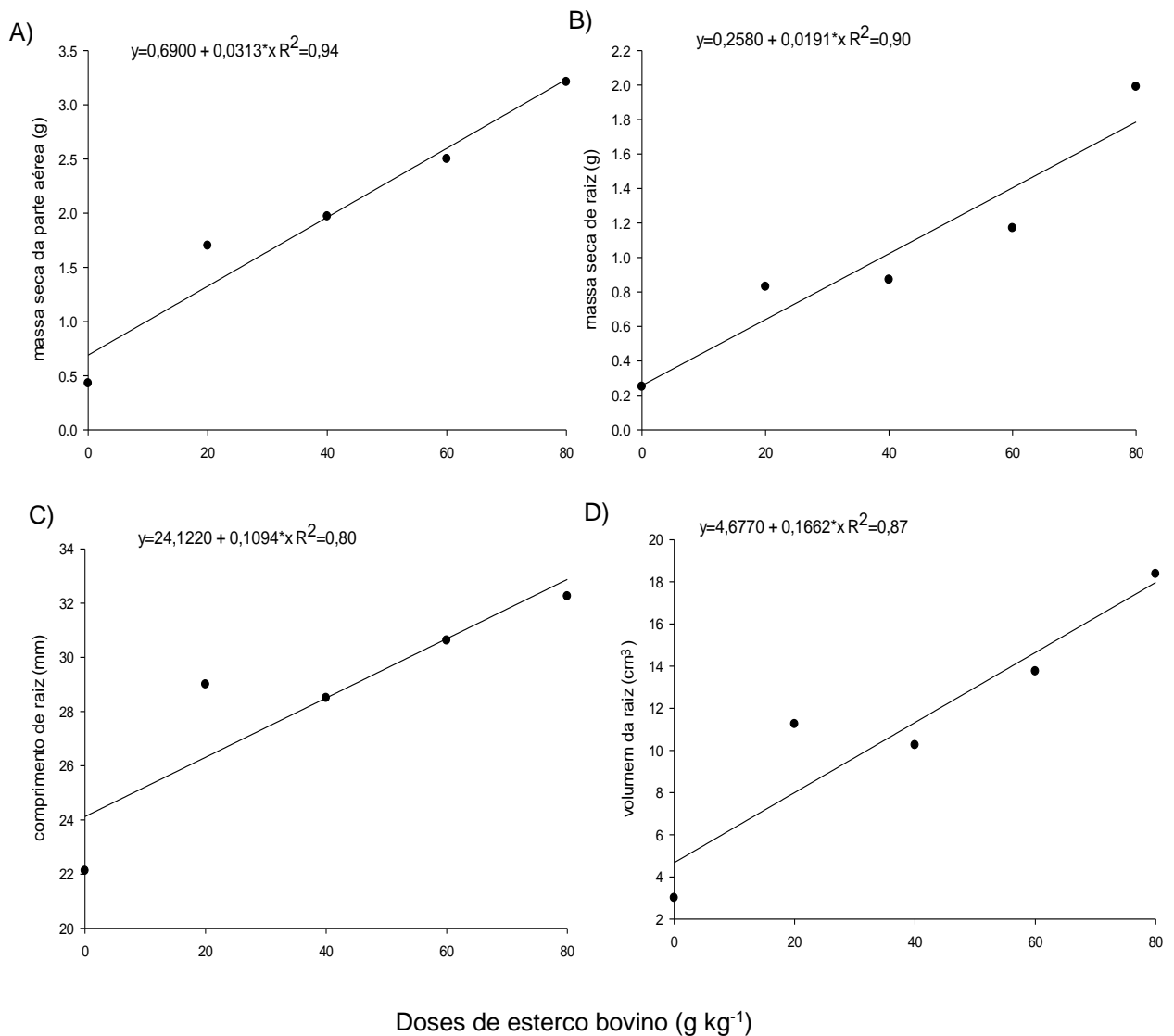


Figura 12 Matéria seca da parte aérea (MSA) e da raiz (MSR); comprimento de raiz (CR); volume de raiz de pimenteiros (VR) em função de diferentes doses de esterco bovino (EB), após 120 dias de cultivo. * Significativo ($P \leq 0,05$).

O acúmulo de fósforo na raiz das pimenteiros exerce ação positiva no desenvolvimento das raízes e melhora a utilização dos nutrientes do solo, aumentando o crescimento da planta. Segundo Boonlertnirun et al. (2008), o contato prolongado da raiz da planta no solo com quitosana pode favorecer a interação entre as cargas positivas da quitosana e as cargas negativas dos nutrientes contidos no solo, o que pode influenciar a absorção de nutrientes pelas plantas e contribuir para o aumento do rendimento delas. O comprimento de raízes apresentou diferença significativa entre as doses de EB (Figura 12c e Figura 13).



Figura 13 Comprimento de raiz de plantas de pimentas em função de diferentes doses de esterco bovino aplicadas em plantas de pimenta. Teresina, PI. 2019.

4.3 Biomassa e extração de quitina e quitosana de isolado de *Cunninghamella elegans* no controle de *Colletotrichum* sp.

4.3.1 Extração e caracterização de quitosana

A quitosana obtida de *C. elegans* apresentou grau de desacetilação (DD) de 63 %, pelo método de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR). O espectro das bandas características em FTIR para quitosana fúngica entre 3400-3500 cm^{-1} , refere-se ao alongamento axial da ligação OH e NH (Figura 14). A banda que ocorre entre 2915 cm^{-1} e 2852 cm^{-1} está relacionada ao alongamento da ligação C-H, estiramento angular C-H, atribuído à mudança axial da ligação C-H de grupos CH_2 e CH_3 . A região mais importante do espectro mostra vibração de banda na região de 1651 cm^{-1} , característico de estiramento de C=O da amida I, assim como as bandas na região de 1573 a 1301 cm^{-1} de deformação CO-NH referente à amida II e amida III (N-H), respectivamente.

As bandas na região de 1314, 1260 e 1381 cm^{-1} de estiramento angular, são características de grupo amina (NH) referentes à amina I, II e II, respectivamente, corroborando ao que foi relatado por Franco et al. (2005) e similar ao descrito na literatura para quitosana padrão extraída de crustáceos (SOUZA e MANSUR, 2008; JIANG, CAI e LI, 2017; SEGHIR e BENHAMZA, 2017; SANTANA et al. 2017; DANG et al. 2018).

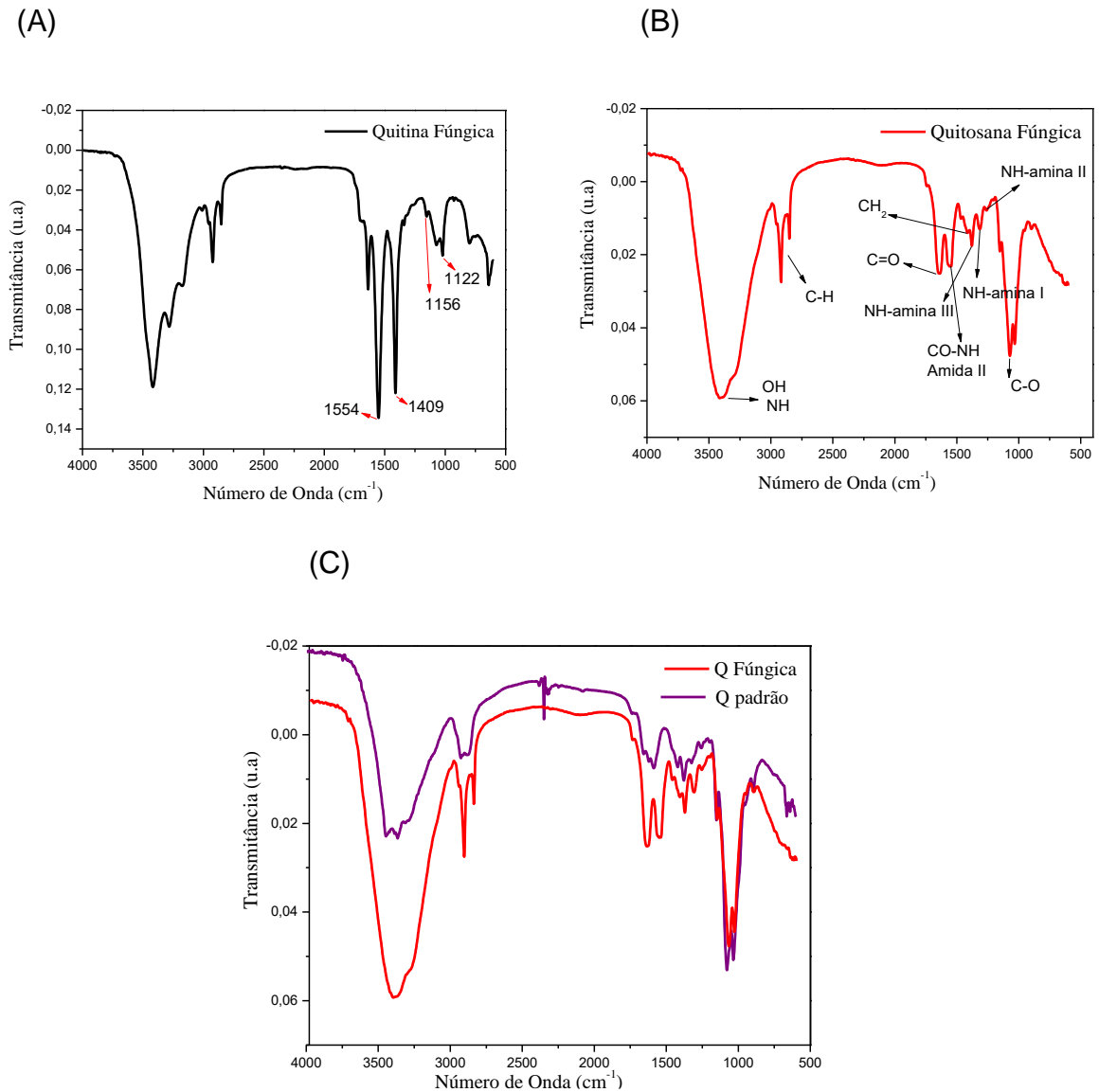


Figura 14. Espectro de FTIR da quitina fúngica (A), quitosana fúngica (B) e comparação entre quitosana padrão (Polymar) e quitosana fúngica (C).

O espectro das bandas em FTIR demonstra as bandas características da estrutura química de quitosana, evidenciando que o fungo *C. elegans* serve como fonte de extração do polímero da quitina e do biopolímero de ação antifúngica quitosana. Estudos realizados por Oliveira et al. (2014) com quitosana obtido a partir *C. elegans* mostram que a ação da quitosana impediu o crescimento de fungos patogênicos no cultivo de uvas, exibiu um valor de concentração mínima inibitória (CIM) de 15 mg mL⁻¹ contra *B. cinerea* e *Penicillium expansum*, demonstrando ser um importante defensivo agrícola.

4.3.2 Severidade de antracnose em frutos de pimenta

O método de inoculação utilizando fermento (deposição de suspensão de esporos) apresentou maiores percentuais de severidade da podridão comparativamente ao método sem fermento (Figura 15). Observa-se, que os primeiros sintomas da antracnose em frutos com fermento já são observados nos primeiros dias após a inoculação, aumentando significativamente a severidade do patógeno (7,2%) a partir do terceiro dia após a inoculação e atingindo um percentual de 75,1% de severidade aos 12 dias, as quais se intensificaram pela presença de bactérias, causadoras da podridão nos frutos, ocasionados pelo processo de fermentação anaeróbia. Esses tratamentos apresentaram odor desagradável, próprio de processos de putrefação do fruto.

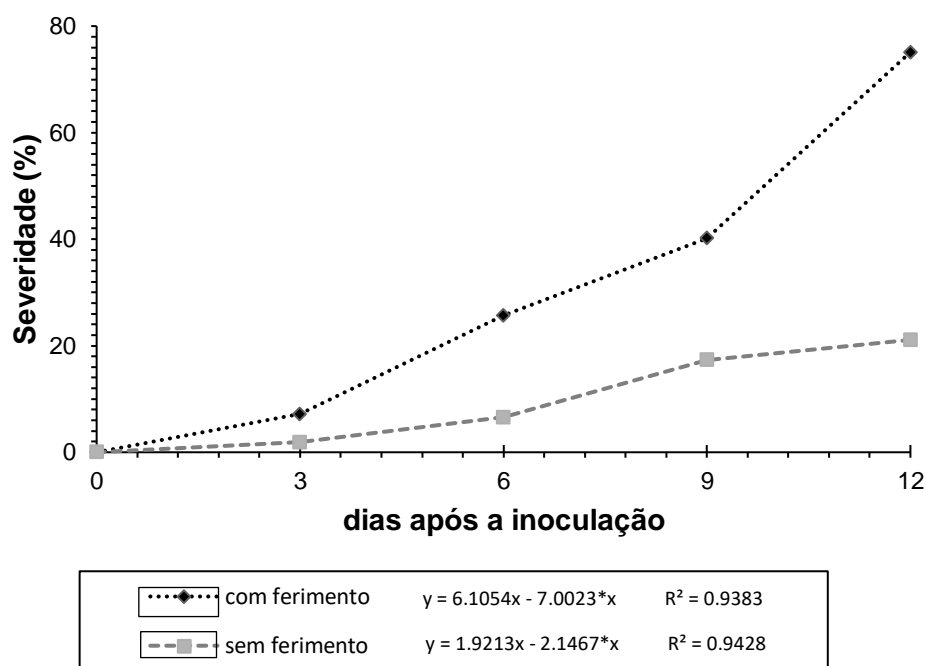


Figura 15. Severidade do *Colletotrichum* sp. em frutos de pimenta utilizados como controle.

A quitosana pode induzir a formação de barreiras estruturais no tecido do hospedeiro e, desta forma, restringir o desenvolvimento do patógeno, bem como atrasar a retomada de desenvolvimento de infecções quiescentes. Em geral, muitas doenças pós-colheita, como a antracnose, originam-se de infecções quiescentes que

se tornam ativas com o declínio do potencial biossintético do tecido em produzir compostos antimicrobianos (EL GHAOUTH et al., 1994).

No entanto, o efeito de diferentes concentrações de quitosana sobre frutos feridos pode ser observado na Figura 16. Para os frutos submetidos à aplicação de quitosana fúngica (*C. elegans*) nas concentrações 0,5, 10, 20 e 30 mg mL⁻¹ a severidade foram de 48,15%, 45,35%, 34,61% e 37,34%, respectivamente. Já nos frutos tratados com quitosana comercial a severidade foi de 38,67%, 37,44%, 30,86% 41,97%, respectivamente, para as mesmas doses. Tanto para a quitosana fúngica como a comercial, a severidade foi observada nas doses de 20 mg mL⁻¹ em relação ao controle, enquanto que na dose de 0,5 mg mL⁻¹ observou-se menor percentual de severidade.

A colonização do patógeno nestes tratamentos pode explicar as maiores médias da acidez nos mesmos, ocasionados pelo processo de fermentação anaeróbia, ao invés de estar relacionada com a redução dos processos metabólicos que levam a um maior tempo de prateleira. Esses tratamentos apresentaram odor desagradável, próprio de processos de putrefação e aspecto não desejável para o consumo.

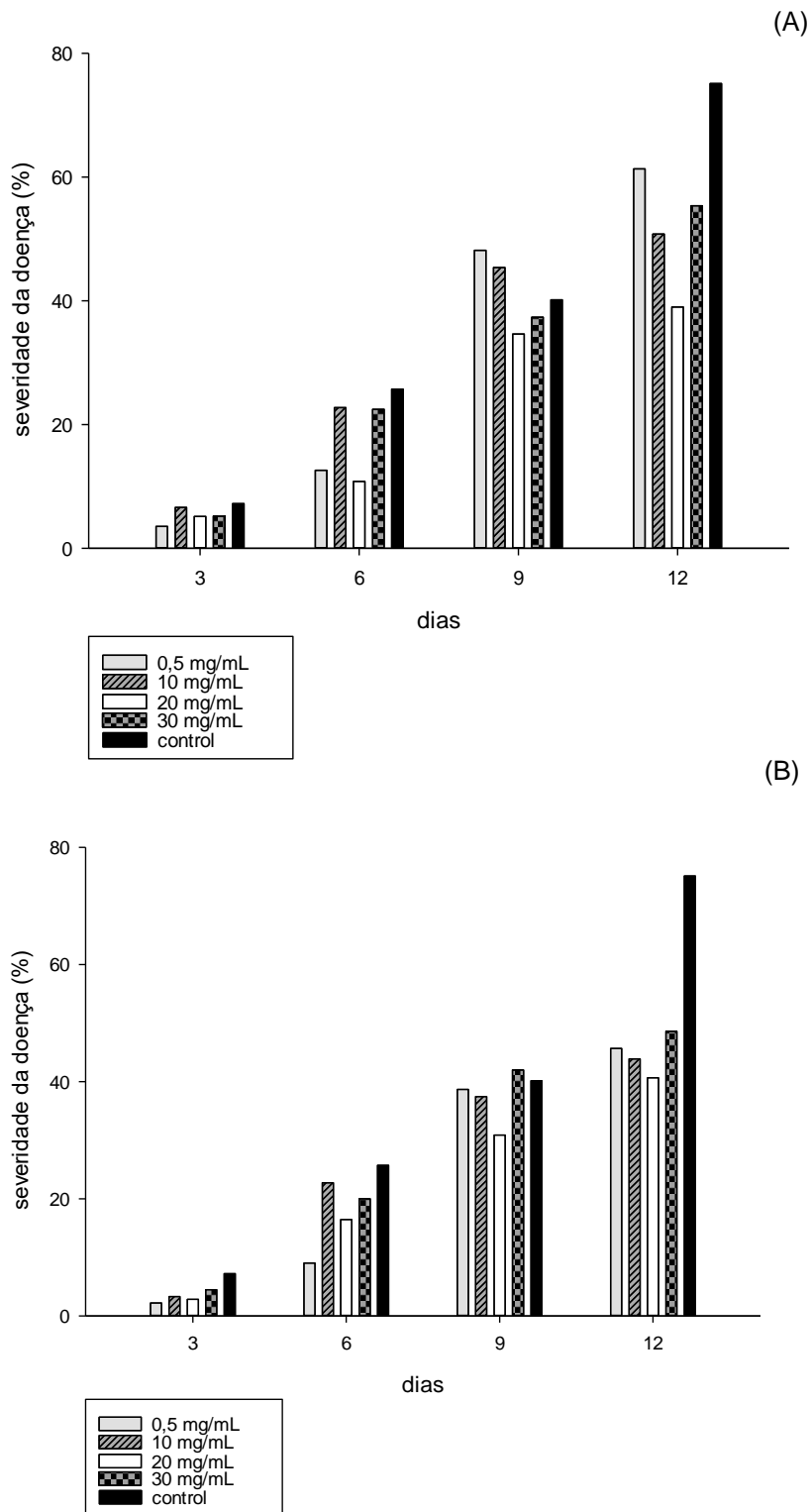


Figura 16. Severidade do *Colletotrichum* sp em frutos feridos após exposição à diferentes concentrações de quitosana de *Cunninghamella elegans* (A) e quitosana comercial (B).

Os frutos sem fermento com o método de suspensão de esporos e o método do disco, não apresentaram sintomas de doença, independentemente das doses de quitosana utilizadas, no entanto, os frutos controle que não foram tratados com

quitosana apresentaram os sintomas (Figura 17). Observou-se maior consistência ao tacto da casca dos frutos, independente das concentrações. Além disso, os revestimentos com quitosana suprimiram o crescimento de fungos, em comparação aos controles, sendo mais acentuado para aqueles tratados com 20 mg mL^{-1} de quitosana.

De acordo com El Hadrami et al. (2010), a ação da quitosana ocorre através da toxicidade direta ou quelação de nutrientes e minerais, restringindo o desenvolvimento de agentes fitopatogênicos devido suas propriedades de biopolímero, formando barreiras físicas em torno dos locais de penetração dos patógenos.

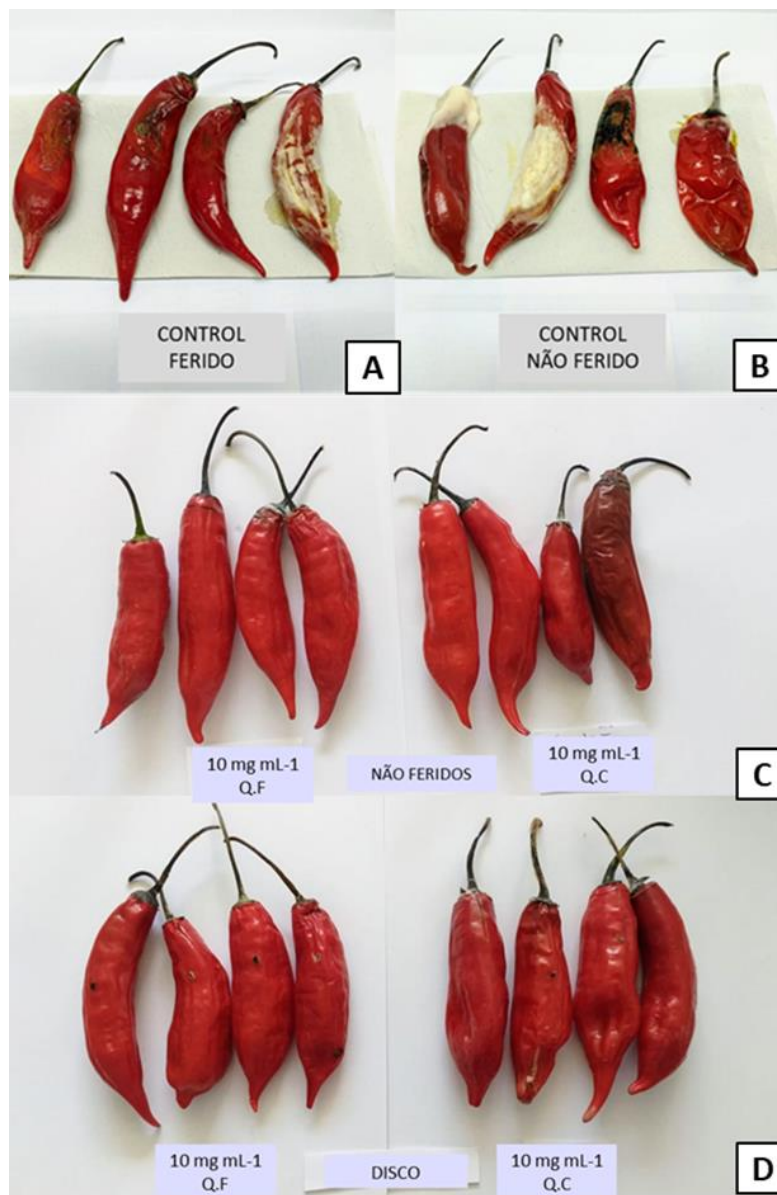


Figura 17. Sintomas de antracnose em frutos feridos (A) e não feridos (B); frutos sem ferimentos inoculados com o método de suspensão conidial (C); frutos inoculados com o método disco (D). Teresina, PI. 2019.

Nos resultados do segundo grupo de fruto de pimenta (com fermento) avaliado aos sete dias, houve efeito quadrático em função das concentrações de quitosana fúngica (QF) para os dois métodos de inoculação, apresentando uma redução da severidade proporcional nas doses de 0,5, 10 e 20 mg mL⁻¹, sendo que dose de 20 mg mL⁻¹ da quitosana de fúngica e comercial apresentou um decréscimo da severidade aproximadamente de 85% 90%, respectivamente, no entanto não houve regressão significativa para a quitosana comercial (Figura 18).

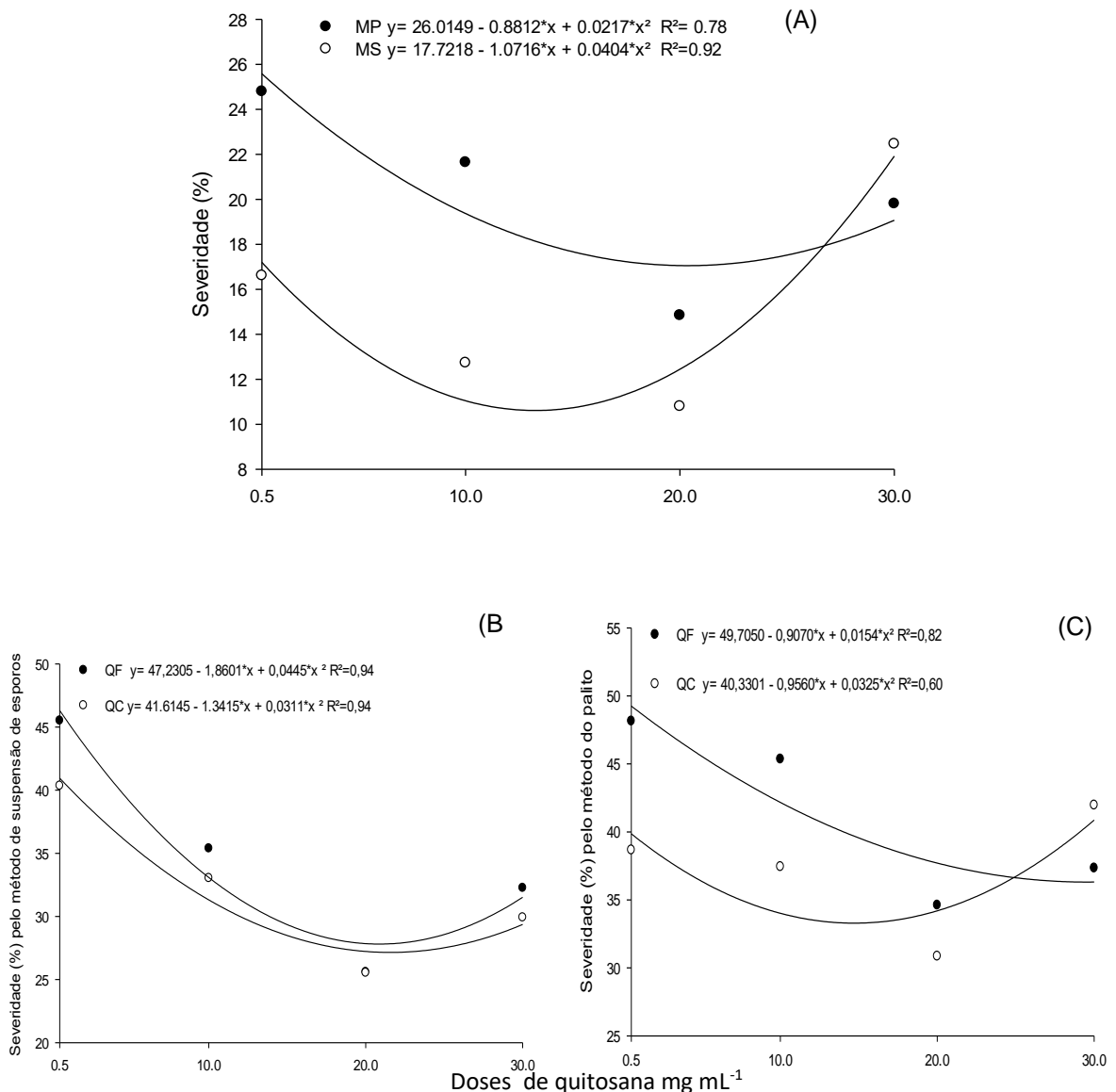


Figura 18 Efeito das doses de quitosana fúngica (QF) sobre a severidade aos sete dias após inoculação pelo método do palito (MP) e método de suspensão (MS) (A), efeito das doses de quitosana sobre a severidade após sete dias de inoculado (B), efeito das doses de quitosana sobre a severidade após 10 dias de inoculado (C). * Significativo ($P \leq 0,05$).

Para os resultados da severidade aos sete e 10 dias houve efeito quadrático em função das doses de quitosana para antracnose utilizando o método de inoculação do palito (MP) e de suspensão de esporos (MS), sendo que a dose de 20 mg mL^{-1} apresentou um decréscimo de aproximadamente 76 e 81% respectivamente.

Os valores referentes ao comprimento de lesões nos frutos do segundo ensaio, utilizando o método do palito, apresentou maior comprimento da lesão em virtude do ferimento realizado em relação aos frutos controle (Figura 19). Entretanto, a dose aplicada de quitosana diminuiu o desenvolvimento da colonização do fungo, indicando concordância entre os dois métodos de inoculação. Ao realizar o ferimento para inoculação de *Colletotrichum*, houve favorecimento à penetração e colonização do fungo e, por consequência, aumento da lesão.

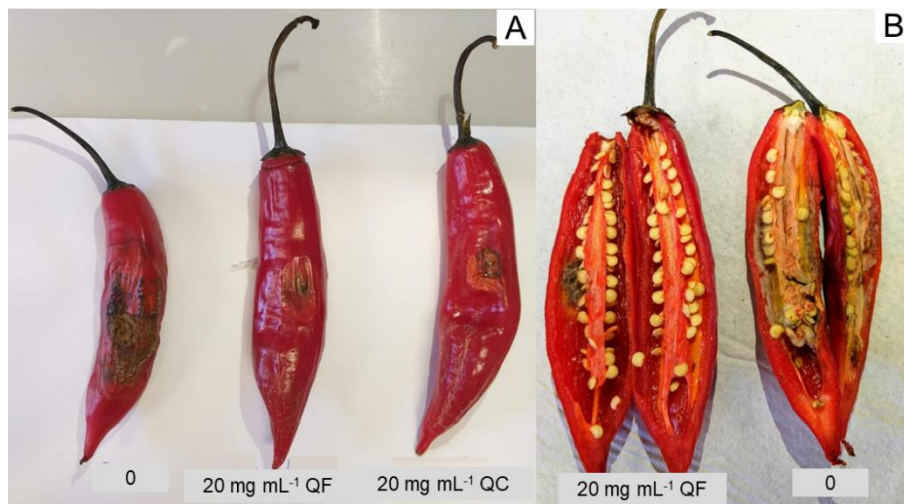


Figura 19. Sintomas de antracnose em frutos com ferimento (A); Colonização interna do fruto inoculados com o método do palito (B). Teresina, PI. 2019.

O aumento do diâmetro da lesão na dose de 30 mg mL^{-1} pode ser atribuído à consistência da quitosana na parede do fruto com formações de geleificação, favorecido pelo aumento da concentração de quitosana e favorecendo o crescimento de fungos do ambiente sobre os frutos.

5 CONCLUSÕES

A adubação orgânica com uso de esterco bovino inoculado com bactéria diazotrófica de vida livre e *Cunninghamella elegans*, incrementa a disponibilidade de nutrientes, principalmente de N, K e indiretamente aumentando a disponibilidade de Ca e Mg.

O esterco bovino na dose de 80 g kg⁻¹ promove maior comprimento de raízes e maior acúmulo de nutrientes na parte aérea (NPK) de pimenteira.

A quitosana oriunda de *C. elegans* reduz a severidade de *Colletotrichum* sp. em pimenta.

O método de inoculação com fermento permite maior severidade da doença em pimenta.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALI, A.B.; ORDOH, P.K.; SINGH, A.; SIDDIQUI, Y.; DROBY, S. Post-harvest development of anthracnose in pepper (*Capsicum* spp): Etiology and management strategies. **Crop Protection**, v.90, p132-141, 2016.
- ANDRADE, M.V.R.F.; DEUSDARA, T.T.; SHEIDT, G.N.; CHANGAS, J. Isolamento, caracterização fenotípica e perfil decrescimento de cepas do Fungo *Cunninghamella* sp. do solo do sul. **Biota Amazônia**, v.5, n.2, p.58-64, 2015.
- ARAÚJO, E.N.; OLIVEIRA, A.P.; CAVALCANTE, L.F.; PEREIRA, W.E.; BRITO, N.M.; NEVES, C.M.L.; SILVA, E.E.S. Produção do pimentão adubado com esterco bovino e biofertilizante. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v11, n.5, p.466-470, 2007.
- ARAÚJO, F.F.; HENNING, A.A.; HUNGRIA, M. Phytohormones and antibiotics produced by *Bacillus subtilis* and their effects on seed pathogenic fungi and on soybean root development. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.21, p.1639-1645, 2005.
- BALDANI, J.I.; CARUSO, L.; BALDANI, V.L.; GOE, S.R.; DOBEREINER J. Recent advances in BNF with non-legume plants. **Soil Biology and Biochemistry**, v.29, p.911-922, 1997.
- BATISTA, A.C.; SOUZA, N.F.E.; PAIVA, W.S. Review of fungal chitosan: past, present and perspectives in Brazil. **Polímeros**, v.28, n.3, p. 275-283, 2018.
- BERGER, L.R.R. **Efeito da quitosana e do biofertilizante bioprotetor na murcha de fusarium em caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp)**. 2010, 75f. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo). Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2010.
- BERGER, L.R.R.; FELIX, F.F.; BORGES, T.K.S.; MALHEIROS, S.M.M.; STAMFORD, N.P. Cultivo de *Cunninghamella Elegans* (UCP 542) em Meio BD. **IX Jornada de Ensino Pesquisa e Extensão da Universidade Federal de Pernambuco**, R1084-1, 3p, 2009.
- BLACK, J.S.E.; GREGERSEN, H.B. Antecedents to cross-cultural adjustment for expatriates on Pacific Rim assignments. **Human Relations**, v.44, p.497-515, 1991.
- BOONLERTNIRUN, S.; BOONRAUNG, C.; SUVANASARA, R. Application of chitosan in rice production. **Journal of Minerals, Metallurgy, and Materials**, v.18, p.47-52, 2008.
- BOSLAND, P.W. Chiles: A gift from a fiery god. **HortScience**, v.34, n.5, p.809-811, 1999.
- CÂNDIDA, L.J.; CHAGAS, A.; NEWTON, S.G.; PASSOS, S.L.; BORGES, C.F.L. Biomassa e extração de quitina e quitosana a partir de isolados de *Cunninghamella* sp. **Ciências Biológicas e da Saúde**, v.38, n.1, p.25-34, 2017.

CARRIZO, G.C.; BARFUSS, M.H.; BARBOZA, E.M.; SAMUEL, G.E.R.; MOSCONE, E.A.; EHRENDORFER, F. Phylogenetic relationships, diversification and expansion of chili peppers (*Capsicum*, *Solanaceae*). **Annals of Botany**, v.1, n.118, p.35-51, 2016.

CARVALHO, F.P. Pesticides, environment and food safety. **Food and Energy Security**, v.6, n.2, p.48-60, 2017.

CARVALHO, S.I.C.; BIANCHETTI, L.B.; RIBEIRO, C.S.C.; LOPES, C.A.; HENZ, G.P.; REIFSCHNEIDER, F.J.B. Botânica e recursos genéticos. **Pimentas *Capsicum***, Brasília, DF: EMBRAPA, Cap.5, p.39-53, 2008.

COUTINHO, M.P.; CARNEIRO, J.G.A.; BARROSO, D.G.; RODRIGUES, L.A.; SIQUEIRA, J. Substrato de cavas de extração de argila enriquecido com subprodutos agroindustriais e urbanos para produção de mudas de *Sesbania virgata*. **Revista *Árvore***, v.30, n.1, p.147-153, 2006.

DANG, Q.; LIU, K.; LIU, C.; XU, T.; YAN, J.; CAO, Y. Preparation, characterization, and evaluation of 3, 6-ON-acetylene diamine modified chitosan as potential antimicrobial wound dressing material. **Carbohydrate Polymers**, v.180, p.1-12, 2018.

DAMM, U.; CANNON, P.F.; WOUDEBERG, J.H.C.; AND CROUS, P.W. The *Colletotrichum acutatum* species complex. **Studies in Mycology**, v.73, p.37-113p, 2012.

DEAN, T.R.; VAN KAN, J.A.L.; PRETORIUS, Z.A.; HAMMOND-KOSACK, K.E; DI PIETRO, A.; SPANU, P.D.; RUDD, J.J; DICKMAN, M.; KAHMANN, R.; ELLIS, J.; FOSTER, G.D. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. **Molecular Plant Pathology**, v.13, p.414-430, 2012.

DOMSZY, J.G.; ROBERTS, G.A.F.; MUZZARELLI, R.A.A.; PARISER, E.R. Proceedings of the first international conference on chitin/chitosan. **MIT Sea Grant Report**, v.78, p.421, 1978.

EL GHAOUTH, A.; ARUL, J.; WILSON, C.; BENHAMOU, N. Ultrastructural and cytochemical aspects of the effect of chitosan on decay of bell pepper fruit. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v.44, n.6, p.417-432, 1994.

EL GHAOUTH, A.; ARUL, J.; WILSON, C.; BENHAMOU, N. Biochemical and cytochemical aspects of the interaction of chitosan and *Botrytis cinerea* in bell pepper fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v.12, p.183-194, 1997.

EL HADRAMI, A.; ADAM, L. R.; EL HADRAMI, I.; DAAYF, F. Chitosan in plant protection. **Marine drugs**, v.8, n.4, p.968-987, 2010.

ETMINANI, F.; HARIGHI, B. Isolation and identification of endophytic bacteria with plant growth promoting activity and biocontrol potential from wild pistachio trees. **The Plant Pathology Journal**, v.34, n.3, p.208-217, 2018.

FALKER AUTOMAÇÃO AGRÍCOLA LTDA. **Manual do medidor eletrônico de clorofila ClorofiLOG CFL 1030**, p.4, 2008.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2016. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>>. Acesso em: 15 abr. 2018.

FAO. World agriculture towards 2030/2050: revision, p. 200, Rome, 2012. Disponível em: <<http://www.fao.org/3/a-ap106e.pdf>>. Acesso em: 12 out. 2018.

FELIX, F.F. **Produção e efeitos de biofertilizantes bioprotetor com quitosana na alface**. 2011, 68p. (Tese de Doutorado em Ciência do Solo) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

FERRAZ, R.M.; RAGASSI, C.F.; HEINRICH, A.G.; LIMA, M.F.; PEIXOTO, J.R.; REIFSCHNEIDE, F.J.B. Caracterização morfoagronômica preliminar de acessos de pimentas cumari. **Horticultura Brasileira**, v.34, n.4, p.498-506, 2016.

FILGUEIRA, F.A.R. **Novo manual de olericultura: Agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**. Viçosa: UFV, 2000. 402p.

FILGUEIRA, F.A.R. **Novo manual de olericultura**. 3 Ed. Viçosa-MG, UFV, 2008. 785p.

FRANCO, L.O.; MAIA, R.D.C.C.; PORTO, A.L.F.; MESSIAS, A.S.; FUKUSHIMA, K.; CAMPOS-TAKAKI, G.M.D. Heavy metal biosorption by chitin and chitosan isolated from *Cunninghamella elegans* (IFM 46109). **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, n.3, p.243-247, 2004.

FRANCO, L.D.O.; STAMFORD, T.C.M.; STAMFORD, N.P.; CAMPOS-TAKAKI, G. M.D. *Cunninghamella elegans* (IFM 46109) como fonte de quitina e quitosana. **Revista Analytica**, v.4, n.14, p.40-44, 2005.

GAVHANE, Y.N.; GURAV, A.S.; YADAV, A.V. Chitosan and Its Applications: A Review of Literature, **International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Science**, v.4, p.312-331, 2013.

GLASER, B.; LEHMANN, J.; ZECH, W. Ameliorating physical and chemical properties of highly weathered soils in the tropics with charcoal- a review. **Biology and Fertility of Soils**, v.35, p.219-230, 2002.

JIANG, W.Z.; CAI, Y.; LI, H.Y. Chitosan-based spray-dried mucoadhesive microspheres for sustained oromucosal drug delivery. **Powder Technology**, v.312, p. 124-132, 2017.

JIMÉNEZ, M.R. Las enfermedades de las plantas: impactos, amenazas y control. **Real Academia L de Córdoba**, n.166, p.111-130, 2018.

KALEDA, A.M.; SIDNALDO J.P.; MARQUES K.M.; MATTIUZ B.H. Chitosan-propolis combination inhibits anthracnose in 'Hass' avocados. **Journal of Food and Agriculture**, v.30, n.8, p.681-687, 2018.

- KIEHL, E.J. **Fertilizantes organominerais**, Piracicaba: Agronômica Ceres, p.189, 1993.
- KIM, K.D.; OH, B.J.; YANG, J. Differential interactions of a *Colletotrichum gloeosporioides* isolates with green and red pepper fruits. **Phytoparasitica**, v.27, p. 97-106, 1999.
- KUROZAWA, C.; PAVAN, M.A. Doenças das solanáceas. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M. (Eds). **Manual de fitopatologia**. 4ed. São Paulo: Editora agronômica Ceres, v.2, p.589-596, 2005.
- LIMA, F.S.; STAMFORD, N.P.; SOUSA, C.S.; LIRA JÚNIOR, M.A.; MALHEIROS, S.M.M.; VAN STRAATEN, P. Earthworm compound and rock biofertilizer enriched in Nitrogen by inoculation with free living diazotrophic bacteria. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.27, p.1-7, 2010.
- MACHADO, D.M.; SCHOSSLER, T.R.; ZUFFO, A.M.; ANDRADE, F.R.; PIAUILINO, A.C. Atividades microbianas e as transformações no ciclo dos elementos no solo. **Enciclopédia biosfera**, v.8, n.15, p.180, 2012.
- MAIA, F.G.M.; ARMESTO, C.; ZANCAN, W.L.A.; MAIA, J.B.; ABREU, M.S. Efeito da temperatura no crescimento micelial, produção e germinação de conídios de *Colletotrichum* spp. isolados de mangueira com sintomas de antracnose. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v.27, n.2, p.205-210, 2011.
- MANANDHAR, J.B.; HARTMAN, G.L.; WANG, T.C. Anthracnose development on pepper fruits inoculated with *Colletotrichum gloeosporioides*. **Plant Disease**, v.3, n.79, p.380, 1995.
- MATIAS, S.S.R.; CORREIA, M.A.R.; CAMARGO, L.A.; FARIAS, M.T.; CENTURION, J.F.; NOBREGA, J.C.A. Influência de diferentes sistemas de cultivo nos atributos físicos e no carbono orgânico do solo. **Revista Brasileira de Ciência Agrária**, v.7, n.3, p.414-420, 2012.
- MELLO, K.G.P.C.D.; BERNUSSO, L.D.C.; PITOMBO, R.N.D.M.; POLAKIEWICZ, B. Synthesis and physicochemical characterization of chemically modified chitosan by succinic anhydride. **Biology and technology**, v.4, n.49, p.665-668, 2006.
- MONTRI, P.; TAYLOR, P.W.J.; MONGKOLPORN, O. Pathotypes of *Colletotrichum capsici*, the causal agent of chili anthracnose, in Thailand. **Plant Disease**, v.93, p.17-20, 2009.
- MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. 2ed. Editora UFLA: Lavras, 2006.
- MOREIRA, G.R.; CALIMAN, F.R.B.; SILVA, D.J.H.; RIBEIRO, C.S.C. Espécies e variedades de pimenta. **Informe Agropecuário**, v.27, n. 235, p.16-29, 2006.

MORENO, M.J.; VALENZUELA, E.L.M.; PLASCENCIA, J.C.; ENCINAS, F.; RODRÍGUEZ, S.; SÁNCHEZ, E.C.; ROSAS, V.M.; OCANO, A.Z.; GRACIANO, V. Functionalization of chitosan by a free radical reaction: characterization, antioxidant and antibacterial potential. **Carbohydrate Polymers**, v.155, n.117-127, 2017.

OLIVEIRA, C.E.V.; MAGNANI, M.; SALES, C.V.; PONTES, A.L.S.; CAMPOS-TAKAKI, G.M.; STAMFORD, T.C.M.; SOUZA, E.L. Effects of chitosan from *Cunninghamella elegans* on virulence of post-harvest pathogenic fungi in table grapes (*Vitis labrusca* L.). **International Journal of Food Microbiology**, v.171, p.54-61, 2014.

OLIVEIRA, W.S.; STAMFORD, N.P.; SILVA, E.V.N.; SANTOS, C.E.R.S.; FREITAS, A.D.S.; ARNAUD, T.M.S.; SARMENTO, B.F. Biofertilizer produced by interactive microbial processes affects melon yield and nutrients availability in a Brazilian semiarid soil. **Australian Journal of Crop Science**, v.8, p.1124-1131, 2014.

OLIVEIRA, F.L.N.; STAMFORD, N.P.; NETO, D.S.; OLIVEIRA, E.C.A.; OLIVEIRA, W.S.; SILVA SANTOS, C. E. R. Effects of biofertilizers produced from rocks and organic matter, enriched by diazotrophic bacteria inoculation on growth and yield of sugarcane. **Australian journal of Crop Science**, v.9, n.6, p.504-508, 2015.

OLIVEIRA, V.C.; SANTOS, A.R.; SOUZA, G.S. Efeito da adubação orgânica e mineral no crescimento de plantas de orégano cultivadas em ambiente protegido. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v.10, n.2, p.08-13, 2015.

OLIVEIRA, C.T.; BRAGA, P.L.; MAUCH, C.R. Entraves do cultivo convencional e as potencialidades do cultivo orgânico do pimentão no Brasil. **Revista Thema**, v.14, n.3, p.291-302, 2017.

OLIVEIRA, F.L.N.; OLIVEIRA, W.S.; STAMFORD, N.P.; SILVA, E.V.N.; SANTOS, C.E.R.S.; FREITAS, A.D.S. Effectiveness of biofertilizer enriched in N by *Beijerinckia indica* on sugarcane grown on an Ultisol and the interactive effects between biofertilizer and sugarcane filter cake. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, v. 17, n. 4, p. 1040-1057, 2017.

ONU, United Nations General Assembly Report of the Special Rapporteur on the law to food. 2017. Disponível em: < <https://United-Nations-Report-of-the-Special-Rapporteur-on-the-right-to-food.pdf>>. Acesso em: 16 mar. 2019.

PASQUALE, T.; KUMAR, S. The Pepper Genome: An introduction, Compendium of plant genomes, origin and diffusion. **Plant Sciences Springer International Publishing**, cap.1, p.1-8, 2019.

PEREIRA, L.A.; SILVA, R.L; BATISTA, F.A.; MENDES, A.N.; OSAJIMA, J.A.; SILVA-FILHO, E.C. Biological properties of chitosan derivatives associated with the ceftazidime drug. **Carbohydrate Polymers**, v.222, 2019.

PHILIBERT, T.; LEE, B.H.; FABIEN, N. Current status and new perspectives on chitin and chitosan as functional biopolymers. **Applied biochemistry and biotechnology**, v.181, p.1314-1337, 2017.

PINHEIRO, J.B.; AMARO, G.B.; PEREIRA, R.B. Nematoides em pimentas do gênero *Capsicum*. Brasília: **Embrapa Hortaliças**. 9p. (Embrapa Hortaliças. Circular Técnica, 104), 2012.

PRUSKY, D., LICHTER, A. Activation of quiescent infections by post-harvest pathogens during transition from biotrophic to the necrotrophic stage. **Federation of European Microbiologist Societies**, v.268, p.1-8. 2007.

REIFSCHNEIDER, F.J.B. **Capsicum: pimentas e pimentões no Brasil, Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia**. Brasília, DF, EMBRAPA HORTALIÇAS, n.18, 2015, 113p.

RIBEIRO, J.G.; SERRA, I.M.R.S.; ARAÚJO, M.U.P. Uso de produtos naturais no controle de antracnose causado por *Colletotrichum gloeosporioides* em mamão. **Summa Phytopathologica**, v.42, n.2, p.160-164, 2016.

ROBERTS, P.D.; PERNEZNY, K.; KUCHARREK, T.A. Anthracnose Caused by *Colletotrichum* sp. on Pepper [Online]. **University of Florida's Institute of Food and Agricultural Sciences**, pp. 178, 2001: Disponível em: <<http://edis.ifas.ufl.edu/PP104>>. Acesso em: 16 jan. 2019.

ROTEM, J.; PALTI, J.; KRANZ, J. Epidemiological factors as related to plant disease control by cultural practices, In: PALTI, J, & KRANZ, J, (eds,) Comparative epidemiology: a tool for better disease management. **Centre for Agricultural Publishing and Documentation**, Wageningen, 1980, p.104-116.

SANCHEZ, P.A. Soil fertility and hunger in Africa. **Science**, v.295, p.2019-2020, 2002.

SANTANA, C.S.G.V.; SOBRINHO, J. L. S.; DA SILVA FILHO, E.C.; NUNES, L.C.C. Preparation and physicochemical characterization of binary composites palygorskite–chitosan for drug delivery. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v.3, n.128, p.1327-1334, 2017.

SANTOS, E.R.; SILVA, M.C.; SOUZA, P.M.; SILVA, A.C.; PAIVA, S.C.; ALBUQUERQUE, C.D.; CAMPOS-TAKAKI, G.M. Enhancement of *Cunninghamella elegans* UCP/WFCC 0542 biomass and chitosan with amino acid supply. **Molecules**, v.18, p. 10095-10107, 2013.

SAXENA, A.; RAGHUWANSHI, R.; GUPTA, V.K.; SINGH, H.B. Chilli Anthracnose: The Epidemiology and Management. **Frontiers in Microbiology**, v.7, n.1527, p.1-18, 2016.

SEGHIR, B.B.; BENHAMZA, M.H. Preparation, optimization and characterization of chitosan polymer from shrimp shells. **Journal of Food Measurement and Characterization**, v.3, n.11, p.1137-1147, 2017.

SILVA, D.D.; ADES, P.; CROUS, P.; TAYLOR, P. *Colletotrichum* species associated with chili anthracnose in Australia. **Plant Pathology**, v.66, p.254-272, 2016.

SILVA, W. O.; STAMFORD, N.; SILVA, E.V.N.; SANTOS, E.R.S.; FREITAS, A.D.V.; SILVA, M. The impact of biofertilizers with diazotrophic bacteria and fungi chitosan on melon characteristics and nutrient uptake as an alternative for conventional fertilizers. **Scientia Horticulturae**, v.211, p.236-240, 2016.

SOTELO-BOYÁS, M.; VALVERDE, A.G.; PLASCENCIA, J.M.; CORREA, P.Z.; JIMÉNEZ, A.A.; SOLORZA, F.J.; BARRERA, N.L.; BAUTISTA, B.S. Characterization of chitosan nanoparticles added with essential oils in vitro effect on *Pectobacterium carotovorum*. **Revista Mexicana de Ingeniería Química**, v.3, n.14, p.589-599, 2015.

SOUZA, C.J.E.; MANSUR, H.S. Preparação e caracterização de blendas de quitosana/poli (álcool vinílico) reticuladas quimicamente com glutaraldeído para aplicação em engenharia de tecido. **Química Nova**, v.6, n.31, p.1460-1466, 2008.

STAMFORD, T.C.M. Growth of *Cunninghamella elegans* UCP 542 and production of chitin and chitosan using yam bean medium. **Electronic Journal of Biotechnology**, v.10, n.1, p.61-68, 2007.

STAMFORD, N.P., ANDRADE, I.P., SILVA JUNIOR, S., SANTOS, C.E.R.S., LIRA JÚNIOR, M.A., FREITAS, A.D.S., STRAATEN, V.P. Nutrient uptake by grape in a Brazilian soil affected by rock biofertilizer. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, v.11, p. 79-88, 2011.

STAMFORD, N.P.; JUNIOR, S.S.; SANTOS, C.E.R.S.; FREITAS, A.D.S.; SANTOS, C.M.A.; ARNAUD, T.M.S.; SOARES, H.R. Yield of grape (*Vitis labrusca* cv. Isabel) and soil nutrients availability affected by biofertilizer with diazotrophic bacteria and fungi chitosan. **Australian Journal of Crop Science**, v.8, n.2, p.301-306, 2014.

STAMFORD, N.P.; FIGUEIREDO, M.V.B.; SILVA JÚNIOR, S.; FREITAS, A.D.S.; SANTOS, C.E.R.S.; LIRA JÚNIOR, M.A. Effect of gypsum and sulfur with *Acidithiobacillus* on soil salinity alleviation and on cowpea biomass and nutrient status as affected by PK rock biofertilizer. **Scientia Horticulturae**, v.192, p. 287-292, 2015.

STAMFORD, N.P.; SILVA, E.V.N.; OLIVEIRA, W.S.; SILVA, M.C.F.; MARTINS, M.S.; SILVA, V.S.G. Organic matter inoculated with diazotrophic bacterium *Beijerinckia indica* and *Cunninghamella elegans* fungus containing chitosan on banana "Williams" in field. **Acta Scientiarum**, v.39, n.1, p.33-41, 2017.

STAUB, T. Fungicide resistance: practical experience and anti-resistance strategies and the role of integrated use. **Annual Review of Phytopathology**, v. 29, p. 421-442, 1991.

STRAATEN, P. **Rocks for crops – Agrominerals of sub - Saharan Africa**. (ICRAF: International Center for Research in Agroforestry). Nairobi, Kenya. University of Guelph, Ontario, p. 338, 2002.

TÖFOLI, J.G.; DOMINGUES, R.J.; FERRARI, J.T. Antracnose em solanáceas: etiologia, características e controle. **Biológico**, São Paulo, v.77, n.1, p.73-79, 2015.

THAN, P.P.; JEEWON, R.; HYDE, K.D.; PONGSUPASAMIT, S.; MONGKOLPORN, O.; TAYLOR, P.W.J. Characterization and pathogenicity of *Colletotrichum* species associated with anthracnose on chilli (*Capsicum spp*). **Thailand Plant Pathology**, v. 57, p. 562-572, 2008.

VERZIGNASSI, J.R.; VIDA, J.B.; GASPAROTTO, F.; CORTEZ, G.L.S.; LORENZETTI, E.R.; FARIA, G. de S.; TESSMANN, D.J. & SEVERINO, J.J. Método do palito para inoculação de *Didymella bryoniae* em melão nobre e pepino "japonês". **Fitopatologia Brasileira**, v.29, p.154, 2004.

WU, T.; HUANG, J.; JIANG, Y.; HU, Y.; YE, X.; LIU, D.; CHEN, J. Formation of hydrogels based on chitosan/alginate for the delivery of lysozyme and their antibacterial activity. **Food chemistry**, v. 240, p. 361-369, 2018

WECKNER, F.C.; MILTON, C.C.; MANTOVANELLI, B.; CAMPOS, C.J.M. Efeito da aplicação de biofertilizantes à base de esterco bovino fresco no crescimento de pimenta de cheiro (*Capsicum Chinense Jacq.*). **Vale do Rio Verde**, v.16, n.1, 2018.

ZACCARDELLI, M.P.; CATELLO, V.; DOMENICA, P.; ASSUNTA, C. Compost tea spraying increases yield performance of pepper (*Capsicum annuum L.*) grown in greenhouse under organic farming system. **Italian Journal of Agronomy**, v.13, p. 229-234, 2018.