UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA AGRÍCOLA

INFLUÊNCIA DE FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES, SISTEMAS DE CULTIVO E PARÂMETROS PÓS-COLHEITA NA CONCENTRAÇÃO DE ESTEVIOSÍDEOS E DESENVOLVIMENTO DE *Stevia rebaudiana* (BERT.) BERTONI

EDILBERTO PRINCI PORTUGAL

CAMPINAS
DEZEMBRO DE 2006

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA AGRÍCOLA

INFLUÊNCIA DE FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES, SISTEMAS DE CULTIVO E PARÂMETROS PÓS-COLHEITA NA CONCENTRAÇÃO DE ESTEVIOSÍDEOS E DESENVOLVIMENTO DE *Stevia rebaudiana* (BERT.) BERTONI

Tese submetida à banca examinadora para obtenção do título de Doutor em Engenharia Agrícola na área de concentração em Tecnologia Pós-Colheita

EDILBERTO PRINCI PORTUGAL
Orientador: Prof. Dr. Sylvio Luis Honório

CAMPINAS
DEZEMBRO DE 2006

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA E ARQUITETURA - BAE - UNICAMP

Portugal, Edilberto Princi
P838i Influência de fungos micorrízicos arbusculares, sistemas de cultivo e parâmetros pós-colheita na concentração de esteviosídeos e desenvolvimento de *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni / Edilberto Princi Portugal .--Campinas, SP: [s.n.], 2006.

Orientador: Sylvio Luis Honório.
Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Agrícola.

1. *Stevia rebaudiana*. 2. Micorriza arbuscular. 3. Tecnologia pós-colheita. 4. Cultivo. 5. Hidroponia. 6. Secagem. I. Honório, Sylvio Luis. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Agrícola. III. Título.

Título em Inglês: Influence of arbuscular mycorrhizal fungi, cultivation systems and postharvest parameters in the concentration of steviosides and development of *Stevia Rebaudiana* (Bert.) Bertoni.
Palavras-chave em Inglês: Stevia, Arbuscular mycorrhiza, Postharvest, Cultivation, Field, Aeroponics, Hidroponics, Equilibrium moisture content, Drying, Substrate.
Área de concentração: Tecnologia Pós-Colheita
Titulação: Doutor em Engenharia Agrícola
Banca examinadora: Adriana Parada Dias da Silveira, Pedro Melillo de Magalhães, Benedito Carlos Benedetti e Mônica Ferreira de Abreu.
Data da defesa: 20/12/2006
Programa de Pós-Graduação: Engenharia Agrícola

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Sylvio Luis Honório – Faculdade de Engenharia Agrícola – UNICAMP
Orientador

Dra. Adriana Parada Dias da Silveira – Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Solos e Recursos Naturais – Instituto Agronômico de Campinas (IAC)

Dr. Pedro Melillo de Magalhães – Centro de Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) – UNICAMP

Prof. Dr. Benedito Carlos Benedetti – Faculdade de Engenharia Agrícola – UNICAMP

Dra. Mônica Ferreira de Abreu – Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Solos e Recursos Naturais – Instituto Agronômico de Campinas (IAC)

200719096

À minha esposa

Sônia

Ao meu filho

Victor

Dedico este trabalho

AGRADECIMENTOS

Ao Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) pela oportunidade concedida.

Ao Prof. Dr. Sylvio Luís Honório, pela orientação, colaboração e incentivo na realização deste trabalho.

À Faculdade de Engenharia Agrícola (FEAGRI) pela oportunidade na realização desta tese de doutorado.

À Divisão de Agrotecnologia do CPQBA pelo uso dos equipamentos, dependências e acima de tudo ao pessoal, pela colaboração sempre que se fez necessária.

À Giuliana pela colaboração durante o transcorrer dos trabalhos, principalmente na realização das análises.

Ao Leandro Menezes que colaborou na fase inicial dos experimentos.

À Dra. Adriana Parada Dias da Silveira, do Instituto Agronômico de Campinas, pelo fornecimento dos fungos micorrízicos.

À Divisão de Química Orgânica e Farmacêutica do CPQBA, Marilí, Adilson, Adriana pelas análises de esteviosídeos por HPLC.

Ao Alexandre e a Marta, da Divisão de Microbiologia do CPQBA, pela colaboração e apoio na realização deste trabalho.

Ao Instituto de Química da UNICAMP pela realização das análises epectrométricas por ressonância magnética nuclear (RMN).

Ao Prof. Dr. João da Rocha Pereira pelo incentivo e cobrança, quase que diária, pela defesa da tese.

À Steviafarma Industrial S.A. pelo fornecimento do padrão de esteviosídeos e sementes de estévia.

À Eucatex Química e Mineral Ltda, Terra do Paraíso, Amafriba – Fibras e Substratos Agrícolas da Amazônia e Corn Products Brasil pelo fornecimento de substratos.

A todos, que direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

Sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS ---------- XI

LISTA DE TABELAS ---------- XIII

RESUMO ---------- XVII

ABSTRACT ---------- XIX

1. INTRODUÇÃO ---------- 1

2. REVISÃO DE LITERATURA ---------- 3

2.1 ESTÉVIA ---------- 3
2.2 MICORRIZAS ---------- 6
2.3 SUBSTRATO ---------- 10
2.4 SISTEMAS DE CULTIVO ---------- 12
2.5 SISTEMAS DE SECAGEM ---------- 16
2.6 ATIVIDADE DE ÁGUA ---------- 16

3. MATERIAL E MÉTODOS ---------- 22

3.1 MATERIAL ---------- 22
3.1.1 Espécies vegetais ---------- *22*
3.1.2 Fungos micorrízicos arbusculares ---------- *22*
3.1.3 Substratos ---------- *23*
3.1.4 Solo ---------- *24*
3.1.5 Moinho ---------- *24*
3.2 MÉTODOS ---------- 24
3.2.1 Métodos analíticos e estatísticos ---------- *24*
3.2.1.1 Extração e análise de esteviosídeos por HPLC ---------- 24
3.2.1.2 Clareamento e coloração de raízes e avaliação de colonização micorrízica ---------- 30
3.2.1.3 Análise estatística ---------- 30
3.2.2 Ensaios ---------- *31*
3.2.2.1 Seleção de substratos para produção de mudas micorrizadas. ---------- 31
3.2.2.2 Seleção de fungos micorrízicos arbusculares para estévia. ---------- 33
3.2.2.3 Influência de fungos micorrízicos arbusculares e sistemas de cultivos na produção de biomassa e concentração de esteviosídeos em estévia. ---------- 34
3.2.2.3.1 Preparo das mudas ---------- 34
3.2.2.3.2 Ensaio de hidroponia ---------- 35
3.2.2.3.3 Ensaio de aeroponia ---------- 36
3.2.2.3.4 Ensaio de vasos em casa de vegetação ---------- 38
3.2.2.3.5 Ensaio de campo ---------- 38
3.2.2.4 Determinação da umidade de equilíbrio ---------- 39
3.2.2.5 Influência de sistemas de secagem no teor de esteviosídeos ---------- 41
3.2.2.5.1 Colheita e secagem da matéria prima ---------- 41
3.2.2.5.2 Secagem ao sol ---------- 41
3.2.2.5.3 Secador a gás ---------- 42
3.2.2.5.4 Estufa elétrica com circulação forçada de ar ---------- 43

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES ---------- 44

4.1 SELEÇÃO DE SUBSTRATOS PARA PRODUÇÃO DE MUDAS MICORRIZADAS. ---------- 44
4.2 SELEÇÃO DE FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES PARA ESTÉVIA. ---------- 50
4.3 INFLUÊNCIA DE FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES E SISTEMAS DE CULTIVOS NA PRODUÇÃO DE BIOMASSA E CONCENTRAÇÃO DE ESTEVIOSÍDEOS EM ESTÉVIA. ---------- 57
4.3.1 Ensaio de hidroponia ---------- *59*
4.3.2 Ensaio de aeroponia ---------- *63*
4.3.3 Ensaio de campo ---------- *69*
4.3.4 Ensaio com vasos em casa de vegetação ---------- *73*

4.3.5 Análise comparativa dos sistemas de cultivo ---------- *80*
4.4 DETERMINAÇÃO DE UMIDADE DE EQUILÍBRIO PARA ESTÉVIA. ---------- 87
4.5 INFLUÊNCIA DOS SISTEMAS DE SECAGEM NO TEOR DE ESTEVIOSÍDEOS EM ESTÉVIA. ---------- 92
5. CONCLUSÕES ---------- **96**
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS ---------- **97**
7. ANEXOS ---------- **111**

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estruturas moleculares do esteviol, intermediários, esteviosídeo e rebaudiosídeo A 5

Figura 2. Cromatograma por HPLC do padrão de esteviosídeo na concentração de 560µg mL^{-1} (A), e amostra da 2ª colheita de planta mantida em vaso com solo esterilizado e inoculada com fungo MA (B). 26

Figura 3. Espectro, com pré-saturação do sinal residual da água, de RMN de ^{1}H (300,07 MHz, DMSO/D_2O)....28

Figura 4. Espectro de RMN de ^{13}C (75,45 MHz, DMSO/D_2O) desacoplado de ^{1}H. 28

Figura 5. Espectro de RMN de ^{13}C (75,45 MHz, DMSO/D_2O) DEPT com ângulos de 135° e 90°....29

Figura 6. Os números, entre parênteses, na estrutura química correspondem aos deslocamentos químicos de RMN de ^{13}C e a posição dos mesmos corresponde à atribuição..29

Figura 7. Desenho esquemático de uma das bandejas do ensaio de seleção de substratos.....32

Figura 8. Vista superior do sistema de nebulização no interior da caixa. 36

Figura 9. Vista geral do ensaio de aeroponia com as plantas recém transplantadas (esquerda) e uma vista das raízes no interior das caixas (direita). 37

*Figura 10. **Stevia rebaudiana**, genótipo T9 em experimento de campo. 41*

*Figura 11. Material vegetal de **Stevia rebaudiana**, genótipo T9, secando ao sol. 42*

Figura 12. Material vegetal de estévia para secagem no secador a gás. Detalhe da bandeja (A) e vista do secador com os carrinhos (B). 43

*Figura 13. Porcentagem de colonização micorrízica de **B. humidicola** pelas diferentes espécies de fungos em substrato compostado de casca (ERCSA). 47*

*Figura 14. Fotos mostrando as mudas de **B. humidicola** inoculada com o fungo **G. intraradices** nos diferentes substratos (A), mudas da gramínea inoculadas com os diversos fungos MA no substrato ERCSA (B), hifas e vesículas do fungo **Entrophospora** sp. ao longo da raiz da gramínea no substrato ERCSA (C) e formação de esporos pelo fungo **G. intraradices** no substrato TPMSA (D). 48*

*Figura 15. Visão geral do ensaio na época da colheita mostrando a distribuição das bandejas com **B. humidicola** nos diferentes substratos. 48*

Figura 16. Efeito da inoculação de fungos MA na produção de massa da matéria seca total da parte aérea (MST) e massa da matéria seca de folhas (MSF) de estévia. 52

Figura 17. Determinação da eficiência micorrízica em relação à matéria seca total da parte aérea (MST) e matéria seca de folhas (MSF) de estévia....53

Figura 18. Teor e quantidade acumulada de esteviosídeos na matéria seca de folhas de plantas de estévia inoculadas ou não com fungos MA. 54

Figura 19. Determinação da eficiência micorrízica em relação ao teor e quantidade acumulada de esteviosídeos na matéria seca de folhas de estévia....55

Figura 20. Valores de porcentagem de colonização radicular de estévia por fungos MA....56

Figura 21. Colonização micorrízica na raíz de estévia. ***Entrophospora*** *sp. (IAC23) – detalhe de vesícula (A);* ***Glomus etunicatum*** *(IAC42) – detalhe de um arbúsculo (B).....56*

Figura 22. Desenvolvimento da cultura no momento da colheita. Visão geral dos tratamentos (A); controle x ***G. intraradices*** *(IAC43) (B) e controle x CPVG (C). 57*

Figura 23. Eficiência micorrízica para matéria seca de folhas e quantidade acumulada de esteviosídeos nas duas colheitas.....62

Figura 24. Imagens do experimento em casa de vegetação na época da 2ª colheita (A) e de um seguimento de raiz de estévia colonizado pelo fungo MA G. intraradices (B). 62

Figura 25. Comparação entre plantas de estévia (1ª colheita) cultivadas em aeroponia (esquerda) e hidroponia (direita) (A). Detalhe do desenvolvimento do sistema radicular (aeroponia – esquerda; hidroponia – direita) (B). 65

Figura 26. Eficiência micorrízica para matéria seca de folhas e quantidade acumulada de esteviosídeos nas três colheitas. 66

Figura 27. Imagens do experimento de aeroponia na 1ª colheita (A), 2ª colheita (B) e detalhe das raízes quando da 1ª colheita (C).....67

Figura 28. Detalhes da colonização micorrízica por ***Glomus intraradices*** *em raízes de estévia durante o transcorrer do ensaio de aeroponia.....68*

Figura 29. Eficiência micorrízica para matéria seca de folhas e quantidade acumulada de esteviosídeos nas duas colheitas.....71

Figura 30. Vista geral do ensaio de campo na época das colheitas, 1ª (A), 2ª (B) e 3ª (C). Colonização micorrízica nas raízes de estévia, 1ª colheita-tratamento inoculado com ***G. intraradices*** *(D).....72*

Figura 31. Eficiência micorrízica para matéria seca de folhas e quantidade acumulada de esteviosídeos para as duas colheitas nos dois tratamentos de solo. 79

Figura 32. Imagens do experimento de vasos em casa de vegetação e da colonização do sistema radicular da estévia. 80

Figura 33. Total de esteviosídeos acumulados por planta ao longo do experimento para os sistemas de cultivo e controle (vasos) para plantas inoculadas ou não com fungos MA. 86

Figura 34. Modelo de HALSEY, GAB e OSWIN ajustado aos valores experimentais (T=30°C). 91

Figura 35. Modelo de GAB, BET LINEAR e HALSEY ajustado aos valores experimentais (T=45°C).....91

Figura 36. Variação da temperatura ao longo do dia para as três épocas de colheita. 93

Figura 37. Variação da umidade relativa do ar ao longo do dia para as três épocas de colheita. 93

Figura 38. Variação da velocidade do vento ao longo do dia para as três épocas de colheita. 94

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Relação dos fungos micorrízicos arbusculares empregados nos ensaios, código e origem. *22*

Tabela 2. Relação dos substratos testados no ensaio, código, tipo e origem. *23*

Tabela 3. Concentrações dos sais nas espumas biodegradáveis. *33*

Tabela 4. Regime de irrigação para o sistema hidropônico. *35*

Tabela 5. Regime de irrigação para o sistema aeropônico. *37*

Tabela 6. Umidade relativa de acordo com a solução salina (GREENSPAN, 1977). *40*

Tabela 7. Resultado da análise química dos substratos. *44*

*Tabela 8. Porcentagem de colonização por fungos MA em raízes de **B. humidicola** nos diferentes substratos. Média de cinco repetições.* *46*

Tabela 9. Análise química do solo utilizado no ensaio para seleção de fungos MA para estévia. Análise realizada pelo Instituto Agronômico de Campinas. *51*

Tabela 10. Resultados da análise química do substrato Eucatex Rendmax Citrus sem adubação. *58*

Tabela 11. Comparação entre os resultados da análise química de dois lotes do substrato ERCSA. *59*

Tabela 12. Valores de CE, temperatura e pH da solução nutritiva para o ensaio de hidroponia. *60*

*Tabela 13. Produção de massa da matéria seca total da parte aérea (MST), massa da matéria seca de folhas (MSF), teor e acúmulo de esteviosídeos nas folhas e porcentagem de colonização radicular por **G. intraradices** em plantas de estévia cultivadas em hidroponia.* *61*

Tabela 14. Valores de CE, temperatura e pH da solução nutritiva para o ensaio de aeroponia. *63*

*Tabela 15. Produção de massa da matéria seca total da parte aérea (MST), massa da matéria seca de folhas (MSF), teor e acúmulo de esteviosídeos nas folhas e porcentagem de colonização radicular por **G. intraradices** em plantas de estévia cultivadas em aeroponia.* *64*

Tabela 16. Análise química do solo da área do ensaio. Análise realizada pelo Instituto Agronômico de Campinas. *69*

*Tabela 17. Produção de massa da matéria seca total da parte aérea (MST), massa da matéria seca de folhas (MSF), teor e acúmulo de esteviosídeos nas folhas e porcentagem de colonização radicular por **G. intraradices** em plantas de estévia cultivadas em campo.* *70*

Tabela 18. Análise química do solo utilizado no ensaio. Análise realizada pelo Instituto Agronômico de Campinas. *73*

*Tabela 19. Efeito da inoculação ou não de **G. intraradices**, tratamento do solo (esterilizado ou não) e época de colheita, na produção de massa da matéria seca total da parte aérea – MST (g), de planas cultivadas em vasos na casa de vegetação.* *74*

*Tabela 20. Efeito da inoculação ou não de **G. intraradices**, tratamento do solo (esterilizado ou não) e época de colheita, na produção de massa da matéria seca folhas – MSF (g) de estévia, de plantas cultivadas em vasos na casa de vegetação. 75*

*Tabela 21. Efeito da inoculação ou não de **G. intraradices**, tratamento do solo (esterilizado ou não) e época de colheita, no teor de esteviosídeos (% m/m) em folhas estévia, de plantas cultivadas em vasos na casa de vegetação. 76*

*Tabela 22. Efeito da inoculação ou não de **G. intraradices**, tratamento do solo (esterilizado ou não) e época de colheita, na quantidade acumulada de esteviosídeos (mg/MSF/planta) em folhas de estévia, de plantas cultivadas em vasos na casa de vegetação. 77*

*Tabela 23. Taxa de colonização (%) por **G. intraradices** em raízes de estévia, de acordo com o tratamento do solo (esterilizado ou não) e época de colheita, em plantas cultivadas em vasos na casa de vegetação. 78*

*Tabela 24. Produção de massa da matéria seca total da parte aérea – MST/planta (g), de plantas inoculadas ou não com **G. intraradices**, cultivadas em aeroponia, hidroponia, campo e vasos em casa de vegetação, nas diferentes épocas de colheita. 82*

*Tabela 25. Produção de massa da matéria seca de folhas – MSF/planta (g), de plantas inoculadas ou não com **G. intraradices**, cultivadas em aeroponia, hidroponia, campo e vasos em casa de vegetação, nas diferentes épocas de colheita. 83*

*Tabela 26. Teor de esteviosídeos (%), de plantas inoculadas ou não com **G. intraradices**, cultivadas em aeroponia, hidroponia, campo e vasos em casa de vegetação, nas diferentes épocas de colheita. 83*

*Tabela 27. Quantidade acumulada de esteviosídeos (mg/MSF/planta), de plantas inoculadas ou não com **G. intraradices**, cultivadas em aeroponia, hidroponia, campo e vasos em casa de vegetação, nas diferentes épocas de colheita. 84*

*Tabela 28. Taxa de colonização micorrízica (%), de plantas inoculadas ou não com **G. intraradices**, cultivadas em aeroponia, hidroponia, campo e vasos em casa de vegetação, nas diferentes épocas de colheita. 87*

Tabela 29. Valores de umidade de equilíbrio e respectivos desvios padrões de folhas de estévia em função da atividade de água e temperatura. 88

Tabela 30. Estimativas dos parâmetros dos modelos empíricos. 90

Tabela 31. Massa da matéria seca de folhas de estévia (g), após moagem, para cada sistema de secagem nas 3 épocas de colheita. 92

*Tabela 32. Teores de esteviosídeos (% m/m) obtidos na parte aérea de **Stevia rebaudiana**, em três épocas de colheita e o material colhido seco em três sistemas de secagem. 95*

Tabela 33. Produção de massa da matéria seca total da parte aérea (MST), massa da matéria seca de folhas (MSF), teor e quantidade acumulada de esteviosídeos nas folhas e porcentagem de colonização por fungos MA em plantas de estévia. Média de cinco repetições. 111

Tabela 34. Comparação entre as médias de tratamento de solo (esterilizado e não esterilizado) e épocas de colheita (1^a e 2^a Colheita) em relação aos tratamentos de inoculação (inoculado e não inoculado) para massa da matéria seca total da parte aérea – MST (g), em plantas de estévia cultivadas em vasos na casa de vegetação. 111

Tabela 35. Comparação entre as médias de tratamento de solo (esterilizado e não esterilizado) e épocas de colheita (1ª e 2ª Colheita) em relação aos tratamentos de inoculação (inoculado e não inoculado) para massa da matéria seca de folhas – MSF (g), em plantas de estévia cultivadas em vasos na casa de vegetação.....112

Tabela 36. Comparação entre as médias de tratamento de solo (esterilizado e não esterilizado) e épocas de colheita (1ª e 2ª Colheita) em relação aos tratamentos de inoculação (inoculado e não inoculado) para teor de esteviosídeos (% m/m), em plantas de estévia cultivadas em vasos na casa de vegetação.....112

Tabela 37. Comparação entre as médias de tratamento de solo (esterilizado e não esterilizado) e épocas de colheita (1ª e 2ª Colheita) em relação aos tratamentos de inoculação (inoculado e não inoculado) para quantidade acumulada de esteviosídeos (mg/MSF/planta), em plantas de estévia cultivadas em vasos na casa de vegetação.....113

Tabela 38. Comparação entre as médias de tratamento de solo (esterilizado e não esterilizado) e épocas de colheita (1ª e 2ª Colheita) em relação aos tratamentos de inoculação (inoculado e não inoculado) para porcentagem de colonização micorrízica (%) em plantas de estévia cultivadas em vasos na casa de vegetação.....113

Tabela 39. Valores de temperatura, umidade relativa e velocidade do vento durante o período de secagem da estévia ao sol para as 3 épocas de colheita.....114

RESUMO

A *Stevia rebaudiana,* um arbusto que tem na produção de esteviosídeos seu principal produto de interesse, foi objeto deste trabalho. Considerando sua cadeia produtiva, existem lacunas que necessitam pesquisas, tanto no aspecto agronômico, como o emprego de espécies fúngicas micorrízicas, quanto procedimentos pós-colheita, dos quais a secagem é um dos fatores. O presente trabalho teve como objetivos, identificar uma espécie de fungo micorrízico arbuscular eficiente e sua relação com o desenvolvimento e concentração de esteviosídeos em plantas de estévia, cultivadas em campo, hidroponia e aeroponia, selecionar substrato adequado para o desenvolvimento da colonização micorrízica, avaliar sistemas de secagem no teor de esteviosídeos e determinar as isotermas de sorção da estévia.

Para seleção de fungo micorrízico foram testadas sete espécies, sendo cinco de um banco de culturas e duas isoladas da própria cultura da estévia. O ensaio foi conduzido em casa de vegetação em vasos com solo esterilizado e cinco repetições. Foram determinados a massa seca total da parte aérea e de folhas, teor e quantidade acumulada de esteviosídeos nas folhas e colonização micorrízica. Para seleção de substratos, foram testados nove produtos comerciais, utilizando-se como planta indicadora uma gramínea (*Brachiaria humidicola*) e como parâmetro avaliado a taxa de colonização fúngica no sistema radicular.

Plantas de estévia inoculadas ou não com o fungo micorrízico *Glomus intraradices* foram cultivadas em três sistemas distintos, campo, aeroponia e hidroponia. Foram realizadas três colheitas em épocas distintas e determinada a massa da matéria seca total da parte aérea e de folhas, teor e acúmulo de esteviosídeos nas folhas e colonização micorrízica.

Foram testados três processos de secagem, ao sol, secador a gás e estufa elétrica com circulação forçada de ar, à temperatura de 45^{o}C. Os processos foram avaliados em função do teor de esteviosídeos nas folhas. A determinação da umidade de equilíbrio nas folhas de estévia foi realizada nas temperaturas de 30 e 45^{o}C e, as isotermas de sorção foram tratadas com os modelos matemáticos de BET, BET linear, Peleg, GAB, Halsey, Langmuir, Oswin, Henderson e Chung e Pfost.

A espécie *Glomus intraradices* foi a mais eficiente para o desenvolvimento da estévia e acumulação de esteviosídeos. O substrato Rendmax Citrus sem adubação propiciou as melhores condições para a colonização micorrízica nas raízes da gramínea.

Dentre os sistemas de cultivo estudados a hidroponia mostrou-se o menos eficiente para o cultivo de estévia. Em aeroponia obteve-se maior produtividade em termos de matéria seca da parte aérea, enquanto no campo maior quantidade acumulada de esteviosídeos.

Não se observou diferença entre a secagem na estufa e no secador para qualquer das épocas de colheita. O teor de esteviosídeos nas folhas de plantas secadas ao sol foi sempre inferior, com perda de até 20% em relação aos outros dois sistemas.

Os modelos que apresentaram melhor ajuste, nas temperaturas de 30 e 45^{o}C, foram GAB e HALSEY. O modelo BET LINEAR também mostrou bom ajuste, mas somente para a temperatura de 45^{o}C.

Palavras chaves: estévia, micorriza arbuscular, pós-colheita, cultivo, campo, aeroponia, hidroponia, umidade de equilíbrio, secagem, substrato.

ABSTRACT

Stevia rebaudiana, a shrub mostly interesting for its production of steviosides, was the object of this work. In regard to its productive chain, further researches must be done, not only in agronomical aspects, but also in the utilization of mycorrhizal fungal species, as well as in the post-harvest processes, namely the drying one. The present work aimed at the identification of an efficient arbuscular mycorrhizal fungal species and its influence in the development and concentration of steviosides in stevia plants grown in hydroponic and aeroponic systems; to select an adequate substrate for the development of mycorrhizal fungi; to evaluate drying systems in steviosides rates and to determine stevia's isotherms of sorption.

For the mycorrhizal fungi selection seven species were tested, five from a germplasm bank and two were isolated from their own stevia culture. Five assays in pots with sterilized soil were carried out in a greenhouse. The total dry mass of the aerial parts and of the leaves, the rate and accumulated quantity of steviosides in the leaves as well as the mycorrhizal colonization were determined. Nine commercial substrates were tested for the rate of colonization of the root system of an indicating gramineous plant (*Brachiaria humidicola*).

Stevia plants that were inoculated (or not) with the mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* were cultivated in three different growing systems, field, aeroponic and hydroponic. Three harvests were carried out in different periods and the total dry mass of the branch and leaves sections, contents and accumulated steviosides in the leaves and mycorrhizal colonization were determined. Three processes for drying leaves were tested: by sunlight, gas dryer and electrical stove with forced air circulation, at 45^{o}C. The processes were evaluated in relation to the steviosides rate of the leaves. The equilibrium moisture content for stevia leaves was done at 30^{o}C and 45^{o}C, while the isotherms of sorption were tested for the best fit by mathematical models of BET, BET linear, Peleg, Gab, Halsey, Langmuir, Oswin, Henderson and Chung and Pfost.

The *Glomus intraradices* species was the most efficient for the stevia development and accumulation of steviosides. The *Rendmax Citrus* substrate without manure rendered the best conditions for the mycorrhizal colonization in the gramineous roots.

Among the growing systems studied, hydroponics turned out to be the least efficient for stevia cultivation. Aeroponics brought the highest production in terms of dry mass from the aerial parts, while in the field a larger accumulated quantity of steviosides was obtained.

No difference was observed between the stove and gas drying processes at any of the harvesting periods. The steviosides rate from the leaves dried by sunlight was always inferior, coming to a loss of 20% in relation to the others.

The best fit models were GAB and HALSEY. The BET LINEAR fitted by 45^{o}C.

Key-words: *Stevia, arbuscular mycorrhiza, post-harvest, cultivation, field, aeroponics, hidroponics, equilibrium moisture content, drying, substrate.*

1. INTRODUÇÃO

Estudos com plantas medicinais vêm aumentando consideravelmente nos últimos anos, principalmente nos aspectos relacionados à adaptabilidade e ao cultivo destas plantas em substituição ao extrativismo que ainda impera com inúmeras espécies vegetais, vem aumentando consideravelmente nos últimos anos. Atualmente, dentro do conceito de qualidade de vida, existe a preocupação com a qualidade do produto a ser consumido, portanto, a cadeia produtiva de plantas medicinais, do cultivo à comercialização, deve ser muito bem estudada e todas as etapas do processo devem ser consideradas, para que o produto tenha a qualidade e eficiência esperada pelo consumidor final.

Entre as culturas estudadas neste sentido está a *Stevia rebaudiana,* um arbusto que tem na produção de esteviosídeos seu principal valor econômico e social. Este açúcar glicosídico é 300 vezes mais doce que o açúcar de cana-de-açúcar, sendo anticárie e não tóxico, ocupando lugar de destaque como substitutos de edulcorantes sintéticos como a sacarina, ciclamatos e aspartame, além disso, não são metabolizados pelo corpo humano. Além desta aplicabilidade a planta também é utilizada no Brasil em outras funções terapêuticas, como ação cardiotônica, diabética, diurética, hipoglicêmica, vasodilatadora, antimicrobiana, entre outras descritas na literatura (VALOIS, 1992; MAGALHÃES, 2000).

Analisando a cadeia produtiva dessa planta observa-se lacunas tecnológicas, nas fases de pré-colheita à pós-colheita. Isso requer a formulação de um programa de pesquisa e desenvolvimento de modo a harmonizar o processo do aproveitamento racional da esteviacultura e dos seus produtos. O cultivo da estévia permite a agregação de valores levando à geração de benefícios socioeconômicos e ambientais (LIMA FILHO et al., 2004).

Dentre as tecnologias que poderão ser empregadas, a utilização de microrganismos em associação simbiótica com a planta torna-se importante, permitindo melhor desenvolvimento da cultura e ganhos na concentração de esteviosídeos em suas folhas, bem como maior resistência às condições ambientais adversas e doenças.

Micorrizas são associações simbióticas que se estabelecem entre as raízes da maioria das espécies vegetais e fungos do solo. Essas associações caracterizam-se pela translocação de nutrientes em movimentos bidirecionais. De um lado, o fluxo de carboidratos para o fungo e de outro lado, os nutrientes inorgânicos para as plantas. Como resultado, plantas colonizadas

com fungos micorrízicos, comumente denominadas plantas micorrizadas, tornam-se mais competitivas e tolerantes às condições ambientais adversas.

Durante os últimos anos tem se conseguido substancial progresso na compreensão da simbiose micorrízica e estes avanços esboçam tendências do futuro das pesquisas dessa associação universal fungo/raiz com ênfase para: (i) biologia da população de fungos micorrízicos; (ii) os processos biológicos básicos como o desenvolvimento da compatibilidade e do sinergismo entre organismos, e os programas genéticos e celulares envolvidos; (iii) papel da micorriza na adaptabilidade da planta ao estresse e na qualidade do solo, assim favorecendo a sustentabilidade; (iv) papel da simbiose na evolução da vida; (v); interações na micorrizosfera; (vi) tecnologia micorrízica visando promover práticas sustentáveis em sistemas de produção das plantas, bem como em esquemas de conservação e restauração do ecossistema; e (vii) simbiose micorrízica como um modelo para compreender outros tipos de associações planta-micróbio. O impacto advindo destas pesquisas permitirão melhorar o conhecimento básico da ciência na produção sustentável de alimentos e na promoção da qualidade ambiental, e foram os principais objetivos do V Congresso Internacional sobre Micorrizas (ICOM 5, 2006).

A cultura da estévia, que por natureza apresenta grande variabilidade genética, pode ser favorecida se mudas forem obtidas em condições de ambientes protegidos e em substratos favoráveis ao seu desenvolvimento e de fungos micorrízicos arbusculares. Tais condições poderão refletir em plantas resistentes, adequadas às condições de cultivo e com melhor produtividade.

Entretanto esses substratos podem não ser adequados ao cultivo da cultura, seja por aspectos nutricionais ou pela qualidade fitossanitária. É importante salientar que atualmente o aspecto fitossanitário vem sendo intensamente discutido entre empresas e governo, justamente visando melhor controle de qualidade e evitando desta forma a propagação de doenças ou de plantas invasoras. Neste sentido, o emprego de substrato inerte, ou seja, não obtido por meio da compostagem de cascas, isento de contaminantes e que permitisse o desenvolvimento adequado das mudas e fungos micorrízicos, seria muito interessante.

Considerando-se ainda a cadeia produtiva da estévia, e tão importante quanto os aspectos descritos acima, estão os processos pós-colheita, pois procedimentos inadequados poderiam levar a perder todo o esforço feito durante a fase de cultivo. Dentre esses processos,

o conhecimento da umidade de equilíbrio (UE) das folhas da cultura de estévia permitirá melhorar os procedimentos de secagem, embalagem e armazenagem.

Neste contexto, os objetivos deste trabalho foram:

A) relacionados à estévia

- selecionar fungo micorrízico arbuscular para estévia;

- avaliar a influência da inoculação de fungos micorrízicos e sistemas de cultivo na produção de biomassa e concentração de esteviosídeos em estévia;

- determinar a UE em folhas de estévia a 30 e 45^{o}C;

- avaliar a influência de diferentes sistemas secagem no teor de esteviosídeos.

B) relacionados a substratos

- selecionar substrato que permita o estabelecimento e desenvolvimento da colonização radicular por fungos micorrízicos arbusculares.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Estévia

Stevia rebaudiana **(Bert.) Bertoni**, ordem Capanular, pertence à família *Compositae* (*Asteraceae*) sendo conhecida desde épocas remotas pelos índios Guaranis por Kaá-hê-ê, que significa erva-doce. A estévia, como é conhecida no Brasil, é uma espécie herbácea, ereta, de raiz pivotante perene e parte aérea anual, alcançando até aproximadamente 0,90m de altura. É uma espécie de dias curtos, ou seja, em dias com menos de 12 horas de luz, a estévia floresce. As folhas são pequenas, medindo 30 a 50mm de comprimento e 10 a 15mm de largura, simples, sésseis e com disposição oposta em vértices alternados. Possui flores com pétalas brancas reunidas em capítulos terminais ou axilares. Os frutos são do tipo aquênio com cinco vértices quase uniformes, delgados e plumosos, com cerca de 2,5mm de comprimento (MAGALHÃES, 2000).

É uma espécie nativa do continente sul-americano, habitando pastagens arenosas e úmidas nas encostas da serra do Amambaí, nordeste do Paraguai, nos limites da fronteira com o Brasil. É de clima sub-tropical, quente e úmido, devendo-se evitar regiões de clima frio.

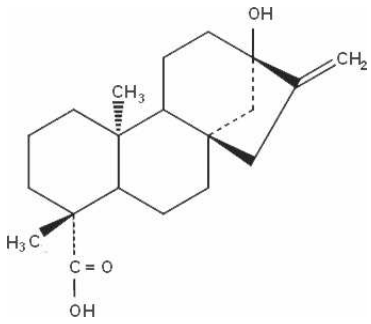
Pouco exigente em tipo de solo, preferindo aqueles levemente ácidos, argilo-arenosos ou argilosos, úmidos e bem drenados (MAGALHÃES, 2000).

O interesse pela estévia está no fato de suas folhas possuírem diversos compostos glicosídeos não calóricos (esteviosídeos e rebaudiosídeos), alguns com poder adoçante cerca de 300 vezes maior que a sacarose. Todos estes compostos estão presentes, principalmente, nas folhas, e o seu conteúdo podendo variar de 4 a 20% da massa seca das folhas, dependendo do cultivar e das condições de cultivo (MAGALHÃES, 2000; GEUNS, 2003).

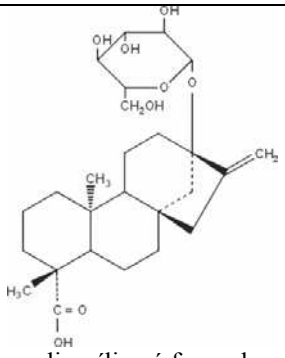
Todos os glicosídeos diterpenos têm em comum o esteviol e diferem no conteúdo de resíduos de carboidratos, mono, di ou trissacarídeos de glicose nas posições C13 e C19 (Figura 1). O principal glicosídeo diterpeno é o esteviosídeo (5-10%), rebaudiosídeo A (2-4%), rebaudiosídeo C (1-2%) e, dulcosídeo A (0,4-0,7%) (KOCHIKYAN, et al. 2006).

O Japão é o maior consumidor mundial do açúcar esteviosídeo importando, o que é produzido pelo Brasil, Paraguai, Estados Unidos, Coréia, Malásia entre outros. Em 09/10/1986 o Governo Federal brasileiro autorizou o consumo desses açúcares na proporção de 5,55mg/ peso corpóreo/dia (VALOIS, 1992).

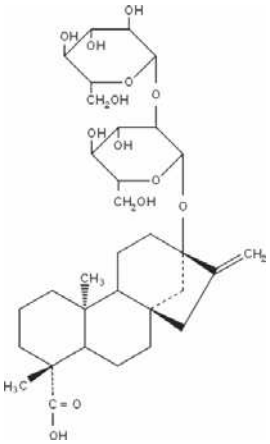
Estudos agronômicos com estévia foram conduzidos por LIMA FILHO e MALAVOLTA (1997) e LIMA FILHO et al. (1997a,b), onde foram avaliados aspectos de absorção e acumulação de macro e micronutrientes, bem como aspectos de desordens nutricionais, possibilitando o cultivo adequado da mesma. Segundo LIMA FILHO et al. (2004) o cultivo da estévia possui potencial de agregação de valor, favorecendo a geração de renda, empregos, serviços entre outros benefícios para a sociedade.



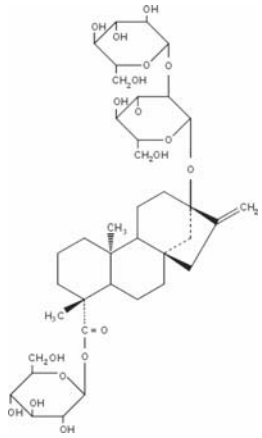
Esteviol



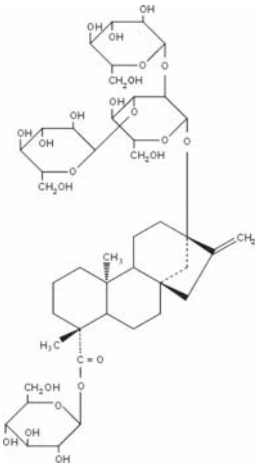
Esteviol monoglicosílico é formado quando glicose é adicionada ao C13-OH



Esteviol diglicosílico é formado quando um segundo açúcar é adicionado ao C13 da glicose



O C19-COOH é glicosilado formando o esteviosídeo



Finalmente um terceiro açúcar é adicionado ao C13 resultando no rebaudiosídeo A

Figura 1. Estruturas moleculares do esteviol, intermediários, esteviosídeo e rebaudiosídeo A

2.2 Micorrizas

O termo micorriza refere-se a uma associação simbiótica entre plantas e fungos que colonizam o tecido cortical das raízes durante o período de crescimento ativo da planta. Esta associação caracteriza-se pelo movimento de carbono produzido pela planta para o fungo e nutrientes minerais, principalmente fósforo, zinco e cobre, além da água, adquiridos pelo fungo para a planta. Estima-se que 95% de todas as espécies de plantas caracterizadas em gênero formam micorriza. A condição micorrízica é uma regra, não uma exceção.

Os principais efeitos desta simbiose podem ser caracterizados pelo maior crescimento e produtividade da planta, aumento na absorção de nutrientes pouco móveis, maior tolerância ao estresse hídrico, maior nodulação, atividade da nitrogenase e teor de nitrogênio por leguminosas, maior resistência à pragas e doenças, possíveis modificações anatômicas, bioquímicas e fisiológicas da planta, e ainda, por meios de suas hifas externas participam da agregação de partículas do solo e estabilização de agregados (SILVEIRA, 2000).

Em solos pobres em nutrientes e deficientes em água, essas hifas incrementam a absorção dos mesmos possibilitando melhor desenvolvimento da cultura. Desse modo, plantas micorrizadas são mais competitivas e suportam melhor as condições ambientais adversas que plantas não micorrizadas. Isto pode ser observado em solos tropicais, mais precisamente, em pastagens no cerrado, onde a inoculação de *Acaulospora scrobiculata* promoveu o desenvolvimento da gramínea (*Panicum maximum*) e da leguminosa (*Centrosema pubescens*) estando elas consorciadas ou não (PORTUGAL, 1988).

Plantas introduzidas em solos com baixas populações de fungos micorrízicos ou contendo espécies ineficientes podem melhorar a probabilidade de sucesso na introdução e no desenvolvimento se inoculadas com fungos micorrízicos eficientes (GERDEMANN, 1975; ABBOTT e ROBSON, 1978; HALL, 1979).

Levantamento sobre a ocorrência de espécies de plantas tropicais brasileiras, naturalmente infectadas com fungos micorrízicos arbusculares (MA) foi descrito por ST. JOHN (1980). Todas as espécies foram coletadas no campo e eram nativas, algumas economicamente importantes. As coletas foram feitas na região da Amazônia Central, próximo a Manaus, outras em Belém (Pará) e também em várias partes da região cacaueira do sul da Bahia; em todas estas regiões a vegetação nativa típica é a floresta úmida de baixio. Entre as espécies descritas está o caju, manga, pau d'arco, oitil, mandioca, mamona, bambu,

braquiária, capim limão, abricó, matamatá, cravo-da-índia, jambo, pimenta-do-reino, guaraná entre outras.

Existem trabalhos conduzidos no Brasil demonstrando a ocorrência de fungos MA em regiões de reservas biológicas. BONOMI e TRUFEM (1983) observaram a presença desses fungos na reserva biológica de Moji-Guaçu, SP, uma região típica de cerrado. Nesse levantamento identificaram 24 espécies de fungos na rizosfera de 62 espécies de plantas, pertencentes a 32 famílias fanerogâmicas. Entre as espécies vegetais pode-se citar *Copaifera langsdorffii* (copaíba), *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão), e outras tantas variedades utilizadas para reflorestamento, paisagismo e fornecimento de madeira. As espécies de fungos mais freqüentes foram *Gigaspora calospora*, *Gigaspora heterogama* e *Gigaspora nigra*.

TRUFEM (1995) também fez um trabalho no Parque Estadual da Ilha do Cardoso no Estado de São Paulo coletando amostras da rizosfera de 535 plantas. As espécies fúngicas mais abundantes foram *Glomus intraradices*, *Glomus macrocarpum*, *Scutellospora gilmorei*, *Acaulospora elegans* e *Acaulospora mellea.* As espécies vegetais que apresentaram maior diversidade de espécies fúngicas foram *Diodia radula, Cordia radula, Cordia verbenácea* e *Symphyopappus cuneatus*.

Em 1979, FERRAZ avaliou a ocorrência de fungos micorrízicos em algumas culturas da Amazônia, como o guaraná (*Paullinia cupana* H.B.K. var. sorbolis, pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.), malva (*Urena lobata* L.) e juta (*Corchorus capsulares* L.). Observou-se a predominância de espécies fúngicas do gênero *Acaulospora* e a ocorrência de infecção radicular em todas as espécies descritas com ênfase para guaraná (89%) e malva (57%).

Correlações positivas entre a concentração foliar de Ca, Mg, P e Cu para o cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) de Ca, Fe, Zn e Cu para o guaraná (*Paullinia cupana*) e a presença de colonização micorrízica, foram constatadas por OLIVEIRA e OLIVEIRA (2004) em um sistema agroflorestal em Manaus/AM.

Nos Estados de Azad Jammu e Kashmir na Índia, conhecidos pela riqueza em plantas medicinais e aromáticas, foram avaliadas 76 espécies de plantas quanto à presença de colonização micorrízica. Verificou-se que a infestação radicular do fungo foi universal, ocorrendo em todas as plantas e nos diferentes habitats, e a extensão da colonização variou com o tipo de solo e as espécies vegetais (GORSI, 2002).

Entre as ornamentais foram observadas variações de morfologia da infecção bem como diferenças nos níveis de infecção entre os 30 cultivares amostrados de *Narcissus* L. T*ulipa* L. e *Crocus* L. como observado por CHILVERS e DAFT (1981).

Poucos são os estudos sobre a interação entre fungos MA e plantas medicinais, mas efeito positivo da presença do fungo pode ser observado em todos os trabalhos revistos, como o descrito por CAMPRUBI et al. (1991), que constataram aumento na produção de matéria seca da parte aérea e raiz pela inoculação de *Glomus mosseae* em *Salvia officinalis*, *Artemisia dracunculus*, *Thymus vulgaris* e *Ocimum basilicum*, na comparação com o tratamento não inoculado. Resultados semelhantes foram observados por SAILO e BAGYARAJ (2005) quando estudaram a influência de 11 diferentes espécies de fungos micorrízicos em *Coleus forskohlii*, com destaque para *Glomus bagyarajii* seguido por *Scutellospora calospora* como os melhores em termos de produção de biomassa, absorção de fósforo e conteúdo do alcalóide forskolin.

Castanospermina, alcalóide do tipo indolizidino, sintetizado pela *Castanospermum australe* e efetivo contra o vírus da AIDS, teve seu conteúdo aumentado nas folhas, bem como o conteúdo de P e o desenvolvimento da plantas, quando inoculadas com *Glomus intraradices* e *Gigaspora margarita*, como constatado por ABU-ZEYAD et al. (1999).

A concentração e a qualidade de óleo essencial também podem ser influenciadas pela presença de fungos MA. KAPOOR et al. (2002b), estudando *Coriandrum sativum***,** observaram que a concentração de óleo foi 28% superior ao controle com a inoculação de *Glomus macrocarpum* e de 43% com a presença de *Glomus fasciculatum*. Observaram também alterações qualitativas no óleo, com aumento nas concentrações de geraniol e linalol nas plantas colonizadas com *G. macrocarpum* e *G. fasciculatum*, respectivamente.

Os mesmos autores (KAPOOR et al., 2002a), estudando os mesmos fungos citados acima, obtiveram resultados semelhantes para *Anethum graveolens* e *Trachysoermum ammi* onde a micorrização permitiu incremento na concentração de óleo essencial de 90% para *A. graveolens* e de 72% para *T. ammi*, sendo que o fungo micorrízico *G. macrocarpum* foi mais efetivo que *G. fasciculatum*. Também os níveis de alguns constituintes foram positivamente alterados dependendo do fungo presente. A inoculação de *Schizonepeta tenuifolia* com fungos MA promoveu significativamente o desenvolvimento da planta, acúmulo de P e S e aumento na síntese de óleo volátil nas mudas (WEI e WANG, 1991).

Estudos sobre a influência de fungos MA na produção e qualidade de óleos essenciais de menta (*Mentha arvensis*) tanto em campo (GUPTA et al., 2002) como em casa de vegetação (FREITAS et al., 2004), demonstraram o efeito significativo da presença do fungo nos teores do óleo e de mentol.

Experimentos desenvolvidos no Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas da Universidade Estadual de Campinas (CPQBA-UNICAMP) buscando a seleção de fungos MA para artemísia (*Artemisia annua*) encontraram no fungo *Glomus macrocarpum* uma interação positiva com aumento de 39% no teor de artemisinina em relação ao controle, apesar de não ter havido diferença significativa na produção de biomassa da parte aérea (QUITÉRIO e PORTUGAL, 2005).

Fungos MA também estão sendo empregados para a aclimatação de plantas micropropagadas. COSTA e LOVATO (2000), estudando a aclimatização de porta enxerto micropropagado de videira em substratos inoculados ou não com fungos MA, concluíram que a colonização fúngica propiciou incrementos em altura e biomassa total das plantas. A utilização de fungos MA também determinou melhor desenvolvimento da goiabeira (*Psidium guajava* L.) micropropagada durante a aclimatização e estabelecimento da planta *ex vitro* (ESTRADA-LUNA et al., 2000).

O emprego de substratos adequados para a produção de mudas pode ainda propiciar a utilização de microrganismos simbiontes que permitiriam às plantas melhor desenvolvimento, maior resistência a pragas e uma agricultura mais limpa e de menor custo (DAL SOGLIO, 2000).

Desenvolvimento vegetativo e conteúdo de reserva nos tecidos de Fly Dragon (*Poncirus trifoliata* Raf.) foram avaliados por CARNIEL et al. (1999) em substratos inoculados ou não com fungos MA. Os autores concluíram que a escolha adequada do substrato e da espécie de fungo micorrízico, isoladamente ou em conjunto, influe decisivamente no desenvolvimento da cultura. Resultados semelhantes foram obtidos por SOUZA et al. (1999) com Citrange Troyer (*Poncirus trifoliata* Raf. X *Citrus sinensis* L. Osb.).

Quando se avalia tamanho de partículas no substrato tem-se como preocupação, além do bom desenvolvimento da plantas, também o dos fungos MA. De acordo com GAUR e ADHOLEYA (2000), partículas com diâmetro de 0,50 a 0,78mm foram as que

proporcionaram maior produção de sistema radicular, produção de esporos e percentagem de colonização micorrízica.

Uma das maiores dificuldades na utilização de fungos MA está na produção de inóculo e conseqüente inoculação das mudas. De acordo com HALL e KELSON (1981), duas pessoas podem produzir 10.000 “pelets” por dia de solo infestado com micorrizas para serem utilizados em larga escala. Atualmente, a produção comercial de inóculo micorrízico tem sido feita em vasos com os mais diversos substratos e plantas e, mais recentemente, em sistemas de cultivo em aeroponia (GIANINAZZI e VOSÁTKA, 2004).

2.3 Substrato

Substrato é a matéria-prima ou mistura de matérias primas que, usadas para enraizamento e cultivo de plantas, irão exercer a função do solo. Estas funções basicamente são: sustentação da planta, fornecimento de nutrientes, água e oxigênio. Estas matérias primas podem ser de origem animal, vegetal, mineral ou sintética, sendo que na prática apenas os três últimos devem ser considerados (GONÇALVES, 1995). O interesse e a importância que vem adquirindo no Brasil, da mesma forma que no exterior, a questão do substrato para plantas, deve-se à constatação de que é economicamente viável a produção de mudas vegetais com qualidade nestes materiais.

Durante o 1º Encontro Nacional sobre Substrato para Plantas (ENSUB, 2001), fez se uma análise geral do setor de substratos para plantas, constatando-se que, apesar de número crescente de empresas produtoras, seu consumo em alta, pesquisas com substratos alternativos e o andamento quanto à normatização do produto, o setor passa por dificuldades marcantes como definições de metodologias específicas de análises químicas e físicas, o consumidor/produtor está carente de informações técnicas devido a deficiências na assistência técnica bem como na extensão rural.

Os maiores problemas com relação aos substratos estão na definição de metodologias analíticas rápidas, precisas e específicas para o produto em questão, que sirvam como subsídio na definição de qualidade e, por conseguinte, na elaboração de normas que regulamentem a atividade e que coíba o uso de práticas impróprias e desleais de comércio, onde os maiores prejudicados serão os produtores (KÄMPF, 2001; BATAGLIA e ABREU, 2001; GONCZAROWSKA, 2001).

A partir de dezembro de 2004 com a publicação da Instrução Normativa n^{o} 14, pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, parte dos problemas e dificuldades citadas acima foram contempladas, como especificações, garantias, tolerâncias, embalagem e rotulagem. Entretanto há necessidade de se estabelecer metodologias analíticas para a determinação das garantias, os procedimentos para a fiscalização, quais matérias primas são proibidas ou permitidas e os teores limítrofes de elementos tóxicos ou patogênicos (ABREU, 2006).

Apesar de todas as dificuldades a obtenção de mudas, na maioria das vezes em ambientes fechados, que estava restrita a espécies florestais e hortícolas, esta cada vez mais sendo empregada para propagação de mudas de grandes lavouras como fumo, citros e café. Em 2000 mais de 4 milhões de mudas cítricas foram produzidas em potes e avalia-se algo em torno de 500 mil m^3 ano^{-1} a demanda nacional em substrato (KÄMPF, 2001), que na sua grande maioria advém da compostagem da casca de pinus misturada com vermiculita, perlita e turfa.

Na Europa, o principal material empregado como substrato é a turfa de *Spahgnum.* Pesquisas foram conduzidas com vista a utilização de materiais reciclados à turfa de *Spahgnum*, resultando em um modelo de controle de qualidade alemão conhecido como RAL, que publicou uma série de informações e tabelas para os principais constituintes de um substrato, tais como fósforo, potássio, umidade, tamanho de partículas, matéria orgânica, aspectos fitossanitários, entre outros (SCHMILEWSKI, 2001).

Outros experimentos avaliando as propriedades físico-químicas de materiais alternativos para composição de substratos foram conduzidos por FERMINO et al. (1999a, b) com aguapé e resíduos agrícolas industriais, com o principal objetivo de buscar maior regionalização do substrato, diminuir custos e constante disponibilidade.

Alternativamente ao uso do substrato de casca, obtido por compostagem, vem se iniciando no país o emprego da fibra de coco como suporte para produção de mudas. Dentre as características deste substrato pode-se citar, de acordo com fabricante, sua elevada porosidade, capacidade de retenção de água, não é um produto de compostagem, é isento de plantas invasoras, pragas e doenças, sendo um produto homogêneo e estável (AMAFIBRA, 2005).

O uso do substrato de fibra de coco verde no cultivo de tomate em casa de vegetação, superou em 7,3%, na produção de frutos comerciais (média de 3 anos), o segundo melhor substrato, que foi o pó de serra (CARRIJO et al., 2002).

Em experimento conduzido por MORGADO et al. (2000), com emprego de resíduos agroindustriais prensados (bagaço de cana-de-açúcar, casca de coco e torta de filtro de cana) como substrato para produção de mudas de cana, observou-se possibilidades de uso em mistura destes substratos para o preparo de blocos prensados.

A bioespuma foi desenvolvida a partir de produtos naturais e renováveis, basicamente derivados de óleos vegetais, soja e mamona e amido de milho. Esse novo material, com forte apelo ecológico e alta competitividade mercadológica, poderá ser usado para embalagens descartáveis de alimentos, substituir o poliestireno expandido para calços de embalagens e, na agricultura, como substrato para germinação de sementes e crescimento de mudas, substituindo outros materiais derivados de petróleo, como a espuma fenólica (LIBOS, 2000). De acordo com a matéria publicada, enquanto alguns desses materiais levam até centenas de anos para se degradarem na natureza, os testes realizados no CPQBA - UNICAMP, demonstraram que a bioespuma se degrada em dois anos, em condições aeróbicas e em torno de três anos em condições de anaerobiose.

A síntese da bioespuma envolve três reações: duas esterificações, a primeira entre o óleo de mamona e o amido, e a segunda com o óleo de soja. O produto obtido, um poliol, deve reagir ainda com um isocianato (NCO) para que se chegue a uma espuma poliuretana biodegradável. Trata-se de um polímero caracterizado principalmente pela ligação química uretana (RNHCOOR), que lhe dá rigidez e flexibilidade (ESTEVES, 1999).

2.4 Sistemas de cultivo

Após a produção das mudas, de preferência, em ambientes e substratos e adequados, estas deverão ser transplantadas para o local de cultivo. No caso da estévia, este cultivo se dá no campo em áreas previamente preparadas para o pleno desenvolvimento da cultura, refletindo ao final em alta produtividade de biomassa e esteviosídeos.

De acordo com o BOLETIM 200 (1987) o cultivo da estévia permite a produção de 1.500 a 3.000kg ha^{-1} em 3 a 4 cortes anuais, e a cultura permanece produtiva por 4 a 6 anos. Enquanto isso, no Canadá, a produtividade da cultura alcança 6.000kg ha^{-1} ao ano, de acordo

com COLUMBUS (2006). Essas diferenças podem ser devidas a vários fatores, tais como a variedade empregada, solo, tratos culturais, bem como o sistema de produção de mudas.

O cultivo da estévia em sistemas de hidroponia ou aeroponia pode ser uma alternativa ao cultivo em campo. Pode-se destacar como vantagens do cultivo em hidroponia (NUNES, 2006):

- o cultivo não sofre os efeitos do solo, diminuindo assim os riscos da ocorrência de doenças comuns nos solos tropicais;

- permite maior número de colheitas por ano na mesma área de cultivo;

- o produto colhido tende a ser livre de contaminações causadas pela água de irrigação porque exige o uso de água limpa e de boa qualidade;

- o produto colhido tende a ser livre de resíduos de agrotóxicos;

- exige atenção diária do produtor no manejo da solução nutritiva e das plantas, o que permite detectar a ocorrência de pragas e doenças logo no início, ou seja, a tempo de resolver com a aplicação de produtos naturais e biológicos;

- os tratos culturais são mais fáceis de serem executados e envolvem menor custo de mão-de-obra porque poucas horas por dia são suficientes para manutenção de um grande número de plantas;

- pode-se trabalhar nas horas mais frescas do dia, tornando o trabalho mais agradável que o trabalho no campo.

Alguns estudos com plantas medicinais em sistemas hidropônicos estão descritos na literatura, como o ensaio conduzido por MURCH et al. (2002), analisando quantitativamente hiperforina, hipericina e pseudohipericina nos tecidos florais da erva de São João (*Hypericum perfofatum*), que obtiveram nas plantas em hidroponia quantidades similares ou superiores às plantas cultivadas em campo.

LÉONHART et al. (2002) estudando 10 espécies plantas medicinais em sistema hidropônico observaram que algumas espécies como, *Tanacetum parthenium*, *Achillea millefolium*, *Taraxacum officinale* e *Calendula officinalis* adaptaram-se muito bem a este sistema de cultivo com produção vegetal de alta qualidade por metro quadrado em período de tempo menor.

Resultados de um estudo comparativo entre cultivo hidropônico e de campo, para determinação da concentração de metabólitos secundários de *Taraxacum officinale* (ácidos

caftárico, chicórico e clorogênico), *Achillea millefolium* (luteolina, apigenina e glicosídeos de apigenina), *Tanacetum parthenium* (partenolidina) e *Inula helenium* (iso alantolactonas), demonstraram que os compostos fenólicos de *T. officinale* foram 6,2 vezes maiores no campo, o mesmo acontecendo para as lactonas sesquiterpênicas de *I. helenium* e para partenolidina de *T. parthenium*. Por outro lado, alta concentração de flavonoides foi observada em cultivo hidropônico de *A. millefolium* (PEDNEAULT et al., 2002).

Apesar do cultivo em aeroponia ainda se encontrar na fase de estudos para produção em escala equivalente ao sistema hidropônico, é possível listar algumas vantagens deste sistema em relação ao cultivo em campo (PAGLIARULO e HAYDEN, 2006):

- obtenção de raízes limpas de organismos e materiais do solo, e de outras raízes de plantas contaminantes;

- ciclo de cultivo acelerado devido ao incremento na taxa de crescimento e maturação;

- consistência dos fitoquímicos produzidos devido à uniformidade de nutrientes e disponibilidade de água, com baixo risco de doenças;

- potencial plantio em alta densidade, por meio da eliminação da competição por água e nutrientes e pelo uso da bancada tipo escada;

- minimização do uso de água e nutrientes por meio da reciclagem;

- controle mais eficiente do ambiente radicular, por meio da manipulação da solução nutritiva e temperatura;

- possibilidade de múltiplas colheitas.

Uma das maiores limitações para a utilização de fungos MA em escala comercial está na produção de inóculo. O uso do sistema aeropônico com plantas adequadas ao desenvolvimento do fungo, esta se tornando uma alternativa para a produção de inóculo. Nesta linha, vários experimentos foram conduzidos e resultados promissores, apesar de ainda serem necessários alguns ajustes na técnica, foram obtidos por HUNG e SYLVIA (1988), avaliando a produção de *Glomus deserticola*, *G. etunicatum* e *G. intraradices* em *Paspalum notatum* e *Ipomoea batatas*, por SOUZA et al. (1996) com *Gigaspora margarita*, *Glomus etunicatum* e *Entrophospora colombiana* em batata-doce e por PAIVA et al. (2003) avaliando *Glomus clarum* e *G. etunicatum* também em batata-doce.

No sentido de se ajustar o sistema para a produção de inóculo, MOHAMMAD et al. (2000) compararam o sistema tradicional de emprego de discos atomizadores com a tecnologia ultra-sônica de nebulização e constataram que esta última permitiu a produção de inóculo de alta qualidade, seja na quantidade de propágulos infectivos como na manutenção da viabilidade do inóculo.

Estudos com plantas medicinais foram conduzidos por HAYDEN et al. (2004) comparando o sistema de cultivo em aeroponia e vasos em casa de vegetação, utilizando *Arctium lappa* L. Os resultados demonstraram produção de biomassa da parte aérea significativamente superior no cultivo aeropônico em relação ao cultivo em vasos, enquanto diferenças não significativas foram observadas para biomassa do sistema radicular e concentração de ácido clorogênico. Observação interessante dos autores foi com relação à variabilidade entre as plantas, que no sistema de cultivo em aeroponia foi significativamente menor, sugerindo que produções consistentes e uniformes de fitofármacos poderiam ser obtidas com o emprego desta técnica de cultivo.

Resultados promissores com *Echinacea purpurea* e *Arctium lappa* foram obtidos por PAGLIARULO e HAYDEN (2006), na produção do sistema radicular de *E. purpurea* e significativa produção foliar e de raízes de *A. lappa*.

O sistema de cultivo em aeroponia também foi testado para se avaliar a co-inoculação de dois microrganismos, uma bactéria fixadora de nitrogênio, *Bradyrhizobium* sp e um fungo micorrízico, *Glomus intraradices*, em *Acacia mangium*. Os resultados obtidos demonstraram que no sistema aeropônico a dupla inoculação estimulou o desenvolvimento da cultura (WEBER et al., 2005).

MARTIN-LAURENT et al. (1997), estudando *Acacia mangium* inoculada com *Bradyrhizobium* spp, observaram efeito altamente significativo no desenvolvimento da cultura em sistema aeropônico de cultivo quando comparado ao sistema hidropônico e areia. Em trabalho posterior, MARTIN-LAURENT et al. (2000) constataram que os efeitos positivos do sistema aeropônico no crescimento e desenvolvimento foliar da planta se mantiveram por 4 meses após as plantas serem transplantadas para o campo.

2.5 Sistemas de secagem

Em continuidade ao processo de cultivo é necessário avaliar aspectos pós-colheita. No caso da estévia, procedimentos inadequados de secagem podem levar à perda da qualidade do produto, com queda significativa nos teores de esteviosídeos nas folhas.

PUERTA (2001) relata que após a colheita as folhas devem ser transportadas para a sombra de um galpão, esparramadas para desidratação e conservação da coloração esverdeada, e serem revolvidas pelo menos duas vezes ao dia. Nestas condições secarão rapidamente e poderão ser ensacadas. De acordo com VALOIS (1992), após a colheita as plantas são colocadas para secar ao sol (6 horas) sobre lonas. Em seguida as folhas são separadas das ramas postas à sombra até secagem total, tendo-se o cuidado de manter a coloração esverdeada.

No Canadá, de acordo com COLUMBUS (2006), a secagem é feita imediatamente após a colheita em carretas de secagem a campo ou estufas. Geralmente esta se completa em 24 a 48 horas com a temperatura entre 40 e 50^{o}C.

Entretanto pouco se sabe sobre os efeitos dos processos de secagem nos teores de esteviosídeos. De acordo com BRANDLE et al. (2006), em condições artificiais de secagem, diversos fatores podem afetar o processo, entre eles a temperatura, carga e condições ambientais do ar. Dependendo das condições de secagem estas podem afetar não apenas os níveis de glicosídeos bem como o processamento adequado das folhas.

É importante salientar que processos de secagem, onde não se conhecem ou não se tem controle da temperatura, velocidade e umidade relativa do ar de secagem, não permitem melhor controle da matéria-prima, tornando-se difícil predizer o tempo de secagem.

2.6 Atividade de água

Um dos principais componentes dos alimentos é a água, responsável pelas diversas propriedades destes. É possível se estabelecer uma relação direta entre o teor de água livre no alimento e sua conservação. Segundo MOHSENIN (1986), o teor de água livre é expresso pela atividade de água (a_w) que é dada pela relação entre a pressão de vapor de água em equilíbrio sobre o alimento e a pressão de vapor de água pura, à mesma temperatura.

A afinidade existente entre a água e os componentes de um produto define sua higroscopicidade, tornando-se uma característica fundamental para o controle de processos de manuseio, estocagem e consumo de materiais biológicos (TEIXEIRA NETO e QUAST,

1977). Ao expormos um material biológico ao ar com determinada umidade relativa, este tende a equilibrar o seu conteúdo de água com a umidade relativa do ambiente. Isto ocorre quando a pressão de vapor da água na superfície do material se iguala à pressão de vapor da água do ar que o envolve (TREYBALL, 1968). Segundo GUSTAFSON e HALL (1974), o nível de umidade que o produto alcança, quando deixado por um longo tempo em contato com determinada condição atmosférica, é definido como umidade de equilíbrio.

O estudo da atividade de água pode ser feito por meio de isotermas de sorção, que podem ser obtidas em duas direções, isoterma de adsorção ou de dessorção. A isoterma de adsorção ocorre quando o material previamente seco é mantido em ambientes com diversos incrementos de umidade relativa e são medidos os ganhos de massa do material devido à água; a isoterma de dessorção é obtida quando o material, inicialmente úmido, é colocado sob as mesmas condições ambientais criadas pela adsorção, sendo medidas as perdas de massa do material, devido a saída de água (SILVA, 2005).

Com o intuito de prever o comportamento das isotermas, diversos autores propuseram modelos de ajustes, que em sua maioria, são modelos empíricos e úteis no conhecimento das características dos produtos. Os modelos descritos abaixo e foram extraídos de SILVA (2005):

Modelo de LANGMUIR **(eq. 1)**

$$\frac{Xeq}{Xm} = \frac{C.a_w}{1 + C.a_w}$$

em que:

Xeq – teor de umidade de equilíbrio, kg kg^{-1};

Xm – conteúdo de umidade na monocamada molecular, kg kg^{-1};

a_w – atividade de água, adimensional;

C – constante.

Modelo de BET (Brunauer, Emmet e Teller) **(eq. 2)**

$$Xeq = \frac{(Xm.C.a_w).\left(1 - (n+1).a_w{}^{n} + n.a_w{}^{n+1}\right)}{(1 - a_w).\left(1 - (C-1).a_w - C.a_w{}^{n+1}\right)}$$

em que:

Xeq - teor de umidade de equilíbrio, kg kg^{-1};

Xm – conteúdo de umidade na monocamada molecular, kg kg^{-1};

a_w – atividade de água, adimensional;

C e n – constantes.

Modelo de BET linearizado **(eq. 3)**

$$\frac{a_w}{(1-a_w).Xeq} = \frac{1}{Xm.C} + \frac{a_w.(C-1)}{Xm.C}$$

em que:

Xeq - teor de umidade de equilíbrio, kg kg^{-1};

Xm – conteúdo de umidade na monocamada molecular, kg kg^{-1};

a_w – atividade de água, adimensional;

C – constante.

Modelo de GAB (Gugghenheim, Anderson e de Boer) **(eq. 4)**

$$Xeq = \frac{Xm.C.K.a_w}{(1-K.a_w).(1-K.a_w+C.K.a_w)}$$

em que:

Xeq - teor de umidade de equilíbrio, kg kg^{-1};

Xm – conteúdo de umidade na monocamada molecular, kg kg^{-1};

a_w – atividade de água, adimensional;

C e K – constantes de adsorção.

$$C = C_0 \exp\left(\frac{\Delta H_c}{RT}\right) \quad \textbf{(eq. 5)}$$

$$K = K_0 \exp\left(\frac{\Delta H_k}{RT}\right) \quad \textbf{(eq. 6)}$$

$$\Delta H_c = H_m - H_n \quad \textbf{(eq. 7)}$$

$$\Delta H_k = H_1 - H_n \quad \textbf{(eq. 8)}$$

Modelo de HALSEY **(eq. 9)**

$$a_w = \exp\left(\frac{-A}{Xeq^B}\right)$$

em que:

Xeq - teor de umidade de equilíbrio, kg kg^{-1};

a_w – atividade de água, adimensional;

A e *B* – constantes.

Modelo de OSWIN **(eq. 10)**

$$Xeq = A.\left(\frac{a_w}{1-a_w}\right)^B$$

em que:

Xeq - teor de umidade de equilíbrio, kg kg^{-1};

a_w – atividade de água, adimensional;

A e *B* – constantes.

Modelo de PELEG **(eq. 11)**

$$Xeq = k1.a_w{}^{n1} + k2.a_w{}^{n2}$$

em que:

Xeq - teor de umidade de equilíbrio, kg kg^{-1};

a_w – atividade de água, adimensional;

*k*1, *k*2, n1 e n2 – constantes.

A restrição para esta equação é que n1 < 1 e n2 > 1.

Modelo de HENDERSON **(eq. 12)**

$$Xeq = \frac{Ln(1-a_w)}{-K.(T+C)^{1/n}}$$

em que:

Xeq - teor de umidade de equilíbrio, kg kg^{-1};

a_w – atividade de água, adimensional;

T – temperatura, ^{o}C;

C, *K*, e *n* – constantes.

Modelo de CHUNG & PFOST **(eq. 13)**

$$Xeq = E - D.Ln((C - T).Ln(a_w))$$

em que:

Xeq - teor de umidade de equilíbrio, kg kg^{-1};

a_w – atividade de água, adimensional;

T – temperatura, ^oC;

C, D, e E – constantes.

De acordo com SOYSAL e OZTEKIN (1999), os produtos agrícolas possuem diferentes UE nas mesmas condições de temperatura e umidade relativa, devido a diferenças químicas e físicas entre eles. Esses autores estudaram várias equações para UE de 13 diferentes plantas medicinais e aromáticas. Os modelos aceitáveis devem apresentar erros relativos médios inferiores a 10%, de acordo com AGUERRE et al. (1989).

Resultados da literatura, para plantas medicinais, demonstraram que o modelo de OSWIN foi aquele que apresentou menor erro relativo médio para a espinheira santa (*Maytenus ilicifolia*), conforme FIGUEIRA et al. (2004), com valores de 5,05, 2,33 e 6,41% respectivamente para as temperaturas de 30, 40 e 50^{o}C. SOYSAL e ÖZTEKIN (1999) obtiveram com este modelo os melhores ajustes para as temperaturas de 5, 25 e 45^{o}C em seu estudo de UE para plantas medicinais e aromáticas.

Uma mesma cultura pode ter modelos diferentes, conforme resultados obtidos por CORDEIRO e OLIVEIRA (2004) também estudando folhas de espinheira santa, em 4 temperaturas (30, 40, 50 e 60^{o}C), encontram no modelo de CHUNG e PFOST o melhor ajuste para a isoterma de adsorção e o modelo de HENDERSON THOMPSON para a isoterma de dessorção.

Ajustes abaixo de 10% para o modelo de PELEG foram observados em trabalhos, como o de SILVA et al. (2004b) para a calêndula (*Calendula officinales*) nas temperaturas de 30, 45 e 60^{o}C com valores de 9,40, 5,71 e 3,36%, respectivamente. FIGUEIRA et al. (2004) encontraram neste modelo os valores de 9,45 e 5,71% para as temperaturas de 30 e 45^{o}C para *Artemisia annua*. Em menta (*Mentha crispa*) os valores de 9,45% para a temperatura de 30^{o}C e de 5,71% à 45^{o}C, conforme demonstrado no trabalho de PARK et al. (2002).

Algumas vezes o modelo se ajusta bem a uma determinada faixa de umidade relativa, como observado por BELGHITA et al. (2000), estudando verbena, onde o modelo BET mostrou um bom ajuste, mas em umidade relativa entre 0 e 50%.

Portanto, a determinação da UE das folhas de estévia torna-se um fator importante, pois permite melhor controle de secagem e armazenagem, assim como possibilita melhor definição da embalagem a ser utilizada.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

3.1.1 Espécies vegetais

Stevia rebaudiana (Bert.) Bertoni – Genótipo T9 fornecido pela EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia e mantido pelo CPQBA-UNICAMP para pesquisas em melhoramento.

Stevia rebaudiana (Bert.) Bertoni – Sementes fornecidas pela empresa Steviafarma Industrial S.A. – Maringá – PR.

Brachiaria humidicola (Rendle) Schweickt. Sementes fornecidas pelo Instituto Agronômico de Campinas.

3.1.2 Fungos micorrízicos arbusculares

Tabela 1. Relação dos fungos micorrízicos arbusculares empregados nos ensaios, código e origem.

Códigos	Nomes	Origem
IAC13	*Acaulospora* sp.	Instituto Agronômico de Campinas
IAC23	*Entrophospora* sp	Instituto Agronômico de Campinas
IAC42	*Glomus etunicatum*	Instituto Agronômico de Campinas
IAC43	*Glomus intraradices*	Instituto Agronômico de Campinas
IAC50	*Glomus macrocarpum*	Instituto Agronômico de Campinas
CP13	Provável *Acaulospora* sp	Isolado de plantas de estévia mantidas no campo experimental do CPQBA
CPVG	Provável *Glomus* sp	Isolado de plantas de estévia mantidas no campo experimental do CPQBA

3.1.3 Substratos

Tabela 2. Relação dos substratos testados no ensaio, código, tipo e origem.

Códigos	Substratos	Empresas
EA	Espuma biodegradável para uso agrícola	Corn Products Brasil–São Paulo-SP
EE	Espuma biodegradável para embalagem	Corn Products Brasil–São Paulo-SP
ERCA	Rendmax citrus adubado (casca de Pinus compostada, vermiculita e perlita expandida, turfa, corretivo e fertilizante químico)	Eucatex Química e Mineral Ltda – Paulínia - SP
ERCSA	Rendmax citrus não adubado (casca de Pinus compostada, vermiculita e perlita expandida, turfa e corretivo)	Eucatex Química e Mineral Ltda – Paulínia - SP
TPMA	Multisoil 3010 adubado (casca de Pinus compostada, vermiculita expandida, turfa, corretivo e fertilizante químico)	Terra do Paraíso – Holambra - SP
TPMSA	Multisoil 3010 não adubado (casca de Pinus compostada, vermiculita expandida, turfa e corretivo)	Terra do Paraíso – Holambra - SP
AGM80	Golden-Mix 80 (fibra de coco)	Amafriba – Fibras e Substratos Agrícolas da Amazônia – Holambra - SP
AGMPM	Golden-Mix PM (fibra de coco)	Amafibra – Fibras e Substratos Agrícolas da Amazônia - Holambra - SP
AGM11	Golden-Mix 11 (fibra de coco)	Amafibra – Fibras e Substratos Agrícolas da Amazônia - Holambra - SP
CTRL *	Solo + areia (1,6 : 10 v/v) - esterilizado	

* Solo coletado no campo experimental do CPQBA-UNICAMP, peneirado e secado. Areia de rio peneirada (0,50 a 0,80mm), lavada e secada. A mistura foi esterilizada em autoclave (121^{o}C) por 2 horas.

3.1.4 Solo

O solo utilizado nos experimentos em casa de vegetação foi coletado no campo experimental do CPQBA, sendo que o ensaio de campo foi conduzido em área próxima ao local da coleta. Para a classificação do solo foram utilizados as informações de OLIVEIRA et al., 1977 (localização) e EMBRAPA (1999), sendo classificado como Latossolo vermelho eutroférrico típico.

3.1.5 Moinho

Para o processo de moagem das folhas secas de estévia foi utilizado um moinho de faca marca MR-Manesco & Ranieri, modelo MMR320 e malha com orifícios de 1,45mm.

3.2 Métodos

3.2.1 Métodos analíticos e estatísticos

3.2.1.1 Extração e análise de esteviosídeos por HPLC

Para determinação do teor de esteviosídeos na parte aérea das plantas de estévia foi empregado o procedimento descrito por KOLB et al. (2001) com algumas adaptações, principalmente com relação à limpeza da amostra.

Segue o procedimento:

1. Extração:

Pesar analiticamente cerca de 0,3g de folhas secas e moídas;

↓

Extrair com 10mL de acetonitrila:água (1:1), durante 1 minuto em um dispersor do tipo ultra-turrax;

↓

Centrifugar a 1.861 x *g* durante 6 minutos;

↓

Reservar o sobrenadante em balão volumétrico de 50mL;

↓

Repetir a extração com mais 10mL da mistura 1:1;

↓

Centrifugar novamente;

↓

Agrupar os sobranadantes, avolumando para 50mL com a mistura 1:1.

2. Limpeza:

Eluir alíquota de 3mL da amostra em sistema de filtração Sep-Pak NH_2 (500mg, Waters), filtrar novamente em uma unidade filtrante descartável (Millex HV 13mm de diâmetro) e injetar.

3. Condições cromatográficas

Sistema cromatográfico: LC-DAD Shimadzu constituído por bomba LC-10AT vp; detetor de arranjo de diiodos SPD-M10A vp; interface SCL-10A; forno para coluna CTO-10A vp e software para processamento dos dados Class-vp versão 6.13, nas seguintes condições:

Coluna: Carbohydrate analysis 300 x 3,9mm 5µm (Waters) com pré-coluna;

Temperatura do forno: 30^{o}C;

Eluente: água pH 4,0 com ácido acético e acetonitrila (22:78);

Vazão: 0,5mL min $^{-1}$;

Detetor: 190 a 370nm e $\lambda_{leitura}$: 210nm;

Solvente: água:acetonitrila (1:1);

Curva analítica: 100 a 800µg mL^{-1} com padrão de esteviosídeo;

Tempo de retenção: 13 minutos;

Resultados: expressos em % m m^{-1}.

4. Padrão de esteviosídeo

Padrão secundário fornecido pela empresa Steviafarma Industrial S.A., como sendo 100% esteviosídeo. A Figura 2, mostra o padrão na concentração de 560µg mL^{-1} e uma amostra de material vegetal dos ensaios.

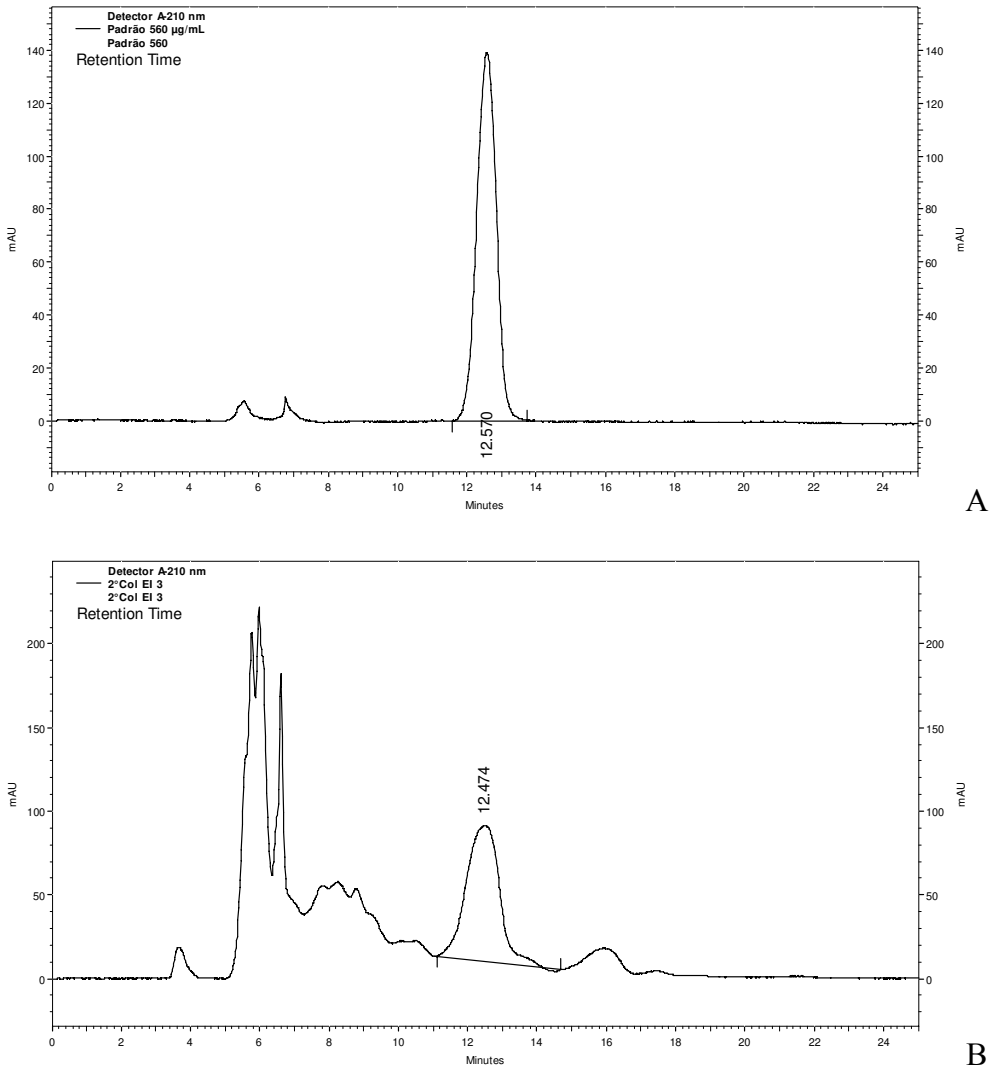


Figura 2. Cromatograma por HPLC do padrão de esteviosídeo na concentração de 560µg mL^{-1} (A), e amostra da 2ª colheita de planta mantida em vaso com solo esterilizado e inoculada com fungo MA (B).

Para autenticação e confirmação de pureza do padrão, foram feitas análises epectrométricas por ressonância magnética nuclear (RMN).

Os espectros de RMN de ^{1}H foram obtidos em DMSO/D_2O em espectrômetro Gemini 300P – Varian Instruments (300,07MHz) fazendo uma pré-saturação do sinal residual de água para melhor visualização dos sinais (Figura 3). Os espectros de RMN de ^{13}C foram registrados em espectrômetros Gemini 300P – Varian Instruments (75,45MHz) em DMSO/D_2O (Figura 4). Os deslocamentos químicos foram registrados em δ_C, tomando-se como padrões de referência interna o (DMSO, δ 40,0).

Os espectros de DEPT (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer) com ângulos de 135° e 90° foram utilizados para determinar o tipo dos carbonos metil, metileno e metino nos espectros de ^{13}C (Figura 5), de acordo com a convenção: C (carbono quaternário, determinado pela comparação entre o espectro de RMN de ^{13}C desacoplado), CH (carbono metínico), CH_2 (carbono metilênico) e CH_3 (carbono metílico).

Não foram utilizadas nas interpretações dos compostos as técnicas de RMN 2D: H,H-COSY, H,C-HSQC e H,C-HMBC mas sim comparação com dados da literatura (KEDIK et al., 2003).

Observou-se coerência entre os dados da literatura e do padrão onde todos os sinais dos carbonos da aglicona do esteviosídeo puderam ser atribuídos (Figura 6). A pequena diferença nos deslocamentos químicos entre os dados da literatura e os do padrão foi atribuída ao efeito do solvente que no presente caso foi DMSO/D_2O e na literatura os espectros foram obtidos em piridina deuterada.

Portanto, o padrão foi autenticado por espectrometria de RMN de ^{1}H e de ^{13}C e era puro.

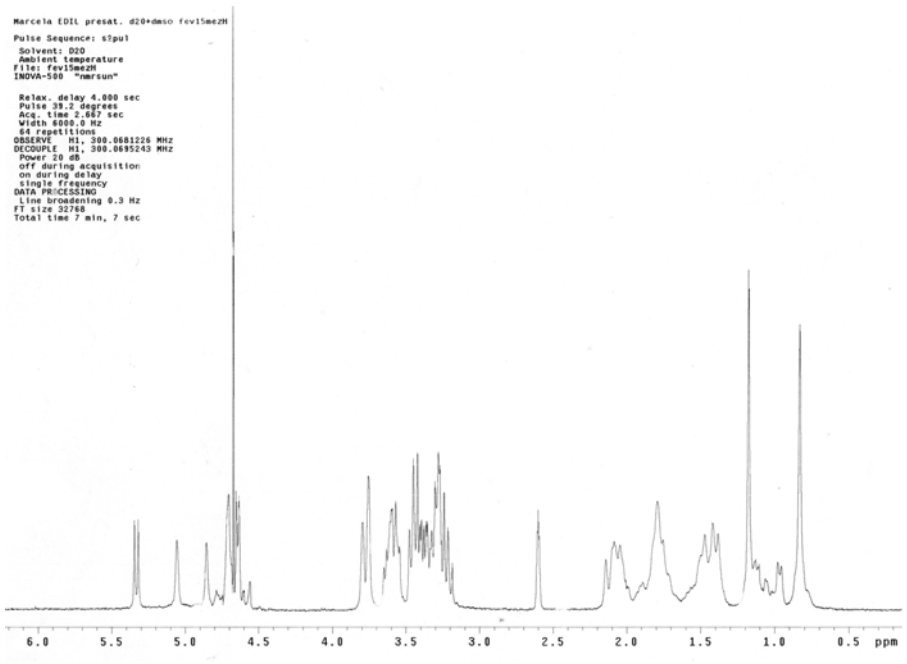


Figura 3. Espectro, com pré-saturação do sinal residual da água, de RMN de ^{1}H (300,07 MHz, DMSO/D_2O).

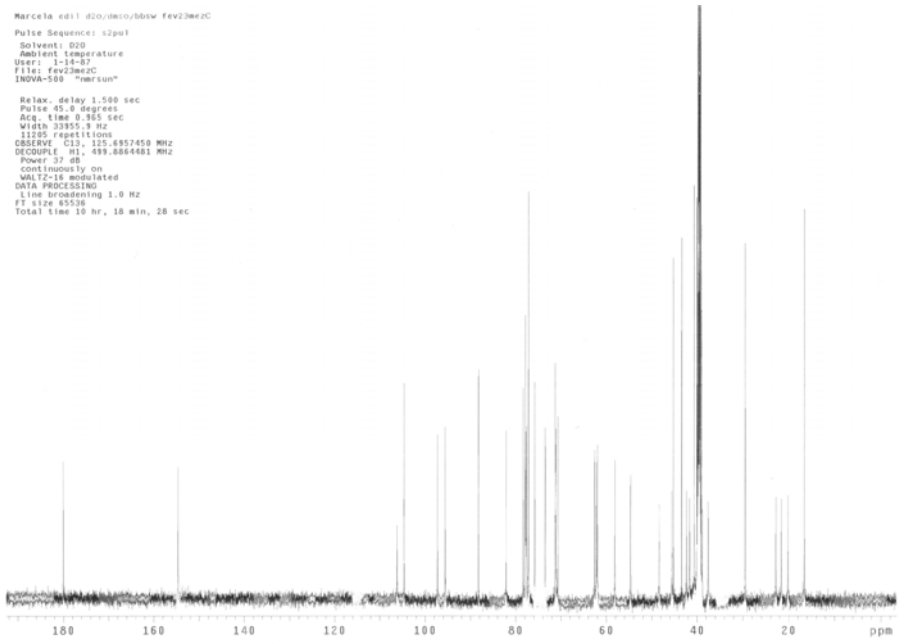


Figura 4. Espectro de RMN de ^{13}C (75,45 MHz, DMSO/D_2O) desacoplado de ^{1}H.

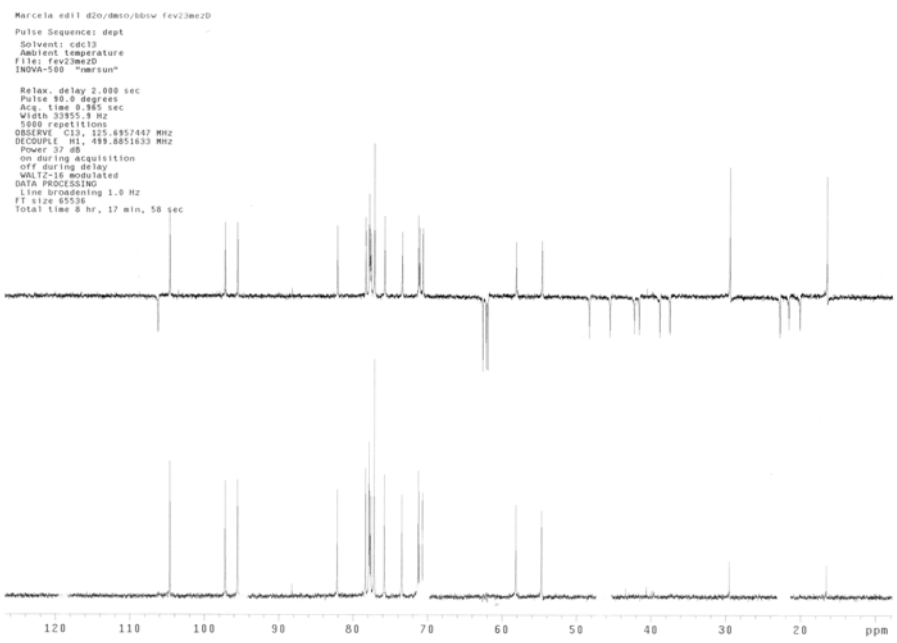


Figura 5. Espectro de RMN de ^{13}C (75,45 MHz, DMSO/D_2O) DEPT com ângulos de 135° e 90°.

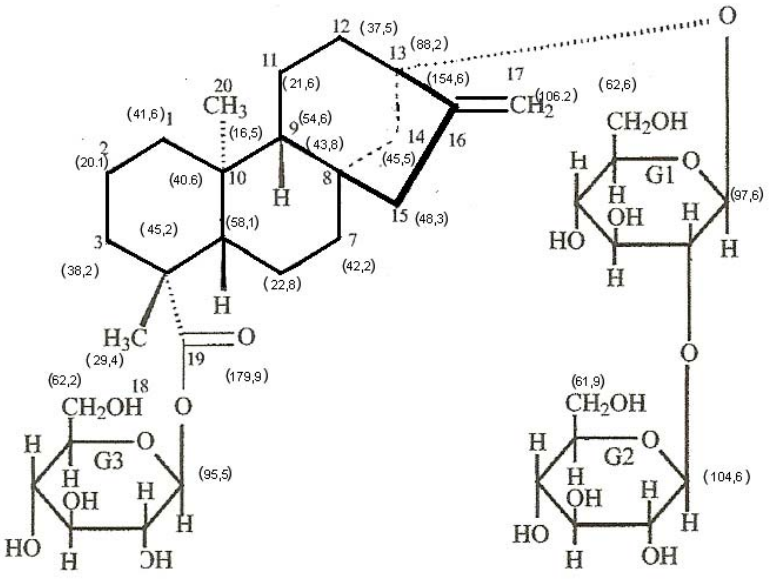


Figura 6. Os números, entre parênteses, na estrutura química correspondem aos deslocamentos químicos de RMN de ^{13}C e a posição dos mesmos corresponde à atribuição.

3.2.1.2 Clareamento e coloração de raízes e avaliação de colonização micorrízica

Para o processo de clareamento amostras de aproximadamente 1g de raízes frescas foram:

a) acondicionadas em tubos de ensaio contendo KOH (10%);

b) mantidas por 15 minutos em banho-maria em ebulição;

c) lavadas em água até retirada do excesso de KOH;

d) lavadas com HCl (5%);

e) lavadas novamente em água.

O processo de coloração foi realizado de acordo com ABBOTT e ROBSON (1981), com as raízes imersas em solução corante azul de tripano em lactoglicerol (0,05%), por 15 minutos (estévia) e 10 minutos (braquiária) em banho-maria, em ebulição, e lavadas com água para retirar o excesso de corante.

Após coloração as amostras foram acondicionadas em frascos tipo penicilina contendo solução de lactoglicerol (ácido láctico:glicerol:água – 1:2:1).

Para a determinação da porcentagem de colonização micorrízica nas raízes das plantas estudadas utilizou-se de um microscópio estereoscópico e, a metodologia empregada foi a da Placa Quadriculada descrita por GIOVANETTI e MOSSE (1980).

3.2.1.3 Análise estatística

Todos os ensaios foram analisados estatisticamente com a utilização do programa Sistat 8.0 da Systat Software Inc e aplicou-se o teste Tukey para comparar os contrastes entre as médias dos tratamentos. Para o ensaio de UE foi utilizado o programa Statistica for Windows 5.0 da StatSoft Inc. para a análise pelo método *Quasi-Newton* de regressão não linear.

Para efeito de análise estatística os resultados percentuais obtidos de teores de esteviosídeos e de colonização micorrízica em raízes foram transformados em ARCO SENO $\sqrt{x/100}$.

A determinação da Eficiência micorrízica (EM - expressa em porcentagem) foi calculada de acordo com a seguinte fórmula:

$$EM = \left[(A - B)/B\right] * 100 \qquad \textbf{(eq. 14)}$$

onde:

A – Parâmetro (biomassa ou esteviosídeo) da planta micorrizada;

B – Parâmetro (biomassa ou esteviosídeo) da planta não micorrizada.

3.2.2 Ensaios

3.2.2.1 Seleção de substratos para produção de mudas micorrizadas.

Para a condução do ensaio de seleção de substratos adequados ao desenvolvimento de fungos MA, foram utilizados os microrganismos descritos no item 3.1.2, incluindo-se um tratamento controle não inoculado. Os substratos testados estão descritos no item 3.1.3. e a planta indicadora foi a *Brachiaria humidicola* conforme descrito no item 3.1.1.

A utilização da gramínea deve-se ao fato da planta ser facilmente colonizável e muitas vezes utilizada para produção de inóculo de fungos MA, além disso, produzem sementes apomíticas, ou seja, obtidas por reprodução assexual, garantido a menor variabilidade possível entre as plantas, o que não ocorreria com o uso da estévia.

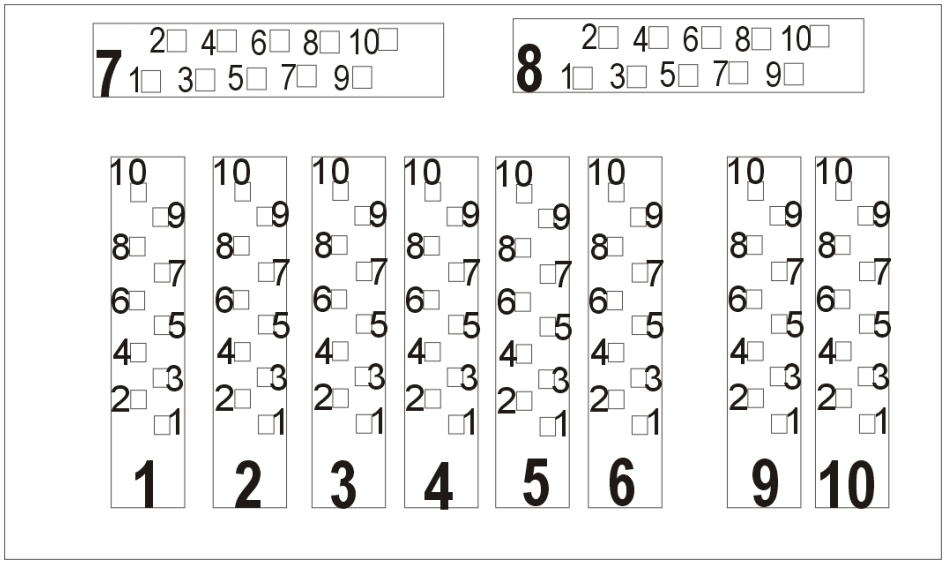
O ensaio foi conduzido em casa de vegetação, com a utilização de tubetes de 150mm altura, 38mm de diâmetro da abertura superior e 10mm de diâmetro da abertura inferior, lavados e mantidos em contato com vapor d'água, gerado por uma caldeira elétrica, por 10 minutos. Cada bandeja para suporte dos tubetes correspondia a uma espécie de fungo ou controle não inoculado, com os 10 tipos diferentes de substratos e cada um destes com 10 repetições, totalizando 8 bandejas e cada qual com 100 tubetes. Duas vezes por semana era feito o rodízio das bandejas (Figura 7).

A irrigação deu-se manualmente, pela observação visual de cada grupo de substrato, visto terem características distintas entre si.

Os substratos, incluindo-se o tratamento controle (solo + areia) foram analisados quimicamente pelo Instituto Agronômico de Campinas por meio do método de extração 1:1,5 (Holanda) como sendo o mais apropriado para substratos. Não foram analisadas as espumas biodegradáveis.

Durante o preparo dos tubetes foi feita a inoculação dos fungos, introduzindo-se ao redor de 200 esporos/tubete a 20mm de profundidade. As sementes, previamente desinfestadas com hipoclorito de sódio 5%, foram semeadas e 13 dias após, foi feito o desbaste para uma planta por tubete. A colheita deu-se 30 dias após o desbaste, com as raízes sendo lavadas e guardadas em lactoglicerol para avaliação de colonização micorrízica, conforme descrito no

item 3.2.1.2. Devido à perda de plantas durante o ensaio foram selecionados 5 tubetes por tratamento para avaliação.



Glomus intraradices

1 = AGM11; 2 = TPMA; 3 = ERCA; 4 = AGMPM; 5 = TPMSA; 6 = CTRL;
7 = ERCSA; 8 = AGM80; 9 = EA; 10 = EE

Figura 7. Desenho esquemático de uma das bandejas do ensaio de seleção de substratos.

As espumas biodegradáveis, agrícola e embalagem, foram previamente lavadas com água destilada para retirada de resíduos e receberam pouco antes da inoculação e semeadura uma adubação prévia descrita na Tabela 3.

Os substratos de casca não adubados (TPMSA e ERCSA) foram fornecidos pelas empresas após terem recebidos todos os seus constituintes, homogeneizados e ensacados antes de receberem os sais de adubação.

Foram feitas duas aplicações complementares de adubação nos substratos durante o transcorrer do experimento. A primeira, 15 dias após o desbaste com a aplicação da solução A, e a segunda 10 dias após com a aplicação da solução B.

Solução A (g L^{-1}): 0,5g de Fosfato Monoamônio (MAP); 0,5g de Nitrato de cálcio.

Solução B (g L^{-1}): 0,5g de Nitrato de cálcio; 0,5g de Nitrato de amônia.

Tabela 3. Concentrações dos sais nas espumas biodegradáveis.

Solução estoque	mL L^{-1} de espuma	Solução de Micronutrientes (SMN)	g L^{-1}
KH_2PO_4 – 0,01 M	3,0	H_3BO_3	2,86
KNO_3 - 1,0 M	0,75	$MnCl_2.4H_2O$	1,81
$Ca(NO_3)_2$ - 1,0 M	0,75	$ZnSO_4.7H_2O$	0,22
NaFeEDTA – 0,1 M	0,15	$CuSO_4.5H_2O$	0,80
NaCl – 0,1 M	0,2	$Na_2MoO_4.\ 2H_2O$	0,016
$MgSo_4$ – 1,0 M	0,3		
SMN	0,15		

3.2.2.2 Seleção de fungos micorrízicos arbusculares para estévia.

Procurou-se, com este experimento, identificar entre sete espécies testadas de fungos MA, aquela que se mostrasse mais eficiente na produção de biomassa e na concentração de esteviosídeos na parte aérea de estévia.

As espécies fúngicas estudadas estão relacionadas no item 3.1.2., incluindo-se um tratamento não inoculado. As plantas de estévia avaliadas foram obtidas de sementes fornecidas pela empresa Steviafarma (item 3.1.1). Estas sementes foram previamente selecionadas, separando-as das impurezas.

O solo coletado no campo experimental do CPQBA-UNICAMP, foi peneirado, secado e esterilizado em autoclave (121^{o}C) por 2 horas e analisado quimicamente no Instituto Agronômico de Campinas.

Após o preparo do solo, esse foi acondicionado em vasos plásticos com capacidade de 2L. O ensaio foi conduzido em casa de vegetação do CPQBA-UNICAMP e cada tratamento foi feito com 5 repetições em delineamento estatístico inteiramente casualisado.

O inóculo dos fungos MA (1.000 esporos/vaso) foi aplicado no centro do vaso a uma profundidade de 20mm de maneira a formar um círculo de 50mm de diâmetro, aproximadamente. As sementes (80/vaso) de estévia foram semeadas na superfície do solo. Após 20 dias da semeadura foi feito o desbaste para 2 plantas e a colheita feita no início do florescimento, 63 dias após a semeadura.

A parte aérea foi secada a 45^{o}C em estufa elétrica com circulação forçada de ar até massa constante. Em seguida as folhas foram separadas dos ramos, pesadas em balança digital semi-analítica (precisão de 0,01g) da marca Kern, modelo EW300-2M, moídas e analisadas quanto ao teor de esteviosídeos (item 3.2.1.1). As raízes foram lavadas, mantidas em lactoglicerol e posteriormente coradas para avaliação de colonização micorrízica, conforme descrito no item 3.2.1.2.

3.2.2.3 Influência de fungos micorrízicos arbusculares e sistemas de cultivos na produção de biomassa e concentração de esteviosídeos em estévia.

O objetivo do experimento foi avaliar a influência da inoculação de fungos MA em estévia, cultivadas em hidroponia, aeroponia e campo quanto à produção de biomassa aérea e concentração de esteviosídeos.

Um ensaio conduzido em casa de vegetação com a utilização de vasos com solo esterilizado ou não, que receberam mudas de plantas colonizadas ou não com o fungo *G. intraradices*, serviu como controle de referência.

As metodologias para a determinação de esteviosídeos na parte aérea e colonização micorrízica estão descritas nos itens 3.2.1.1 e 3.2.1.2, respectivamente.

3.2.2.3.1 Preparo das mudas

O substrato utilizado no preparo das mudas foi o Eucatex Rendmax Citrus sem adubação, conforme resultado do ensaio de seleção de substratos. Este substrato foi analisado quimicamente no Instituto Agronômico de Campinas.

A espécie de fungo utilizada foi o *Glomus intraradices*, de acordo com os resultados do ensaio de seleção de fungos MA para estévia.

As sementes de estévia, fornecidas pela empresa Steviafarma conforme descrito no item 3.1.1, foram selecionadas e semeadas na superfície do substrato nos tubetes.

Os mesmos tubetes do experimento de seleção de substratos foram utilizados para a produção das mudas. Estes foram previamente lavados e mantidos na presença de vapor d'água por 10 minutos. O inóculo do fungo *G. intraradices* foi adicionado a 20mm de profundidade em quantidade suficiente para dispor 1.000 esporos/tubete. A outra metade das mudas não recebeu inoculação.

Na época da instalação dos experimentos foram separadas 12 mudas de estévia para avaliação da colonização fúngica, sendo metade inoculada e metade não inoculada.

Após 45 a 60 dias da semeadura as mudas foram transplantadas para os seus respectivos ensaios.

3.2.2.3.2 Ensaio de hidroponia

O ensaio de hidroponia foi conduzido na casa de vegetação do CPQBA – UNICAMP empregando-se canaletas semicirculares de pvc de 0,10 x 0,05m (L x A), com espaçamentos entre plantas de 0,15m e entre as canaletas de 0,17m. A altura das canaletas em relação a bancada era de 0,35m na entrada da solução nutritiva e de 0,16m na saída e a extensão total da canaleta sobre a bancada era de 8,9m. Foram dispostas 3 linhas de canaletas de cada lado da bancada para facilitar o manuseio.

A solução nutritiva utilizada foi descrita por MEHL (1995) e ajustada para as condições experimentais pelo próprio autor. Era composta pelos seguintes sais (g L^{-1}): $CaNO_3$ = 1,0; KNO_3 = 0,5; $MgSO_4$ = 0,35; MAP = 0,15; FeEDDHA – Ferrilene = 0,025 e solução de micronutrientes = 0,1mL L^{-1}. A solução de micronutrientes era composta por (g L^{-1}): H_3BO_3 = 30; $MnSO_4.H_2O$ = 0,8; $ZnSO_4.7H_2O$ = 2,2; $CuSO_4.5H_2O$ = 0,3 e $H_2MoO_4.H_2O$ = 0,09. Esta solução nutritiva foi preparada à concentração de 25% em reservatório com capacidade de 500L.

O regime de irrigação esta demonstrado na Tabela 4.

Tabela 4. Regime de irrigação para o sistema hidropônico.

Horário	Acionamento	Programação
Das 06:00 às 20:00 h	A cada hora	13 minutos
Das 20:00 às 06:00 h	A cada 2 horas	13 minutos

Esta solução era periodicamente monitorada para verificação da condutividade elétrica CE (conduntivímetro Oakton, modelo ECTestr high), temperatura (termômetro digital marca YFE com sensor termopar tipo K) e pH (pHmetro Digimed, modelo DM20). A cada colheita uma nova solução era preparada.

Os tratamentos consistiam de plantas inoculadas com fungos MA ou não inoculadas, sendo 3 canaletas para cada tratamento e cada canaleta com 10 plantas. As plantas foram espaçadas 0,45m e os tratamentos foram intercalados nas canaletas. O experimento previa 3 colheitas.

A primeira colheita deu-se 31 dias após transplante das mudas para as canaletas e a segunda 46 dias após a primeira, todas no início do florescimento, e a cada colheita retiradas 3 plantas por canaleta. Não foi possível obter a terceira colheita.

A cada colheita a parte aérea de todas as plantas foi secada a 45^{o}C em estufa elétrica com circulação forçada de ar, por 48 horas, até massa constante. Em seguida as folhas foram separadas dos ramos, pesadas (balança digital semi-analítica marca Kern), moídas e analisadas quanto ao teor de esteviosídeos. As raízes das 3 plantas retiradas eram lavadas, mantidas em lactoglicerol e posteriormente coradas para avaliação de colonização micorrízica.

3.2.2.3.3 Ensaio de aeroponia

Este ensaio foi conduzido na casa de vegetação do CPQBA – UNICAMP. Foram utilizadas caixas plásticas com tampa e capacidade de 195L, com as seguintes dimensões internas: 0,475 x 0,510 x 0,810m (A x L x C), modelo 1018 da empresa Marfinite. Na tampa de cada uma das caixas, foram feitas aberturas de 0,03m de diâmetro dispostas em 5 linhas, com a distância entre linhas de 0,10m e a distância entre plantas na linha de também 0,10m. Internamente foi feita uma linha de tubulação de pvc de 0,0127m de diâmetro (½ polegada) para passagem da solução nutritiva que era nebulizada por meio de 9 bicos nebulizadores (Modelo Fogger da empresa Naandan Irrigation Systems, bocal da cor laranja com vazão de 14L h^{-1} a uma pressão de 4 bar) (Figura 8).

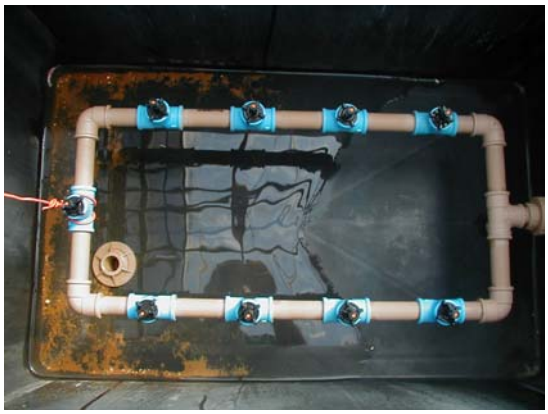


Figura 8. Vista superior do sistema de nebulização no interior da caixa.

A solução nutritiva e a concentração utilizada foram exatamente as mesmas descritas para o ensaio de hidroponia. O regime de irrigação esta demonstrado na Tabela 5.

Tabela 5. Regime de irrigação para o sistema aeropônico.

Horário	Acionamento	Programação
Das 06:00 às 12:00 h	A cada 45 min.	10 minutos
Das 12:00 às 19:30 h	A cada 30 min.	10 minutos
Das 19:30 às 21:00 h	A cada 45 min.	10 minutos
Das 21:00 às 06:00 h	A cada 95 min	10 minutos

Foram montadas 6 caixas dispostas 3 de cada lado da bancada. Os tratamentos inoculados ou não com fungos MA foram feitos em triplicata, com 12 plantas por caixa, espaçadas 0,30m na linha (Figura 9). A primeira colheita foi feita 32 dias após o transplante, a segunda 49 dias após a primeira e a terceira 45 dias após a segunda. A cada colheita foram retiradas 4 plantas por caixa.

A cada colheita a parte aérea, de todas as plantas, foi secada a 45^{o}C em estufa elétrica com circulação forçada de ar, por 48 horas, até massa constante. Em seguida as folhas foram separadas dos ramos, pesadas (balança digital semi-analítica marca Kern), moídas e analisadas quanto ao teor de esteviosídeos. As raízes das 4 plantas retiradas eram lavadas, mantidas em lactoglicerol e posteriormente coradas para avaliação de colonização micorrízica.

Figura 9. Vista geral do ensaio de aeroponia com as plantas recém transplantadas (esquerda) e uma vista das raízes no interior das caixas (direita).

3.2.2.3.4 Ensaio de vasos em casa de vegetação

Neste experimento procurou-se avaliar o efeito da inoculação de *G. intraradices* na produção de biomassa e concentração de esteviosídeos, de plantas de estévia cultivadas em casa de vegetação em vasos com solo esterilizado ou não.

O ensaio foi conduzido na casa de vegetação do CPQBA – UNICAMP, em vasos com capacidade 4,0L. O solo foi coletado no campo experimental, peneirado, secado e corrigido o pH com a adição de calcário dolomítico na concentração de 4,8g/vaso. Metade do solo foi esterilizado em autoclave (121^{o}C) por 2 horas. Amostras de solo após a calagem foram enviadas para análise química.

O experimento constou dos seguintes tratamentos: plantas inoculadas com fungo micorrízico *Glomus intraradices*; plantas não inoculadas; solo esterilizado e solo não esterilizado, totalizando 4 tratamentos, cada qual com 12 repetições e cada vaso com 1 planta após o desbaste. Foram previstas 3 colheitas e, em cada colheita, 4 vasos eram desmontados. O delineamento experimental do ensaio foi inteiramente casualisado.

A irrigação se dava por meio de bicos aspersores instalados nas laterais e no centro da bancada, programada para o início da manhã e no final da tarde, quando necessário, garantindo adequado suprimento de água.

As colheitas ocorreram considerando-se o início de florescimento, 34 dias após o transplante das mudas para o vaso (1ª colheita) e a 2ª colheita 50 dias após a primeira. Não foi possível obter-se a terceira colheita por problemas de doenças.

A cada colheita a parte aérea de todas as plantas foi secada a 45^{o}C em estufa elétrica com circulação forçada de ar, por 48 horas, até massa constante. Em seguida, as folhas eram separadas dos ramos, pesadas (balança digital semi-analítica marca Kern), moídas e analisadas quanto ao teor de esteviosídeos. Para avaliação da colonização micorrízica, quatro vasos de cada tratamento eram desmontados, as raízes lavadas, mantidas em lactoglicerol e posteriormente coradas.

3.2.2.3.5 Ensaio de campo

Neste experimento procurou-se avaliar a influência da inoculação de *G. intraradices*, no desenvolvimento, produção de biomassa e concentração de esteviosídeos na parte aérea de plantas de estévia em condições de campo.

Na Quadra A do campo experimental do CPQBA – UNICAMP foi instalado o ensaio com 10 parcelas, 5 com plantas inoculadas e as outras 5 com plantas não inoculadas, cada qual com 4 linhas e 6 plantas por linha, com espaçamento de 0,20 x 0,50m. Uma bordadura com plantas não inoculadas foi feita ao redor do ensaio. A área dispunha de sistema de irrigação e esta se dava semanalmente, de acordo com a rotina de irrigação da cultura e para a época de cultivo. O solo foi analisado quimicamente no Instituto Agronômico de Campinas.

Da mesma forma que os outros experimentos, as colheitas eram realizadas sempre considerando o início do florescimento, sendo a 1ª colheita 30 dias após o transplante, a 2ª colheita 54 dias após a 1ª e a 3ª colheita 48 dias após a 2ª.

Após a 2ª colheita foi feita uma adubação complementar de 8g m^{-1} linear de NPK (10:10:10 - N total = 10% : P_2O_5 = 10% : K_2O = 10%).

A cada colheita a parte aérea de todas as plantas era secada a 45^oC em estufa elétrica com circulação forçada de ar, por 48 horas, até massa constante. Em seguida, as folhas foram separadas dos ramos, pesadas (balança digital semi-analítica marca Kern), moídas e analisadas quanto ao teor de esteviosídeos. Para avaliação da colonização micorrízica, 4 plantas/parcela (1 por linha) eram colhidas e as raízes lavadas, mantidas em lactoglicerol e posteriormente coradas.

3.2.2.4 Determinação da umidade de equilíbrio

Para a determinação da UE foi utilizado *Stevia rebaudiana*, genótipo T9 (item 3.1.1). O material vegetal utilizado era proveniente de um ensaio, conduzido pela Divisão de Agrotecnologia do CPQBA-UNICAMP no ano de 2002, de avaliação de 5 genótipos de estévia quanto à produtividade de biomassa e teor de esteviosídeo.

Após a segunda colheita, início do florescimento, a parte aérea foi secada em estufa com circulação forçada a 45^oC até massa constante. As folhas foram separadas das ramas, e em alíquotas aproximadas de 2g foram colocadas em cadinhos de pvc, em quadruplicata, e estes colocados dentro de dessecadores. Cada um desses dessecadores foi utilizado para simular nove diferentes condições constantes de umidade relativa, de acordo com a solução salina no seu interior. (Tabela 6).

Tabela 6. Umidade relativa de acordo com a solução salina (GREENSPAN, 1977).

T [^oC]	Umidade relativa (%)								
	LiCl	KF	$MgCl_2$	K_2CO_3	NaBr	KI	NaCl	KCl	KNO_3
30	11,28	27,27	32,44	43,17	56,03	67,89	75,09	83,62	92,31
45	11,16	21,46	31,10	-	51,95	65,26	74,52	81,74	87,03

Os dessecadores foram dispostos em duas estufas de circulação forçada, uma a 30ºC e a outra a 45ºC, iniciando-se medidas periódicas de determinação da massa até tornarem-se constantes, utilizando-se de uma balança digital analítica (precisão de 0,0001g, marca Mettler, modelo AE163) de acordo com o método gravimétrico padrão (GÁL, 1975). A matéria seca foi determinada colocando-se amostras de cada experimento em estufa à 105ºC por 24 horas (ASAE, 1991).

O método *Quasi-Newton* (STATISTICA, 1995) de análise de regressão não linear foi usado para estimar as constantes dos modelos testados, que estão descritos na Revisão de Literatura, item 2.6. A regressão foi repetida com estimativas dos valores acima e abaixo dos calculados (método iterativo: PELEG, 1993). O módulo do erro relativo médio foi o critério utilizado na avaliação:

$$E = \frac{100}{ne}\sum_{i=1}^{ne}\frac{|VE - VP|}{VE} \qquad \textbf{(eq. 15)}$$

Onde:

VE - valores experimentais

VP - valores preditos pelo modelo

E - erro relativo

ne – número de dados experimentais

Geralmente, considera-se que valores de erro relativo médio abaixo de 10% indicam razoável ajuste nas práticas propostas (AGUERRE et al., 1989).

3.2.2.5 Influência de sistemas de secagem no teor de esteviosídeos

Para determinação da influência dos sistemas de secagem no teor de esteviosídeos foram utilizadas plantas de *Stevia rebaudiana*, genótipo T9 (ver itens 3.1.1 e 3.2.2.4 primeiro parágrafo, páginas 21 e 39, respectivamente) (Figura 10).

Figura 10. *Stevia rebaudiana*, genótipo T9 em experimento de campo.

3.2.2.5.1 Colheita e secagem da matéria prima

As colheitas ocorreram sempre no início do florescimento nas seguintes datas: 25/09/2002, 04/12/2002 e 06/02/2003.

O material vegetal de cada colheita, devidamente homogeneizado, era separado em três grupos, cada qual destinado a um sistema de secagem, ao sol, secador e estufa.

Ao término do período de secagem as folhas foram separadas dos ramos, pesadas (balança digital semi-analítica marca Kern) e moídas. De cada amostra de secagem, de cada época, eram feitas 3 sub-amostras que foram utilizadas para análise de esteviosídeos, de acordo com o descrito no item 3.2.1.1.

3.2.2.5.2 Secagem ao sol

Para a secagem das plantas ao sol foram utilizadas bandejas de aço inoxidável de 1,0 x 1,0 x 0,15m (LxPxA) com o fundo revestido com tela de sombreamento de 50%, mantidas a uma altura de 0,06m do chão para facilitar a circulação do ar. As plantas foram dispostas em camada de aproximadamente 0,05m, mantidas ao sol por 7 horas, entre 10:30 e 17:30 horas, e revolvidas a cada 2 horas. Após este período as bandejas eram levadas para uma área coberta (sombra), por mais 24 horas, completando o processo de secagem (Figura 11).

Durante o transcorrer do ensaio, enquanto as folhas estavam expostas ao sol, foram registras informações sobre as condições ambientais de temperatura, umidade relativa e velocidade do vento para as três colheitas. Estes dados foram obtidos no Centro de Pesquisas Meteorológicas e Climáticas Aplicadas a Agricultura (CEPAGRI - UNICAMP).

Figura 11. Material vegetal de *Stevia rebaudiana*, genótipo T9, secando ao sol.

3.2.2.5.3 Secador a gás

O secador a gás com aquecimento indireto da Divisão de Agrotecnologia do CPQBA, foi ajustado a 42,5 ± 2,5^{o}C. O ar é insuflado pelas paredes laterais com velocidade média de 0,61m s^{-1} (determinação feita a 0,5m de distância do ponto de entrada do ar e a 1,5m de altura do chão).

A disposição das plantas nas bandejas foi exatamente igual ao descrito para a secagem ao sol. As bandejas eram dispostas em carrinhos que então eram colocados no secador, por 48 horas, até massa constante (Figura 12).

A

B

Figura 12. Material vegetal de estévia para secagem no secador a gás. Detalhe da bandeja (A) e vista do secador com os carrinhos (B).

3.2.2.5.4 Estufa elétrica com circulação forçada de ar

A estufa marca Blue M, da Divisão de Agrotecnologia do CPQBA, foi ajustada para temperatura de 45^{o}C com a abertura lateral para saída do ar ajustada na posição totalmente aberta e velocidade interna do ar era, em média, de 1,17m s^{-1} O material vegetal era distribuído nas bandejas e mantido na estufa por 48 horas até massa constante.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Seleção de substratos para produção de mudas micorrizadas.

Na Tabela 7 estão demonstrados os resultados da análise química dos substratos.

Tabela 7. Resultado da análise química dos substratos.

Determinações	Substratos							
	AGM11	**AGM80**	**AGMPM**	**TPMA**	**TPMSA**	**ERCA**	**ERCSA**	**CTRL**
pH	4,4	4,7	5,0	5,1	5,9	5,1	5,8	5,1
C.E. dS m^{-1}	1,62	0,51	0,75	0,71	0,12	2,22	0,22	0,06
N – Amônio mg L^{-1}	2,0	0,7	1,3	1,2	1,1	1,5	1,2	1,6
N – Nitrato mg L^{-1}	20,6	0,3	0,3	0,1	0,4	0,6	0,3	0,4
P – mg L^{-1}	17,7	1,4	8,6	12,2	2,4	1,6	0,3	0,1
K – mg L^{-1}	305	152	189	66	17	124	28	1
Na - mg L^{-1}	16,1	10,5	12,1	5,8	2,1	26,6	10,7	11,4
Ca - mg L^{-1}	35,2	3,3	2,3	44,0	4,4	183,9	3,7	0,5
Mg - mg L^{-1}	26,9	1,2	2,2	20,0	2,3	94,7	1,9	0,2
S - mg L^{-1}	82,6	10,4	27,4	54,9	5,1	242,4	1,6	1,3
Al - mg L^{-1}	0,1	0,2	0,1	0,5	0,8	0,2	1,2	0,8
B - mg L^{-1}	0,75	0,21	0,21	0,03	<0,01	0,04	0,03	<0,01
Cu - mg L^{-1}	0,05	0,03	0,03	0,04	0,01	0,03	0,02	0,01
Fe - mg L^{-1}	0,4	1,4	0,1	0,2	0,6	0,1	0,8	0,8
Mn - mg L^{-1}	0,8	0,1	0,04	0,1	0,02	0,03	0,01	0,03
Zn - mg L^{-1}	0,48	0,14	0,09	0,05	0,02	0,04	0,01	0,01
Cl - mg L^{-1}	91,59	50,06	74,55	4,26	4,26	37,99	46,86	5,33
Umidade %	75,7	65,0	69,3	37,5	32,7	42,5	46,4	-
Carbono orgânico – g kg^{-1}	479,8	440,8	438,0	201,3	265,6	281,7	309,8	-
N – g kg^{-1}	6,6	6,2	5,6	3,6	2,7	6,9	6,9	-
Relação C/N	73	71	78	56	98	41	45	-

Método de extração: 1:1,5 (Holanda). Métodos de determinação: N-(amoniacal e nitrato): destilação; Al, B,K,Ca,Mg,P,S,Cu,Fe, Mn, Zn: ICP-OES; C orgânico: Walkley-Black; Nitrogênio total: Kjeldahl; Cl: eletrodo de íon seletivo.

Legenda: AGM11-Golden-Mix 11 (fibra de coco); AGM80-Golden-Mix 80 (fibra de coco); AGMPM-Golden-Mix PM (fibra de coco); TPMA-Multisoil 3010 adubado; TPMSA-Multisoil 3010 não adubado; ERCA-Rendmax citrus adubado; ERCSA-Rendmax citrus não adubado; CTRL-Solo+areia (1,6:10 v/v)-esterilizado.

Os valores obtidos de colonização micorrízica em *B. humidicola* podem ser visualizados na Tabela 8. Os resultados do tratamento não inoculado não foram incluídos na

tabela e também não entraram na análise estatística, uma vez que em nenhum dos substratos ocorreu colonização micorrízica, indicando ausência de contaminantes micorrízicos nos mesmos.

Com o tratamento Controle (CTRL), verifica-se que todos os fungos inoculados foram hábeis em colonizar as raízes da Braquiária, entretanto baixas taxas de colonização radicular foram observadas para os isolados CP13 e CPVG e os fungos *Acaulospora* sp. (IAC13) e *Glomus etunicatum* (IAC42) em, praticamente, todos os substratos (Tabela 8).

Os fungos, *Glomus intraradices* (IAC43), *Entrophospora* sp. (IAC23) e *Glomus macrocarpum* (IAC50) apresentaram os maiores valores de porcentagem de colonização, diferindo estatisticamente dos outros fungos na média geral (Tabela 8). Tendência se mantém ao analisar-se os resultados para os melhores substratos (ERCA e ERCSA).

Dos substratos testados, os dois Rendmax Citrus mostraram-se adequados à produção de mudas micorrizadas, principalmente o sem adubação (ERCSA), com a taxa de colonização radicular da gramínea variando de 43,86 a 67,97% para os fungos IAC50, IAC23 e IAC43 (Tabela 8).

Dos sete fungos micorrízicos testados no substrato Rendmax Citrus sem adubação (ERCSA), a espécie *G. intraradices* (IAC43) apresentou taxa de colonização (67,97%) significativamente superior aos demais fungos micorrízicos. (Tabela 8 e Figura 13).

O outro substrato à base de compostagem de casca mostrou taxas de colonização inferiores a 3,0%, quando adubado (TPMA) e de 21,0% quando não adubado (TPMSA). Nos substratos à base de espuma (EA e EE) a taxa de colonização radicular apresentou valores inferiores a 10,0%, exceto para as plantas que se desenvolveram no substrato EE na presença de *G. macrocarpum* (IAC50), com taxa próxima a 15,0%. Quanto aos substratos provenientes da fibra de coco (AGM80, AGMPM e AGM11) as taxas de colonização micorrízica nas raízes da gramínea não ultrapassaram 4,5%. (Tabela 8).

Tabela 8. Porcentagem de colonização por fungos MA em raízes de *B. humidicola* nos diferentes substratos. Média de cinco repetições.

Substratos	Fungos MA													
	IAC43		IAC23		IAC50		IAC13		IAC42		CP13		CPVG	
CTRL	31,33	**b B**	31,31	**b B**	55,93	**a A**	5,58	**ab C**	7,61	**b C**	2,34	**b C**	5,11	**a C**
EA	3,29	**d A**	0,13	**e B**	6,39	**cd A**	0,20	**d B**	0,00	**d B**	0,19	**c B**	0,00	**b B**
EE	4,77	**cd B**	6,07	**c B**	15,35	**bc A**	0,23	**cd C**	7,03	**b AB**	0,00	**c C**	1,07	**b C**
ERCA	40,19	**b A**	34,18	**ab A**	38,60	**a A**	13,06	**a B**	6,79	**b BC**	2,31	**b CD**	0,00	**b D**
ERCSA	67,97	**a A**	49,12	**a B**	43,86	**a B**	6,62	**ab CD**	15,21	**a C**	6,75	**a CD**	5,62	**a D**
TPMA	2,97	**d A**	0,92	**de ABC**	0,00	**e C**	0,82	**cd BC**	1,43	**cd AB**	0,12	**c C**	0,24	**b C**
TPMSA	10,37	**c B**	4,74	**cd BC**	21,49	**b A**	2,28	**bcd CD**	0,49	**cd DE**	0,00	**c E**	0,34	**b E**
AGM80	3,54	**cd A**	4,50	**cd A**	3,83	**d A**	0,08	**d B**	0,00	**d B**	0,00	**c B**	0,00	**b B**
AGMPM	1,88	**d AB**	2,55	**cde A**	0,82	**de ABC**	3,17	**bc A**	1,46	**c AB**	0,28	**c BC**	0,00	**b C**
AGM11	2,48	**d A**	2,16	**cde AB**	2,04	**de AB**	0,31	**cd BC**	0,00	**d C**	0,00	**c C**	0,00	**b C**
Média	16,88	**A**	13,57	**A**	18,83	**A**	3,23	**B**	4,00	**B**	1,20	**B**	1,24	**B**

Letras minúsculas referem-se às diferenças entre os substratos para cada fungo. Letras maiúsculas referem-se às diferenças entre os fungos MA para cada substrato ou média. Médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Legenda:

Substratos	Fungos MA
CTRL = Controle (solo + areia)	IAC43 - *Glomus intraradices*
EA = Espuma biodegradável para uso agrícola	IAC23 - *Entrophospora* sp.
EE = Espuma biodegradável para embalagem	IAC50 - *Glomus macrocarpum*
ERCA = Eucatex Rendmax citrus adubado	IAC13 - *Acaulospora* sp.
ERCSA = Eucatex Rendmax citrus não adubado	IAC42 - *Glomus etunicatum*
TPMA = Terra Paraíso Multisoil 3010 adubado	CP13 - *Acaulospora* sp.
TPMSA = Terra Paraíso Multisoil 3010 não adubado	CPVG - *Glomus* sp.
AGM80 = Amafriba Golden-Mix 80 (fibra de coco)	
AGMPM = Amafibra Golden-Mix PM (fibra de coco)	
AGM11 = Amafibra Golden-Mix 11 (fibra de coco)	

Na Tabela 7, referente à análise química dos substratos, observa-se que os maiores valores de relação C/N e, principalmente, carbono orgânico foram obtidos para os substratos a base de fibra de coco, indicando, talvez, que este tenha sido o elemento inibidor ao desenvolvimento do fungo micorrízico para estes substratos. Para os substratos Terra Paraíso (TPMA e TPMSA) a limitação talvez tenha sido a maior concentração de fósforo (P).

Um outro fator, importante para a produção de mudas, mas que pode ter prejudicado o estabelecimento e desenvolvimento da micorriza nos substratos a base de fibra de coco, é a alta capacidade de retenção de água deste material.

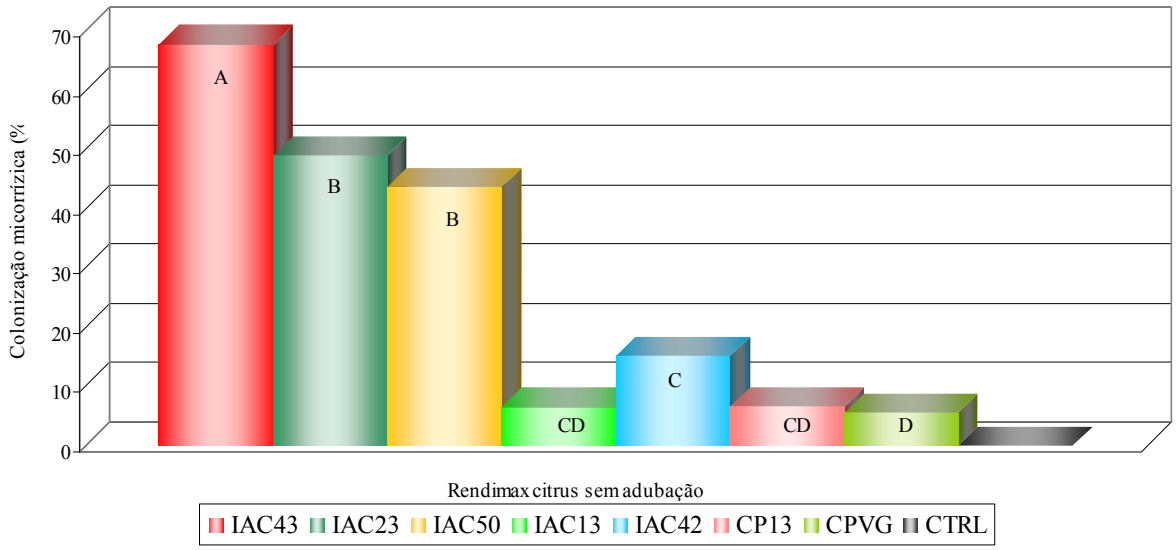


Figura 13. Porcentagem de colonização micorrízica de *B. humidicola* pelas diferentes espécies de fungos em substrato compostado de casca (ERCSA).

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.
Legenda: IAC43 = *Glomus intraradices*; IAC23 = *Entrophospora* sp.; IAC 50 = *Glomus macrocarpum*; IAC13 = *Acaulospora* sp.; IAC42 = *Glomus etunicatum*; CP13 = Provável *Acaulospora* sp.; CPVG = Provável *Glomus* sp; CTRL = Controle não inoculado.

Na Figura 14 são mostradas as mudas de *B. humidicola* inoculadas com o fungo micorrízico *G. intraradices* nos 10 substratos testados, mudas inoculadas ou não com os fungos MA no substrato de casca compostado (ERCSA) e detalhes da colonização micorrízica.

A Figura 15 mostra uma visão geral do ensaio na época da colheita.

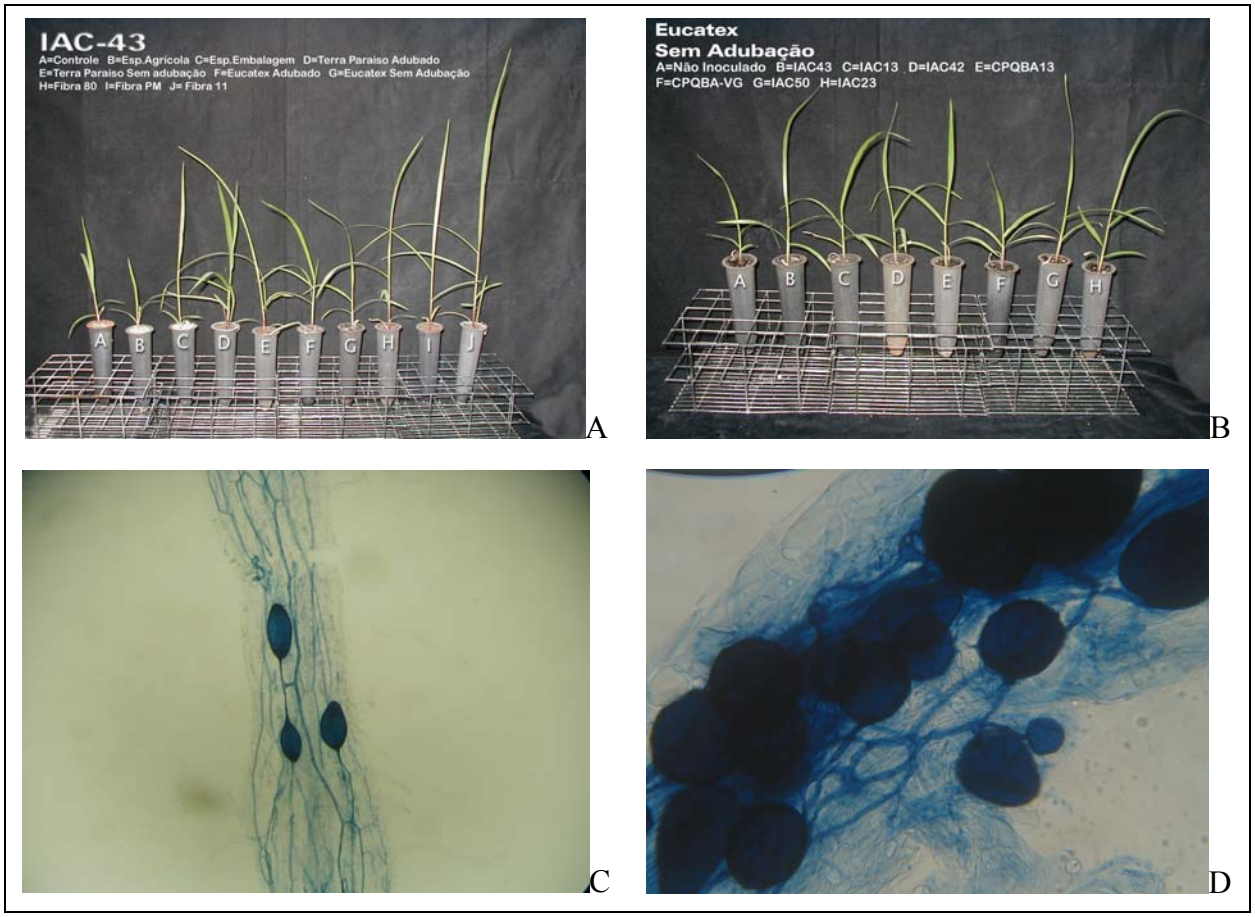


Figura 14. Fotos mostrando as mudas de *B. humidicola* inoculada com o fungo *G. intraradices* nos diferentes substratos (A), mudas da gramínea inoculadas com os diversos fungos MA no substrato ERCSA (B), hifas e vesículas do fungo *Entrophospora* sp. ao longo da raiz da gramínea no substrato ERCSA (C) e formação de esporos pelo fungo *G. intraradices* no substrato TPMSA (D).

Figura 15. Visão geral do ensaio na época da colheita mostrando a distribuição das bandejas com *B. humidicola* nos diferentes substratos.

Poucos são os trabalhos envolvendo produção de mudas micorrizadas em substratos orgânicos comerciais. Entretanto, resultados semelhantes aos obtidos neste experimento, foram descritos por TRISTÃO (2005) demonstrando eficiente produção de mudas de café inoculadas com fungos MA, principalmente em substrato à base de compostagem de casca de Pinus.

Estudos conduzidos para obtenção de mudas de limoeiro cravo inoculadas ou não com fungos micorrízicos em diferentes substratos orgânicos, mostrou que a combinação do substrato de fibra de coco (FC47) inoculado com *G. intraradices* foi a mais eficiente para o desenvolvimento das mudas, apesar de valores de colonização micorrízica inferiores a 5% (MAIORANO, 2003).

Por outro lado, alguns trabalhos demonstram que o emprego de substratos comerciais tende a inibir a colonização das raízes pelos fungos micorrízicos anulando sua ação no desenvolvimento das mudas, como foi observado por SILVA et al. (2001) em maracujazeiro azedo, por TRINDADE et al. (2003) em mudas micropropagadas de bananeira e por ZEMKE et al. (2003) na aclimatação de porta-enxertos de videira micropropagados.

A concentração de matéria orgânica em substratos para produção de mudas inoculadas com fungos MA pode ser um fator limitante. O substrato que propiciou melhor colonização micorrízica foi o Rendimax Citrus sem adubação (ERCSA), com 31% de carbono orgânico, enquanto os substratos à base de fibra de coco variaram de 44 a 48%.

TRINDADE et al. (2000), avaliando o emprego de esterco para o desenvolvimento de mudas de mamoeiro colonizadas com fungos MA, concluíram que quanto maior a concentração de esterco menor a colonização micorrízica e que a concentração ideal foi de 10%. Resultados semelhantes foram encontrados por MATOS et al. (2002) avaliando a aclimatação de mudas de bananeira em substratos com diferentes níveis de matéria orgânica e presença ou ausência de micorrizas arbusculares.

A produção de mudas de maracujazeiro-amarelo em diferentes substratos com ou sem a presença de fungos MA mostrou que os efeitos positivos da micorrização foram maiores no substrato sem adição de matéria orgânica, não superando, entretanto, o efeito da sua adição (SILVEIRA et al., 2003).

Por outro lado, experimento conduzido por SOUZA et al. (1997) avaliando o desenvolvimento do citrange ‘troyer’ infectado com fungo micorrízico em dois substratos,

mostraram que o substrato à base de turfa (65% matéria orgânica) não prejudicou a ação do *G. intraradices*, ao contrário, proporcionou plantas com maior diâmetro de colo, indicando antecipação da época de enxertia.

Estudos desenvolvidos por CARON et al. (1985) sobre a influência dos substratos na interação de *Glomus intraradices* e *Fusarium oxysporum* em tomates, mostraram que a presença do fungo MA diminuiu a necrose radicular das plantas em todos os substratos e, afetou a população de *Fusarium* de maneira diferenciada, dependendo do substrato.

Tanto os resultados experimentais obtidos, quanto aqueles descritos na literatura indicam a necessidade de maiores estudos com substratos adequados ao estabelecimento, desenvolvimento de fungos MA e conseqüente eficiência simbiótica.

Substratos inertes, como o de fibra de coco, poderiam ser indicados para a produção de mudas micorrizadas, uma vez que as variações de lote para lote e dentro do mesmo lote, tendem a ser menores, se comparadas com os substratos à base de compostagem de casca. Se tais substratos forem adequadamente ajustados, pelo fabricante, em termos nutricionais e manejados corretamente pelo produtor, principalmente com relação à irrigação, podem propiciar um bom desenvolvimento da colonização radicular pelo fungo e consequentemente da muda que esta sendo produzida.

4.2 Seleção de fungos micorrízicos arbusculares para estévia.

Os resultados da análise química do solo podem ser visualizados na Tabela 9. Os resultados de todos os parâmetros avaliados estão demonstrados na Tabela 33 (anexos).

Pode-se observar aumento significativo na produção de massa seca total da parte aérea (MST) e massa seca de folhas (MSF) com a inoculação dos fungos MA *G. intraradices* (IAC43)*, G. etunicatum* (IAC42)*, Acaulospora* sp (IAC13) e *Entrophospora* sp (IAC23) em relação ao tratamento não inoculado (Figura 16).

Os dois isolados de estévia, CP13 e CPVG, foram significativamente inferiores aos fungos citados acima, produzindo 39,4 e 46,7% menos massa seca de folhas em comparação ao tratamento com *G. intraradices*, respectivamente. Não diferiram dos fungos *Entrophospora sp.* (IAC23) e *Glomus macrocarpum* (IAC50) (Figura 16).

Tabela 9. Análise química do solo utilizado no ensaio para seleção de fungos MA para estévia. Análise realizada pelo Instituto Agronômico de Campinas.

Sigla	Descrição	Unidade	Amostra Solo	Sigla	Descrição	Unidade	Amostra Solo
M.O.	Matéria Orgânica	g dm^{-3}	37	**CTC**	Cap. Tr. Cat.	$mmol_c$ dm^{-3}	76,9
pH	Solução $CaCl_2$		4,9	**V**	Sat. Bases	%	45
P	Fósforo resina	mg dm^{-3}	18	**B**	Boro	mg dm^{-3}	0,33
K	Potássio	$mmol_c$ dm^{-3}	4,6	**Cu**	Cobre	mg dm^{-3}	8,1
Ca	Cálcio	$mmol_c$ dm^{-3}	18	**Fe**	Ferro	mg dm^{-3}	23
Mg	Magnésio	$mmol_c$ dm^{-3}	12	**Mn**	Manganês	mg dm^{-3}	25,7
H+Al	Acidez Potencial	$mmol_c$ dm^{-3}	42	**Zn**	Zinco	mg dm^{-3}	1,6
S.B.	Soma Bases	$mmol_c$ dm^{-3}	34,6				

Método de extração: 1:1,5 (Holanda). Métodos de determinação: N-(amoniacal e nitrato): destilação; B,K,Ca,Mg,P,S,Cu,Fe, Mn, Zn: ICP-OES; C orgânico: Walkley-Black; Nitrogênio total: Kjeldahl

Dentre os fungos testados, *G. macrocarpum* foi o menos eficiente, não diferindo estatisticamente do tratamento controle não inoculado e dos isolados de estévia (CP13 e CPVG) produzindo apenas 34% de massa seca de folhas produzida pelo tratamento com *G. intraradices* (Figura 16).

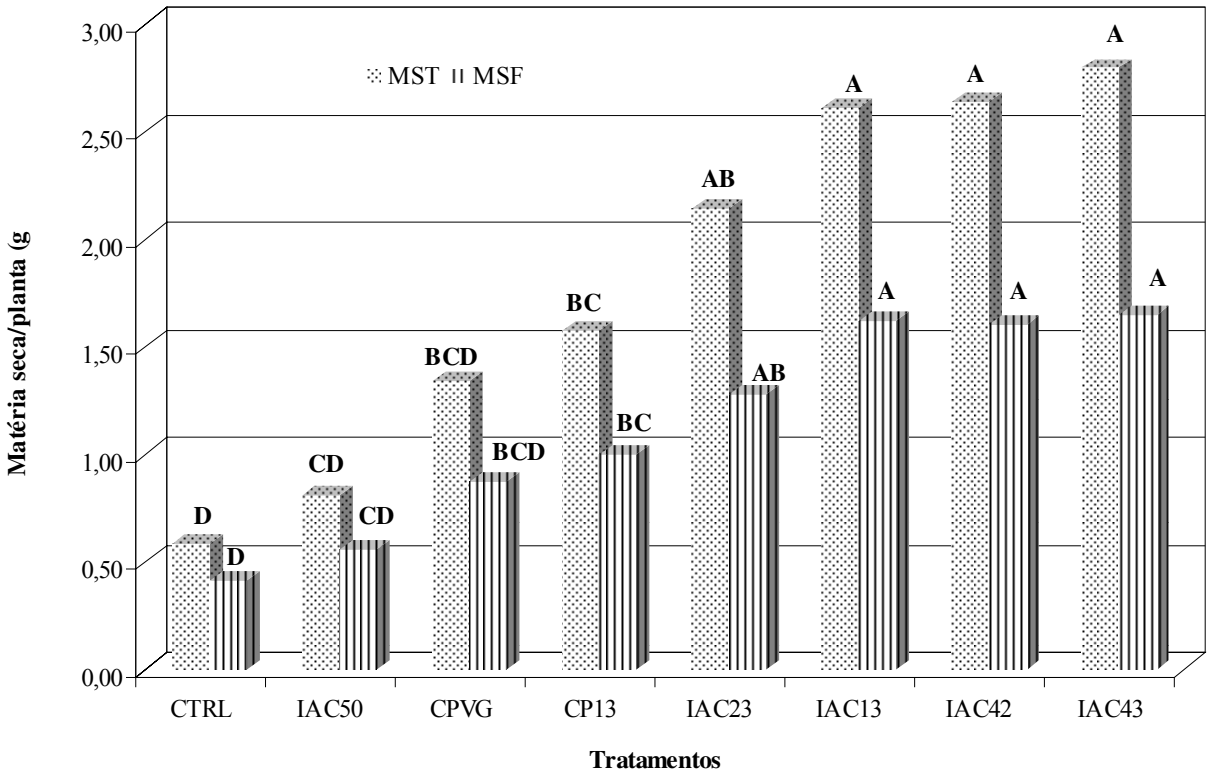


Figura 16. Efeito da inoculação de fungos MA na produção de massa da matéria seca total da parte aérea (MST) e massa da matéria seca de folhas (MSF) de estévia.

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.
Legenda: CTRL = Controle não inoculado; IAC 50 = *Glomus macrocarpum*; CPVG = Provável *Glomus* sp.; CP13 = Provável *Acaulospora* sp.; IAC23 = *Entrophospora* sp.; IAC13 = *Acaulospora* sp.; IAC42 = *Glomus etunicatum*; IAC43 = *Glomus intraradices*.

Os valores de eficiência micorrízica (EM) pelas diferentes espécies de fungos para MST e MSF estão demonstrados na Figura 17. Nenhum dos fungos testados mostrou efeito negativo. Destacam-se os fungos *G. intraradices* (IAC43)*, G. etunicatum* (IAC42) e *Acaulospora* sp. (IAC13) que aumentaram a produção de MSF em 302, 292 e 296%, respectivamente. Os isolados de estévia, CP13 e CPVG proporcionaram aumentos de 144 e 114%, na ordem, e o IAC50 apenas de 37%. Essas observações se repetem para produção de MST, destacando-se novamente o *G. intraradices* (IAC43) com 381% de aumento.

Quanto ao teor de esteviosídeos, os resultados mostram a eficiência simbiótica determinada pela presença do fungo *G. intraradices* (IAC43) em relação aos demais tratamentos de inoculação e ao controle (Figura 18), sendo o único tratamento a mostrar eficiência micorrízica (EM) positiva de 12% em relação ao controle (Figura 19).

A curva mostrando os teores de esteviosídeos obtidos (Figura 18) em comparação e os valores de MSF (Figura 16), permite visualizar o efeito de diluição e concentração, com a inversão da queda nos teores, a partir do tratamento inoculado com o isolado CP13, que passam a aumentar gradativamente quanto menor o valor de matéria seca de folhas.

Os valores de quantidade acumulada de esteviosídeos nas folhas de estévia estão demonstrados na Figura 18. Neste caso, fica evidente a ação significativamente benéfica da inoculação do fungo *G. intraradices* (IAC43), com um acúmulo 51% superior ao segundo melhor tratamento (*Acaulospora* sp. – IAC13) e de 350% em relação ao controle.

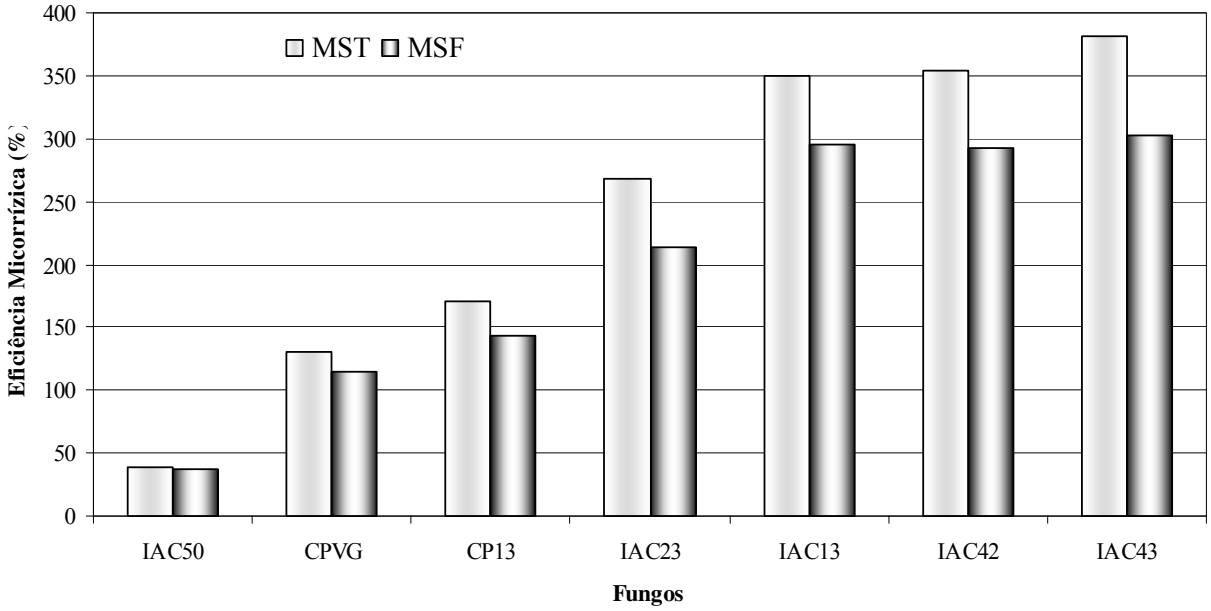


Figura 17. Determinação da eficiência micorrízica em relação à matéria seca total da parte aérea (MST) e matéria seca de folhas (MSF) de estévia.

Legenda: IAC 50 = *Glomus macrocarpum*; CPVG = Provável *Glomus* sp.; CP13 = Provável *Acaulospora* sp.; IAC23 = *Entrophospora* sp.; IAC13 = *Acaulospora* sp.; IAC42 = *Glomus etunicatum*; IAC43 = *Glomus intraradices*.

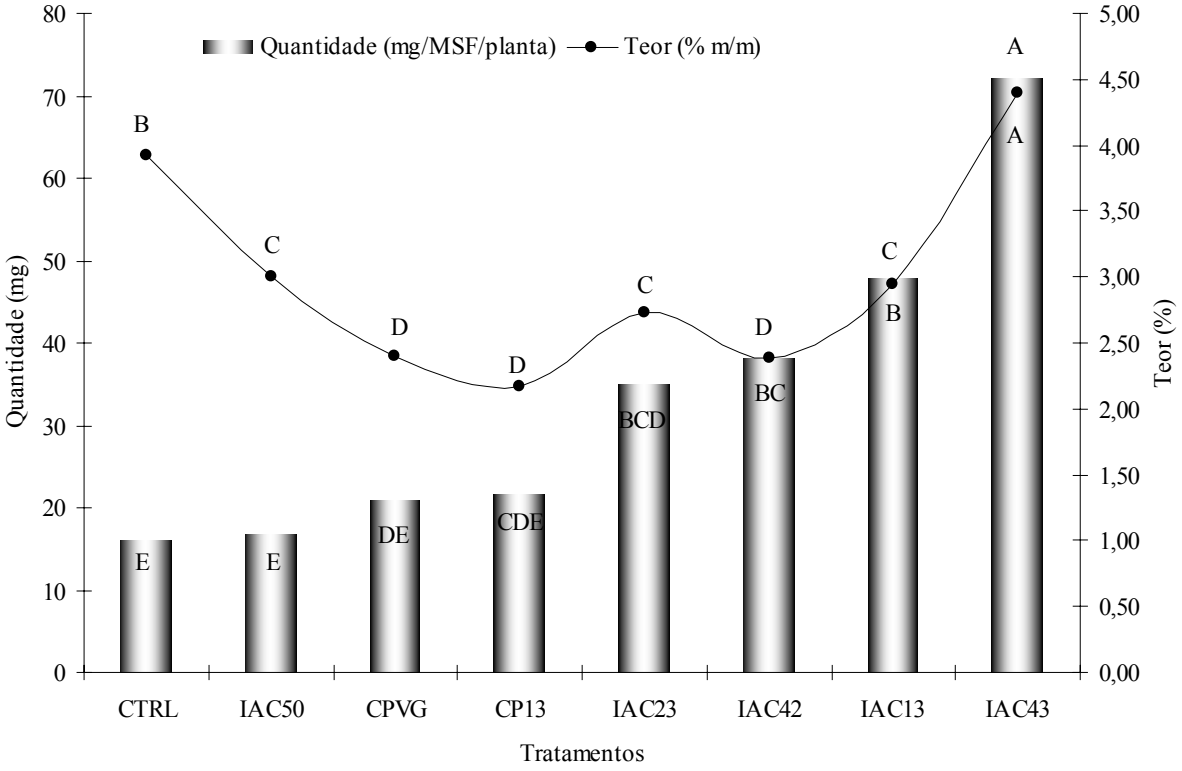


Figura 18. Teor e quantidade acumulada de esteviosídeos na matéria seca de folhas de plantas de estévia inoculadas ou não com fungos MA.

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.
Legenda: CTRL = Controle não inoculado; IAC 50 = *Glomus macrocarpum*; CPVG = Provável *Glomus* sp.; CP13 = Provável *Acaulospora* sp.; IAC23 = *Entrophospora* sp.; IAC13 = *Acaulospora* sp.; IAC42 = *Glomus etunicatum*; IAC43 = *Glomus intraradices*.

Com relação à EM para quantidade acumulada de esteviosídeos (Figura 19) não foi observado efeito negativo dos fungos MA estudados, com destaque para a inoculação com *G. intraradices* (IAC43) com valor de 350%. Valores acima de 100% foram observados para *Acaulospora* sp. (IAC13) com 197%, *G. etunicatum* (IAC42) com 138% e *Entrophospora* sp. (IAC23) com 118%.

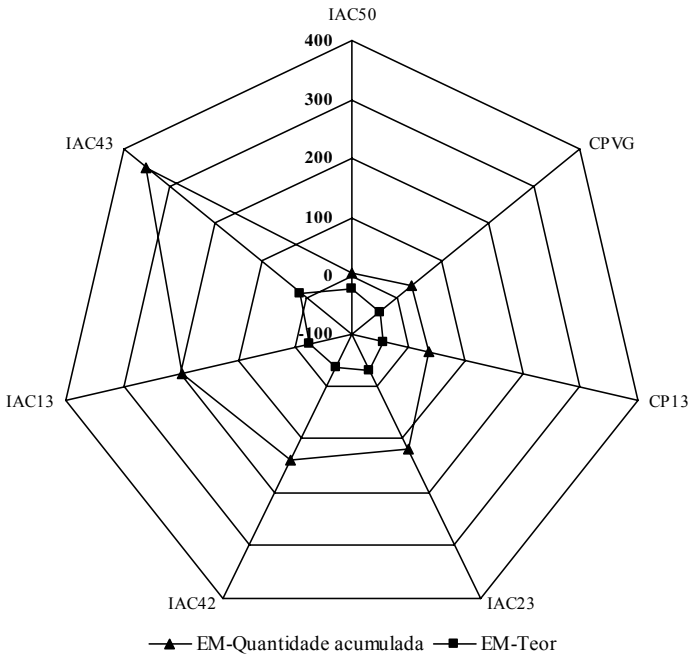


Figura 19. Determinação da eficiência micorrízica em relação ao teor e quantidade acumulada de esteviosídeos na matéria seca de folhas de estévia.

Legenda: IAC 50 = *Glomus macrocarpum*; CPVG = Provável *Glomus* sp.; CP13 = Provável *Acaulospora* sp.; IAC23 = *Entrophospora* sp.; IAC42 = *Glomus etunicatum*; IAC13 = *Acaulospora* sp.; IAC43 = *Glomus intraradices*.

A taxa de colonização do sistema radicular de estévia pelos fungos MA (Figura 20) esteve acima de 50% para a maioria dos fungos estudados, não diferindo estatisticamente entre si, exceto para *G. macrocarpum* (IAC50) que apresentou uma taxa de 27% não diferindo do controle (0%).

Trabalhos conduzidos com plantas medicinais ainda são poucos, se comparados às plantas de maior valor econômico, entretanto a maioria deles tem demonstrado a eficiência da micorriza no desenvolvimento da cultura e na concentração dos princípios ativos, como visto na revisão bibliográfica.

É interessante observar que os isolados de estévia (CP13 e CPVG), naturalmente estabelecidos nas raízes das plantas cultivadas no campo experimental do CPQBA, são hábeis na colonização do sistema radicular dessas plantas, entretanto, a contrapartida em termos de biomassa e principalmente na concentração de esteviosídeos foi muito limitada.

Os resultados demonstraram que o emprego de fungos micorrízicos pode aumentar significativamente a produção de biomassa e a concentração de esteviosídeos, e que os fungos

naturalmente estabelecidos na cultura podem não ser os mais eficientes para o desenvolvimento da cultura.

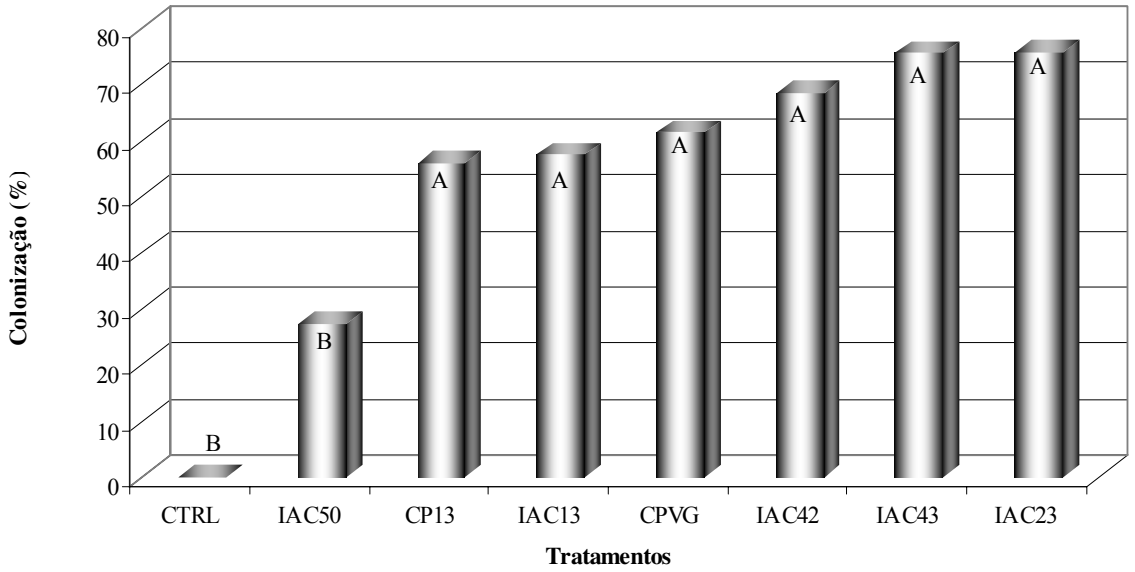


Figura 20. Valores de porcentagem de colonização radicular de estévia por fungos MA

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.
Legenda: CTRL = Controle não inoculado; IAC 50 = *Glomus macrocarpum*; CP13 = Provável *Acaulospora* sp.; IAC13 = *Acaulospora* sp.; CPVG = Provável *Glomus* sp.; IAC42 = *Glomus etunicatum*; IAC43 = *Glomus intraradices*; IAC23 = *Entrophospora* sp.

Na Figura 21 é possível visualizar detalhes da colonização micorrízica nas raízes de estévia, enquanto na Figura 22 tem-se uma visão geral das plantas que foram inoculadas com os fungos MA em relação ao controle, como também dos tratamentos inoculados com *Glomus intraradices* e com o isolado CPVG em relação ao controle.

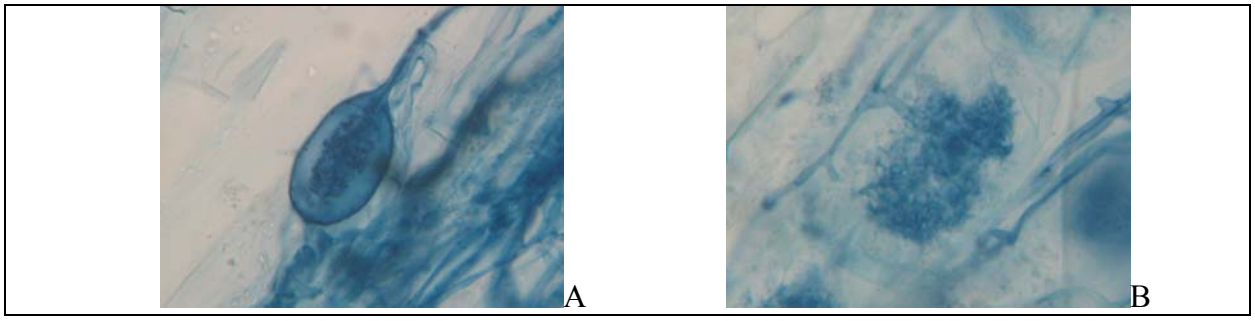


Figura 21. Colonização micorrízica na raíz de estévia. *Entrophospora* sp. (IAC23) – detalhe de vesícula (A); *Glomus etunicatum* (IAC42) – detalhe de um arbúsculo (B).

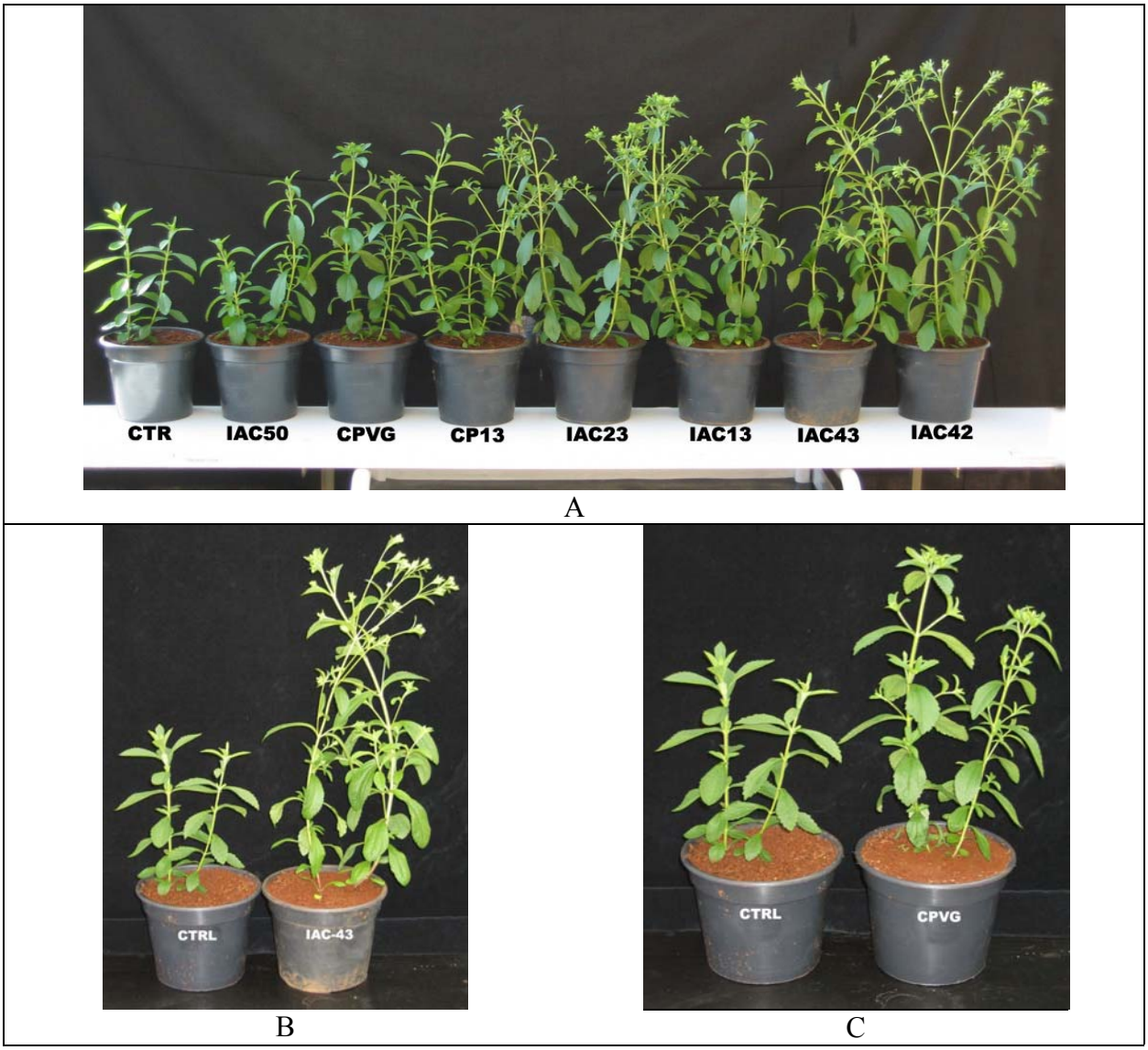


Figura 22. Desenvolvimento da cultura no momento da colheita. Visão geral dos tratamentos (A); controle x *G. intraradices* (IAC43) (B) e controle x CPVG (C).

4.3 Influência de fungos micorrízicos arbusculares e sistemas de cultivos na produção de biomassa e concentração de esteviosídeos em estévia.

Os resultados destes ensaios serão apresentados de acordo com o sistema de cultivo empregado e ao final, uma análise comparativa entre os mesmos.

Na Tabela 10 estão demonstrados os resultados da análise química do substrato.

Tabela 10. Resultados da análise química do substrato Eucatex Rendmax Citrus sem adubação.

Determinações	ERCSA	Determinações	ERCSA
pH	6,1	B - mg L^{-1}	0,05
C.E. dS m^{-1}	0,1	Cu - mg L^{-1}	0,06
N – Amônio - mg L^{-1}	10,5	Fé - mg L^{-1}	15,6
N – Nitrato - mg L^{-1}	0,9	Mn - mg L^{-1}	0,04
P – mg L^{-1}	0,8	Zn - mg L^{-1}	0,05
K – mg L^{-1}	10,3	Cl - mg L^{-1}	6,4
Na - mg L^{-1}	2,1	Umidade %	51,8
Ca - mg L^{-1}	1,0	Carbono orgânico – g kg^{-1}	405,9
Mg - mg L^{-1}	0,5	N – g kg^{-1}	5,5
S - mg L^{-1}	2,5	Relação C/N	73,8

Método de extração: 1:1,5 (Holanda). Métodos de determinação: N-(amoniacal e nitrato): destilação; Al, B K,Ca,Mg,P,S,Cu,Fe, Mn, Zn: ICP-OES; C orgânico: Walkley-Black; Nitrogênio total: Kjeldahl; Cl: eletrodo de íon seletivo.

Na avaliação das mudas de estévia quanto à colonização micorrízica, não se observou desenvolvimento de colonização micorrízica nas mudas não inoculadas. As mudas inoculadas apresentaram colonização média de 60,7 ± 8,93% (mínima = 39,4%; máxima = 80,1%; desvio padrão = 19,96%).

A Tabela 11 mostra os resultados da análise química de dois lotes do mesmo substrato. É possível visualizar diferenças acentuadas entre os mesmos, principalmente com relação ao carbono orgânico, relação C/N, fósforo (P) e também em relação aos outros nutrientes, macro e micro, como ferro (Fe), por exemplo. Essas diferenças podem ser devidas às variações na origem da matéria prima e ao próprio processo de compostagem da casca.

Isto poderia explicar a variação nos resultados de colonização micorrízica, de 39,4 a 80,1%, das mudas de estévia, produzidas para este experimento, com a utilização do lote 2 do substrato ERCSA.

Uma outra possibilidade, para explicar esta variação, poderia ser a variabilidade genética da estévia, entretanto ao analisarem-se os resultados do ensaio de seleção de fungos micorrízicos, a colonização por *G. intraradices* foi de 75,56 ± 1,59 (mínima = 71,0%; máxima

= 79,2%; desvio padrão = 3,55%), mostrando que, apesar dessa variabilidade genética, este não tenha sido o principal fator.

Este resultado reforça a necessidade de se estabelecer um padrão para os substratos destinados à produção de mudas inoculadas com fungos MA. Estes substratos deveriam ser produzidos a partir de matérias primas homogêneas, e que a variação em suas propriedades físico-químicas seja a menor possível dentro e entre os lotes de produção.

Tabela 11. Comparação entre os resultados da análise química de dois lotes do substrato ERCSA.

Determinações	**Substratos**	
	ERCSA – Lote 1 (*)	**ERCSA – Lote 2 (**)**
pH	5,8	6,1
C.E. dS m^{-1}	0,22	0,1
N – Amônio mg L^{-1}	1,2	10,5
N – Nitrato mg L^{-1}	0,3	0,9
P – mg L^{-1}	0,3	0,8
K – mg L^{-1}	28	10,3
Na - mg L^{-1}	10,7	2,1
Ca - mg L^{-1}	3,7	1,0
Mg - mg L^{-1}	1,9	0,5
S - mg L^{-1}	1,6	2,5
Al - mg L^{-1}	1,2	-
B - mg L^{-1}	0,03	0,05
Cu - mg L^{-1}	0,02	0,06
Fe - mg L^{-1}	0,8	15,6
Mn - mg L^{-1}	0,01	0,04
Zn - mg L^{-1}	0,01	0,05
Cl - mg L^{-1}	46,86	6,4
Umidade %	46,4	51,8
C.org. – g kg^{-1}	309,8	405,9
N – g kg^{-1}	6,9	5,5
Relação C/N	45	73,8

(*) ERCSA – Rendmax Citrus sem adubação - Lote 1: Substrato utilizado no experimento de seleção de substratos para fungos micorrízicos. (**) ERCSA – Rendmax Citrus sem adubação - Lote 2: Substrato utilizado para produção de mudas deste experimento.

4.3.1 Ensaio de hidroponia

A Tabela 12 mostra os valores de condutividade elétrica, temperatura e pH da solução nutritiva obtidos entre as colheitas.

Tabela 12. Valores de CE, temperatura e pH da solução nutritiva para o ensaio de hidroponia.

Épocas	CE (dS m^{-1})		temperatura (^oC)	pH	
	Inicial	Final	média	Inicial	Final
Entre transplante e 1ª colheita	1,50	1,10	26,7 ± 0,9	7,64	6,58
Entre 1ª e 2ª colheita	1,60	1,20	26,5 ± 0,4	7,36	6,87

Os resultados obtidos para todos os parâmetros analisados estão demonstrados na Tabela 13. A produção de MST e MSF não foi influenciada pela inoculação de *G. intraradices*, diferenças significativas foram observadas apenas na comparação entre as colheitas para o tratamento não inoculado.

O único parâmetro com aumento significativo pela inoculação do fungo MA foi teor de esteviosídeo na 2ª colheita. Para a quantidade acumulada este efeito foi mais pronunciado, apesar da diferença estatística ser observada apenas para média geral. Tanto na 1ª como 2ª colheita a quantidade acumulada de esteviosídeos nas plantas inoculadas foi 35 e 47% superior ao tratamento não inoculado, respectivamente. O teor de esteviosídeos foi significativamente superior na 1ª colheita em relação à 2ª (Tabela13).

Com os resultados obtidos constata-se que as plantas de estévia não se desenvolveram adequadamente neste sistema, inclusive com a perda da 3ª colheita. Provavelmente, a temperatura no interior da casa de vegetação, 49^{o}C em média às 15 horas, tenha sido um dos principais fatores responsáveis por este baixo desenvolvimento da cultura.

Não se observou colonização micorrízica para as plantas não inoculadas. As taxas de colonização para as plantas inoculadas não diferiram entre si na comparação entre as colheitas. Por outro lado, considerando que a colonização média das mudas de estévia foi de 37% e, no momento do transplante, era de 61%, nota-se que o desenvolvimento do fungo MA nas raízes também foi afetado pelas condições experimentais (Tabela 13).

Ainda que as condições experimentais pudessem ter interferido nos resultados, foi possível observar efeito da micorrização, com aumento de até 32% na MSF e de praticamente 50% de acúmulo de esteviosídeo, ambos na 2ª colheita (Figura 23).

Tabela 13. Produção de massa da matéria seca total da parte aérea (MST), massa da matéria seca de folhas (MSF), teor e acúmulo de esteviosídeos nas folhas e porcentagem de colonização radicular por *G. intraradices* em plantas de estévia cultivadas em hidroponia.

Parâmetros	Fungo micorrízico	Épocas de colheita		$\overline{X}$
		1ª Colheita	2ª Colheita	
MST/planta (g)	Inoculado	1,66	2,70	2,18
	Não Inoculado	1,33 B	2,15 A	1,74
	$\overline{X}$	1,49 B	2,42 A	
MSF/planta (g)	Inoculado	1,03	1,55	1,29
	Não Inoculado	0,84 B	1,18 A	1,01
	$\overline{X}$	0,93	1,36	
Esteviosídeo (%)	Inoculado	7,36 A	4,97 a B	6,16
	Não Inoculado	6,63 A	4,26 b B	5,45
	$\overline{X}$	6,99 A	4,62 B	
Esteviosídeo (mg/MSF/planta)	Inoculado	75,52	74,97	75,25 a
	Não Inoculado	55,97	50,94	53,10 b
	$\overline{X}$	65,75	62,60	
Colonização (%)	Inoculado	34,81	39,87	37,34
	Não Inoculado	--	--	--
	$\overline{X}$	--	--	--

Letras minúsculas referem-se à comparação entre Inoculado e Não Inoculado. Letras maiúsculas à comparação entre as colheitas. Médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

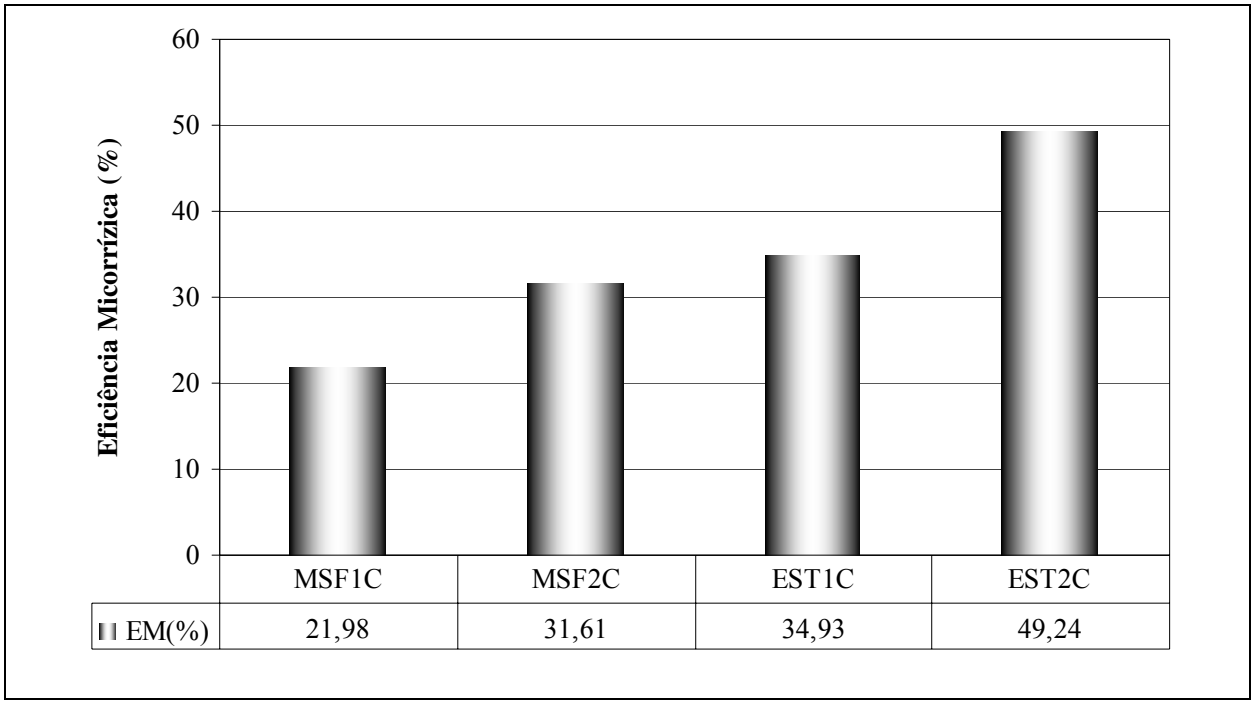


Figura 23. Eficiência micorrízica para matéria seca de folhas e quantidade acumulada de esteviosídeos nas duas colheitas.

Legenda: EM: eficiência micorrízica; MSF: massa seca de folhas; EST: esteviosídeos; 1C: 1ª colheita; 2C: 2ª colheita.

Imagens do ensaio e da colonização radicular da estévia por *G. intraradices*, podem ser vistas na Figura 24.

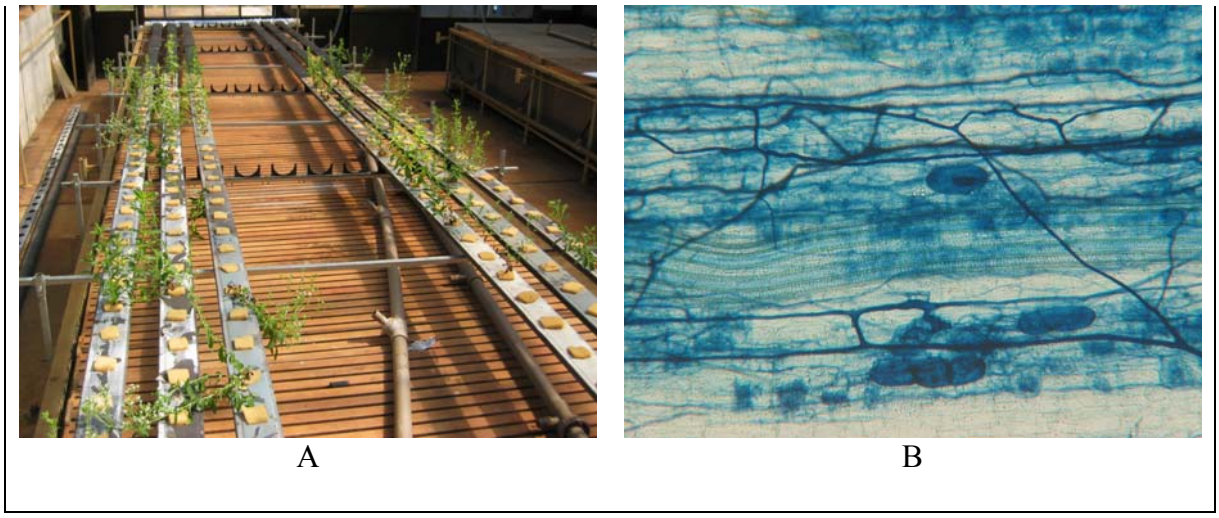


Figura 24. Imagens do experimento em casa de vegetação na época da 2ª colheita (A) e de um seguimento de raiz de estévia colonizado pelo fungo MA *G. intraradices* (B).

4.3.2 Ensaio de aeroponia

Da mesma forma que o sistema hidropônico esta solução era periodicamente monitorada quanto ao CE, temperatura e pH (Tabela 14). A cada colheita uma nova solução era preparada.

Tabela 14. Valores de CE, temperatura e pH da solução nutritiva para o ensaio de aeroponia.

Épocas	CE (dS m^{-1})		temperatura (^oC)	pH	
	Inicial	Final	Média	Inicial	Final
Entre transplante e 1ª colheita	1,60	0,90	25,2 ± 0,8	7,62	7,56
Entre 1ª e 2ª colheita	1,60	0,80	24,6 ± 0,2	7,58	8,10
Entre 2ª e 3ª colheita	1,70	1,10	26,3 ± 0,3	7,60	7,85

Na Tabela 15 estão descritos os resultados obtidos para todos os parâmetros analisados. A inoculação por *G. intraradices* não resultou em efeito significativamente positivo para o desenvolvimento da planta em termos de MST, MSF e concentração ou quantidade acumulada de esteviosídeos.

Diferenças estatísticas foram observadas na comparação entre as épocas de colheitas. A produtividade média em termos de MST ou MSF, das plantas na 1ª colheita foi significativamente inferior em relação às colheitas subseqüentes. Essas diferenças se repetiram para as plantas inoculadas ou não com o fungo, exceto para MSF de plantas inoculadas, não se observando diferenças estatísticas entre as colheitas. Os maiores valores de MST e MSF foram obtidos na 2ª colheita com plantas inoculadas com o fungo MA, 12,05 e 6,03g, respectivamente (Tabela 15).

Tabela 15. Produção de massa da matéria seca total da parte aérea (MST), massa da matéria seca de folhas (MSF), teor e acúmulo de esteviosídeos nas folhas e porcentagem de colonização radicular por *G. intraradices* em plantas de estévia cultivadas em aeroponia.

Parâmetros	Fungo micorrízico	Épocas de colheita			$\overline{X}$
		1ª Colheita	2ª Colheita	3ª Colheita	
MST/planta (g)	Inoculado	6,15 B	12,50 A	9,10 AB	9,25
	Não Inoculado	5,00 B	11,22 A	11,48 A	9,23
	$\overline{X}$	5,57 B	11,86 A	10,29 A	
MSF/planta (g)	Inoculado	3,16	6,03	4,79	4,66
	Não Inoculado	2,50 B	5,24 A	5,13 A	4,29
	$\overline{X}$	2,83 B	5,63 A	4,96 A	
Esteviosídeo (%)	Inoculado	7,78 A	4,43 B	5,03 B	5,75
	Não Inoculado	8,44 A	4,80 B	5,25 B	6,16
	$\overline{X}$	8,11 A	4,61 B	5,14 B	
Esteviosídeo (mg/MSF/planta)	Inoculado	245,32	264,89	231,94	247,38
	Não Inoculado	210,61	252,33	269,86	244,27
	$\overline{X}$	227,96	258,61	250,90	
Colonização (%)	Inoculado	44,00	51,05	43,01	46,02
	Não Inoculado	--	--	--	--
	$\overline{X}$	--	--	--	--

Letras maiúsculas referem-se à comparação entre as colheitas. Médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

O teor de esteviosídeos foi superior para as plantas na 1ª colheita, inoculadas ou não, diferindo estatisticamente para as outras duas colheitas. Entretanto a quantidade acumulada de esteviosídeos nas folhas apresentou valores próximos, ao longo do experimento, não diferindo estatisticamente entre si (Tabela 15).

Plantas não inoculadas não apresentaram colonização micorrízica. Não foram observadas diferenças estatísticas para colonização fúngica das plantas inoculadas entre as colheitas. A taxa média de colonização do sistema radicular das plantas de estévia inoculadas foi de 46% (Tabela 15). Diferentemente do que foi observado para o sistema hidropônico, este valor inferior, ao das mudas no momento do transplante, deve-se ao desenvolvimento radicular destas plantas, muito superior ao das plantas em hidroponia (Figura 25).

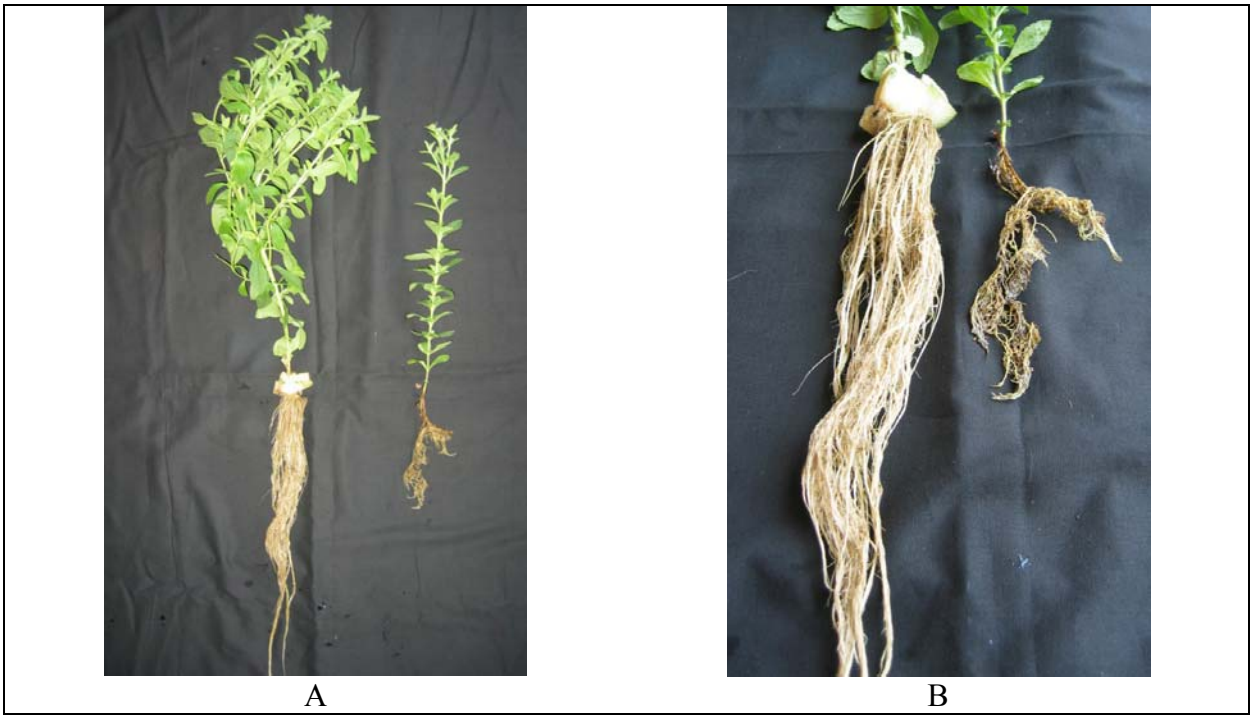


Figura 25. Comparação entre plantas de estévia (1ª colheita) cultivadas em aeroponia (esquerda) e hidroponia (direita) (A). Detalhe do desenvolvimento do sistema radicular (aeroponia – esquerda; hidroponia – direita) (B).

A EM para massa da matéria seca de folhas e quantidade acumulada de esteviosídeos foi decaindo ao longo do cultivo, sendo positivas nas duas primeiras colheitas e negativa na última colheita, com saldo positivo no cômputo geral (Figura 26).

Uma possível explicação poderia estar em uma característica da planta denominada vivaz, em que após o corte seu sistema radicular, praticamente definido, teria condições de propiciar adequadamente o desenvolvimento da planta, diminuindo a influência do fungo MA. Uma outra possibilidade poderia estar no próprio fungo micorrízico, que após o corte da planta é induzido a direcionar seu metabolismo na produção de esporos, por meio da utilização das reservas acumuladas nas vesículas, diminuindo, desta forma, sua eficiência na absorção e na troca de nutrientes com a planta hospedeira.

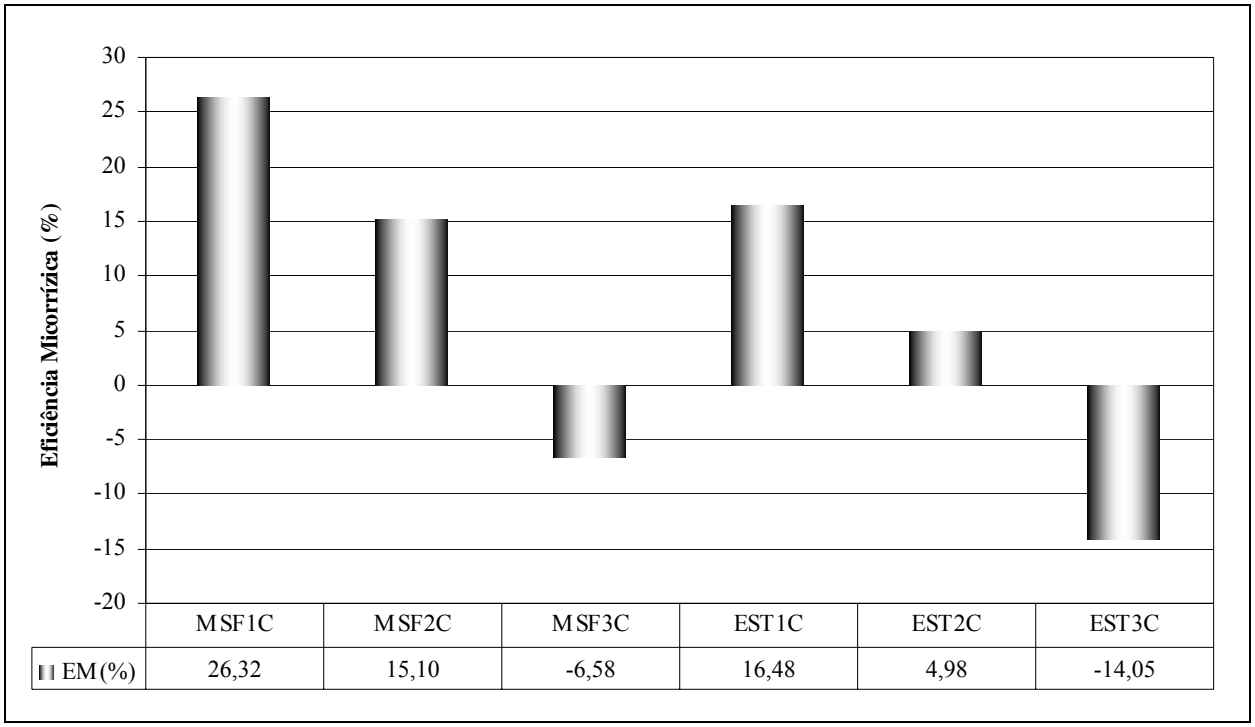


Figura 26. Eficiência micorrízica para matéria seca de folhas e quantidade acumulada de esteviosídeos nas três colheitas.

Legenda: EM: eficiência micorrízica; MSF: matéria seca de folhas; EST: esteviosídeos; 1C: 1ª colheita; 2C: 2ª colheita; 3C: 3ª colheita.

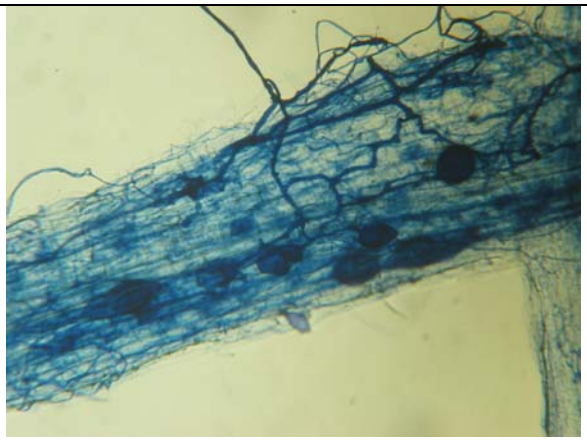
As Figuras 27 e 28 mostram imagens do cultivo aeropônico com detalhe do sistema radicular no interior da caixa e da colonização das raízes da estévia por *G. intraradices* durante o transcorrer do experimento, respectivamente.

A

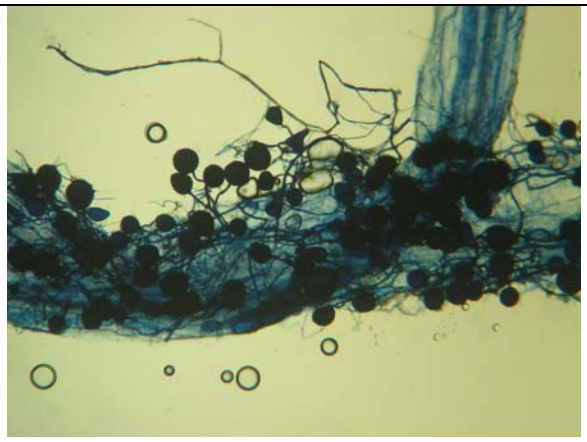
B

C

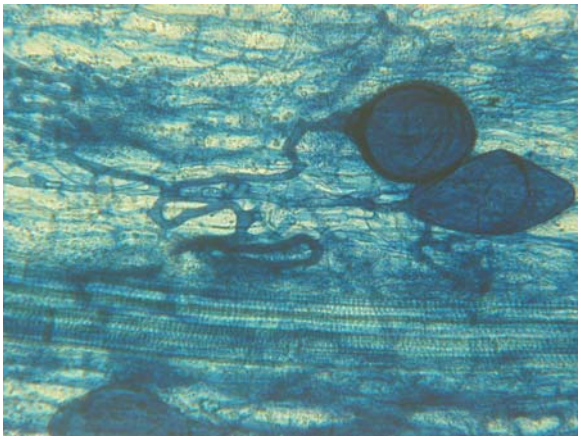
Figura 27. Imagens do experimento de aeroponia na 1ª colheita (A), 2ª colheita (B) e detalhe das raízes quando da 1ª colheita (C).



Hifas e vesículas – 1ª colheita



Formação de esporos – 1ª colheita



Hifas e vesículas - 2ª colheita

Formação de esporos – 2ª colheita

Figura 28. Detalhes da colonização micorrízica por *Glomus intraradices* em raízes de estévia durante o transcorrer do ensaio de aeroponia.

4.3.3 Ensaio de campo

A Tabela 16 mostra os resultados da análise química do solo.

Tabela 16. Análise química do solo da área do ensaio. Análise realizada pelo Instituto Agronômico de Campinas.

Sigla	Descrição	Unidade	Amostra Solo	Sigla	Descrição	Unidade	Amostra Solo
M.O.	Matéria Orgânica	g dm^{-3}	46	**CTC**	Cap. Tr. Cat.	$mmol_c$ dm^{-3}	93,6
pH	Solução $CaCl_2$		4,9	**V**	Sat. Bases	%	50
P	Fósforo resina	mg dm^{-3}	14	**B**	Boro	mg dm^{-3}	0,34
K	Potássio	$mmol_c$ dm^{-3}	2,6	**Cu**	Cobre	mg dm^{-3}	7,7
Ca	Cálcio	$mmol_c$ dm^{-3}	29	**Fe**	Ferro	mg dm^{-3}	35
Mg	Magnésio	$mmol_c$ dm^{-3}	15	**Mn**	Manganês	mg dm^{-3}	29,4
H+Al	Acidez Potencial	$mmol_c$ dm^{-3}	47	**Zn**	Zinco	mg dm^{-3}	1,1
S.B.	Soma Bases	$mmol_c$ dm^{-3}	46,6				

Método de extração: 1:1,5 (Holanda). Métodos de determinação: N-(amoniacal e nitrato): destilação; Al,B,K,Ca,Mg,P,S,Cu,Fe, Mn, Zn: ICP-OES; C orgânico: Walkley-Black; Nitrogênio total: Kjeldahl.

Os resultados para os parâmetros analisados no ensaio de campo estão demonstrados na Tabela 17. Efeito devido à inoculação de *G. intraradices* foi observado apenas para a 1ª colheita, com aumento significativo na produção de MST, MSF e acúmulo de esteviosídeos nas folhas de estévia.

Na comparação entre as colheitas, aumentos significativos na produção de MST e MSF foram observados na 2ª e 3ª colheitas em relação à 1ª, com incremento superior a 300% em média (Tabela 17).

Tabela 17. Produção de massa da matéria seca total da parte aérea (MST), massa da matéria seca de folhas (MSF), teor e acúmulo de esteviosídeos nas folhas e porcentagem de colonização radicular por *G. intraradices* em plantas de estévia cultivadas em campo.

Parâmetros	Fungo micorrízico	Épocas de colheita			$\overline{X}$
		1ª Colheita	2ª Colheita	3ª Colheita	
MST/planta (g)	Inoculado	2,78 a B	8,05 A	9,24 A	6,69
	Não Inoculado	2,08 b B	9,11 A	8,99 A	6,73
	$\overline{X}$	2,43 B	8,58 A	9,11 A	
MSF/planta (g)	Inoculado	1,88 aB	4,94 A	5,19 A	4,00
	Não Inoculado	1,41 bB	5,42 A	4,92 A	3,91
	$\overline{X}$	1,65 B	5,18 A	5,05 A	
Esteviosídeo (%)	Inoculado	9,32 A	9,23 A	4,95 B	7,85
	Não Inoculado	9,39 A	9,11 A	4,88 B	7,79
	$\overline{X}$	9,36 A	9,19 A	4,92 B	
Esteviosídeo (mg/MSF/planta)	Inoculado	175,09 aB	455,31 A	254,36 B	294,92
	Não Inoculado	132,01 bC	494,35 A	239,96 B	288,77
	$\overline{X}$	153,55 C	474,83 A	247,16 B	
Colonização (%)	Inoculado	78,07 aA	73,72 aA	40,08 B	63,96 a
	Não Inoculado	16,95 bB	36,90 bA	33,36 A	29,07 b
	$\overline{X}$	47,51	55,31	36,72	

Letras minúsculas referem-se à comparação entre Inoculado e Não Inoculado. Letras maiúsculas à comparação entre as colheitas. Médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

O teor de esteviosídeos nas folhas de estévia foi significativamente inferior na 3ª colheita em relação às duas primeiras (Tabela 17). Para quantidade acumulada o valor médio obtido na 2ª colheita foi, praticamente, o dobro quando comparado com a 3ª colheita e o triplo em relação à 1ª, diferindo estatisticamente de ambos. Os menores valores obtidos foram na 1ª colheita, diferindo estatisticamente das outras duas, exceto para o tratamento inoculado em relação à 3ª colheita. Diferença significativa devido à inoculação do fungo MA foi observada apenas na 1ª colheita (Tabela 17).

É interessante observar que a queda na quantidade acumulada de esteviosídeos na 3ª colheita em relação à 2ª, apesar de não ter havido diferenças significativas na produção de MSF, isto pode ser devido ao domínio da colonização radicular pelos fungos micorrízicos nativos, que se mostraram ineficientes de acordo com o ensaio de seleção de fungos.

Em relação ao desenvolvimento do fungo MA no sistema radicular da estévia, para o tratamento inoculado, observou-se que a taxa de colonização manteve-se estável entre a 1ª e 2ª colheita, decaindo significativamente na 3ª colheita. Comportamento inverso foi obtido com o tratamento não inoculado. Diferenças significativas também foram observadas entre os tratamentos de inoculação, com valor de colonização significativamente superior para o tratamento inoculado, em relação ao não inoculado, até a 2ª colheita (Tabela 17).

A análise da EM (Figura 29), neste caso, procurou avaliar o efeito da introdução do fungo *G. intraradices* em relação à população nativa de fungos micorrízicos tanto para matéria seca de folhas, quanto para a quantidade acumulada de esteviosídeos, observando-se ganhos relativamente altos na 1ª colheita, mas que declinaram ao longo do ensaio, sendo negativo na 2ª colheita e positivo ao final do experimento. No cômputo geral a EM foi positiva para os parâmetros analisados.

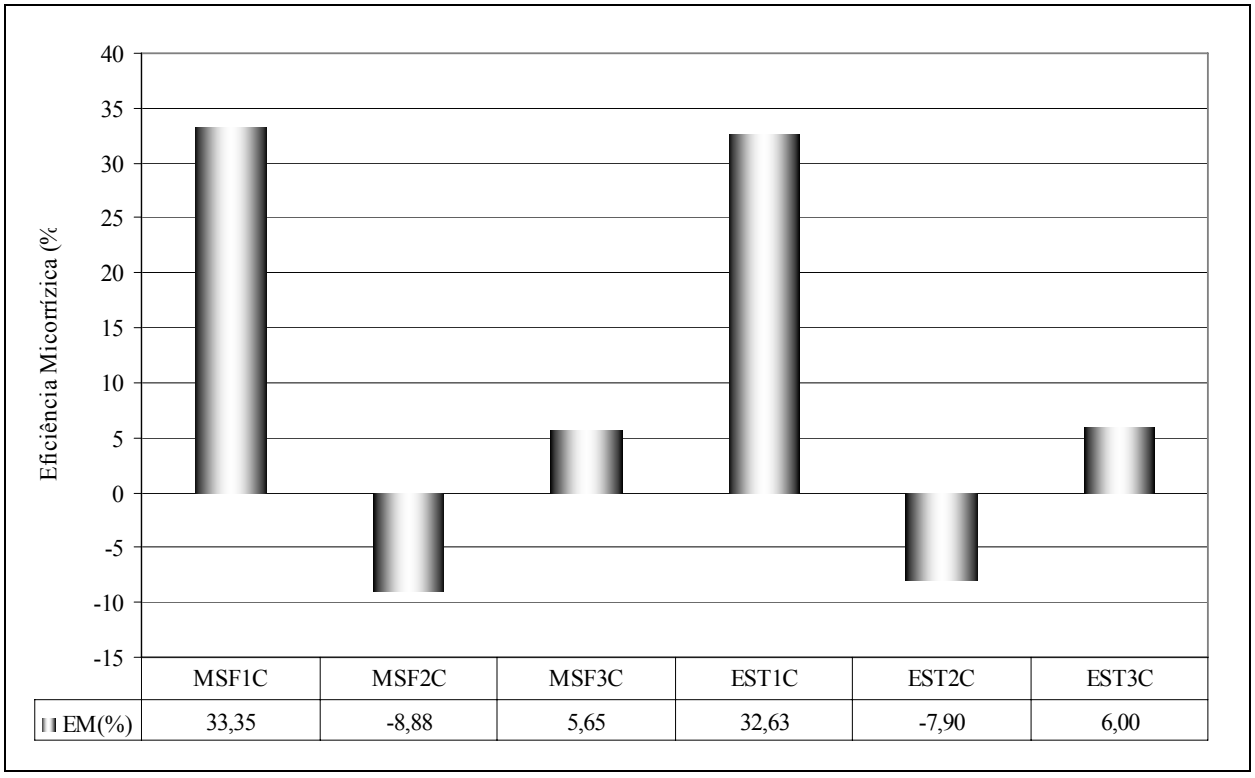


Figura 29. Eficiência micorrízica para matéria seca de folhas e quantidade acumulada de esteviosídeos nas duas colheitas

Legenda: EM: eficiência micorrízica; MSF: matéria seca de folhas; EST: esteviosídeos; 1C: 1ª colheita; 2C: 2ª colheita; 3C: 3ª colheita.

Neste caso, a queda observada na EM pode ser devido à capacidade infectiva dos fungos micorrízicos nativos, associada às observações feitas para o cultivo em aeroponia.

A Figura 30 mostra o desenvolvimento da cultura na época das três colheitas e também o desenvolvimento da colonização micorrízica nas raízes.

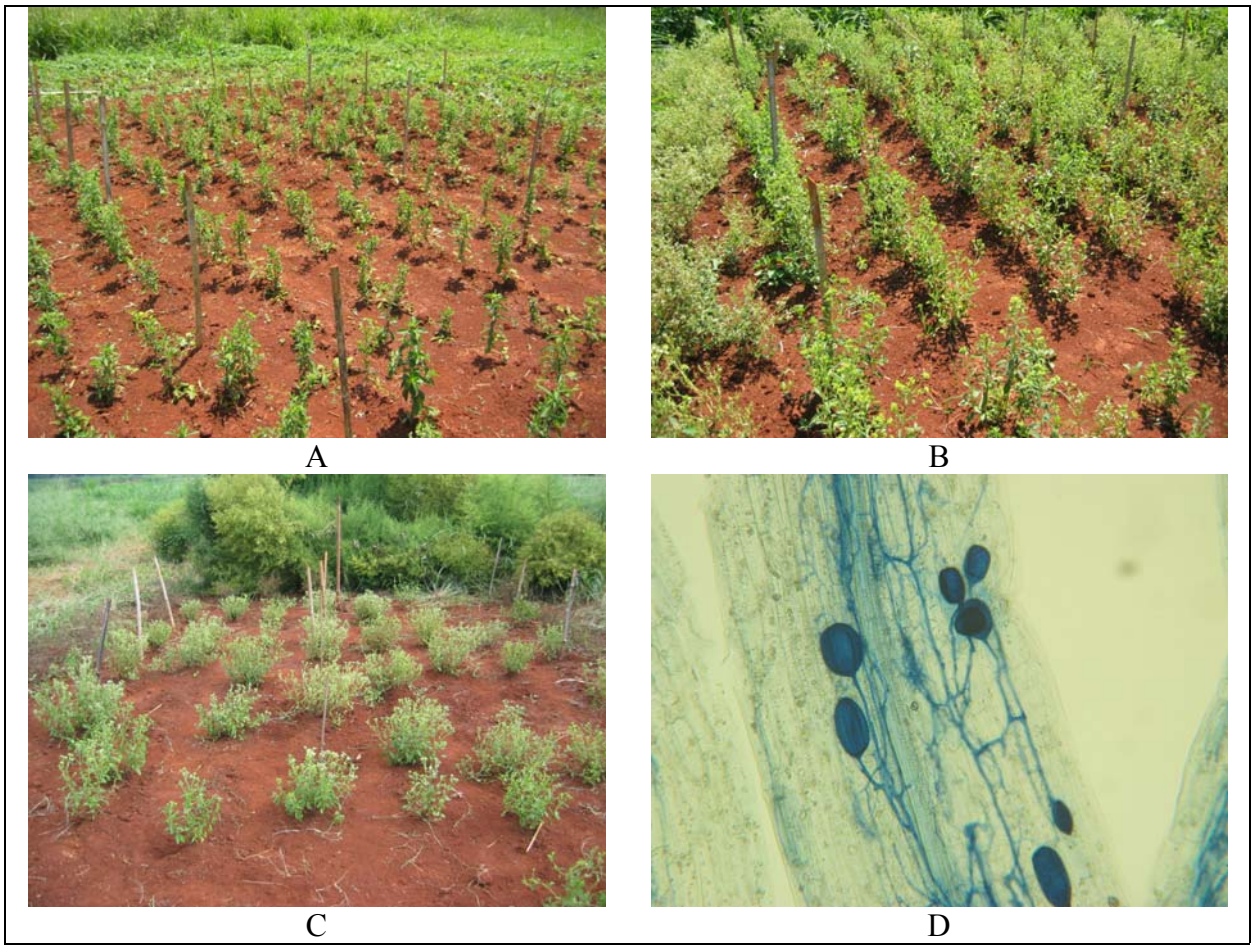


Figura 30. Vista geral do ensaio de campo na época das colheitas, 1ª (A), 2ª (B) e 3ª (C). Colonização micorrízica nas raízes de estévia, 1ª colheita-tratamento inoculado com *G. intraradices* (D).

4.3.4 Ensaio com vasos em casa de vegetação

A Tabela 18 mostra os resultados da análise química do solo após a calagem.

Tabela 18. Análise química do solo utilizado no ensaio. Análise realizada pelo Instituto Agronômico de Campinas.

Sigla	Descrição	Unidade	Amostra Solo	Sigla	Descrição	Unidade	Amostra Solo
M.O.	Matéria Orgânica	g dm^{-3}	41	**CTC**	Cap. Tr. Cat.	$mmol_c\, dm^{-3}$	112,5
pH	Solução $CaCl_2$		5,2	**V**	Sat. Bases	%	73
P	Fósforo resina	mg dm^{-3}	23	**B**	Boro	mg dm^{-3}	0,31
K	Potássio	$mmol_c\, dm^{-3}$	3,7	**Cu**	Cobre	mg dm^{-3}	8,2
Ca	Cálcio	$mmol_c\, dm^{-3}$	53	**Fe**	Ferro	mg dm^{-3}	23
Mg	Magnésio	$mmol_c\, dm^{-3}$	25	**Mn**	Manganês	mg dm^{-3}	26
H+Al	Acidez Potencial	$mmol_c\, dm^{-3}$	31	**Zn**	Zinco	mg dm^{-3}	2,0
S.B.	Soma Bases	$mmol_c\, dm^{-3}$	81,7				

Método de extração: 1:1,5 (Holanda). Métodos de determinação: N-(amoniacal e nitrato): destilação; Al,B,K,Ca,Mg,P,S,Cu,Fe, Mn, Zn: ICP-OES; C orgânico: Walkley-Black; Nitrogênio total: Kjeldahl.

Em virtude de doença fúngica na parte aérea das plantas, não foi possível obter o 3º corte do ensaio.

Na Tabela 19 estão demonstrados os resultados obtidos para massa da matéria seca total da parte aérea. Na comparação entre os tratamentos da 1ª colheita, o tratamento não inoculado em solo não esterilizado (NISNE), que estaria simulando as condições de campo, foi significativamente inferior ao tratamento inoculado em solo esterilizado (ISE), indicando a não eficiência dos fungos nativos para a cultura da estévia, pelo menos até a 1ª colheita. Estes resultados confirmam àqueles obtidos no ensaio de seleção de fungos, com os dois isolados (CP13 e CPVG) estando entre os menos eficientes.

Ainda na 1ª colheita (Tabela 19), a introdução do fungo *G. intraradices*, tratamento inoculado em solo não esterilizado (ISNE), permitiu um ganho de 93% na biomassa da parte

aérea em relação ao tratamento NISNE, por outro lado, mostrou uma queda de 40% em relação ao mesmo tratamento de inoculação em solo esterilizado (ISE), indicando relativa capacidade competitiva das populações micorrízicas nativas. Não foram observadas diferenças estatísticas em relação ao tratamento controle (NISE).

Em relação à 2ª colheita não foram observadas diferenças estatísticas entre os tratamentos. Entretanto, enquanto na primeira colheita a introdução do fungo *G. intraradices* propiciava ganhos em relação às populações fúngicas nativas, neste momento há uma inversão, com queda de 25% deste tratamento (ISNE) em relação ao tratamento NISNE. Isto provavelmente pode ser devido à variabilidade genética da cultura da estévia, principalmente com relação à rebrota.

Tabela 19. Efeito da inoculação ou não de *G. intraradices*, tratamento do solo (esterilizado ou não) e época de colheita, na produção de massa da matéria seca total da parte aérea – MST (g), de planas cultivadas em vasos na casa de vegetação.

Parâmetros	Tratamentos	Épocas de colheita		$\overline{X}$
		1ª Colheita	2ª Colheita	
MST/planta (g)	ISE	8,10 aB	12,30 A	10,20
	ISNE	4,81 ab	8,24	6,52
	NISE	5,82 ab	10,52	8,17
	NISNE	2,48 bB	11,08 A	6,78
	$\overline{X}$	5,30 B	10,53 A	

Letras minúsculas referem-se à comparação entre os tratamentos referente a cada parâmetro. Letras maiúsculas à comparação entre as colheitas. Médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.
Legenda: I – Inoculado com *G. intraradices*; NI – Não inoculado; SE – Solo esterilizado; SNE – Solo não esterilizado

Na comparação entre as médias (Tabela 34 - anexos) a MST foi significativamente superior para o tratamento inoculado em solo esterilizado em relação às plantas em solo não esterilizado. Diferenças significativas também foram observadas para a 2ª colheita em relação à 1ª colheita para plantas colonizadas ou não com o fungo micorrízico introduzido ou fungos nativos.

Os resultados obtidos para MSF estão demonstrados na Tabela 20 e repetem as mesmas observações feitas para MST, com diferenças estatísticas entre os tratamentos observadas apenas na 1ª colheita entre o tratamento ISE e NISNE e entre as colheitas, exceto para o tratamento ISNE.

Como descrito para MST os resultados da 1ª colheita mostram ganho de 46% pela introdução do fungo MA (ISNE) na comparação com o tratamento NISNE. Como as folhas são as matérias primas para obtenção de esteviosídeos este ganho na produtividade torna-se muito importante (Tabela 20).

Na 2ª colheita, a diferença entre as plantas inoculadas com *G. intraradices* em solo não esterilizado (ISNE) em relação às plantas não inoculadas em solo não esterilizado (NISNE) não é tão acentuada como àquela observada para MST, sendo menor que 10%.

Tabela 20. Efeito da inoculação ou não de *G. intraradices*, tratamento do solo (esterilizado ou não) e época de colheita, na produção de massa da matéria seca folhas – MSF (g) de estévia, de plantas cultivadas em vasos na casa de vegetação.

Parâmetros	Tratamentos	Épocas de colheita		$\overline{X}$
		1ª Colheita	2ª Colheita	
MSF/planta (g)	ISE	3,72 aB	5,31 A	4,52
	ISNE	2,42 ab	4,42	3,42
	NISE	2,88 abB	5,16 A	4,02
	NISNE	1,30 bB	4,86 A	3,08
	$\overline{X}$	2,58 B	4,94 A	

Letras minúsculas referem-se à comparação entre os tratamentos referente a cada parâmetro. Letras maiúsculas à comparação entre as colheitas. Médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.
Legenda: I – Inoculado com *G. intraradices*; NI – Não inoculado; SE – Solo esterilizado; SNE – Solo não esterilizado

Na comparação das médias (Tabela 35 - anexos), diferenças significativas para MSF foram observadas apenas em relação à época de colheita, com a 2ª colheita diferindo estatisticamente da 1ª para plantas colonizadas ou não com o fungo micorrízico introduzido ou fungos nativos.

A Tabela 21 mostra os resultados para teores de esteviosídeos presentes nas folhas de estévia. Observa-se que o tratamento que simula as condições de campo (NISNE) apresentou teores significativamente inferiores aos demais tratamentos, tanta para a 1ª como para 2ª colheita e na média geral. Neste caso a ineficiência dos fungos nativos torna-se ainda mais crítica, pois reflete diretamente no produto de interesse que são os esteviosídeos,

A introdução do fungo micorrízico *G. intraradices*, isoladamente (ISE) ou em competição com as populações nativas do solo (ISNE) foram significativamente superiores ao tratamento NISNE, para as duas épocas de colheita e na média geral. Entretanto foram

estatisticamente diferentes do tratamento controle (NISE), principalmente na 2ª colheita (Tabela 21).

Praticamente não foram observadas diferenças nos teores de esteviosídeos entre as colheitas, exceto para o tratamento ISE, com maior concentração na 2ª colheita em relação ã 1ª colheita, indicando a influência do fungo ainda no final do ensaio, e também o tratamento NISNE, com maior teor para a 1ª colheita em relação a 2ª colheita, neste caso devido ao efeito de diluição e concentração (Tabela 21).

Tabela 21. Efeito da inoculação ou não de *G. intraradices*, tratamento do solo (esterilizado ou não) e época de colheita, no teor de esteviosídeos (% m/m) em folhas estévia, de plantas cultivadas em vasos na casa de vegetação.

Parâmetros	Tratamentos	Épocas de colheita		$\overline{X}$
		1ª Colheita	2ª Colheita	
Esteviosídeo (%)	ISE	7,45 bB	8,43 bA	7,94 b
	ISNE	8,65 a	8,49 b	8,57 ab
	NISE	8,78 a	9,19 a	8,99 a
	NISNE	6,67 cA	5,58 cB	6,13 c
	$\overline{X}$	7,89	7,92	

Letras minúsculas referem-se à comparação entre os tratamentos referente a cada parâmetro. Letras maiúsculas à comparação entre as colheitas. Médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.
Legenda: I – Inoculado com *G. intraradices*; NI – Não inoculado; SE – Solo esterilizado; SNE – Solo não esterilizado

Na comparação das médias (Tabela 36 – anexos), observam-se resultados totalmente antagônicos para os tratamentos em solo esterilizado ou não, inoculado ou não. Os teores de esteviosídeos foram significativamente superiores para solo esterilizado em relação solo não esterilizado para o tratamento não inoculado e o inverso foi observado para o tratamento inoculado. Por outro lado, o tratamento inoculado foi significativamente superior ao não inoculado para solo não esterilizado, e o oposto foi observado para solo esterilizado. Não foram observadas diferenças para as épocas de colheita e tratamento de inoculação fúngica.

Efeito positivo da esterilização foi observado para o tratamento não inoculado e na 2ª colheita e efeito negativo para o tratamento inoculado. Na comparação entre as colheitas, o teor de esteviosídeos foi significativo apenas na 2ª colheita em solo esterilizado (Tabela 36).

Os resultados para acúmulo de esteviosídeos nas folhas de estévia estão demonstrados da Tabela 22.

Como era de se esperar, em vista dos resultados obtidos para MSF e teor de esteviosídeos, o tratamento NISNE mostrou valores de quantidade acumulada de esteviosídeos significativamente inferiores aos demais tratamentos, tanto para a 1ª como 2ª colheita, indicando a ineficiência dos fungos micorrízicos nativos (Tabela 22).

Observando-se os resultados da 1ª colheita, o ganho pela introdução do fungo MA (ISNE) chegou a 140% em comparação ao tratamento NISNE, enquanto que a perda pela competição com os fungos nativos (ISE x ISNE) foi de apenas 24%, indicando a eficiência da associação com *G. intraradices* para este parâmetro analisado (Tabela 22).

Estes resultados também confirmam os anteriormente obtidos para seleção de fungos (item 4.2) como também os estudos desenvolvidos no CPQBA com *Artemisia annua* (QUITÉRIO e PORTUGAL, 2005), mostrando a influência significativa do fungo MA para a quantidade acumulada de princípios ativos em plantas medicinais.

O acúmulo de esteviosídeos foi significativamente maior para as plantas da 2ª colheita em relação às da 1ª colheita, exceto para o tratamento ISNE (Tabela 22).

Tabela 22. Efeito da inoculação ou não de *G. intraradices*, tratamento do solo (esterilizado ou não) e época de colheita, na quantidade acumulada de esteviosídeos (mg/MSF/planta) em folhas de estévia, de plantas cultivadas em vasos na casa de vegetação.

Parâmetros	Tratamentos	Épocas de colheita		$\overline{X}$
		1ª Colheita	2ª Colheita	
Esteviosídeo (mg/MSF/planta)	ISE	275,88 aB	447,86 aA	361,87
	ISNE	208,03 ab	374,35 ab	291,19
	NISE	252,59 aB	474,44 aA	363,52
	NISNE	86,87 bB	271,42 bA	179,15
	$\overline{X}$	205,84 B	392,02 A	

Letras minúsculas referem-se à comparação entre os tratamentos referente a cada parâmetro. Letras maiúsculas à comparação entre as colheitas. Médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.
Legenda: I – Inoculado com *G. intraradices*; NI – Não inoculado; SE – Solo esterilizado; SNE – Solo não esterilizado

Diferenças significativas para acúmulo de esteviosídeos podem ser visualizadas na Tabela 37 (anexos), com diferenças entre o solo esterilizado em relação ao não esterilizado, para o tratamento não inoculado, e entre as épocas de colheita, independente da inoculação ou não do fungo MA.

O desenvolvimento da colonização micorrízica nas raízes da estévia pode ser visualizado na Tabela 23. Diferenças significativas dos tratamentos inoculados em relação aos

não inoculados são observados na 1ª colheita, não importando o tratamento do solo. Observa-se que a taxa de colonização do tratamento NISNE foi nula e que para o tratamento com *G. intraradices* (ISE), foi praticamente a mesma observada no ensaio de seleção de fungo, sendo significativamente positiva em relação aos fungos micorrízicos nativos do solo.

Existe uma tendência natural das taxas de colonização radicular por fungos MA se igualarem ao longo do tempo, e isto pode ser observado pelos resultados da 2ª colheita, exceto para o tratamento NISE que deveria ter uma taxa nula, mas apresentou pequena contaminação (Tabela 23). É importante salientar que apesar da colonização ser praticamente a mesma, a eficiência do fungo *G. intraradices* permaneceu, como pode ser observado nos resultados de quantidade acumulada de esteviosídeos na 2ª colheita.

A contaminação observada no tratamento NISE na 2ª colheita (Tabela 23), provavelmente pelo fungo *G. intraradices*, apesar de pequena e significativamente inferior às demais, poderia explicar o bom desenvolvimento das plantas e, principalmente, o acúmulo de esteviosídeos observado para este tratamento como observado na Tabela 22, refletindo, desta forma, nos baixos valores de EM que serão vistos adiante.

Tabela 23. Taxa de colonização (%) por *G. intraradices* em raízes de estévia, de acordo com o tratamento do solo (esterilizado ou não) e época de colheita, em plantas cultivadas em vasos na casa de vegetação.

Parâmetros	Tratamentos	Épocas de colheita		$\overline{X}$
		1ª Colheita	2ª Colheita	
Colonização (%)	ISE	69,90 a	73,13 a	71,52 a
	ISNE	82,08 a	74,82 a	78,45 a
	NISE	0,00 c	26,81 b	13,41 b
	NISNE	49,06 bB	72,88 aA	60,97 a
	$\overline{X}$	50,26	61,91	

Letras minúsculas referem-se à comparação entre os tratamentos referente a cada parâmetro. Letras maiúsculas à comparação entre as colheitas. Médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.
Legenda: I – Inoculado com *G. intraradices*; NI – Não inoculado; SE – Solo esterilizado; SNE – Solo não esterilizado

Na Tabela 38 (anexos) observa-se que a taxa de colonização foi significativamente superior para os tratamentos inoculados tanto para solo esterilizado quanto não esterilizado e também, quando da 1ª colheita.

Na Figura 31 estão demonstrados os resultados de EM para MSF e acúmulo de esteviosídeos. A eficiência da colonização micorrízica pode ser observada tanto para matéria

seca de folhas, quanto acúmulo de esteviosídeos, em solo esterilizado na 1ª colheita, enquanto que para o solo não esterilizado, na mesma colheita, os valores de EM passam a ser negativos, indicando a baixa eficiência dos fungos micorrízicos nativos. Na 2ª colheita esta eficiência praticamente inexiste, com a maioria dos valores de EM negativos, devido, principalmente, à contaminação do tratamento controle (NISE), e em parte, às mesmas observações feitas para o cultivo em aeroponia.

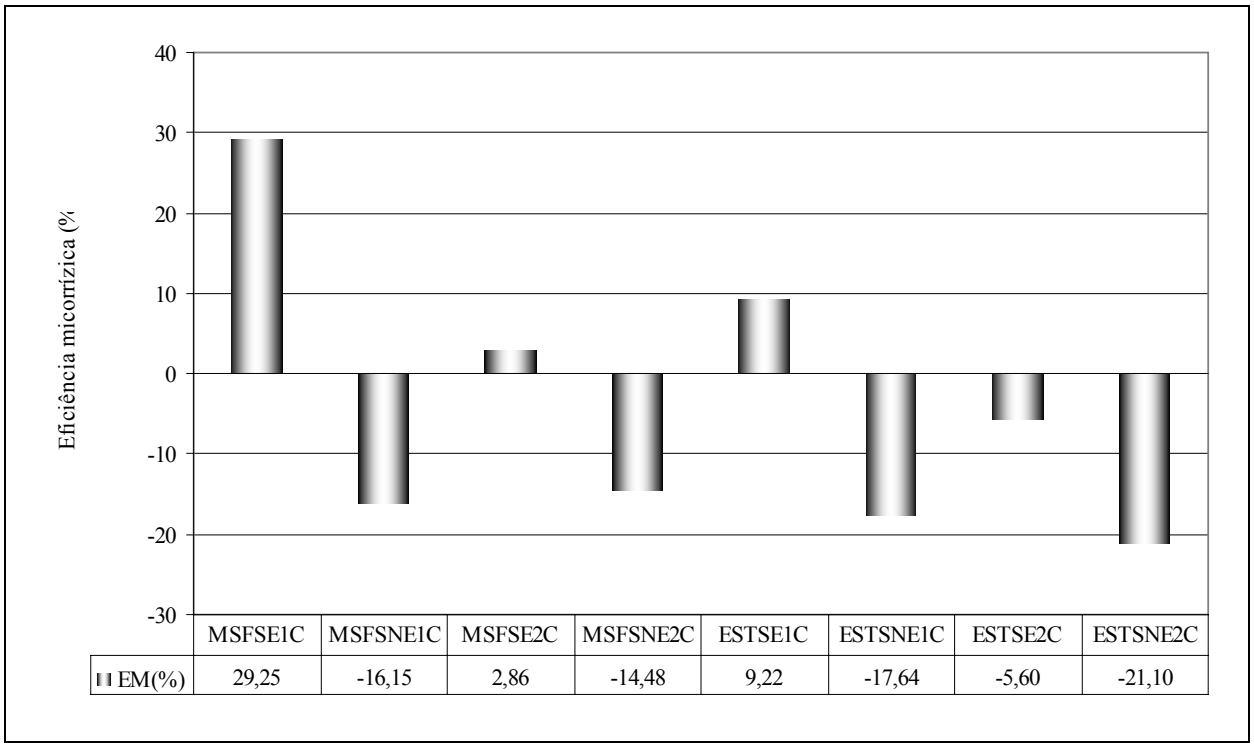
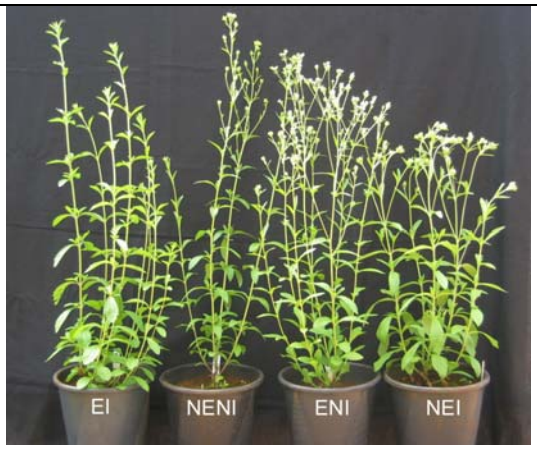


Figura 31. Eficiência micorrízica para matéria seca de folhas e quantidade acumulada de esteviosídeos para as duas colheitas nos dois tratamentos de solo.

Legenda: EM: eficiência micorrízica; MSF: matéria seca de folhas; EST: esteviosídeos; SE: solo esterilizado; SNE: solo não esterilizado; 1C: 1ª colheita; 2C: 2ª colheita.

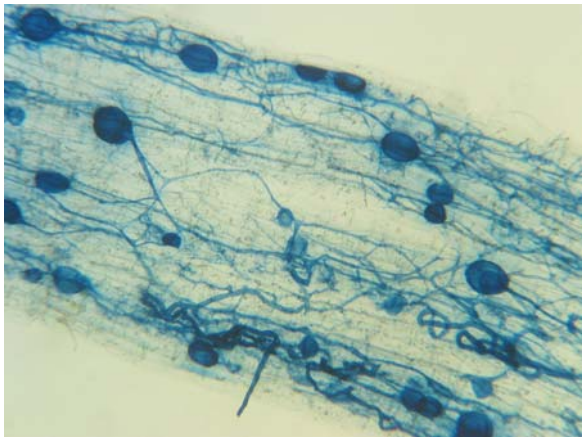
A Figura 32 mostra imagens do ensaio conduzido em casa de vegetação, comparação entre os tratamentos na época da 2ª colheita e do desenvolvimento do fungo micorrízico *G. intraradices* no sistema radicular da estévia.

Vista geral do ensaio na época da 1ª colheita

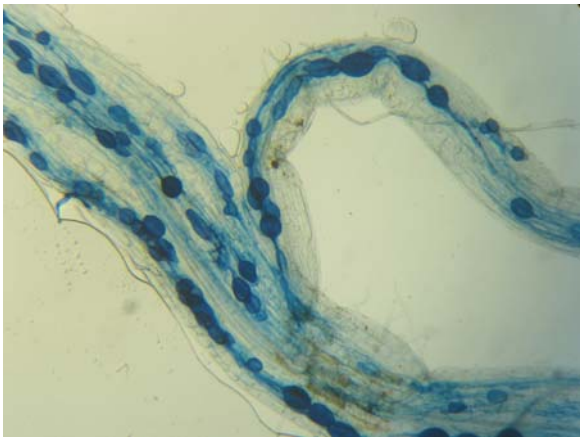


Comparação entre os tratamentos.

Legenda: EI - solo esterilizado e inoculado; NENI - solo não esterilizado e não inoculado; ENI - solo esterilizado e não inoculado; NEI - solo não esterilizado e inoculado.



Colonização radicular da estévia para o tratamento em solo não esterilizado e não inoculado na 1ª colheita.



Colonização radicular da estévia para o tratamento em solo não esterilizado e inoculado na 2ª colheita.

Figura 32. Imagens do experimento de vasos em casa de vegetação e da colonização do sistema radicular da estévia.

4.3.5 Análise comparativa dos sistemas de cultivo

Por serem sistemas distintos entre si, não foram aplicadas análises estatísticas, entretanto para a discussão dos resultados foram elaboradas tabelas com as médias e suas respectivas variações (desvio padrão), para cada um dos parâmetros avaliados. O experimento com vasos em casa de vegetação não foi considerado como sistema de cultivo e sim um controle de referência.

Diferenças acentuadas na produção de MST podem ser observadas na 1ª colheita, com maior produção do cultivo em aeroponia em relação aos demais sistemas de cultivo, hidropônico e campo, inoculados ou não. Na 2ª colheita observa-se uma recuperação do cultivo em campo, diminuindo a diferença em relação ao cultivo aeropônico, enquanto em hidroponia, apesar de um pequeno aumento de produção, continua apresentando os menores valores. Ao final do ensaio, 3ª colheita, não mais se observam diferenças entre o cultivo em aeroponia e campo (Tabela 24).

No computo geral, a produtividade média reflete o descrito acima, com o cultivo em aeroponia apresentando produção de MST superior ao cultivo hidropônico em 4,35 e 5,31 vezes, em média, na presença ou ausência do fungo MA, respectivamente. Enquanto o ganho em relação ao cultivo em campo foi de 1,40 vezes, independente da inoculação pelo fungo *G. intraradices* (Tabela 24).

Pode-se observar (Tabela 24) que os desvios padrões das médias aumentaram ao longo do experimento, isto pode ser devido em parte ao menor número de indivíduos que foram avaliados a cada colheita, ou em parte, à própria variabilidade genética da cultura, onde a capacidade de rebrota ainda é um fator importante a ser avaliado, quando de estudos de melhoramento genético.

Os resultados para MSF são demonstrados na Tabela 25. Da mesma forma como descrito para MST a principal diferença observada na 1ª colheita é em relação ao cultivo em aeroponia, com produção superior aos demais sistemas. Na 2ª colheita o sistema aeropônico apresentou produção superior ao cultivo em hidroponia, diferença que não se observa em relação ao cultivo em campo, tanto na 2ª quanto 3ª colheita.

Tabela 24. Produção de massa da matéria seca total da parte aérea – MST/planta (g), de plantas inoculadas ou não com *G. intraradices*, cultivadas em aeroponia, hidroponia, campo e vasos em casa de vegetação, nas diferentes épocas de colheita.

Fungo micorrízico	Sistemas de Cultivo	Época			$\overline{X}$
		1ª Colheita	2ª Colheita	3ª Colheita	
Inoculado	Aeroponia	6,150 ± 0,183	12,502 ± 0,644	9,096 ± 4,183	9,249 ± 3,473
	Hidroponia	1,657 ± 0,177	2,696 ± 1,317		2,176 ± 2,176
	Campo	2,776 ± 0,355	8,049 ± 1,804	9,237 ± 2,649	6,687 ± 3,379
	Vasos SE	8,103 ± 1,901	12,300 ± 2,085		10,201 ± 2,906
	Vasos SNE	4,808 ± 0,550	8,235 ± 2,949		6,521 ± 2,686
Não Inoculado	Aeroponia	4,997 ± 0,870	11,218 ± 1,663	11,479 ± 3,716	9,231 ± 3,799
	Hidroponia	1,328 ± 0.193	2,146 ± 0,415		1,737 ± 0,533
	Campo	2,075 ± 0,272	9,112 ± 1,230	8,989 ± 1,334	6,725 ± 3,542
	Vasos SE	5,818 ± 3,523	10,523 ± 2,550		8,170 ± 3,800
	Vasos SNE	2,480 ± 0,726	11,080 ± 1,986		6,780 ± 4,801

SE: Solo esterilizado; SNE: Solo não esterilizado.

Na média geral tanto o cultivo em aeroponia quanto campo apresentaram produção de MSF muito próximas, com ligeira tendência de maior produtividade para o cultivo em aeroponia, e superiores ao cultivo em sistema hidropônico. Os desvios padrões das médias, da mesma foram como descrito acima para MST, seguem a mesma tendência de aumento com o transcorrer do experimento (Tabela 25).

Os teores de esteviosídeos determinados nas folhas de estévia estão demonstrados na Tabela 26. Neste parâmetro os maiores teores foram observados no cultivo em campo, com plantas inoculadas com *G. intraradices* ou não, tanto para a 1ª como 2ª colheitas. Valores obtidos para o cultivo em hidroponia, próximos aos de aeroponia, podem ser atribuídos ao efeito de diluição e concentração.

Na 2ª colheita, observou-se que os teores de esteviosídeos, para as plantas cultivadas em aeroponia, inoculadas ou não com fungo MA, apresentaram uma queda de aproximadamente 43% em relação à 1ª colheita (Tabela 26), enquanto que a MSF, praticamente dobrou (Tabela 25), nas mesmas condições, indicando, novamente, o efeito de diluição e concentração.

Tabela 25. Produção de massa da matéria seca de folhas – MSF/planta (g), de plantas inoculadas ou não com *G. intraradices*, cultivadas em aeroponia, hidroponia, campo e vasos em casa de vegetação, nas diferentes épocas de colheita.

Fungo micorrízico	Sistemas de Cultivo	Época			$\overline{X}$
		1ª Colheita	2ª Colheita	3ª Colheita	
Inoculado	Aeroponia	3,159 ± 0,285	6,027 ± 0,685	4,789 ± 2,132	4,658 ± 1,681
	Hidroponia	1,025 ± 0,120	1,551 ± 0,728		1,288 ± 0,548
	Campo	1,882 ± 0,240	4,935 ± 1,073	5,190 ± 1,501	4,002 ± 1,846
	Vasos SE	3,723 ± 0,879	5,310 ± 0,559		4,516 ± 1,089
	Vasos SNE	2,415 ± 0,434	4,415 ± 1,953		3,415 ± 1,690
Não Inoculado	Aeroponia	2,501 ± 0,512	5,236 ± 0,310	5,126 ± 1,208	4,288 ± 1,501
	Hidroponia	0,840 ± 0,111	1,178 ± 0,149		1,009 ± 0,219
	Campo	1,411 ± 0,178	5,416 ± 0,663	5,051 ± 0,926	3,959 ± 1,944
	Vasos SE	2,880 ± 1,606	5,163 ± 0,917		4,021 ± 1,719
	Vasos SNE	1,303 ± 0,327	4,860 ± 0,720		3,081 ± 1,971

SE: Solo esterilizado; SNE: Solo não esterilizado.

Na média geral há uma tendência das plantas cultivadas no campo apresentarem maiores teores, entretanto os valores de desvios padrões, para esta condição, foram os mais acentuados (Tabela 26). Ainda com relação aos desvios padrões das médias, estes estiveram muito próximos entre si, para as três colheitas, e praticamente não variaram ao longo do ensaio, como descrito para MST e MSF.

Tabela 26. Teor de esteviosídeos (%), de plantas inoculadas ou não com *G. intraradices*, cultivadas em aeroponia, hidroponia, campo e vasos em casa de vegetação, nas diferentes épocas de colheita.

Fungo micorrízico	Sistemas de Cultivo	Época			$\overline{X}$
		1ª Colheita	2ª Colheita	3ª Colheita	
Inoculado	Aeroponia	7,783 ± 0,512	4,430 ± 0,594	5,027 ± 0,691	5,747 ± 1,635
	Hidroponia	7,360 ± 0,558	4,967 ± 0,423		6,163 ± 1,384
	Campo	9,320 ± 0,805	9,268 ± 0,334	4,952 ± 0,936	7,847 ± 2,226
	Vasos SE	7,450 ± 0,222	8,433 ± 0,069		7,941 ± 0,547
	Vasos SNE	8,645 ± 0,356	8,488 ± 0,050		8,566 ± 0,250
Não Inoculado	Aeroponia	8,437 ± 0,644	4,797 ± 1,289	5,253 ± 0,150	6,162 ± 1,864
	Hidroponia	6,627 ± 0,402	4,263 ± 0,121		5,445 ± 1,321
	Campo	9,392 ± 1,117	9,106 ± 0,434	4,916 ± 0,240	7,805 ± 2,233
	Vasos SE	8,783 ± 0,076	9,193 ± 0,550		8,988 ± 0,425
	Vasos SNE	6,673 ± 0,243	5,580 ± 0,199		6,126 ± 0,619

SE: Solo esterilizado; SNE: Solo não esterilizado.

Na Tabela 27 são visualizados os resultados para a quantidade acumulada de esteviosídeos nas folhas de estévia, de acordo com o sistema de cultivo.

Na 1ª colheita observa-se maior acúmulo de esteviosídeos nas plantas cultivadas em sistema aeropônico, com ou sem a inoculação do fungo MA, em relação aos demais sistemas de cultivo, principalmente o hidropônico, enquanto na 2ª colheita os maiores valores observados foram obtidos em plantas cultivadas no campo, independente da inoculação de *G. intraradices*, com diferença acentuada para o sistema hidropônico. Os valores de acúmulo de esteviosídeos na 3ª colheita foram praticamente iguais tanto para o cultivo em aeroponia como campo, independente da inoculação do fungo MA (Tabela 27).

Na média geral (Tabela 27) os resultados para o cultivo em campo e em aeroponia foram muito semelhantes e superiores ao sistema hidropônico de cultivo.

Da mesma forma como descrito para MST e MSF, os desvios padrões das médias aumentaram ao longo ensaio, principalmente para os sistemas que receberam a inoculação do fungo micorrízico *G. intraradices* (Tabela 27).

Tabela 27. Quantidade acumulada de esteviosídeos (mg/MSF/planta), de plantas inoculadas ou não com *G. intraradices*, cultivadas em aeroponia, hidroponia, campo e vasos em casa de vegetação, nas diferentes épocas de colheita.

Fungo micorrízico	Sistemas de Cultivo	Época			$\overline{X}$
		1ª Colheita	2ª Colheita	3ª Colheita	
Inoculado	Aeroponia	245,321 ± 20,012	264,888 ± 21,089	231,937 ± 74,289	247,382 ± 42,391
	Hidroponia	75,522 ± 11,335	74,972 ± 27,870		75,247 ± 19,031
	Campo	175,085 ± 24,672	455,311 ± 84,435	254,355 ± 73,561	294,917 ± 136,605
	Vasos SE	275,880 ± 56,242	447,861 ± 48,631		361,871 ± 104,019
	Vasos SNE	208,026 ± 31,707	374,350 ± 164,540		291,188 ± 141,201
Não Inoculado	Aeroponia	210,606 ± 42,861	252,329 ± 73,822	269,857 ± 68,353	244,264 ± 60,701
	Hidroponia	55,969 ± 10,562	50,236 ± 6,472		53,103 ± 8,440
	Campo	132,010 ± 18,434	474,829 ± 74,254	239,963 ± 49,464	282,267 ± 164,597
	Vasos SE	252,595 ± 139,440	474,444 ± 87,380		363,519 ± 160,210
	Vasos SNE	86,868 ± 21,988	271,423 ± 42,976		179,145 ± 103,587

SE: Solo esterilizado; SNE: Solo não esterilizado.

Algumas observações interessantes podem ser feitas com os resultados obtidos para o cultivo em campo e aeroponia.

Para as plantas cultivadas no campo, o teor de esteviosídeos praticamente não se alterou entre a 1ª e 2ª colheita, ficando ao redor de 10%, entretanto a MSF mais que dobrou, resultando em valores acumulados de esteviosídeos 80% superiores ao observados para o cultivo em aeroponia, retornando, ao término do ensaio, aos mesmos níveis do cultivo aeropônico.

Para o cultivo em aeroponia observou-se que o teor de esteviosídeos caiu, praticamente, para a metade, entre a 1ª e 2ª colheita, enquanto o inverso foi observado para MSF, resultando em valores muito próximos de esteviosídeos acumulados, entre as duas colheitas e também em relação à 3ª colheita.

Fatores climáticos, como variações de luminosidade e temperatura e outros fatores físicos, químicos e microbiológicos do solo podem estar relacionados com as diferenças nos resultados obtidos no campo para os cultivos em aeroponia e hidroponia em casa de vegetação.

O total de esteviosídeos acumulados ao longo do ensaio pode ser observado na Figura 33. O cultivo em campo foi, praticamente, 20% superior ao cultivo aeropônico, tanto para as três colheitas, ou quando se analisa o acúmulo até a 2ª colheita, quando é possível comparar os três sistemas. Tanto o cultivo em campo quanto em aeroponia foram muito superiores ao sistema hidropônico. Entretanto foram inferiores ao controle, vasos com solo esterilizado, independente da inoculação do fungo micorrízico.

Observou-se tendência das plantas inoculadas com *G. intraradices*, independente do sistema de cultivo, apresentarem maior quantidade de esteviosídeos nas folhas, quando comparadas às não inoculadas (Figura 33).

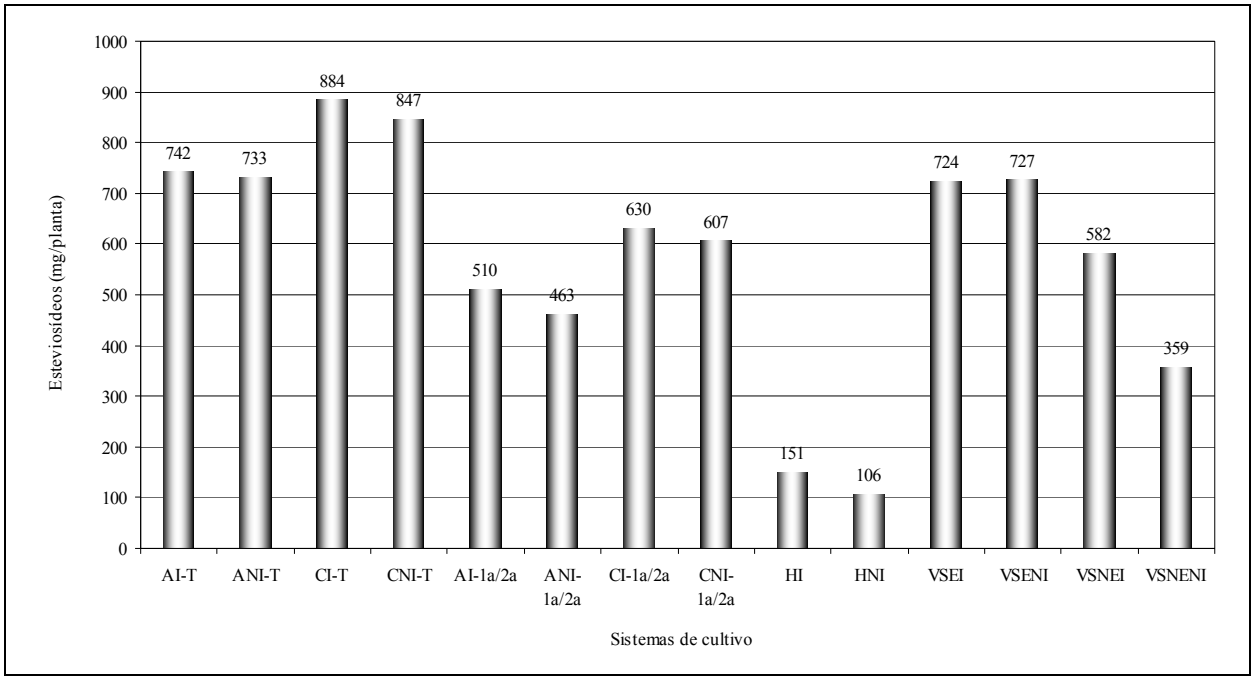


Figura 33. Total de esteviosídeos acumulados por planta ao longo do experimento para os sistemas de cultivo e controle (vasos) para plantas inoculadas ou não com fungos MA.

Legenda: A:aeroponia; C: campo; H: hidroponia; V:vasos; I: inoculado; NI: não inoculado; SE: solo esterilizado; SNE: solo não esterilizado; T: Total acumulado no ensaio (1ª, 2ª e 3ª colheitas); 1ª/2ª: acumulado somente nas duas primeiras colheitas.

Para os resultados de colonização micorrízica (Tabela 28), os maiores valores de colonização radicular por *G. intraradices*, tanto para a 1ª como 2ª colheitas, foram observados nas plantas que receberam a inoculação de *G. intraradices* cultivadas em campo. Entre os tratamentos não inoculados, para a mesma época de colheita, os cultivos aeropônico e hidropônico não apresentaram desenvolvimento de colonização micorrízica, como era esperado, enquanto que em campo a taxa de colonização foi muito pequena quando comparada com o tratamento inoculado. Na 3ª colheita as diferenças restringem-se aos cultivos, não inoculados com *G. intraradices*, em campo em relação ao aeropônico.

Com relação às médias gerais, as maiores taxas de colonização foram observadas para o cultivo em campo, entretanto a variação na média também foi a maior entre os sistemas de cultivo (Tabela 28).

Quanto aos desvios padrões das médias observou-se uma tendência de queda ao longo ensaio, exceto para o cultivo em campo que apresentou aumento da variação na 3ª colheita (Tabela 28).

Tabela 28. Taxa de colonização micorrízica (%), de plantas inoculadas ou não com *G. intraradices*, cultivadas em aeroponia, hidroponia, campo e vasos em casa de vegetação, nas diferentes épocas de colheita.

Fungo micorrízico	Sistemas de Cultivo	Época			$\overline{X}$
		1ª Colheita	2ª Colheita	3ª Colheita	
Inoculado	Aeroponia	44,001 ±11,037	51,055 ± 8,425	43,010 ± 4.840	46,022 ± 8,276
	Hidroponia	34,813 ± 19,403	39,870 ± 7,139		37,342 ± 13,366
	Campo	78,066 ± 8,426	73,724 ± 3,978	40,076 ± 17,542	63,955 ± 20,532
	Vasos SE	69,896 ± 15,063	73,134 ± 4,138		71,515 ± 10,371
	Vasos SNE	82,080 ± 6,158	74,818 ± 9,422		78,449 ± 8,696
Não Inoculado	Aeroponia	0,000	0,000	0,000	0,000
	Hidroponia	0,000	0,000		0,000
	Campo	16,950 ± 5,239	36,904 ± 5,916	33,360 ± 12,066	29,071 ± 11,849
	Vasos SE	0,000	26,811 -		13,406 -
	Vasos SNE	49,059 ± 8,061	72,877 ± 7,122		60,968 ± 14,549

SE: Solo esterilizado; SNE: Solo não esterilizado.

4.4 Determinação de umidade de equilíbrio para estévia.

Os resultados para umidade de equilíbrio estão apresentados na Tabela 29, enquanto que os valores para as constantes estimadas, o coeficiente de determinação (R^2) e os erros relativos médios (E) dos modelos de isotermas, nas temperaturas ensaiadas, são demonstrados na Tabela 30.

Os teores de umidade das folhas de estévia, no início do experimento, eram de 7,75% para o material mantido à temperatura de 30ºC e de 7,91%, para o material à 45ºC.

Conforme esperado (MOHSENIN, 1986), os valores de UE aumentaram com o incremento da atividade de água e diminuíram com o aumento da temperatura (Tabela 29).

De acordo com AGUERRE et al. (1989), os modelos aceitáveis devem apresentar erros relativos médios inferiores a 10%, e de acordo com a Tabela 30, observamos que nem todos atenderam esta premissa.

Tabela 29. Valores de umidade de equilíbrio e respectivos desvios padrões de folhas de estévia em função da atividade de água e temperatura.

Sal	T = 30ºC		T = 45ºC	
	Aw	Xeq (kg kg $^{-1}$)	Aw	Xeq (kg kg $^{-1}$)
LiCl	0,1128	0,1580 ± 0,0021	0,1116	0,0753 ± 0,0036
KF	-	-	-	-
$MgCl_2$	0,3244	0,2454 ± 0,0113	0,3110	0,1131 ± 0,0043
K_2CO_3	0,4317	0,2549 ± 0,0003	0,4147	0,1497 ± 0,0057
NaBr	-	-	0,5195	0,1887 ± 0,0043
KI	0,6789	0,3345 ± 0,0081	0,6526	0,2628 ± 0,0109
NaCl	0,7509	0,4639 ± 0,0120	0,7452	0,3477 ± 0,0078
KCl	0,8362	0,5682 ± 0,0157	-	-
KNO_3	-	-	0,8703	0,6914 ± 0,0111

Obs.: ausência de valores na tabela indica que o valor experimental não foi ajustado.
Valores de umidade inicial: T (30ºC) = 7,75 %; T (45ºC) = 7,91 %

Os modelos que apresentaram melhor ajuste, nas temperaturas estudadas (30 e 45^{o}C) foram GAB com 6,94 e 2,34% e HALSEY com 6,42 e 3,61%, respectivamente. O modelo matemático BET LINEAR mostrou um erro relativo muito bom de 2,61% para a temperatura de 45^{o}C, entretanto para a temperatura de 30^{o}C esse erro foi de 39,05%. Já o modelo de OSWIN foi razoável para os dois valores de temperatura (30 e 45^{o}C), com erros relativos de 9,86 e 11,60% respectivamente (Tabela 30).

Resultados obtidos de literatura demonstram que o modelo de GAB tem sido relatado com freqüência para as plantas medicinais, embora de maneira não muito extensa. Para este modelo resultados foram obtidos por SILVA et al. (2004a,b) para carqueja (*Baccharis genistelloides*) e calêndula (*Calendula officinales*) nas temperaturas de 30 e 60^{o}C, com valores de erros relativos observados de 11,95 e 7,95% para Carqueja e 7,95 e 6,76% para Calêndula, respectivamente às temperaturas. FIGUEIRA et al. (2004), estudando *Phyllantus niruri* (quebra-pedra), encontrou um erro relativo de 8,9% à 50^{o}C para este modelo.

Também ARÉVALO-PINEDO et al. (2004), estudando *Byrsonima sericea* (murici), uma frutífera da região amazônica com alto valor nutricional, encontraram no modelo de GAB o melhor ajuste para as temperaturas de 40 e 60^{o}C. O mesmo foi observado por KOUHILA et

al. (2002) estudando *Eucalyptus globulus*, árvore com importância medicinal e aromática, nas temperaturas de 30, 40 e 50^{o}C.

Por outro lado, o modelo HALSEY aparece como adequado no trabalho desenvolvido por FIGUEIRA et al. (2004) para a espécie de *Philantus amarus*, com erro relativo de 9,3% na temperatura estudada de 50^{o}C . Para SOYSAL e ÖZTEKIN (1999) este modelo apresentou os melhores resultados principalmente na temperatura de 60^{o}C, em uma avaliação de 13 espécies de plantas medicinais e aromáticas.

O modelo de BET LINEAR mostrou-se razoável para os estudos desenvolvidos por SILVA et al. (2004a, b) para a carqueja na temperatura de 45^{o}C (11,95%) e para a calêndula a 45^{o}C (11,95%) e 60^{o}C (9,23%).

Segundo KOUHILA et al. (2001), estudando isotermas de sorção em *Mentha viridis*, *Salvia officinalis* e *Lipia citriodora* nas temperaturas de 20, 40 e 50^{o}C, concluíram que a equação de HENDERSON mostrou-se adequada para plantas aromáticas, entretanto os resultados obtidos neste trabalho mostram que a mesma equação foi totalmente inaceitável, indicando a necessidade de se determinar a UE para cada cultura.

Tabela 30. Estimativas dos parâmetros dos modelos empíricos.

Modelo	Constantes, R^2 e erro	Temperaturas	
		30ºC	45ºC
BET LINEAR	Xm	0,116	0,091
	C	$1,511 \times 10^{6}$	23,854
	R^2	0,954	0,99964
	E(%)	39,05	2,61
BET	Xm	636,009	14,653
	C	0,00015	0,0061
	N	0,712	4,345
	R^2	0,907	0,967
	E(%)	17,62	30,81
CHUNG E PFOST	E	0,044	-0,065
	D	0,163	0,214
	C	0,136	0,184
	R^2	0,950	0,932
	E(%)	11,40	33,52
GAB	Xm	0,147	0,093
	C	$1,062 \times 10^{6}$	19,322
	K	0,909	0,996
	R^2	0,981	0,99972
	E(%)	6,94	2,34
HALSEY	A	0,071	0,089
	B	1,806	1,179
	R^2	0,979	0,9992
	E(%)	6,42	3,61
HENDERSON	K	0,100	0,100
	C	0,100	0,100
	N	0,100	0,100
	R^2	--	--
	E(%)	$5,186 \times 10^{20}$	$2,651 \times 10^{21}$
LANGMUIR	Xm	4,127	$2,524 \times 10^{3}$
	C	0,170	$2,139 \times 10^{-4}$
	R^2	0,903	0,843
	E(%)	19,056	35,472
OSWIN	A	0,298	0,176
	B	0,401	0,707
	R^2	0,967	0,995
	E(%)	9,86	11,60
PELEG	k1	0,289	0,452
	n1	0,804	2,534
	k2	0,289	0,452
	n2	0,804	2,544
	R^2	0,912	0,955
	E(%)	16,44	35,28

R^2 - coeficiente de determinação; E - erro relativo médio.

As Figuras 34 e 35 ilustram as comparações entre os valores experimentais e teóricos previstos pelos os melhores modelos nas temperaturas de 30 e 45°C.

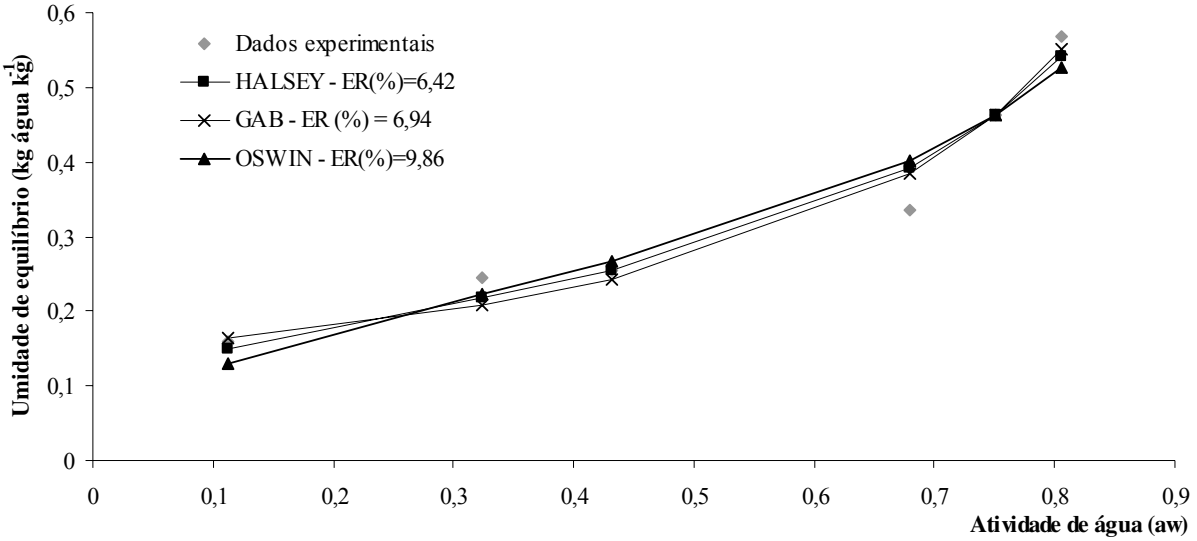


Figura 34. Modelo de HALSEY, GAB e OSWIN ajustado aos valores experimentais (T=30°C).

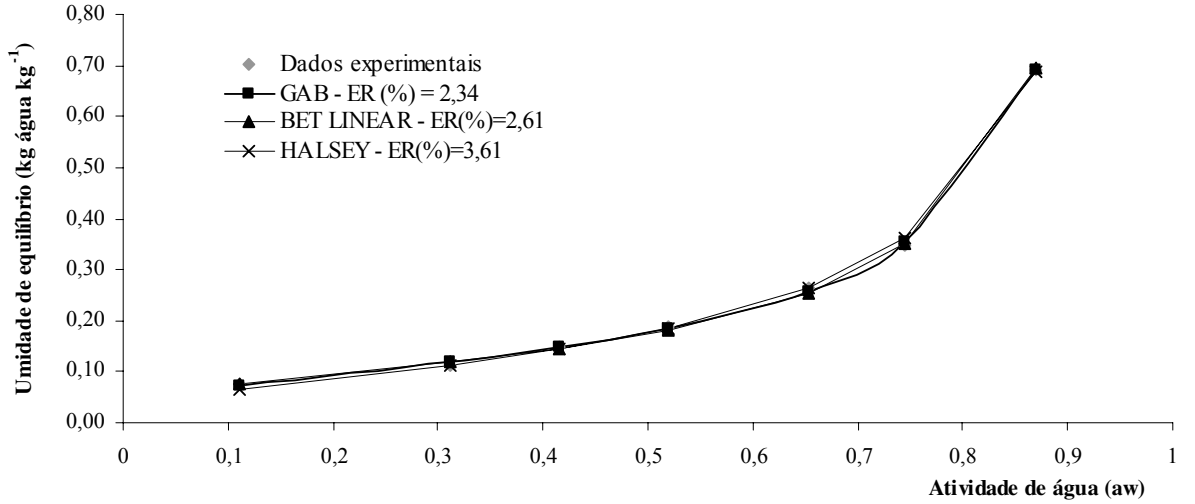


Figura 35. Modelo de GAB, BET LINEAR e HALSEY ajustado aos valores experimentais (T=45°C).

4.5 Influência dos sistemas de secagem no teor de esteviosídeos em estévia.

Na Tabela 31 estão demonstrados os valores de massa da matéria seca para cada sistema de secagem nas diferentes colheitas.

Tabela 31. Massa da matéria seca de folhas de estévia (g), após moagem, para cada sistema de secagem nas 3 épocas de colheita.

Épocas de colheita	Sistemas de secagem		
	Sol	Estufa	Secador
25/09/2002	146,28	136,34	142,04
04/12/2002	244,02	207,82	218,22
06/02/2003	137,04	151,04	146,67

Os valores obtidos sobre as condições ambientais de temperatura, umidade e velocidade do vento estão demonstrados na Tabela 39 – anexos e Figuras 36, 37 e 38.

A temperatura média, para a 1ª colheita foi de 22,72 ± 0,21^{o}C, enquanto nas outras colheitas a média foi de 31,71 ± 0,44^{o}C e de 29,23 ± 0,38^{o}C para a 2ª e 3ª colheita respectivamente (Tabela 39 - anexos, Figura 36).

Para umidade relativa do ar registraram-se os seguintes valores de média, para as três colheitas: 45,2 ± 0,89% (1ª colheita), 56,5 ± 1,79% ± (2ª colheita) e 64,2 ± 1,81% (Tabela 39 - anexos e Figura 37).

Os valores médios, registrados para a velocidade do ar foram de 10,18 ± 0,88km/h para a 1ª colheita, 14,4 ± 0,91km/h para a 2ª colheita e de 18,31 ± 1,36km/h para a 3ª colheita (Tabela 39 - anexos, Figura 38).

De acordo com os dados obtidos observa-se que na primeira colheita (25/09/02) todos os parâmetros estiveram em níveis inferiores às outras duas colheitas, exceto no período da manhã, até às 11:00 h para velocidade do vento.

Enquanto esteve à sombra para a secagem final a temperatura média foi de 29,3^{o}C, com mínima de 25,5^{o}C e máxima de 42,4^{o}C. A umidade relativa com média de 42% com máxima e mínima de 22% e 72%, respectivamente (medidas realizadas apenas durante a primeira colheita).

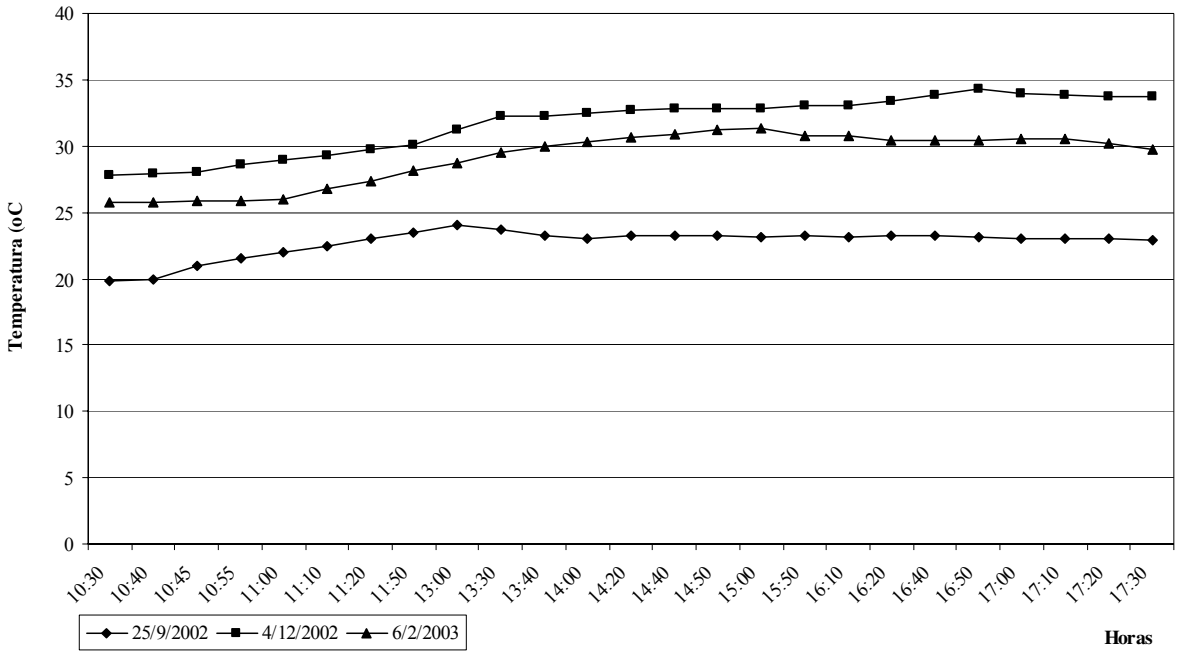


Figura 36. Variação da temperatura ao longo do dia para as três épocas de colheita.

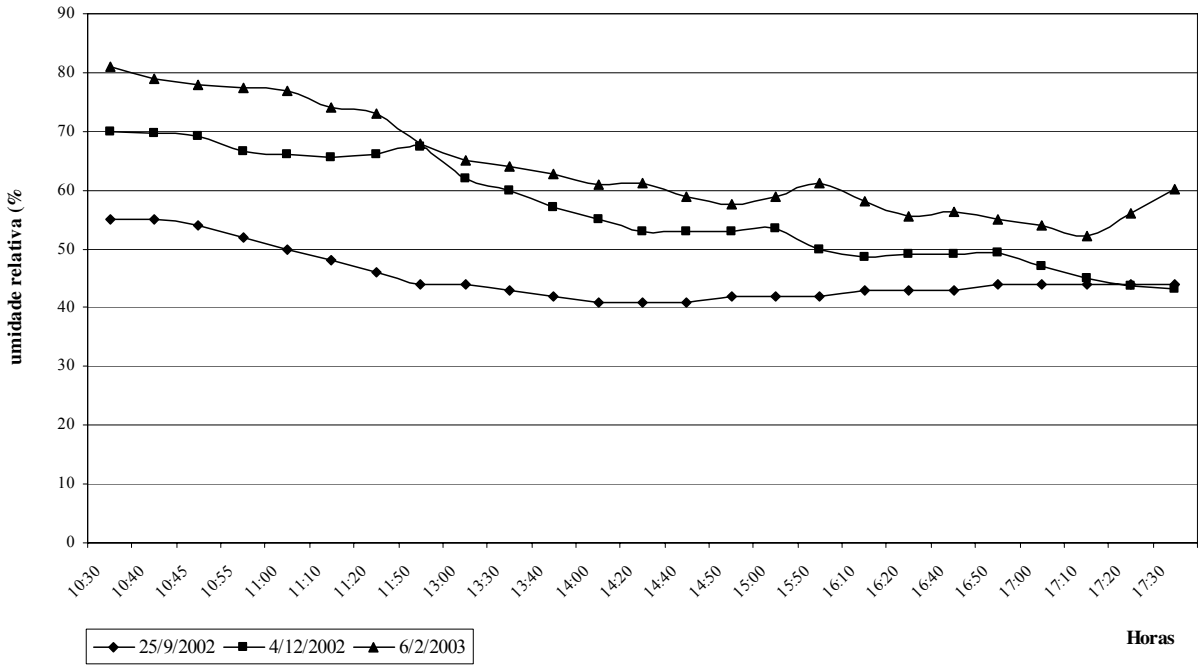


Figura 37. Variação da umidade relativa do ar ao longo do dia para as três épocas de colheita.

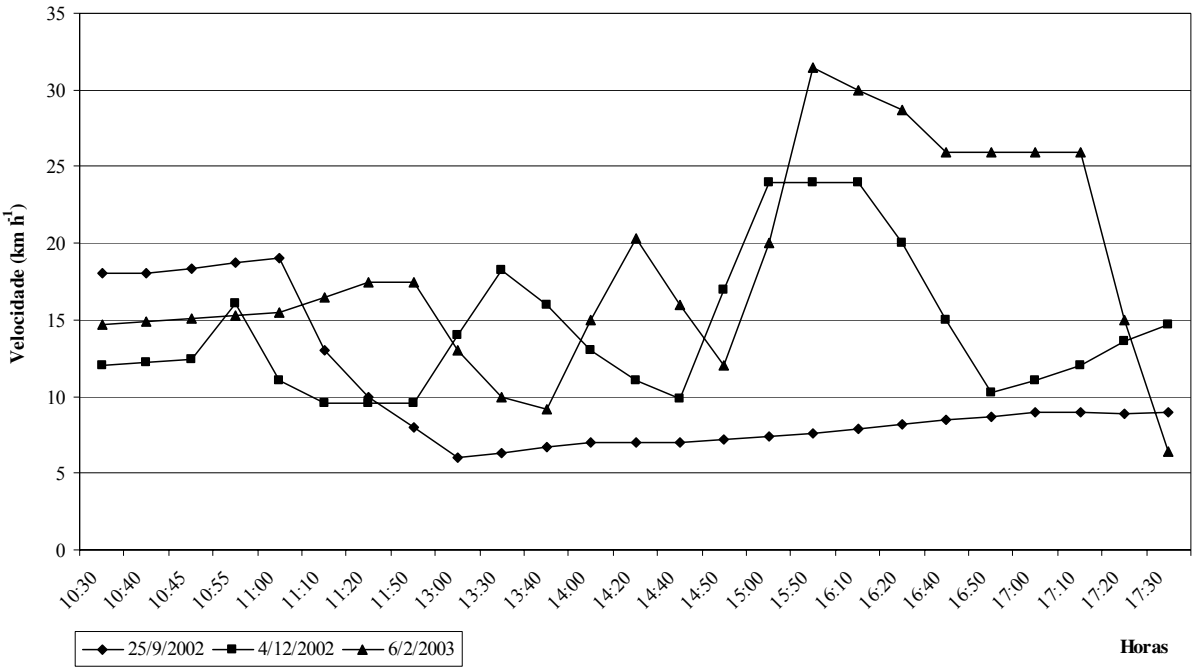


Figura 38. Variação da velocidade do vento ao longo do dia para as três épocas de colheita.

A Tabela 32 mostra os resultados obtidos de teores de esteviosídeos para cada época de colheita, em cada sistema de secagem e a média para estes tratamentos.

Observou-se que, independente da época da colheita a secagem ao sol mostrou resultados inferiores ao material secado tanto na estufa quanto no secador, sendo esta diferença significativa na 1ª colheita. Na 2ª colheita o teor foi significativamente diferente para o material secado na estufa e na 3ª colheita esta diferença se deu com o material secado no secador. Na comparação entre estufa e secador não se observou diferenças para qualquer das épocas de colheita (Tabela 32).

Ao se comparar os sistemas de secagem, independente da época, observou-se não haver diferenças entre o material secado na estufa, secador ou ao sol, com uma ligeira tendência favorável para a secagem no secador à gás (Tabela 32).

Independente do sistema de secagem observou-se, a cada colheita, que o teor de esteviosídeo aumentava em relação à colheita anterior. O maior valor (8,43%) obtido deu-se na 3ª colheita (06/02/2003) com o material secado no secador a gás, sendo estatisticamente diferente das colheitas anteriores. O mesmo foi observado para os materiais secados na estufa

ou ao sol, dos quais somente a 1ª colheita diferiu significativamente das duas subseqüentes (Tabela 32).

Com relação às médias obtidas, não foram observadas diferenças estatísticas significativas entre os sistemas de secagem (Tabela 32).

Tabela 32. Teores de esteviosídeos (% m/m) obtidos na parte aérea de *Stevia rebaudiana*, em três épocas de colheita e o material colhido seco em três sistemas de secagem.

Época de Colheita	Sistemas de Secagem		
	Sol	Estufa (45°C)	Secador (45°C)
25/09/2002	4,36 b B	5,19 b A	4,97 c A
04/12/2002	6,22 a B	7,26 a A	6,78 b AB
06/02/2003	6,74 a B	7,33 a AB	8,43 a A
$\overline{X}$	5,55	6,60	6,72

Letras minúsculas referem-se à comparação entre as épocas de colheita para cada sistema de secagem.
Letras maiúsculas referem-se à comparação entre os sistemas de secagem para cada época e a média.
Médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

A maioria dos artigos disponíveis descreve os procedimentos de secagem, mas não fazem relação entre tais procedimentos e sua influência no processamento das folhas de estévia e, consequentemente, nos teores de esteviosídeos.

Procurou-se observar durante o processo de secagem a manutenção da coloração esverdeada das folhas de estévia, como descritos por PUERTA (2001) e VALOIS (1992).

Com base nos experimentos realizados, observou-se que a secagem ao sol, principal procedimento adotado pelos produtores, a perda no teor de esteviosídeos, pode chegar até 20% (3ª colheita), em relação à secagem em um secador. É importante salientar que o material secado ao sol, além de ficar exposto a elementos ambientais (poeira, insetos, etc), tende a apresentar menor uniformidade, devido às variações climáticas de temperatura, umidade e velocidade do ar, prejudicando o processo de moagem e, portanto, melhor controle da matéria prima, tornando-se difícil predizer o tempo de secagem.

5. CONCLUSÕES

- O substrato Rendmax Citrus sem adubação foi o que propiciou melhores condições para a colonização radicular de *B. humidicula* por fungos micorrízicos arbusculares.
- Nas condições experimentais, o fungo micorrízico *Glomus intraradices* foi o mais eficiente para o desenvolvimento da estévia.
- O efeito da inoculação do fungo *G. intraradices* no desenvolvimento e produção de esteviosídeos foi positivo para todos os sistemas de cultivo, com EM média 16% para MSF e de 18% para esteviosídeos.
- A maior produtividade em termos de massa da matéria seca da parte aérea foi obtida com o cultivo em aeroponia, enquanto no campo obteve-se maior quantidade acumulada de esteviosídeos. O desenvolvimento da cultura foi insatisfatório em condições de cultivo hidropônico.
- O modelo que representou melhor ajuste, nas temperaturas de 30 e 45^{o}C, foi GAB com valores de erro relativo médio 6,94 e 2,34%, respectivamente.
- Por permitir melhor controle do processo, o secador à gás é o mais indicado para a secagem da estévia.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBOTT, L. K., ROBSON, A. D. Growth of subterranean clover in relation to the formation of endomycorrhizas by introduced and indigenous fungi in a field soil. **New phytologist** 81: 575-585, 1978.

ABBOTT, L. K., ROBSON, A. D. Infectivity and effectiveness of five endomycorrhizal fungi: competition with indigenous fungi soils. **Australian Journal Agricultural Research**, Melbourne, 32: 621-630, 1981.

ABREU, M. F. Legislação de substratos para plantas. In: ENCONTRO NACIONAL SOBRE SUBSTRATOS PARA PLANTAS, 5. 2006, Ilhéus, BA, 12-15 de setembro. **Anais.** p.75-77, 2006.

ABU-ZEYAD, R., KHAN, A. G., KHOO, C. Occurrence of arbuscular mycorrhiza in Castanospermum australe A. Cunn. & C. Fraser and effects on growth and production of castanospermine. **Mycorrhiza**, 9: 111-117, 1999.

AGUERRE, R.J., GABITTO, J.F., CHIRIFE, J. Utilization of Fick's second law for the evaluation of diffusion coefficients in food process controlled by internal diffusion. **Journal of Food Technology**, 20(5) 623-629, 1989.

AMAFIBRA. Amafibra - fibra e substratos agrícolas da amazônia Ltda. <http://www.amafibra.com.br/>. Acesso em: 12/04/2005.

ARÉVALO-PINEDO, A., GIRALDO-ZUÑIGA, A. D., SANTOS, F. L., ARÉVALO, Z. D. S., ARÉVALO, R. P. Sorption isotherms experimental data and mathematical models for murici pulp (B*yrsonima sericea*). In: Drying 2004 – Proceedings of the 14th International Drying Symposium (IDS 2004), São Paulo, Brazil, 22-25 August, vol. A, pp. 634-639, 2004.

ASAE - American Society of Agricultural Engineers. Official Methods of Analysis: D245.4, Moisture Relationship of Grains, 363-367, 1991.

BATAGLIA, O. C., ABREU, C. A. Análise química de substratos para crescimento de plantas: Um novo desafio para cientistas do solo. **Boletim Informativo – Sociedade Brasileira de Ciência do Solo**, 26(1): 8-9, 2001.

BELGHITA, A., KOUHILAB, M., BOUTALEBA, B. C. Experimental study of drying kinetics by forced convection of aromatic plants. **Energy Conversion & Management**, 41: 1303-1321, 2000.

BOLETIM N^{o} 200. Instruções agrícolas para o Estado de São Paulo. Instituto Agronômico de Campinas. 231p. 1987

BONOMI, V. L. R., TRUFEM, S. F. B. Endomicorrizas vesículo-arbusculares do cerrado da reserva biológica de Moji-Guaçu, SP, Brasil. **Rickia**, 10: 55-84, 1983.

BRANDLE, J. E., STARRATT, A. N., GIJZEN, M. *Stevia rebaudiana*. Its biological, chemical and agricultural properties. Agriculture and Agri-Food Canada, Southern Crop Protection and Food Research Centre. <http://res2.agr.ca/london/faq/stevia_rev_e.htm>. Acesso em: 20/03/2006.

CAMPRUBI, A., ESTAUN, V., CALVET, C., PERA, J. Infectivity and effectivity of *Glomus mosseae* mycorrhizae in 4 different species of medicinal plants. **Symbiosis**, 9(1-3):305-307, 1991.

CARNIEL, E., SOUZA, P. V. D., SCHMITZ, J. A. K. Influência de substratos e fungos micorrízicos arbusculares no desenvolvimento vegetativo de Fly Dragon (*Poncirus trifoliata* Raf.). In: ENCONTRO NACIONAL SOBRE SUBSTRATO PARA PLANTAS, 1., 1999, Porto Alegre. **Programa e Resumos**. p. 47-48, 1999.

CARON, M., FORTIN, J. A., RICHARD, C. Influence of substrate on the interaction of *Glomus intraradices* and *Fusarium oxysporum* f.sp.*radicis-lycopersici* on tomatoes. **Plant and Soil**, 87(2): 233-239, 1985.

CARRIJO, O. A., LIZ, R. S., MAKISHIMA, N. Fibra da casca do coco verde como substrato agrícola. **Horticultura Brasileira**, 20(4): 533-535, 2002.

CHILVERS, M. T., DAFT, M. F. J. Mycorrhizas of the liliiflorae. II. Mycorrhiza formation and incidence of root hairs in field grown *Narcissus* L., *Tulipa* L. and *Crocus* L. cultivars. **New Phytologist,** 89: 247-261, 1981.

COLUMBUS, M. The cultivation os Stevia, " Nature´s Sweetener ". OMAFRA Herb Series, 2003. <http://www.omafra.gov.on.ca/english/crops/facts/stevia.htm>Acesso em: 21/03/2006.

CORDEIRO, D. S., OLIVEIRA, W. P. Drying of medicinal plants: equilibrium moisture content and mathematical modeling of *maytenus ilicifolia* leaves. In: Drying 2004 – Proceedings of the 14th International Drying Symposium (IDS 2004), São Paulo, Brazil, 22-25 August, vol. C, pp. 1712-1719, 2004.

COSTA, M. D., LOVATO, P. E. Aclimatização de um porta-enxerto micropropagado de videira em dois substratos com e sem inoculação micorrízica. In: ENCONTRO NACIONAL SOBRE SUBSTRATO PARA PLANTAS, 2., 2000, Florianópolis. **Resumos**. p. 66-67, 2000.

DAL SOGLIO, F. K. Potencial de utilização de microrganismos benéficos em cultivos em substrato. In: ENCONTRO NACIONAL SOBRE SUBSTRATO PARA PLANTAS, 2., 2000, Florianópolis. **Resumos**. p. 83-87, 2000.

EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. Sistema brasileiro de classificação de solos. 412 p. **Brasília : Embrapa Produção de Informação; Rio de Janeiro : Embrapa Solos**, 1999.

ENSUB. 1º Encontro Nacional sobre Substratos para Plantas. Alguns pontos levantados no final do I ENSUB realizado em Porto Alegre em 1999 (informe enviado pelos organizadores). <http://www.cca.ufsc.br/substrat/iensub.htm>. Acesso em: 10/04/2001.

ESTEVES, B. Bioespuma pode substituir isopor. Empresa brasileira desenvolve espuma poliuretana biodegradável**. Ciência Hoje**, 25(146): 65-66, 1999.

ESTRADA-LUNA, A. A., DAVIES JR., F. T., EGILLA, J. N. Mycorrhizal fungi enhancement of growth and gas exchange of micropropagated guava plantlets (*Psidium guajava* L.) during *ex vitro* acclimatization and plant establishment. **Mycorrhiza**, 10(1): 1-8, 2000.

FERMINO, M. H., KÄMPF, A. N., TRENTIM, A. L. Caracterização físico-química de materiais alternativos para composição de substratos hortícolas: 1. Resíduos industriais e agrícolas. In: ENCONTRO NACIONAL SOBRE SUBSTRATO PARA PLANTAS, 1. 1999, Porto Alegre. **Programa e Resumos**. p. 25-26. 1999a.

FERMINO, M. H., KÄMPF, A. N., TRENTIM, A. L. Caracterização físico-química de materiais alternativos para composição de substratos hortícolas: 2. Aguapé. In: ENCONTRO NACIONAL SOBRE SUBSTRATO PARA PLANTAS, 1., 1999, Porto Alegre. **Programa e Resumos**. p. 23-24. 1999b.

FERRAZ, J. M. G. Levantamento de micorriza vesicular-arbuscular em culturas da Amazônia. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, 3: 194-196, 1979.

FIGUEIRA, G. M., SILVA, F., MAGALHÃES, P. M., PARK, K. J. Estudo da umidade de equilíbrio de duas espécies de plantas do gênero *Phyllanthus* após secagem para o armazenamento. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 14(01): 22-24, 2004.

FIGUEIRA, G. M., SILVA, F., PARK, K. J. Isotermas de dessorção de Artemísia (*Artemisia annua*). In: Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, 18, 2004. **Resumos...** Manaus, AM, 16-19 Novembro, p. 441, 2004.

FIGUEIRA, G. M., SILVA, F., PARK, K. J., CORIA, P. A. Isotermas de dessorção da espinheira santa (*Maytenus ilicifolia* Mart. Ex. Reiss.). In: Congresso Brasileiro de Engenharia Agrícola, 33, 2004, **Resumos...**São Pedro, SP, 2-6 Agosto, p. 21, 2004.

FREITAS, M. S. M., MARTINS, M. A., VIEIRA, I. J. C. Produção e qualidade de óleos essenciais de *Mentha arvensis* em resposta à inoculação de fungos micorrízicos arbusculares. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 39(9): 887-894, 2004.

GÁL, S. Recent advances in techniques for determination os sorption isotherms. In: International Symposium Glasgow: Academic Press Inc, 139-154, 1975.

GAUR, A.; ADHOLEYA, A. Effects of the particle size of soil-less substrates upon AM fungus inoculum production. . **Mycorrhiza**, 10(1): 43-48, 2000.

GERDEMANN, J. W. Vesicular-arbuscular mycorrhizae. In: TORREY, J. G.; CLARKSON, D. T. (Ed.). The Development and Function of roots. London. Academic Press., p. 575-591, 1975.

GEUNS, J. M. C. Stevioside. **Phytochemistry**, 64: 913-921, 2003.

GIANINAZZI, S., VOSÁTKA, M. Inoculum of arbuscular mycorrhizal fungi for production systems: science meets business. **Canadian Journal of Botany**, 82(8): 1264-1271, 2004.

GIOVANETTI, M., MOSSE, B. An evaluation of techniques for measuring VA mycorrhizal infection in roots. **New Phytologist**, 84:489-500, 1980.

GONÇALVES, A. L. Substratos par produção de mudas de plantas ornamentais. In: **Produção de mudas de alta qualidade em horticultura**. MINAMI, K. (organizador). São Paulo. T. A. Queiros, 107-115, 1995.

GONCZAROWSKA, R. A. Substrato para plantas e legislação. **Boletim Informativo – Sociedade Brasileira de Ciência do Solo**, 26(1): 10-12, 2001.

GORSI, M. S. Studies on mycorrhizal association in some medicinal plants of Azad Jammu e Kashmir. **Asian Journal of Plant Sciences**, 1(4): 383-387, 2002.

GREENSPAN, L. Humidity fixed points of binary saturated aqueous solutions. **Journal of Research of the National Bureau of Standards**, 81A (1): 89-96, 1977.

GUPTA, M. L., PRASAD, A., RAM, M., KUMAR, S. Effect of the vesicular-arbuscular mycorrhizal (VAM) fungus *Glomus fasciculatum* on the oil yield related characters and nutrient acquisition in the crops of different cultivars of menthol mint (*Menta arvensis*) under field conditions. **Bioresource Technology**, 81(1): 77-79, 2002.

GUSTAFSON, R. J., HALL, G. .Equilibrium moisture content of shelled corn from 50 to 155^{o}F. **Transaction of the ASAE**, St Joseph, 17(1): 120-124, 1974.

HALL, I. R. Soil pellets to introduce vesicular-arbuscular mycorrhizae into soil. **Soil Biology and Biochemistry**, 11: 85-86, 1979.

HALL, I. R., KELSON, A. An improved technique for the production of endomycorrhizal infested soil pellets. **New Zealand Journal of Agricultural Research** 24: 221-222. 1981.

HAYDEN, A. L., YOKELSEN, T. N., GIACOMELLI, G. A., HOFFMANN, J. J. Aeroponics: an alternative production system for high-value root crops. **Acta Horticulturae** (ISHS), 629: 207-213, 2004.

HUNG, L. L., SYLVIA, D. M. Production of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus inoculum in aeroponic culture. **Applied and Environmental Microbiology**, 54(2): 353-357, 1988.

ICOM 5. International Conference on Mycorrhiza, 5th. 23-27, July. Granada, Spain. <http://www.eez.csic.es/icom5/Index.htm> Acesso em: 10/03/2006.

KÄMPF. A. N. Análise física de substratos para plantas. **Boletim Informativo – Sociedade Brasileira de Ciência do Solo**, 26(1): 5-7, 2001.

KAPOOR, R., GIRI, B., MUKERJI, K. G. *Glomus macrocarpum*: a potential bioinoculant to improve essencial oil quality and concentration in Dill (*Anethum graveolens* L.) and Carum (*Trachyspermum ammi* (Linn.) Sprague). **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, 18: 459-463, 2002a.

KAPOOR, R., GIRI, B., MUKERJI, K. G. Mycorrhization of coriander (*Coriandrum sativum* L.) to enhance the concentration and quality of essential oil. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 82: 339-342, 2002b.

KEDIK, S. A., FEDOROV, S. V., YANUL, N. A., PROKHOROVA, L. V., SMIRNOVA, E. V., PANOV, A. V. Chromatographic determination of stevioside in raw plant material. **Pharmaceutical Chemistry Journal**, 37(10): 529-532, 2003.

KOCHIKYAN, V. T., MARKOSYAN, A. A., ABELYAN, L. A., BALAYAN, A. M., ABELYAN, V. A. Combined enzymatic modification of stevioside and rebaudioside A. **Applied Biochemistry and Mycrobiology**, 42 (1): 31-37, 2006.

KOLB, N.; HERRERA, J. L.; FERREYRA, D. J. Analysis of sweet diterpene glycosides from *Stevia rebaudiana*: Improved HPLC method. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 49: 4538-4541, 2001.

KOUHILA, M., BELGHIT, A., DAGUENET, M., BOUTALEB, B.C. Experimental determination of the sorption isotherms of mint (*Mentha viridis*), sage (*Salvia officinalis*) and verbena (*Lippia citriodora*). **Journal of Food Engineering**, 47: 281-287, 2001.

KOUHILA, M., KECHAOU, N., OTMANI, M., FLIYOU, M., LAHSASNI, S. Experimental study of sorption isotherms and drying kinetics of Moroccan *Eucalyptus Globulus*. **Drying Technology**, 20(10): 2027–2039, 2002.

LÉONHART, S., PEDNEAULT, K., GOSSELIN, A., ANGERS, P., PAPADOPOULOS, A. P., DORAIS, M. Diversification of greenhouse crop production under supplemental lighting by use of new cultures with high economic potential. **Acta Horticulturae** (ISHS), 580: 249-254, 2002.

LIBOS, H. A inteligência brasileira. **Gazeta Mercantil**, 7, 8 e 9 de Julho. pg.5. 2000.

LIMA FILHO, O. F., MALAVOLTA, E. Sintomas de desordens nutricionais em estévia *Stevia Rebaudiana* (Bert.) Bertoni. **Scientia Agrícola**, 54 (1-2), 13 p. 1997.

LIMA FILHO, O. F., MALAVOLTA, E., SENA, J. O. A., CARNEIRO, J. W. P. Absorção e acumulação de nutrientes em estévia *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni: I. Macronutrientes. **Scientia Agrícola**, 54 (1-2), 14 p. 1997a.

LIMA FILHO, O. F., MALAVOLTA, E., SENA, J. O. A., CARNEIRO, J. W. P. Absorção e acumulação de nutrientes em estévia *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni: II. Micronutrientes. **Scientia Agrícola**, 54 (1-2), 12 p. 1997b.

LIMA FILHO, O. F., VALOIS, A. C. C., LUCAS, Z. M. **Sistemas de produção 5. Estévia**. EMBRAPA Agropecuária Oeste, Dourados. MS. 55 p. 2004.

MAGALHÃES, P. M. Agrotecnología para el cultivo de estévia o hierba dulce. In: CAB & CYTED (Ed.). **Fundamentos de agrotecnologia de cultivo de plantas medicinales iberoamericanas.** Colômbia. p. 441-450, 2000.

MAIORANO, J. A. **Utilização de substratos orgânicos comerciais na obtenção de mudas micorrizadas de limoeiro 'cravo' em ambiente protegido**. 62 p. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical) – Instituto Agronômico de Campinas, 2003.

MARTIN-LAURENT, F., LEE, S.K., THAM, F. Y., HE, J., DIEM, H. G., DURAND, P. A new approach to enhance growth and nodulation of *Acacia mangium* through aeroponic culture. **Biology and Fertility of Soils,** 25: 7–12, 1997.

MARTIN-LAURENT, F., LEE, S.K., THAM, F. Y., HE, J., DIEM, H. G., DURAND, P. Field assessment of aeroponically grown and nodulated *Acacia mangium*. **Australian Journal Botany**, 48: 109–114, 2000.

MATOS, R. M. B.; SILVA, E. M. R.; BRASIL, F. C. Micorriza arbuscular e matéria orgânica na aclimatação de mudas de bananeira, cultivar nanicão. **Bragantia**, 61(3): 277-283, 2002.

MEHL, H.O. **Efeito de Giberelina e Citicinina no Desenvolvimento de Plantas de Alface (Lactuca sativa L. cv.ELISA), em Cultivo Hidropônico**. 82 p. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista. Botucatu, 1995.

MOHAMMAD, A., KHAN, A. G., KUEK, C. Improved aeroponic culture of inocula of arbuscular mycorrhizal fungi. **Mycorrhiza**, 9: 337-339, 2000.

MOHSENIN, N. **Physical properties of plant and animal materials**. Gordon and Breach, London, 1986.

MORGADO, I. F., CARNEIRO, J. G. A., LELES, P. S. S., BARROSO, D. G. Resíduos agroindustriais prensados como substrato para produção de mudas de cana-de-açúcar. **Scientia Agrícola**, 57(4): 709-712, 2000.

MURCH, S., VASANTHA RUPASINGHE, H. P., SAXENA, P. K. An in vitro and hydroponic growing system for hypericin, pseudohypericin, and hyperforin production os St. John's Wort (*Hypericum perforatum* CV New Stem). **Planta Medica**, 68(12): 1108-1112, 2002.

NUNES, M. U. C. Vantagens da hidroponia para pequenos produtores. EMBRAPA Tabuleiros Costeiros. Aracaju, SE. <http://www.cpatc.embrapa.br/index.php?idpagina=artigos&artigo=322>. Acesso em: 04/2006.

OLIVEIRA, A. N., OLIVEIRA, L. A. Associação micorrízica e teores de nutrientes nas folhas de cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum*) e guaranazeiro (*Paullinia cupana*) de um sistema agroflorestal em Manaus, Amazonas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, 28: 1063-1068, 2004.

OLIVEIRA, J.B.; MENK, J. R. F.; ROTTA, C. L. Levantamento semidetalhado dos solos do estado de São Paulo: quadrícula de Campinas. Mapa escala 1:100.000. Campinas, SP: **Instituto Agronômico**, 1977.

PAGLIARULO, C. L., HAYDEN, A. L. Potencial for greenhouse aeroponic cultivation of medicinal root crops. Controlled Environmental Agriculture Center, University of Arizona, Arizona. <http://ag.arizona.edu/ceac/research/archive/aeroponic_medicinals.pdf>. Acesso em: 15/03/2006.

PAIVA, L. M., SILVA, M. A., SILVA, P. C., MAIA, L. C. Glomus clarum e G. etunicatum: cultivo em solo e aeroponia. **Revista Brasileira de Botânica**, 26(2): 257-262, 2003.

PARK, K. J., VOHNIKOVA, Z., BROD, F. P. R. Evaluation of drying parameters and desorption isotherms of garden mint leaves (*Mentha crispa* L.). **Journal of Food Engineering**, 51:193-199, 2002.

PEDNEAULT, K., LÉONHART, S., GOSSELIN, A., PAPADOPOULOS, A. P., DORAIS, M., ANGERS, P. Variations in concentration of active compounds of four hydroponically-and-field-grown medicinal plant species. **Acta Horticulturae** (ISHS), 580: 255-262, 2002.

PELEG, M. Assessment of a semi-empirical four parameter general model for sigmoid moisture sorption isotherms. **Journal of Food Processing Engineering**, Connecticut – USA: Food & Nutrition Press Inc., 16(1): 21-37, 1993.

PORTUGAL, E. P. **Contribuição de fungos endomicorrízicos na absorção de nitrogênio e fósforo por forrageiras consorciadas**. Piracicaba, 139 p. Dissertação (Mestre em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. 1988.

PUERTA, H. F. Stevia, un edulcorante natural: Cultivo, processos y comercialización. In: Congreso Internacional de Plantas Medicinales y Aromáticas, 1er, 2001, . **Memorias...** Cali, Colombia, 13-15 Agosto, 2001.

QUITÉRIO, G. C. M., PORTUGAL, E. P. Produção intrínseca do antimalárico artemisinina por *Artemisia annua* L. Sob influência de fungos micorrízicos arbusculares. In: Jornada Paulista de Plantas Medicinais, 7, 2005. **Resumos...** Campinas, SP, 23-25 Novembro, p. AGR-23, 2005.

SAILO, G. L., BAGYARAJ, D. J. Influence of different AM-fungi on the growth, nutrition and forskolin content of *Coleus forskohlii*. **Mycological Research**, 109(7): 795-798, 2005.

SCHMILEWSKI, G. Limitations of additional organic material in growing media. **Flower Tech**, 4(2): 20-23, 2001.

SILVA, F**. Avaliação do teor e da composição química do óleo essencial de plantas medicinais submetidas a processos de secagem e armazenamento**. Campinas, 152 p. Tese (Doutorado em Engenharia Agrícola). Universidade Estadual de Campinas. 2005.

SILVA, F., PARK, K. J., MAGALHÃES, P. M., POZINATO, M. Determination of drying and desorption isotherms parameters in carqueja (*Baccharis genistelloides* L.). In: III International Symposium breeding research on medicinal and aromatic plant & II Latin american Symposium on the production of medicinal and aromatic plants and condiments, 2004, **Abstracts...**Campinas, SP, Brazil, 5-8 July p. A03-13, 2004a.

SILVA, F., PARK, K. J., MAGALHÃES, P. M.; POZINATO, M. Desorption isotherms of *calendula officinalis* L. In: Drying 2004 – Proceedings of the 14th International Drying Symposium (IDS 2004), São Paulo, Brazil, 22-25 August, vol. C, p. 1569-1576, 2004b.

SILVA, R. P., PEIXOTO, J. R., JUNQUEIRA, N. T. V. Influência de diversos substratos no desenvolvimento de mudas de maracujazeiro azedo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* DEG). **Revista Brasileira de Fruticultura**, 23(2): 377-381, 2001.

SILVEIRA, A. P. D. Avaliação de fungos micorrízicos arbusculares e sua importância ambiental. In: **Indicadores biológicos e bioquímicos da qualidade do solo. Manual Técnico**. Coord. FRIGHETTO, R. T. S.; VALARINI, P. J. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 198 p., 2000.

SILVEIRA, A. P. D.; SILVA, L. R.; AZEVEDO, I. C.; OLIVEIRA, E.; MELETTI, L. M. M. Desempenho de fungos micorrízicos arbusculares na produção de mudas de maracujazeiro-amarelo, em diferentes substratos. **Bragantia**, 62(1): 89-99, 2003.

SOUZA, E. S., BURITY, H. A., SANTO, A. D. E., SILVA, M. L. R. B. Alternativa de produção de inóculo de fungos micorrízicos arbusculares em aeroponia. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 31(2): 153-158, 1996.

SOUZA, P. V. D., BERJON, M. A., ORENGA, V. A., FONFRÍA, M. A. Desenvolvimento do citrange 'troyer' infectado com fungo micorrízico, em dois substratos de cultivo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 32(10): 13 p., 1997.

SOUZA, P. V. D., CARNIEL, E., SCHMITZ, J. A. K. Influência de substratos e fungos micorrízicos arbusculares no desenvolvimento vegetativo de Citrange Troyer (*Poncirus trifoliata* Raf. X *Citrus sinensis* L. Osb.). In: ENCONTRO NACIONAL SOBRE SUBSTRATO PARA PLANTAS, 1., 1999, Porto Alegre. **Programa e Resumos**. p. 49-50, 1999.

SOYSAL, Y.; ÖZTEKIN, S. Equilibrium moisture content equations for some medicinal and Aromatic Plants. **Journal of Agricultural Engineering Research**, 74: 317-324, 1999.

ST. JOHN, T. Uma lista das espécies de plantas tropicais brasileiras naturalmente infectadas com micorriza vesicular-arbuscular. **Acta Amazônica** 10(1): 229-234, 1980.

STATISTICA for Windows 5.0. Computer program manual. Tulsa, OK: StatSoft Inc Inc. 1995.

TEIXEIRA NETO, R. O., QUAST, D. G. Isotermas de adsorção de umidade em alimentos. **Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos**., Campinas, 8: 141-197, 1977.

TREYBAL, R. B. Drying. In: Mass transfer operations. New York, Mc Graw-Hill, p. 569-575, 1968.

TRINDADE, A. V., FARIA, N. G., ALMEIDA, F. P. Uso de esterco no desenvolvimento de mudas de mamoeiro colonizadas com fungos micorrízicos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 35(7): 1389-1394, 2000.

TRINDADE, A. V., LINS, G. M. L., MAIA, I. C. S. Substratos e fungo micorrízico arbuscular em mudas micropropagadas de bananeira na fase de aclimatação. **Revista Brasileira de Fruticultura**, 25(1): 137-142, 2003.

TRISTÃO, F. S. M. **Produção de mudas micorrizadas de cafeeiro em diferentes substratos orgânicos.** 89 p. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical) – Instituto Agronômico de Campinas, 2005.

TRUFEM, S. F. B. Ecological aspects of arbuscular mycorrhizal fungi from coastal sand dunes community of Ilha do Cardoso, SP, Brazil. **Revista Brasileira de Botânica**, 18(1): 51-60, 1995.

VALOIS, A. C. C. ***Stevia rebaudiana*** **Bert.: Uma alternativa econômica**. Comunicado Técnico CT/13, CENARGEN, p. 1-13, 1992.

WEBER, J., DUCOUSSO, M., THAM, F. Y., NOURISSIER-MOUNTOU, S., GALIANA, A., PRIN, Y., LEE, S. K. Co-inoculation of *Acacia mangium* with *Glomus intraradices* and *Bradyrhizobium* sp. In aeroponic culture. **Biology and Fertility of Soils**, 41(4): 233-239, 2005.

WEI, G., WANG, H. Effect of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi on growth, nutrient uptake and synthesis of volatile oil in *Schizonepeta tenuifolia* briq. **Zhongguo Zhong Yao Za Zhi**, 16(3): 139-142, 1991.

ZEMKE, J. M., PEREIRA, F., LOVATO, P. E., SILVA, A. L. Avaliação de substratos para inoculação micorrízica e aclimatação de dois porta-enxertos de videira micropropagados. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 38(11): 1309-1315, 2003.

7. ANEXOS

Tabela 33. Produção de massa da matéria seca total da parte aérea (MST), massa da matéria seca de folhas (MSF), teor e quantidade acumulada de esteviosídeos nas folhas e porcentagem de colonização por fungos MA em plantas de estévia. Média de cinco repetições.

Fungos	MST/planta (g)	MSF/planta (g)	Esteviosídeo (%)	Esteviosídeo (mg/MSF/planta)	Colonização micorrízica (%)
IAC43	2,80 a	1,65 a	4,39 a	72,205 a	75,56 a
IAC42	2,64 a	1,60 a	2,39 d	38,258 bc	68,37 a
IAC13	2,61 a	1,62 a	2,95 c	47,731 b	57,43 a
IAC23	2,14 ab	1,28 ab	2,73 c	34,956 bcd	75,77 a
CP13	1,57 bc	1,00 bc	2,17 d	21,657 cde	56,01 a
CPVG	1,34 bcd	0,88 bcd	2,40 d	21,024 de	61,35 a
IAC50	0,81 cd	0,56 cd	3,00 c	16,811 e	27,42 b
CTRL	0,58 d	0,41 d	3,92 b	16,046 e	0,00 b

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.
IAC 13 = *Acaulospora* sp; IAC 23 = *Entrophospora* sp; IAC 42 = *Glomus etunicatum*; IAC 43 = *Glomus intraradices*; IAC 50 = *Glomus macrocarpum*; CP13 = *Acaulospora* sp; CPVG = *Glomus* sp; CTRL = Controle não inoculado

Tabela 34. Comparação entre as médias de tratamento de solo (esterilizado e não esterilizado) e épocas de colheita (1ª e 2ª Colheita) em relação aos tratamentos de inoculação (inoculado e não inoculado) para massa da matéria seca total da parte aérea – MST (g), em plantas de estévia cultivadas em vasos na casa de vegetação.

Fungo micorrízico	Solo	
	Esterilizado	Não Esterilizado
Inoculado	10,20 A	6,52 B
Não Inoculado	8,17	6,78

Letras maiúsculas referem-se às diferenças entre os tratamentos para solo esterilizado ou não.

Fungo micorrízico	Época	
	1ª Colheita	2ª Colheita
Inoculado	6,46 B	10,27 A
Não Inoculado	4,15 B	10,80 A

Letras maiúsculas referem-se às diferenças entre colheitas.
Médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 35. Comparação entre as médias de tratamento de solo (esterilizado e não esterilizado) e épocas de colheita (1ª e 2ª Colheita) em relação aos tratamentos de inoculação (inoculado e não inoculado) para massa da matéria seca de folhas – MSF (g), em plantas de estévia cultivadas em vasos na casa de vegetação.

Fungo micorrízico	Solo	
	Esterilizado	Não Esterilizado
Inoculado	4,52	3,42
Não Inoculado	4,02	3,08

Fungo micorrízico	Época	
	1ª Colheita	2ª Colheita
Inoculado	3,07 B	4,86 A
Não Inoculado	2,09 B	5,01 A

Letras maiúsculas referem-se às diferenças entre colheitas.
Médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 36. Comparação entre as médias de tratamento de solo (esterilizado e não esterilizado) e épocas de colheita (1ª e 2ª Colheita) em relação aos tratamentos de inoculação (inoculado e não inoculado) para teor de esteviosídeos (% m/m), em plantas de estévia cultivadas em vasos na casa de vegetação.

Fungo micorrízico	Solo	
	Esterilizado	Não Esterilizado
Inoculado	7,94 bB	8,57 aA
Não Inoculado	8,99 aA	6,13 bB

Letras minúsculas referem-se às diferenças entre os tratamentos inoculados ou não. Letras maiúsculas referem-se às diferenças entre os tratamentos para solo esterilizado ou não.

Fungo micorrízico	Época	
	1ª Colheita	2ª Colheita
Inoculado	8,05	8,46
Não Inoculado	7,73	7,39

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 37. Comparação entre as médias de tratamento de solo (esterilizado e não esterilizado) e épocas de colheita (1ª e 2ª Colheita) em relação aos tratamentos de inoculação (inoculado e não inoculado) para quantidade acumulada de esteviosídeos (mg/MSF/planta), em plantas de estévia cultivadas em vasos na casa de vegetação.

Fungo micorrízico	Solo	
	Esterilizado	Não Esterilizado
Inoculado	361,87	291,19
Não Inoculado	363,52 A	179,15 B

Letras maiúsculas referem-se às diferenças entre os tratamentos para solo esterilizado ou não.

Fungo micorrízico	Época	
	1ª Colheita	2ª Colheita
Inoculado	241,95 B	411,11 A
Não Inoculado	169,73 B	372,93 A

Letras maiúsculas referem-se às diferenças entre colheitas.
Médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 38. Comparação entre as médias de tratamento de solo (esterilizado e não esterilizado) e épocas de colheita (1ª e 2ª Colheita) em relação aos tratamentos de inoculação (inoculado e não inoculado) para porcentagem de colonização micorrízica (%) em plantas de estévia cultivadas em vasos na casa de vegetação.

Fungo micorrízico	Solo	
	Esterilizado	Não Esterilizado
Inoculado	71,52 a	78,45 a
Não Inoculado	13,41 bB	60,97 bA

Letras minúsculas referem-se às diferenças entre os tratamentos de inoculação. Letras maiúsculas referem-se às diferenças entre os tratamentos para solo esterilizado ou não.

Fungo micorrízico	Época	
	1ª Colheita	2ª Colheita
Inoculado	75,99 a	73,98
Não Inoculado	24,53 b	49,84

Letras minúsculas referem-se às diferenças entre os tratamentos de inoculação.
Médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 39. Valores de temperatura, umidade relativa e velocidade do vento durante o período de secagem da estévia ao sol para as 3 épocas de colheita.

Horário	25/09/2002			04/12/2002			06/02/2003		
	T (^oC)	UR (%)	V (km h^{-1})	T (^oC)	UR (%)	V (km h^{-1})	T (^oC)	UR (%)	V (km h^{-1})
10:30 h	19,8	55	18,0	27,8	70	12,0	25,7	81	14,7
10:40 h	20,0	55	18,0	27,9	70	12,2	28,8	79	14,9
10:45 h	21,0	54	18,3	28,0	69	12,4	25,9	78	15,1
10:55 h	21,5	52	18,7	28,6	67	16,1	25,9	78	15,3
11:00 h	22,0	50	19,0	29,0	66	11,0	26,0	77	15,5
11:10 h	22,5	48	13,0	29,3	66	9,6	26,8	74	16,5
11:20 h	23,0	46	10,0	29,8	66	9,6	27,3	73	17,5
11:50 h	23,5	44	8,0	30,1	67	9,6	28,1	68	17,5
13:00 h	24,0	44	6,0	31,2	62	14,0	28,7	65	13,0
13:30 h	23,7	43	6,3	32,2	60	18,2	29,5	64	10,0
13:40 h	23,3	42	6,7	32,3	57	16,0	30,0	63	9,2
14:00 h	23,0	41	7,0	32,5	55	13,0	30,3	61	15,0
14:20 h	23,2	41	7,0	32,7	53	11,0	30,6	61	20,3
14:40 h	23,3	41	7,0	32,8	53	9,9	30,9	59	16,0
14:50 h	23,2	42	7,2	32,8	53	17,0	31,2	58	12,0
15:00 h	23,1	42	7,4	32,8	54	24,0	31,3	59	20,0
15:50 h	23,2	42	7,6	33,0	50	24,0	30,8	61	31,5
16:10 h	23,1	43	7,9	33,1	49	24,0	30,8	58	30,0
16:20 h	23,3	43	8,2	33,4	49	20,0	30,4	56	28,7
16:40 h	23,2	43	8,5	33,8	49	15,0	30,4	56	25,9
16:50 h	23,1	44	8,7	34,3	49	10,3	30,4	55	25,9
17:00 h	23,0	44	9,0	34,0	47	11,0	30,5	54	25,9
17:10 h	23,0	44	9,0	33,9	45	12,0	30,5	52	25,9
17:20 h	23,0	44	8,9	33,7	44	13,6	30,2	56	15,0
17:30 h	22,9	44	9,0	33,7	43	14,7	29,8	60	6,4
$\overline{X}$	22,72	45,2	10,18	31,71	56,5	14,41	29,23	64,2	18,31
Desvio Padrão	1,06	4,43	4,42	2,18	8,96	4,56	1,88	9,02	6,77
Erro Padrão	0,21	0,89	0,88	0,44	1,79	0,91	0,38	1,81	1,36
Mín.	19,8	41	6,0	27,8	43	9,6	25,7	52	6,4
Máx.	24,0	55	19,0	34,3	70	24,0	31,3	81	31,5

Obs.: T- Temperatura; UR – umidade relativa; V – Velocidade do vento