

UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
AGRONOMIA – BACHARELADO

TRATAMENTO DE SEMENTES DE FEIJÃO COM ÓLEOS ESSENCIAIS:
EFEITOS NA GERMINAÇÃO E SANIDADE

ARUAN MARCONDES DOS SANTOS
LARISSA MENDES

DOURADOS – MS

2021

**TRATAMENTO DE SEMENTES DE FEIJÃO COM ÓLEOS ESSENCIAIS:
EFEITOS NA GERMINAÇÃO E SANIDADE**

**ARUAN MARCONDES DOS SANTOS
LARISSA MENDES**

Orientador(a): Prof^a. Dra. Lilian Maria Arruda Bacchi

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Universidade Federal da Grande Dourados,
como parte das exigências do Curso de
Bacharelado em Agronomia, para obtenção do
título de Engenheiro Agrônomo.

DOURADOS – MS

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

M538t Mendes, Larissa

Tratamento de sementes de feijão com óleos essenciais: efeitos na germinação e sanidade
[recurso eletrônico] / Larissa Mendes, Aruan Marcondes dos Santos. -- 2021.
Arquivo em formato pdf.

Orientadora: Lilian Maria Arruda Bacchi.

TCC (Graduação em Agronomia)-Universidade Federal da Grande Dourados, 2021.

Disponível no Repositório Institucional da UFGD em:

<https://portal.ufgd.edu.br/setor/biblioteca/repositorio>

1. Óleos essenciais. 2. Fungicida. 3. Tratamento alternativo. I. Marcondes dos Santos, Aruan. II.
Bacchi, Lilian Maria Arruda. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

©Direitos reservados. Permitido a reprodução parcial desde que citada a fonte.

**TRATAMENTO DE SEMENTES DE FEIJÃO COM ÓLEOS ESSENCIAIS:
EFEITOS NA GERMINAÇÃO E SANIDADE**

por

Aruan Marcondes dos Santos e Larissa Mendes

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como parte dos requisitos exigidos para
obtenção do título de ENGENHEIRO AGRÔNOMO (BACHAREL EM AGRONOMIA)

Aprovada em: 28/05/2021



Prof^a. Dr^a. Lilian Maria Arruda Bacchi
Orientadora – UFGD/FCA



Prof^a. Dr^a. Tathiana Elisa Masetto
Docente convidada – UFGD/FCA



Me. Suelen Pieta
Doutoranda convidada – UFGD/FCA

A Paulo César Mendes, dedicamos.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida, pela oportunidade de estudar, pela força e ânimo de todos os dias para superar cada obstáculo da minha carreira.

A Virgem Maria, minha querida mãe, pela sustentação e intercessão.

Pela proteção e por guiar meus passos todos os dias, agradeço ao meu Anjo da Guarda.

A minha mãe Lucilene Silva Marcondes, pelo suporte e incentivo, ao meu padrasto Luiz Carlos dos Santos e ao meu irmão Canaã Marcondes dos Santos por todo apoio.

A Larissa Mendes, minha namorada, pelo amor e carinho, por fazer meus dias de faculdade terem sido mais leves e alegres.

A professora Lilian Maria Arruda Bacchi, pela orientação e dedicação com o presente trabalho.

A todos os meus amigos, em especial Francisco Antonio Beltramin e Willian Costa Silva, pelo companheirismo e amizade que vou levar por toda vida.

Aruan Marcondes dos Santos

AGRADECIMENTOS

“19. Nos céus estabeleceu o Senhor o seu trono, e o seu império se estende sobre o universo.

20. Bendizei o Senhor todos os seus anjos, valentes heróis que cumpris suas ordens, sempre dóceis à sua palavra.

21. Bendizei o Senhor todos os seus exércitos, ministros que executais sua vontade.

22. Bendizei o Senhor todas as suas obras, em todos os lugares onde ele domina.
Bendize, ó minha alma, o Senhor.”

Salmos, 102

A Deus agradeço, por tudo.

A Nossa Senhora, São José, e Santa Rita de Cássia.

Ao meus pais, Jaqueline Benatti Mendes e Paulo César Mendes, em especial a ele que hoje, ainda, não pode comemorar esse momento tão especial comigo, mas que se faz presente na profissional que me tornei. Eterna gratidão a toda minha família.

Ao meu namorado, Aruan Marcondes dos Santos, pelo imensurável amor, e pela parceria de sempre.

A Lilian Maria Arruda Bacchi, minha professora e orientadora de anos.

A todos os meus amigos, companheiros de serestas.

Larissa Mendes

RESUMO

A cultura do feijão possui importância mundial por ser constituinte base da alimentação humana. Diversos são os agentes fitopatológicos que acometem esta cultura, e como forma de controle, destaca-se o tratamento de sementes. Dentre eles, o uso de óleos essenciais vem sendo amplamente estudado para o controle de fungos fitopatogênicos como alternativa ao tratamento químico. O trabalho consistiu em avaliar a ação antifúngica de óleos essenciais no tratamento de sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris*), bem como seus possíveis efeitos sobre a fisiologia das sementes. Foram comparados três tipos de óleos: de cravo (*Syzygium aromaticum*), eucalipto (*Eucalyptus* spp.) e melaleuca (*Melaleuca alternifolia*), além do fungicida químico Derosal Plus®. Os produtos analisados foram aplicados nas sementes, e estas foram submetidas à teste de germinação, para determinar sua porcentagem germinativa, e à teste de sanidade para determinar a eficiência dos produtos naturais e químico no controle de fungos fitopatogênicos. O tratamento químico de sementes apresentou melhor resultado em relação a qualidade fisiológica de sementes de feijão, comparado aos tratamentos alternativos. O tratamento com óleo essencial de cravo reduziu a incidência de fungos em sementes de feijão, com níveis de controle significativamente iguais ao do fungicida comercial.

Palavras-chave: *Phaseolus vulgaris*; Óleos essenciais; Fungicida.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	11
2.1 Óleos Essenciais	11
2.2 Óleos Essenciais na Agricultura.....	12
3 MATERIAL E MÉTODOS	14
3.1 Teste de Germinação.....	16
3.2 Teste de Sanidade	17
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	19
4.1 Teste de Germinação.....	19
4.2 Teste de Sanidade	22
5 CONCLUSÃO.....	25
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	26

1 INTRODUÇÃO

O feijão possui um papel histórico muito importante na alimentação das antigas civilizações, sendo, atualmente, a leguminosa mais consumida no mundo (SALVADOR, 2018). Além de seu papel fundamental como fonte proteica de origem vegetal, sendo um dos principais constituintes da cesta básica nacional, também corresponde a uma das alternativas de exploração agrícola em pequenas propriedades de ocupação com mão-de-obra menos qualificada, de acordo com Embrapa Arroz e Feijão (2004), citada por Fuscaldi e Prado (2005).

Os maiores produtores mundiais de feijão, em ordem, são Myanmar, Índia, Brasil, Estados Unidos, México e Tanzânia, responsáveis por 57% do total produzido no mundo, ou 15,3 milhões de toneladas (FAOSTAT, 2019). Dados da Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB, 2019) apontam que a produção brasileira está estimada em 245,8 milhões de toneladas, 1,6% maior em relação à safra passada.

Dezenas de doenças acometem o feijoeiro-comum, tanto causadas por fungos, quanto por bactérias, vírus e nematoides. No Brasil, aproximadamente 20% dessas doenças têm grande expressão, sendo o restante raramente observadas, ou não registradas no país. Dentre as principais doenças fúngicas, estão: Antracnose (*Colletotrichum lindemuthianum*); Mancha-angular (*Pseudocercospora griseola*); Ferrugem (*Uromyces appendiculatus*); Mancha de alternária (*Alternaria alternata* e *A. tenuis*); Oídio (*Erysiphe polygoni*); Sarna (*Colletotrichum dematium* f. sp. *truncata*); Mofo-branco (*Sclerotinia sclerotiorum*); Podridão-radicular de *Rhizoctonia solani*; entre outras (FARIA et al., 2018).

As sementes de feijão podem ser portadoras de um grande número de patógenos que podem afetar sua qualidade fisiológica e também causar doenças em diferentes estádios da cultura, afetando sua produtividade. Alguns destes patógenos atacam a planta através das sementes, são eles: *Sclerotinia sclerotiorum* (mofo branco), *Colletotrichum lindemuthianum* (antracnose) e *Xanthomonas axonopodis* (crestamento bacterian).

De acordo com Rey et al. (2009) a cultura do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) está sujeita ao ataque de vários fungos e bactérias. Alguns desses patógenos são agentes causais de doenças que podem ser transmitidas pelas sementes. A baixa qualidade das sementes simboliza uma das principais causas da baixa produtividade das lavouras de feijão no Brasil, devido a maioria dos agricultores utilizar as sementes de sua própria produção. Estas, geralmente, apresentam graus variáveis de mistura, com alto grau de umidade, baixa

germinação e vigor e, infestadas por insetos e patógenos.

Dentre os métodos de tratamento de sementes observados na literatura temos os métodos físicos, químicos e biológicos. Segundo Menten (1995), esta técnica, no sentido amplo, envolve a aplicação de diversos processos e substâncias às sementes, com o objetivo de preservar ou aperfeiçoar o desempenho e aumentar a produtividade das plantas. No sentido restrito e mais tradicional, o tratamento de sementes visa, exclusivamente, o controle de agentes causais de doenças que interferem na produtividade.

Segundo Pacheco e Vasconcelos (2013), a utilização de produtos químicos em tratamentos de sementes é uma técnica usada em muitas empresas do setor agrícola, que tem por objetivo evitar possíveis perdas de produtividade devido aos ataques de patógenos às sementes e plântulas. Porém, esse processo, muitas vezes feito na propriedade rural e sob a responsabilidade do produtor, bem como o manuseio de sementes tratadas, envolvem sérios riscos à saúde e ao ambiente por conterem agentes tóxicos.

Tratamentos alternativos têm sido buscados, principalmente àqueles à base de extratos vegetais, controle biológico ou tratamento físico. A utilização de produtos naturais extraídos de vegetais poderá, eventualmente, constituir-se como uma alternativa para o controle de patógenos associados a sementes, com a vantagem de redução de gastos para o produtor e ausência de impacto ambiental causado pelos agroquímicos (COUTINHO et al., 1999).

Assim, neste trabalho teve-se como objetivo geral avaliar o efeito dos óleos essenciais de cravo, melaleuca e eucalipto como alternativa no tratamento de sementes sobre a qualidade fisiológica e sanitária de sementes de feijão-comum (*Phaseolus vulgaris* L.) da cultivar ANfc 9, uma variedade do grupo carioca. Os objetivos específicos foram analisar o efeito dos óleos essenciais de cravo, eucalipto e melaleuca sobre as sementes de feijão contra patógenos; verificar se a porcentagem de germinação das sementes tratadas permanecem aceitáveis após o tratamento alternativo com óleos essenciais; proporcionar um tratamento de sementes de feijão natural e de baixo custo para o pequeno produtor.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Óleos Essenciais

Óleos essenciais (OE) são extraídos de plantas através da técnica de arraste a vapor, na grande maioria das vezes, e também pela prensagem do pericarpo de frutos cítricos, que no Brasil dominam o mercado de exportação. São compostos principalmente de mono e sesquiterpenos e de fenilpropanoides, metabólitos que conferem suas características organolépticas (BIZZO, 2009).

O óleo essencial de palmarosa, por exemplo, revela em sua composição dois principais produtos, geraniol, constituindo mais de 80%, e o acetato de geranila, 12% (SCHERER et al., 2009). Entretanto, Duarte et al. (2005), tiveram resultados divergentes, onde o geraniol apresentou 63%, e o acetato de geranila, 28% da área total. Desta forma, levanta-se a questão das diferenças químicas presentes entre os óleos essenciais poderem interferir nas propriedades funcionais dos mesmos, entre elas a atividade antimicrobiana e antioxidante (SCHERER et al., 2009).

De acordo com Souza (2017), uma alternativa interessante, tanto do ponto de vista ambiental como econômico, para o controle de patógenos de sementes de plantas são os óleos essenciais, substituindo então, o uso de fungicidas químicos. Algumas plantas apresentam substâncias em sua composição química, as quais podem demonstrar potencial fungicida, devem ser estudadas para utilização direta pelos produtores rurais, bem como para servir de matéria prima para formulação de novos produtos (CELOTO et al, 2008).

Como constatado por Cerqueira et al. (2009), o cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*), pertencente à Família Myrtaceae, que abrange aproximadamente 140 gêneros com cerca de 3000 espécies, sendo as espécies desta família particularmente ricas em óleos essenciais. Dentre as substâncias provenientes da extração do óleo essencial do cravo destaca-se o β -cariofileno, que possui ação bactericida e anti-inflamatória, e o eugenol, a que se atribui a ação anestésica, anti-inflamatória, antimicrobiana, correspondendo a 78 a 90% do óleo essencial (AFFONSO et al., 2012).

O óleo essencial de cravo possui uma ampla gama de utilizações já descritas na literatura. Scherer et al. (2009) citam: anestesia para peixes durante o transporte ou para minimizar o estresse antes do abate, anestésico tópico, tratamento de candidíase vaginal, ação antimicrobiana, antioxidante e anestésica.

O óleo essencial de eucalipto (*Eucalyptus* spp.) é composto por uma série de componentes orgânicos voláteis contendo de 50 a 100 componentes isolados, apresentando os grupos químicos: hidrocarbonetos, álcoois, aldeídos, cetonas, ácidos e ésteres. Na maioria das espécies de eucalipto os óleos etéreos são produzidos e armazenados por glândulas distribuídos no parênquima de suas folhas (SALGADO et al., 2003).

Numerosas são as aplicações do óleo essencial de eucalipto, de acordo com Piat et al. (2011), dentre elas estão as atividades terapêuticas, antifúngicas, antibacterianas, antissépticas, entre outras.

Segundo Oliveira et al. (2015), a *Melaleuca alternifolia*, ou *Tea Tree*, é uma árvore de ampla ocorrência na América Tropical, Austrália e Malásia. Esta árvore possui casca fina e folhas pontiagudas, pertence à Família Myrtaceae, subfamília Leptospermoideae, gênero *Melaleuca*. O principal produto é o óleo essencial (TTO - *tea tree oil*), de grande importância medicinal por possuir comprovada ação bactericida e antifúngica contra diversos patógenos humanos, sendo utilizado em formulações tópicas (OLIVEIRA et al., 2011), bem como os óleos essenciais de cravo e eucalipto. Este óleo também é amplamente empregado no setor de cosméticos por suas propriedades antissépticas (GONELLI et al., 2018).

2.2 Óleos Essenciais na Agricultura

Em pesquisa, Ascensão e Filho (2013) concluíram que a atividade antifúngica do óleo essencial de cravo-da-índia foi fortemente eficaz nas espécies *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, com inibição de até 100%, permitindo recomendar seu uso como uma forma de controle de doenças de plantas com produtos biodegradáveis.

Os óleos essenciais de diferentes espécies de eucalipto (*E. urophylla*, *E. citriodora* e *E. camaldulensis*) apresentaram controle em diferentes níveis sobre os fungos *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea* e *Bipolaris sorokiniana*, onde foram observadas variadas inibições nos crescimentos miceliais (SALGADO et al., 2003).

Steffen et al. (2010) observaram que o óleo essencial de *E. grandis* foi eficiente na bioestimulação do crescimento vegetativo de mudas de eucalipto. Em concentração de 25 e 50 µL/L proporcionou uma maior germinação de sementes, 15% e 11,7%, respectivamente, e em 30 e 40 µL/L, um maior desenvolvimento de raiz e parte aérea das mudas testadas.

Devido aos riscos de intoxicação por ingestão de frutos que podem reter fungicidas, além da intoxicação do trabalhador no momento da aplicação do produto, Piatí et al. (2013) apresentaram o óleo essencial de eucalipto como uma forma de controle alternativo eficiente no tratamento do bolor em citros. O óleo essencial de *E. globulus* apresentou atividade antifúngica sobre *Penicillium* spp. na fase vegetativa, através do controle no crescimento micelial, e na fase reprodutiva, na produção e germinação de esporos.

Estudos a respeito do uso deste componente até mesmo como potencial herbicida já foram realizados, onde Ibáñez e Blázquez (2019) avaliaram o controle das plantas daninhas *Portulaca oleracea*, *Lolium multiflorum*, *Echinochloa crusgalli* e *Nicotiana glauca* pela ação dos óleos essenciais de eucalipto e lavanda, bem como a atividade destes compostos sobre as culturas do pepino e tomate. As conclusões indicaram que a cultura do pepino foi a mais resistente aos tratamentos naturais, entretanto, o óleo essencial de lavanda demonstrou-se mais promissor ao manejo de *L. multiflorum*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Tecnologia de Sementes e no Laboratório de Microbiologia Agrícola e Fitopatologia, da Faculdade de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Grande Dourados, município de Dourados, estado do Mato Grosso do Sul.

As sementes da variedade ANfc 9, escolhida para a realização do trabalho, na primeira etapa, foram cedidas pelos produtores rurais Joaquim Eológio Silva Marcondes e Luiz Fernando de Oliveira Vicente, sócios de uma lavoura comercial localizada no município de Ribas do Rio Pardo - MS, denominada Fazenda Jatobazinho/4 Irmãos. Para a segunda implantação dos testes, as sementes foram cedidas pelo produtor rural Álvaro Luiz Pinheiro, Fazenda São Geraldo, Bonito – MS.

Foram realizados os testes de germinação e de sanidade de sementes, a fim de se avaliar a qualidade fisiológica e sanitária de sementes de feijão-comum (*Phaseolus vulgaris* L.), variedade ANfc 9, grupo carioca, tratadas com óleos essenciais e fungicida químico.

O estudo compreendeu o tratamento alternativo de sementes envolvendo óleos essenciais, à 20% de concentração, contrapondo tratamento químico convencional difundido atualmente no mercado.

Os tratamentos consistiram em:

T1- Derosal Plus®, Bayer S.A.;

T2- Óleo essencial de cravo (*Caryophyllus aromaticus* L.);

T3- Óleo essencial de eucalipto (*Eucalyptus* spp.);

T4- Óleo essencial de melaleuca (*Melaleuca alternifolia*);

T5- Testemunha (sem tratamento).

Os testes foram realizados duas vezes, com sementes conseguidas de origens diferentes, pois as primeiras não apresentaram boa qualidade de germinação.

O agrotóxico Derosal Plus possui Methyl benzimidazol-2-ylcarbamate (Carbendazim), 150 g/L, e Tetramethylthiuram disulfide (Tiram), 350 g/L, como ingredientes ativos, enquadrando-se no grupo dos Benzimidazóis e Dimetiltiocarbamatos. Apresenta registro no Ministério da Agricultura número 1602, pertence à classe agrônômica “Fungicida”, toxicológica “5 - Produto Improvável de Causar Dano Agudo”, e ambiental “II

- Produto muito perigoso”. Sua corrosividade é classificada como “Não corrosivo” e inflamabilidade “Não inflamável”. É fabricado como “Suspensão Concentrada para tratamento de sementes (FS)”, e modo de ação “Contato e Sistêmico” (AGROLINK, 2021).

Antemão a montagem dos testes, as sementes de feijão receberam seus respectivos tratamentos no Laboratório de Tecnologia de Sementes, realizados manualmente com o auxílio de seringa graduada e sacos plásticos. As dosagens dos óleos essenciais foram de 10ml de óleo (20%) e 40ml (80%) de água destilada, totalizando 50ml/kg de semente. Para a utilização do fungicida Derosal Plus®, em TS, foram seguidas as recomendações da bula do produto comercial, dose de 300mL/100 kg de sementes, ou seja, 3ml/kg (Figura 1).



Fonte: SANTOS, A. M. 2021.

Figura 1: Produtos utilizados na formulação das caldas para tratamento de sementes.

Logo após a secagem da calda nas sementes (Figura 2), iniciou-se a etapa de montagem dos testes, que ocorreu, primeiramente, com o teste de germinação no Laboratório

de Tecnologia de Sementes, mesmo laboratório onde foram feitos os tratamentos, seguido pelo teste de sanidade no Laboratório de Microbiologia Agrícola e Fitopatologia. No teste de germinação cada unidade experimental conteve 50 sementes com 8 repetições, e delineamento experimental inteiramente casualizado; e no teste de sanidade, 25 sementes com 16 repetições, em delineamento inteiramente casualizado.



Fonte: SANTOS, A. M. 2021.

Figura 2: Sementes secando após o tratamento com fungicida e óleos essenciais.

3.1 Teste de Germinação

Para a montagem do teste de germinação seguiu-se os princípios das Regras para Análise de Sementes (RAS) (BRASIL, 2009b). As unidades experimentais, correspondentes a 50 sementes de feijão cada, foram feitas em substrato de papel de filtro previamente umedecido com água a 2-3 vezes o peso do substrato, sob placa perfurada, facilitando a operação e a distribuição ao acaso das sementes, com um espaçamento uniforme entre elas. O delineamento usado foi inteiramente casualizado.

Cada unidade experimental foi colocada para germinar entre duas ou mais folhas de papel de filtro, embrulhada em formato de rolo e posteriormente condicionada na germinadora em posição vertical, método conhecido como RP. A temperatura foi regulada para 20-30°C, com o fornecimento de luz artificial, no mínimo, de 8 horas a cada ciclo de 24 horas.

Este teste foi avaliado contando-se o número de sementes que germinaram, convertendo-o em porcentagem. Sementes mortas, ou que não apresentaram emissão completa de radícula foram descartados.

3.2 Teste de Sanidade

Para avaliação da incidência de fungos nas sementes tratadas, o delineamento utilizado foi o de blocos casualizados, com 5 tratamentos (incluindo a testemunha) e 4 repetições.

Para o teste de sanidade seguiram-se as recomendações do Manual de Análise Sanitária de Semente (Brasil, 2009a), consistindo na disposição de 25 sementes de feijão em caixas gerbox sobre camada de papel filtro umedecida, com um distanciamento de 1-2cm entre elas. Cada unidade experimental foi constituída de 4 caixas gerbox, totalizando 100 sementes por parcela.

Os recipientes com as sementes foram dispostos sob lâmpada de luz fluorescente branca, com distância de 30-40cm, em câmara BOD com fotoperíodo de 12 horas, por 10 dias, na temperatura de $20 \pm 2^\circ\text{C}$. No segundo dia de incubação, as sementes foram levadas ao congelador por 24 horas, com a finalidade de evitar a germinação das mesmas, retornando após esse período para as condições de incubação.

Para a avaliação do teste de sanidade, foram analisadas cada uma das sementes de todas as gerboxes de todos os tratamentos, uma a uma, em uma estereomicroscópio, para a identificação da presença de fungos e feitas as devidas classificações.

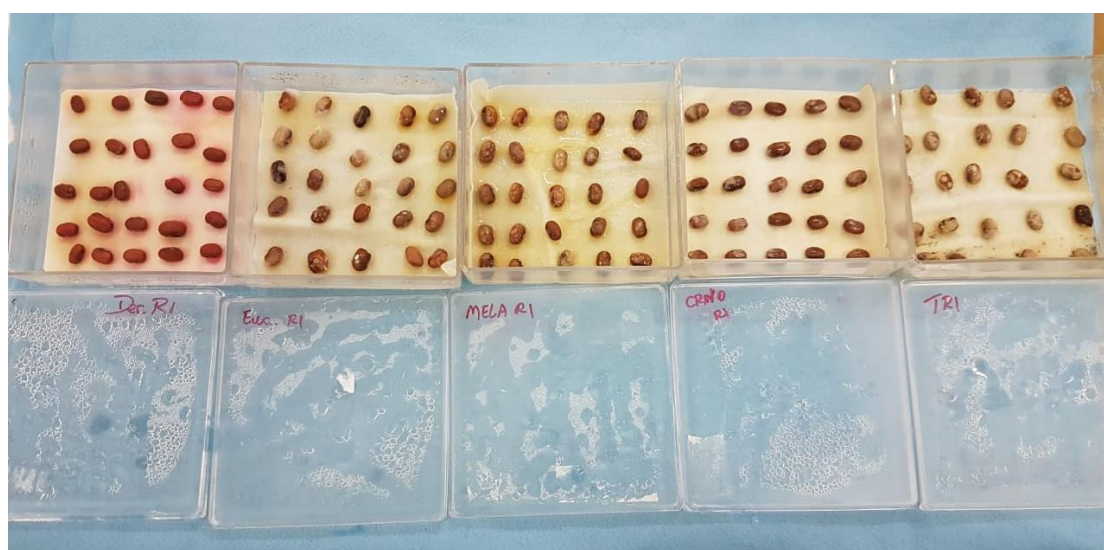
Dando sequência a coleta dos resultados, avaliou-se o teste de sanidade no qual foi feito individualmente com auxílio de um estereomicroscópio a resolução de 30-80X para a identificação de frutificações típicas do crescimento de fungos. O livro *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*, 3ª edição, de Barnett e Hunter (1999), atuou como suporte para fazer a identificação dos gêneros de fungos. Os resultados foram expressos em percentual de ocorrência dos fungos com duas casas decimais (BRASIL, 2009a).

Os dados de porcentagens de fungos, germinação e viabilidade foram transformados em arco seno da raiz de X para análise de variância (teste F). Havendo efeito de tratamento, compararam-se as médias pelo teste de Tuckey a 5%.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Quanto à avaliação dos primeiros testes implantados, observou-se que as sementes não se apresentavam com boa qualidade fisiológica. No teste de germinação não se observou germinação alguma em todos os tratamentos e repetições realizadas, inclusive na testemunha sem tratamento. Mediante esse fato, considerou-se que o lote de sementes escolhido possuía baixo vigor por, provavelmente, ser oriundo de safras passadas. Já no teste de sanidade, a temperatura ideal para o pleno desenvolvimento do trabalho, programada na BOD do laboratório, foi alterada de forma accidental, ficando acima do limite recomendado pelo Manual de Análise Sanitária de Semente para a cultura do feijão, comprometendo os resultados. Concluindo, portanto, que os testes deveriam ser refeitos seguindo a mesma metodologia proposta, entretanto, alterando o lote de sementes de feijão.

Mesmo com todas as adversidades encontradas, em análise visual, o tratamento alternativo com o óleo essencial de cravo demonstrava menor ataque de patógenos nas sementes (Figura 3).



Fonte: SANTOS, A. M. 2021.

Figura 3: Teste de sanidade do primeiro lote de sementes.

4.1 Teste de Germinação

Na segunda montagem, as avaliações foram realizadas no período planejado e recomendado. Na porcentagem de germinação de sementes de feijão observou-se que o tratamento químico com o fungicida Derosal Plus® (Carbendazim + Tiram) apresentou a

maior média quando comparado aos demais, diferenciando-se estatisticamente dos tratamentos alternativos eucalipto, melaleuca e cravo, respectivamente, pelo teste de Tukey a 5% (Figura 4). Os tratamentos com óleo de cravo e óleo de melaleuca resultaram em uma menor porcentagem de germinação das sementes, comparados à testemunha, indicando fitotoxidade na concentração utilizada.

CAUSAS DA VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	VALOR F	PROB. >F
TRATAMENTO	4	28746.6621793	7186.6655448	229.9533	0.00001
RESÍDUO	35	1093.8453390	31.2527240		
TOTAL	39	29840.5075183			

MÉDIA GERAL= 57.783913

COEFICIENTE DE VARIAÇÃO= 9.675 %

Quadro 1:

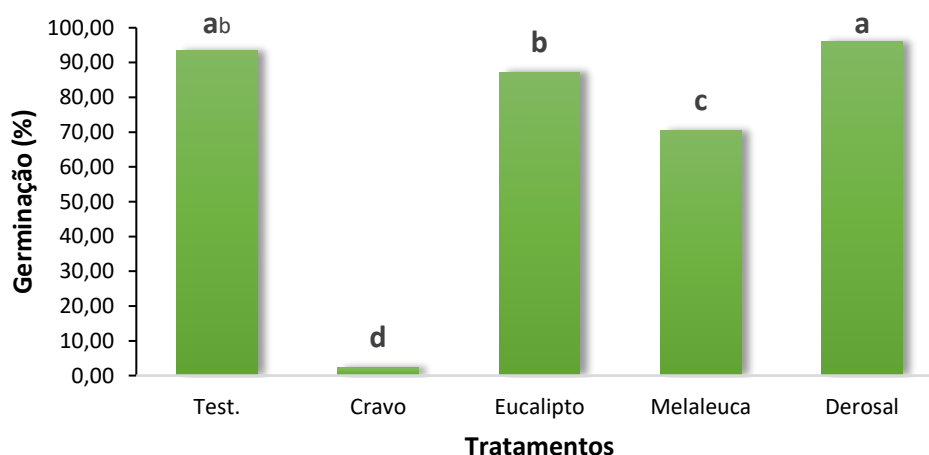


Figura 4: Germinação de sementes de feijão tratadas com fungicida e óleos essenciais de cravo, eucalipto e melaleuca. Dourados. 2021. Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey, à 5% de probabilidade.

A eficiência do tratamento fungicida na germinação de sementes já foi discutida em outros experimentos, evidenciando os benefícios do Tiram à germinação de feijão em relação à testemunha, apresentando maiores médias quando comparado a das sementes não tratadas, durante todo o período experimental (NOVEMBRE e MARCOS FILHO, 1991). De forma semelhante, Rocha et al. (2001) evidenciaram que o tratamento de sementes de soja com diversas combinações com Tiram, promoveu aumento na população de plantas e na produtividade de grãos.

O fungicida Derosal Plus®, combinado com os químicos Atento® e Cropstar®, em semente, apresentou resultados satisfatórios de germinação de sementes de soja, cultivar FUNDACEP 53 RR, com médias acima do mínimo exigido pelo MAPA (2015) de 80% (DANELLI et al. 2011). Camilo et al. (2016) constataram que a cultivar M7739 IPRO, tratada com Cropstar®+Derosal Plus®, apresentou uma taxa de emergência, em canteiro, superior a 90% com 45 dias de armazenamento.

Visando a manutenção da qualidade fisiológica de sementes, segundo Martins et al. (1996), o tratamento destas demonstra resultados positivos no stand de plantas e vigor, acarretando em maiores produtividades, até mesmo quando os patógenos da cultura se encontram em baixa quantidade, ou nulos.

Ressalta-se também que o tratamento com óleo essencial de cravo demonstrou ação fitotóxica em relação a germinação dos feijões, apresentando a maior taxa de sementes não germinadas, 96,75%. Fato já observado por Coser (2018) em trabalho realizado com óleos essenciais de cravo, capim limão e hortelã para controle da incidência de *S. rolf sii*, onde o óleo de cravo causou toxidade as plântulas de tomate avaliadas. Resultado semelhante também obtido por Gomes et al. (2016) em plântulas de feijão-fava.

A ação fitotóxica dos tratamentos alternativos já foi constatada em outras culturas (HILLEN et al., 2012); (XAVIER et al., 2012). De acordo com Fialho et al. (2015), os óleos essenciais de tomilho-branco, canela e citronela apresentaram este efeito nas folhas de videira avaliadas. Diversos aleloquímicos oriundos do metabolismo secundário dos vegetais se encontram presentes na composição de seus extratos, podendo causar efeito fitotóxico sobre várias plantas ou demais organismos (MAZZAFERA, 2003).

Entretanto, o tratamento de sementes de pimentão com o óleo essencial de cravo a 0,25% não afetou a germinação e vigor das sementes, além de proporcionar uma taxa de controle de antracnose de aproximadamente 90% em relação a testemunha inoculada não tratada, tendo maior eficiência que os demais óleos testados, alecrim, citronela, cravo, copaíba, eucalipto, hortelã, manjerição e *tea tree* (NASCIMENTO, 2017).

No presente trabalho, o tratamento com óleo essencial de eucalipto proporcionou um bom desempenho, revelando porcentagens de germinação acima do padrão mínimo de 80%, exigido pelo ministério da agricultura para comercialização (MAPA, 2013). Brito et al. (2010) concluíram que as sementes de mandacaru tratadas com óleo essencial de canela (*Cinnamomum zeylanicum*) em concentração de 0,5%, apresentaram um índice germinativo

de 96%, maiores velocidades de germinação e comprimento de plântulas, quando comparadas as sementes não tratadas.

Com base nisso, levanta-se a hipótese de os resultados variarem de acordo com as espécies, os óleos essenciais empregados, bem como suas concentrações. Portanto, os aspectos relacionados à fitotoxicidade necessitam ser elucidados.

4.2 Teste de Sanidade

Mediante os resultados obtidos pelo teste de sanidade, pode-se averiguar em todos os tratamentos a presença de fungos, divergindo entre si em quantidade e gênero. Foram encontrados os gêneros *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *Penicillium* spp. e *Rhizopus* spp.

Penicilium:

CAUSAS DA VARIÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	VALOR F	PROB. >F
BLOCOS	3	85.8028728			
TRATAMENTO	4	1014.0739080	253.5184770	5.5220	0.00950
RESÍDUO	12	550.9242589	45.9103549		
TOTAL	19	1650.8010397			

MÉDIA GERAL= 6.886977

COEFICIENTE DE VARIAÇÃO= 98.385 %

Quadro 2:

Aspergillus:

CAUSAS DA VARIÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	VALOR F	PROB. >F
BLOCOS	3	30.9284463			
TRATAMENTO	4	2752.0087826	688.0021957	37.3325	0.00002
RESÍDUO	12	221.1486583	18.4290549		
TOTAL	19	3004.0858871			

MÉDIA GERAL= 9.371264

COEFICIENTE DE VARIAÇÃO= 45.809 %

Quadro 3:

Fusarium:

CAUSAS DA VARIÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	VALOR F	PROB. >F
BLOCOS	3	187.4960802			
TRATAMENTO	4	3712.9248939	928.2312235	21.7270	0.00009
RESÍDUO	12	512.6696036	42.7224670		
TOTAL	19	4413.0905778			

MÉDIA GERAL= 18.809856

COEFICIENTE DE VARIAÇÃO= 34.749 %

Quadro 4:

Risophus

CAUSAS DA VARIÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	VALOR F	PROB. >F
BLOCOS	3	9.8598981			
TRATAMENTO	4	323.6817881	80.9204470	6.1501	0.00654
RESÍDUO	12	157.8920726	13.1576727		
TOTAL	19	491.4337589			

MÉDIA GERAL= 2.350889

COEFICIENTE DE VARIAÇÃO= 154.297 %

Quadro 5:

Constatou-se que a testemunha sem tratamento apresentou a maior incidência de agentes fúngicos, diferenciando-se estatisticamente de todos os demais tratamentos, exceto do tratamento com óleo essencial de eucalipto na incidência de *Penicillium* spp (Figura 5).

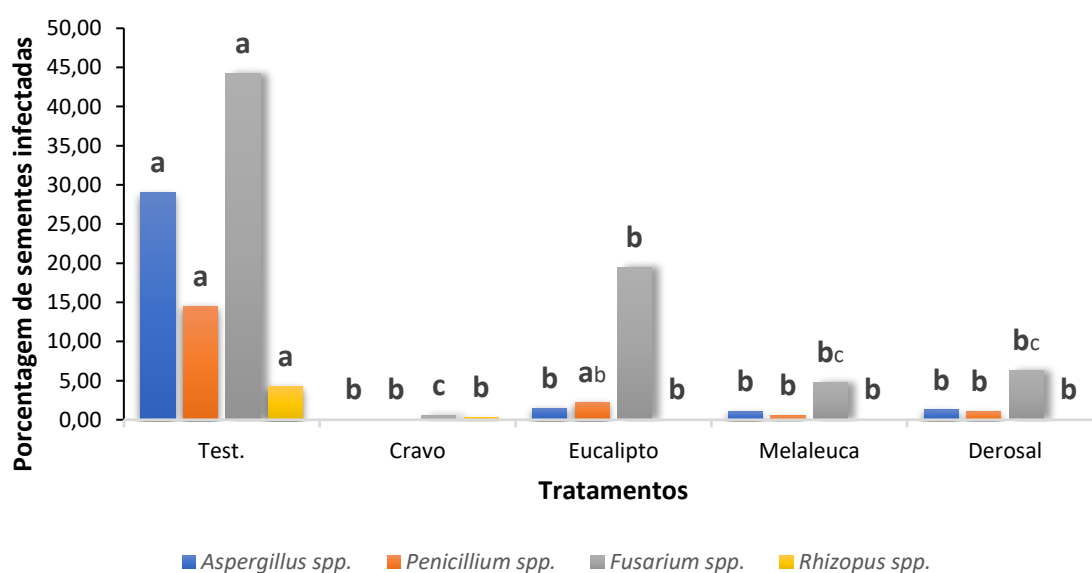


Figura 5: Incidência de fungos em sementes de feijão tratadas com fungicida e óleos essenciais de cravo, eucalipto e melaleuca. Dourados. 2021. Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey, à 5% de probabilidade, para cada fungo.

O óleo de cravo de fato apresentou forte ação tóxica, tanto para a germinação de sementes, quanto para o desenvolvimento de patógenos, possuindo baixa incidência de *Fusarium* spp. em relação aos outros tratamentos, além da ausência de *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp. Todavia, o tratamento de sementes de pimentão com o óleo essencial de cravo não afetou a germinação e vigor das sementes e proporcionou uma taxa de controle de aproximadamente 90% em relação a testemunha não tratada, tendo maior eficiência que os óleos testados.

Em trabalho similar, Seixas et al. (2011) relataram baixa taxa de desenvolvimento de *Fusarium subglutinans* no tratamento com óleo essencial de citronela. O controle deste fungo pela utilização de óleos essenciais já havia sido descrito por Zacaroni et al. (2009), onde foi observado o controle do crescimento micelial de *Fusarium oxysporum* sob tratamento com óleo essencial de pimenta longa.

O tratamento químico com Derosal Plus® não apresentou diferença estatística entre os demais tratamentos alternativos testados, todos demonstrando resultados positivos na supressão de patógenos fúngicos.

Com base nos resultados obtidos, é inviável economicamente o tratamento alternativo de sementes de feijão carioca com os óleos essenciais testados, tendo em vista que o valor dos óleos essenciais é mais elevado que o fungicida, em quantidades equivalentes. Atualmente, para se tratar 1 Kg de sementes de feijão com óleos essenciais, haveria um investimento de R\$ 35,00, enquanto que com Derosal Plus®, teria que investir R\$ 0,27.

5 CONCLUSÃO

O tratamento químico de sementes com o fungicida Derosal Plus® apresentou melhor desenvoltura, dentre os tratamentos alternativos, em relação a qualidade fisiológica de sementes de feijão, seguido pelo óleo essencial de eucalipto. Nenhum tratamento se sobressaiu no quesito qualidade sanitária de sementes, sendo que todos eles reduziram a incidência de fungos nas sementes.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFFONSO, R. S.; RENNO, M. N.; SLANA, G. B. C. A.; FRANÇA, T. C. C. Aspectos químicos e biológicos do óleo essencial de cravo da Índia. **Revista Virtual de Química**, v. 4, n. 2, p. 146-161, 2012.

ASCENÇÃO, V. L.; FILHO, V. E. M. Extração, caracterização química e atividade antifúngica de óleo essencial *Syzygium aromaticum* (cravo da Índia). **Cad. Pesq.**, São Luís, v. 20, n. especial, julho 2013.

BARNETT, H.; HUNTER, B. **Illustrated genera of imperfect fungi**. St. Paul: APS Press, 1999. 218p.

BIZZO, H. R. HOVELL, A. M. C. REZENDE, C. M. **Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas**. Química Nova. Vol. 32. No. 3, p. 588-594, 2009.

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

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Regras para análise de sementes**. Brasília: MAPA/ACS, 2009a. 399p.

BRITO, N. M.; NASCIMENTO, L. C.; COELHO, M. S. E.; FÉLIX, L. P. Efeitos de óleos essenciais na germinação de sementes de *Cereus jamacaru*. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 5, n. 2, p. 207-211, 2010.

BULA DERO-SAL PLUS. **AGROLINK**, [s. d.]. Disponível em: https://www.agrolink.com.br/agrolinkfito/produto/derosal-plus_3304.html. Acesso em: 20 de Setembro de 2020.

CAMILO, G. L.; CASTELLANOS, C. I. S.; SUÑÉ, A. S.; ALMEIDA, A. S.; SOARES, V. N.; TUNES, L. V. M. Qualidade fisiológica de sementes de soja durante o armazenamento após revestimento com agroquímicos. **Revista de Ciências Agrárias**, Capão do Leão, p. 436-446, 2016.

CELOTO, M. I. B.; PAPA, M. F. S.; SACRAMENTO, L. V. S.; CELOTO, F. J. Atividade antifúngica de extratos de plantas a *Colletotrichum gloeosporioides*. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 30, n. 1, p. 1-5, 2008.

CERQUEIRA, M. D.; MARQUES, E. D.; MARTINS, D.; ROQUE, N. F.; CRUZ, F. G.; GUEDES, M. L. S. Variação sazonal da composição do óleo essencial de *Myrcia salzmannii* Berg. (Myrtaceae). **Quím. Nova**, São Paulo, v. 32, n. 6, p. 1544-1548, 2009.

CONAB. **Primeiro levantamento da safra 2019/20 de grãos indica produção de 245 milhões de t**. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br>>. Acesso em: 20 set. 2020.

COSER, E. **Potencial dos óleos essenciais no controle do fungo *Sclerotium rolfsii* in vitro e em plantas de tomate**. 2018. 39 f. Monografia (Graduação) – Universidade Federal de Santa Catarina, Curitiba/SC. Disponível em: https://repositorio.ufsc.br/bitstream/handle/123456789/187677/TCC_ELISA_COSER.pdf?sequence=1&isAllowed=y. Acesso em: 10 maio 2021.

COUTINHO, W.M.; ARAÚJO, E.; MAGALHÃES, F.H.L. Efeitos de extratos de plantas anacardiáceas e dos fungicidas químicos benomyl e captan sobre a microflora e qualidade fisiológica de sementes de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). **Ciência e Agrotecnologia, Lavras**, v. 23, n. 3, p. 560-568, 1999.

DANELLI, A. L.; FIALLOS, F. R. G.; TONIN, R. B.; FORCELINI, C. A. Qualidade sanitária e fisiológica de sementes de soja em função do tratamento químico de sementes e foliar no campo. **Ciencia y Tecnología**, Passo Fundo, v. 4, p. 29-37, 2011.

DUARTE, M. C. T.; FIGUEIRA, G. M.; SARTORATTO, A.; REHDER, V. L. G.; DELAMERLINA, C. Anti-Candida activity of Brazilian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, p. 305-11, 2005.

EMBRAPA ARROZ E FEIJÃO. Disponível em: <http://www.cnpaf.embrapa.br>. Acesso em: 20 de setembro de 2020.

FAOSTAT. **Crops**. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>. Acesso em: 27 set. 2020.

FARIA, J. C.; LOBO JUNIOR, M.; WENDLAND, A. **Manual de Identificação das Principais Doenças do Feijoeiro-Comum**. EMBRAPA. 1ª edição, p. 4-48. Brasília-DF. 2018.

FIALHO, R. de O.; PAPA, M. de F. S.; PEREIRA, D. A. dos S. Efeito fungitóxico de óleos essenciais sobre *Phakopsora euvitis*, agente causal da ferrugem da videira. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 82, p. 1-7, 2015.

FUSCALDI, K. C.; PRADO, G. R. Análise econômica da cultura do feijão. **Revista de Política Agrícola**. Ano XIV, n. 1, 2005.

GOMES, R. S. S.; NUNES, M. C.; NASCIMENTO, L. C.; SOUZA, J. O.; PORCINO, M. M. Eficiência de óleos essenciais na qualidade sanitária e fisiológica em sementes de feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.). **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 18, n. 1, p. 270-287, 2016.

GONELLI, T.; PILON, T. P. F.; CHIARI-ANDRÉO, B. G. Óleo de melaleuca para o tratamento da acne: as evidências da literatura. **Revista Brasileira Multidisciplinar**, [S. l.], v. 21, n. 3, p. 113-119, 2018.

HILLEN, T.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; MESQUINI, R. M.; CRUZ, M. E. S.; STANGARLIN, J. R.; NOZAK, M. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais no controle de alguns fitopatógenos fúngicos in vitro e no tratamento de sementes. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v. 14, n. 3, p. 439-445, 2012.

ILBÁÑEZ, M. D.; BLÁZQUEZ, M. A. Phytotoxic Effects of Commercial *Eucalyptus citriodora*, *Lavandula angustifolia*, and *Pinus sylvestris* Essential Oils on Weeds, Crops, and Invasive Species. **Molecules**, v. 24, p. 1-15, 2019.

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Nº 45, de 17 de setembro de 2013. Anexo XI - **Padrões para produção e comercialização de sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.)**. Disponível em: https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-agricolas/sementes-e-mudas/publicacoes-sementes-e-mudas/copy_of_INN45de17desetembrode2013.pdf. Acesso em: 10 abr. 2021.

MARTINS, J. F. S.; BOTTON, M.; CARBONARI, J. J. Efeito de inseticidas no tratamento de sementes e na água de irrigação no controle de *Oryzophagus oryzae* (Costa Lima), em arroz irrigado. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 2, p. 27-32, 1996.

MAZZAFERA, P. Efeito alelopático do extrato alcoólico de cravo da-índia e eugenol. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 26, n. 2, p. 231-238, 2003.

MENTEN, J. O. M. **Patógenos em Sementes, Detecção, Danos e Controle Químico**. Ciba Agro. São Paulo. 1995.

NASCIMENTO, D. M. Efeito do tratamento de sementes de pimentão com óleos essenciais sobre o controle de *Colletotrichum gloeosporioides* e o potencial fisiológico das sementes. 2017. 66 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Botucatu/SP. Disponível em: https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/150465/nascimento_dm_me_bot.pdf?sequence=3&isAllowed=y. Acesso em: 05 maio 2021.

NOVEMBRE, A. D. L. C.; MARCOS FILHO, J. Tratamento fungicida e conservação de sementes de feijão. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 13, n. 2, p. 105-113, 1991.

OLIVEIRA, A. C. M. FONTANA, A. NEGRINI, T. C. NOGUEIRA, M. N. M. BEDRAN, T. B. L. ANDRADE, C. R. SPOLIDORIO, L. C. SPOLIDORIO, D. M. P. Emprego do óleo de *Melaleuca alternifolia* Cheel (Myrtaceae) na odontologia: perspectivas quanto à utilização como antimicrobiano alternativo às doenças infecciosas de origem bucal. **Rev. bras. plantas med.**, Botucatu , v. 13, n. 4, p. 492-499, 2011.

OLIVEIRA, M. I.; SCHNEIDER, M.; ROSA, M. B.; SILVA, C. M.; MORAES, M. S. A.; SCHNEIDER, R. C. S.; KIST, L. T. Extração e caracterização do óleo essencial de melaleuca e desenvolvimento de uma formulação semi-sólida de uso tópico. **Revista Jovens Pesquisadores**, Santa Cruz do Sul, v. 5, n. 1, p. 50-59, 2015.

PACHECO, F. P. VASCONCELOS, H. L. Saúde e segurança do trabalho: agentes químicos e equipamentos de proteção individual utilizados no tratamento e manuseio de sementes tratadas. **Revista Varia Scientia Agrárias** v. 03, n.02, p. 33-54. 2013.

PIATI, A.; SCHNEIDER, C. F.; NOZAKI, M. H. Efeito do óleo essencial de eucalipto sobre *Penicillium digitatum*. **Revista Acadêmica Ciência Animal**, [S.l.], v. 11, p. 19-26, 2013.

PIATI, A.; SCHNEIDER, C. F.; NOZAKI, M. H. Efeito in vitro do óleo essencial de *Eucalyptus globulus* sobre o crescimento e desenvolvimento de *Penicillium* sp. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 32, n. 3, p. 1033-1040, 2011.

REY, M. S. LIMA, N. B. DOS SANTOS, J. PIEROBOM, C. R. Transmissão semente-plântula de *Colletotrichum lindemuthinum* em feijão (*Phaseolus vulgaris*). **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v.76, n.3, p.465-470. 2009.

ROCHA, M. R.; COSTA, G. O.; PEREIRA FILHO, N. A.; AZEVEDO, L. A. S. Eficiência de fungicidas para o tratamento de sementes de soja (*Glycine max*). **Pesquisa Agropecuária Tropical**. v. 27, n. 2, p. 1-8, 1997.

SANTOS, C. H. S.; PICCOLI, R. H.; TEBALDI, V. M. R. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais e compostos isolados frente aos agentes patogênicos de origem clínica e alimentar. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, p. 1-8, 2017.

SALGADO, A. P. S. P.; CARDOSO, M. G.; SOUZA, P. E.; SOUZA, J. A.; ABREU, M. P.; PINTO, J. E. B. P. Avaliação da atividade fungitóxica de óleos essenciais de folhas de *Eucalyptus* sobre *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea* e *Bipolaris sorokiniana*. **Ciênc. agrotec.**, Lavras, v. 27, n. 2, p. 249-254, 2003.

SALVADOR, C. A. **Feijão**: Análise da Conjuntura Agropecuária. Disponível em: <http://www.agricultura.pr.gov.br/sites/default/arquivos_restritos/files/documento/2019-09/feijao_2019_v1.pdf>. Acesso em: 20 set. 2020.

SCHERER, R. WAGNER, R. DUARTE, M. C. T. GODOY, H. T. Composição e atividades antioxidante e antimicrobiana dos óleos essenciais de cravo-da-índia, citronela e palmarosa. **Rev. bras. plantas med.** V.11. N. 4 p. 442-449. 2009.

SEIXAS, P. T. L.; CASTRO, H. C.; SANTOS, G. R.; CARDOSO, D. P. Controle fitopatológico do *Fusarium subglutinans* pelo óleo essencial do capim-citronela (*Cymbopogon nardus* L.) e do composto citrônella. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v. 13, n. spe, p. 513-517, 2011.

STEFFEN, R. B.; ANTONIOLLI, Z. I.; STEFFEN, G. P. K. Efeito estimulante do óleo essencial de eucalipto na germinação e crescimento inicial de mudas de *Eucalyptus grandis*. **Pesquisa Florestal Brasileira**, Colombo, v. 30, n. 63, p. 199-206, 2010.

XAVIER, M. V. A.; OLIVEIRA, C. R. F.; BRITO, S. S. S.; MATOS, C. H. C.; PINTO, M. A. D. S. C. Viabilidade de sementes de feijão caupi após o tratamento com óleo essencial de citronela (*Cymbopogon winterianus* Jowitt). **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v. 14, p. 250-254, 2012.

ZACARONI, L. M.; CARDOSO, M. G.; SOUZA, P. E.; PIMENTEL, F. A.; GUIMARÃES, L. G. L.; SALGADO, A. P. S. P. Potencial fungitóxico do óleo essencial de *Piper hispidinervum* (pimenta longa) sobre os fungos fitopatogênicos *Bipolaris sorokiniana*, *Fusarium oxysporum* e *Colletotrichum gloeosporioides*. **Acta Amaz.**, Manaus, v. 39, n. 1, p. 193-197, 2009.