

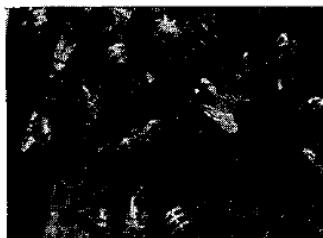
# Agroforum

Revista da Escola Superior Agrária de C. Branco N.º 8 e 9, ANO 4, 1995 PREÇO 500\$00



# Agroforum

Revista da Escola Superior Agrária de Castelo Branco



CAPA: Colónia de abelhas

Publicação Semestral  
Ano 4, nº 8/9  
Abril, 1996

**Director**  
Vergílio A. Pinto de Andrade

**Editor, Redacção e Sede**  
Escola Superior Agrária do  
Instituto Politécnico de C. Branco  
Quinta da Sr<sup>a</sup> de Mércules  
6000 CASTELO BRANCO  
Telef.: (072)327535/6/7  
Fax.:328881

**Conselho Redactorial**  
Luís Pedro Pinto de Andrade  
Cristina Alegria  
Fernanda Delgado  
José Carlos Gonçalves  
José Nunes  
Maria Eduarda P. Rodrigues  
Ofélia Maria S. dos Anjos

**Revisão de Texto**  
Deolinda Alberto  
Natividade Pires

**Impressão e Acabamentos**  
Centro de Recursos da ESACB  
e Albigráfica Lda.

**Tiragem**  
600 exemplares

Depósito Legal nº 39426/90  
ISSN: 0872-2617

As teorias e ideias expostas no presente número são da inteira responsabilidade dos seus autores. Tudo o que compõe a revista pode ser reproduzido desde que a proveniência seja indicada.

## SUMÁRIO

Editorial 3

### CIÊNCIA E TÉCNICA

Caracterização isoenzimática de material vegetal 5

*Carlos Manuel Gaspar dos Reis*

Sistemas "in vitro" de multiplicação de plantas: presente e futuro (I) 11

*José Carlos Gonçalves*

Métodos imunológicos na detecção de fraudes em leite/queijo de ovinos 19

*Valdemar Rebelo Osório e Castro*

Bacteriosis y virosis apícolas 27

*Miguel Hermoso de Mendonza Salcedo*

Proposta metodológica para avaliação de projectos inseridos em programas de desenvolvimento regional 31

*Deolinda Maria Fonseca Alberto*

A Poda da Oliveira 39

*António M.<sup>o</sup> dos Santos Ramos e outros*

Sistemas "in vitro" de multiplicação de plantas: presente e futuro (II) 45

*José Carlos Gonçalves*

Uso da palha para fins energéticos 51

*José Nunes e outros*

Enfermidades fungicas de la abeja 57

*Juan M. Alonso*

### EXPERIMENTAÇÃO E INVESTIGAÇÃO

Predição de volumes e perfil do tronco para o Pinheiro Bravo na região de Castelo Branco 61

*Cristina Alegria*

Síndrome de mortalidade neonatal en cabritos: datos para una primera aproximación al proceso 73

*Joaquín M. Rey Perez*

O efeito da *Cymadothea trifolii* Wolf na produtividade de 4 espécies de trevo 79

*Pedro Sequeira*

Influência do tipo de polietileno utilizado em cobertura do solo de morangueiro, cv. Oso Grande 83

*Fernanda Delgado e outro*

### DIVULGAÇÃO

Uma perspectiva de utilização da Classificação Decimal Universal 87

*Maria Eduarda Pereira Nogueira Rodrigues*

Novos cursos da ESACB 91

Teses e dissertações de docentes da ESACB 92



# INSTITUTO POLITÉCNICO DE CASTELO BRANCO

## Escola Superior Agrária

### Bacharelato em:

Eng.º de Prod. Agrícola  
Eng.º de Prod. Animal  
Eng.º de Prod. Florestal  
Eng.º de Ordenamento  
dos Recursos Naturais

### C. E. S. E. em:

Eng.º de Prod. de Óleos  
Alimentares

## Escola Superior de Educação

### Bacharelato em:

Língua e Secretariado  
Tradução e Relações  
Internacionais

### Licenciatura em:

(Duas variantes)

Prof. do Ensino Básico

### C. E. S. E. S. em:

Insp. Esc., Área Pedag.  
Administ. Escolar  
Orientação Pedagógica  
Educação Física

## Escola Superior Tecnologia e Gestão

### Bacharelato em:

Em Castelo Branco:

Eng.º de Const. Civil  
Eng.º de Comunicações  
Eng.º Informática  
(Tecnologias da Informação)  
Eng.º Informática  
(Informática Industrial)

No Polo de Idanha-a-Nova:

Contab. e Gestão de Pessoal  
Contab. e Gestão Financeira

- O Instituto Politécnico organiza também diversos cursos de especialização e formação contínua.
- O apoio às aulas, os trabalhos de investigação e o apoio à comunidade estão a cargo de 130 docentes/investigadores.
- Existe uma forte ligação à região, traduzida em protocolos de colaboração com Organismos Oficiais, Empresas, Cooperativas e Escolas.
- O Instituto Politécnico possui um Gabinete de Apoio e Informação destinado a apoiar os alunos, na procura de estágios e emprego.
- Os Serviços Sociais, para além do apoio na concessão de bolsas e outros benefícios sociais, dispõe de:
  - Duas residências, sendo uma masculina e outra feminina, com capacidade para cerca de 110 alunos(as) cada uma;
  - Cantina e bares, em cada uma das Escolas superiores.
- O IPCB tem instalações desportivas e condições para a prática do Rúgbi, Futebol de 5 e de 11, Ténis, Basquetebol, Voleibol, Andebol, Atletismo e Canoagem.

Avenida Pedro A. Cabral nº 12 - 2º, 6000 CASTELO BRANCO  
Telef.: (072) 22126/8 - Telex: (072) 53901 - Fax: (072) 331874



1 - Terminada a fase de instalação, é tempo de fazer uma pausa que permita analisar o percurso feito de 1981 até agora.

Provavelmente muitos já esqueceram as dificuldades do percurso, e o que foi o esforço feito para, a partir do zero e com as dificuldades de financiamento e de recrutamento de pessoal de todos conhecidos, construir uma Instituição digna e prestigiada, numa cidade do interior.

Valerá a pena lembrar alguns aspectos deste percurso.

2 - Adquirimos 183 ha de terreno e construímos 40.000 m<sup>2</sup> de área coberta que incluem:

- Instalações para a Escola Superior Agrária, Escola Superior de Educação e Escola Superior de Tecnologia e Gestão, esta com um Pólo a funcionar em Idanha-a-Nova;
- Instalações condignas para os Serviços Centrais do Instituto Politécnico e Serviços de Acção Social Escolar;
- Duas residências para estudantes com capacidade para 228 alunos;
- Um Centro de Formação de Técnicos Superiores Agrários, em colaboração com o Ministério da Agricultura;
- Um jardim botânico e viveiros que ocupam uma área de 26 ha e onde plantamos cerca de 10.000 árvores e arbustos;
- Instalações desportivas, que incluem um pavilhão, campos polivalentes, um campo de rãguebi e futebol relvado e uma pista de 400 m, bancadas e balneários. Aguardamos financiamento para a construção de um pavilhão desportivo e uma piscina há muito planeadas;
- Todas as Associações de Estudantes têm instalações próprias e foram apoiadas na aquisição de equipamento e nas suas actividades culturais e desportivas;
- Às bibliotecas existentes, em cada Escola Superior, junta-se um Centro de Documentação Europeia, único em todos os Institutos Politécnicos, na biblioteca do Instituto Politécnico.
- Existe já um projecto para a construção de uma biblioteca central e de um anfiteatro.

3 - Oferecemos um conjunto de 17 cursos diferentes, de formação inicial, que são frequentados por 2.000 alunos, a que se juntam 3 Cursos de Estudos Superiores Especializados.

No início do ano lectivo de 1995/96 temos 132 docentes, a maioria dos quais já com o mestrado. O esforço de formação de docentes ocupou sempre, um lugar de relevo nas nossas preocupações.

Bastará lembrar que na E.S.A., dos 55 docentes existentes, 95% têm o mestrado, 4 o doutoramento e 11 estão a fazer o doutoramento.

Desempenhando funções técnicas, administrativas e outras, apoiando o ensino, a investigação e o apoio à comunidade, existem 146 funcionários.

Convém realçar que se formaram já no Instituto Politécnico quase 1.300 novos técnicos.

Para apoiar os alunos, o Instituto criou o Gabinete de Apoio e Informação que visa: divulgar os cursos aqui professados; ajudar os alunos a encontrar locais de estágio e emprego; apoiar a realização de jornadas e seminários de promoção dos cursos, visitas de estudo às empresas e apresentação das mesmas nas Escolas.

Tem tido a seu cargo as bolsas concedidas pelos programas COMMET, ERASMUS, LINGUA, e TEMPUS.

Publica um Boletim Informativo "O POLINFOR".

Criou uma Unidade de Inserção na Vida Activa, (UNIVA) em colaboração com o Instituto de Emprego e Formação Profissional.

Tem a seu cargo as Relações Internacionais e os contactos necessários aos vários projectos, estágios e visitas de estudo.

**4 - No domínio da investigação o trabalho desenvolvido tem sido notável.** Para além do trabalho que tem servido de base às teses de mestrado e de doutoramento, muitos outros trabalhos foram realizados, grande parte deles sobre problemas da região.

Temos colaborado com Instituições nacionais e estrangeiras, não podendo deixar de salientar, pela sua importância, que somos sócios fundadores do Pólo Universitário da Região Centro e das Regiões Autónomas de Castela e Leon; pertencemos ao grupo universitário do Arco Atlântico. Somos fundadores do Réseau Européen Inter -Universitaire de Formation des Enseignants Agricoles (REIFEA) e do Instituto de Investigação de Sistemas Agrários, para além de termos convénio assinado com a Universidade da Estremadura (Espanha) e da colaboração com as Universidades de Praga e Brno.

A publicação dos trabalhos de investigação efectuados, dá-nos bem a ideia do esforço desenvolvido.

A própria revista Agroforum, que a ESA publica, tem divulgado muitos desses trabalhos.

**5 - Que impacto e que apoio tem dado o Instituto e as suas Escolas à Região?**

A fixação de um número elevado de técnicos superiores constitui já uma massa crítica importante e que pode desempenhar papel de relevo no desenvolvimento regional.

Com a preocupação de colaborarmos no desenvolvimento regional fundámos a Associação para o Desenvolvimento da Raia (ADIRA), somos sócios fundadores do Instituto para o Desenvolvimento Agrário da Região Centro

(IDARC) e criámos, como unidade orgânica do I.P.C.B. o Centro de Estudos e Desenvolvimento Regional (CEDER), para além do Centro de Estudos de Planeamento e Divulgação, há muito tempo a funcionar na ESA e que apoia directamente os agricultores.

O acesso de muitos alunos da região, ao ensino superior sem necessidade de irem para outras cidades mas, simultaneamente, a vinda de alunos de todo o país para frequentarem os nossos cursos, são factores igualmente relevantes.

Têm sido organizadas inúmeras acções de formação, nos mais diversos domínios e a ADIRA é considerada uma Escola Tecnológica no sector da Informática.

Estamos desenvolvendo esforços no sentido de criar, em Castelo Branco, um Pólo Tecnológico.

Estamos também, através do PRODEP e do Pólo Universitário da Região Centro, procurando financiamento para conseguir meios informáticos que permitam desenvolver ligações à rede Internet.

Temos dado apoio laboratorial para análises físico-químicas e microbiológicas de produtos alimentares, água, solos, componentes de rações, azeite e outros, pedidos directamente pelos agricultores e entidades públicas ou privadas.

Temos contribuído para a dinamização da actividade cultural e desportiva.

A contribuição económica que a instalação do ensino superior público deu, não pode ser menosprezada: o investimento feito atingiu os 10 milhões de contos, dos quais 50% gastos em pessoal e 25% em terrenos e construções.

**6 - Esta breve resenha tem apenas o objectivo de recordar alguns dos aspectos mais importantes da actividade desenvolvida ao longo destes anos e mostrar que estão criados todos os meios para se fazer ensino, investigação e apoio à comunidade, com a qualidade que todos queremos e desejamos alcançar.**

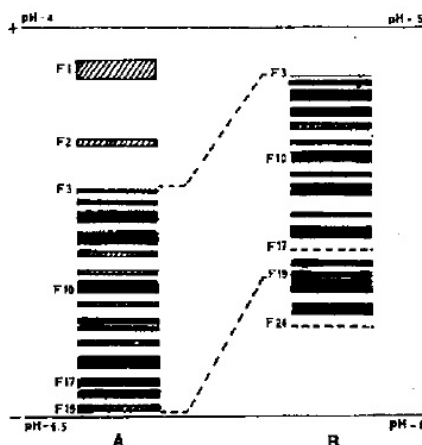
É possível, a partir daqui, descobrir novos caminhos, ensaiar novas experiências, de acordo com as necessidades sentidas no país e na comunidade europeia, fortalecer ligações aos países de língua oficial portuguesa, melhorar e diversificar os serviços que vimos prestando.

**7 - Não queria deixar de salientar que a intensa actividade que procurei resumir, é mérito de todos os que com o seu saber, o seu trabalho, o seu entusiasmo e a sua dedicação permitiram que o sonho se tornasse realidade.**

Podem por isso com justiça, orgulhar-se da obra que ajudaram a criar e a desenvolver.

# Caracterização isoenzimática de material vegetal

Carlos Manuel Gaspar dos Reis (\*)



## 1. Introdução

As metodologias normalmente utilizadas para distinguir e caracterizar o material vegetal baseiam-se, fundamentalmente, nas diferenças fenotípicas observadas nas variedades e nas cultivares estudadas. Apesar deste tipo de avaliação fenotípica ser muito importante, é difícil fazer a interpretação dos dados ao nível genético já que a maioria das características estudadas são de natureza poligénica, além da sua expressão ser marcadamente mediada por interações com o ambiente.

Pode-se tentar realizar a distinção de génotipos pela comparação dos seus cromatogramas quando se separam moléculas como flavonóides e antocianinas. Contudo, na cromatografia, à semelhança do que acontece nos descritores morfológicos, é difícil estabelecer uma relação directa entre fenótipo e génotipo pois a maioria desses compostos resulta de complexos processos metabólicos.

De entre os métodos bioquímicos, a electroforese de isoenzimas constitui um instrumento analítico de grande eficácia e precisão, constituindo estas óptimos "marcadores moleculares" em estudos de identificação e caracterização de génotipos. As diferenças existentes entre os genes que codificam para os polipéptidos traduzem-se, na electroforese, por variações na mobilidade das enzimas, permitindo o estudo destas o estabelecimento de uma directa relação entre fenótipo e génotipo.

## 2. Características das isoenzimas

As isoenzimas são diferentes formas moleculares de uma enzima, presentes no mesmo indivíduo, que compartilham um substrato comum e catalisam a mesma reacção, mas que diferem na mobilidade electroforética (Markert e Moller, 1959).

As isoenzimas especificadas por alelos do mesmo locus foram designadas por aloenzimas (Prakash *et al.*, 1969, citados por Wendel e Weeden, 1990), reservando-se o termo isoenzima para designar as formas que se devem à expressão de genes estruturais de diferentes loci. Contudo, o termo isoenzimas é utilizado normalmente em sentido lato, englobando tanto as aloenzimas como as isoenzimas no sentido restrito do termo.

A ocorrência das isoenzimas poderá ser explicada, em termos genéticos, como o produto de mutações a nível do DNA que se irão reflectir na composição e na sequência dos aminoácidos das cadeias polipeptídicas.

As mutações podem acarretar diferenças significativas nas cargas iónicas das cadeias polipeptídicas e, ainda, nas suas dimensões e formas. Quando as cadeias polipeptídicas são submetidas a uma diferença de potencial num gel semiporoso de amido ou poliácridamida, verificar-se-ão distintas velocidades de migração, não só pelo efeito eléctrico como também pela crivagem molecular

imposta pela estrutura do gel. Estes efeitos irão produzir, idealmente, a separação das isoenzimas presentes na amostra em zonas discretas de actividade enzimática (bandas) ao longo do gel, cuja natureza matricial irá manter a posição da molécula proteica após o final da electroforese. A subsequente imersão do gel numa solução que contém um substrato específico para a enzima que se pretende estudar e um corante que precipita ao nível do produto da reacção, permitirá revelar *in situ* as diferentes bandas da mesma enzima. O padrão de bandas observadas no gel para cada amostra é designado de **zimograma**.

Assim, uma vez que a sequência de aminoácidos de uma proteína é primariamente determinada pela sequência de nucleótidos de um gene estrutural, a análise da estrutura de uma proteína por electroforese é, numa primeira aproximação, uma análise do respectivo gene codificante (Gottlieb, 1977).

Basicamente, são três os mecanismos de produção das isoenzimas (Weeden, 1983; Castro, 1989):

- i) mutação num dado *locus* com a formação de diferentes alelos;
- ii) duplicação génica num cromossoma homólogo ou num não-homólogo. Este fenómeno poderá resultar de diferentes processos, como o entrecruzamento desigual entre cromossomas homólogos, a ocorrência de translocações recíprocas entre cromossomas não homólogos ou, mais simplesmente, por poliploidização. Subsequente divergência do gene original pela ocorrência de mutações no(s) gene(s) duplicado(s) poderão conduzir a novas formas da mesma enzima, codificadas por diferentes *loci*;
- iii) ocorrência de modificações das proteínas após a tradução, nomeadamente por clivagem da cadeia polipeptídica, ligação a outras moléculas, como coenzimas, grupos fosfato, etc., e agregação de cadeias polipeptídicas em unidades multiméricas.

Poder-se-á tentar explicar a ocorrência de múltiplas formas moleculares de uma enzima num organismo pelo facto de, a mesma reacção química ocorrer em diferentes compartimentos subcelulares, com diferentes condições de pH e de concentração de metabolitos, sendo necessário, por isso, diferentes isoenzimas para uma catálise eficiente (Gottlieb, 1982).

Alguns sistemas enzimáticos, como as esterases, aminopeptidases e peroxidases, apresentam frequentemente, no mesmo compartimento subcelular, três ou mais isoenzimas, pelo que uma outra hipótese avançada para explicar a abundância de isoenzimas observável é a variação na especificidade do substrato. Contudo, nem sempre se consegue demonstrar a existência de uma divergência funcional entre diferentes isoenzimas, pelo que não se sabe muito bem se estas desempenham realmente um papel importante na fisiologia celular, ou se não serão mais do que proteínas redundantes (Weeden e Wendel, 1990).

Quando comparadas com os restantes "marcadores moleculares", as isoenzimas apresentam algumas propriedades que as tornam extremamente interessantes, das quais salientamos:

- i) as aloenzimas são tipicamente codificadas por alelos de expressão codominante e são herdadas de acordo com as proporções mendelianas, o que permite a distinção fácil entre genótipos homozigóticos e heterozigóticos<sup>1</sup>;
- ii) as isoenzimas não apresentam interações de natureza epistática e pleiotrópica e não são influenciadas, salvo raras excepções, por factores ambientais;
- iii) é possível estudar um elevado número de *loci* utilizando pequenas quantidades de material biológico.

Como qualquer método analítico a electroforese de isoenzimas apresenta algumas limitações. Com efeito, para além de permitirem cobrir apenas uma pequena fracção do genoma dos indivíduos estudados, as isoenzimas podem não manifestar toda a variabilidade genética existente nos genes estruturais que as codificam. Em primeiro lugar, a electroforese de isoenzimas não permite detectar todas as diferenças existentes ao nível genético, devido à redundância do código genético e ao facto de nem todas as substituições de aminoácidos alterarem a mobilidade electroforética. Segundo, os genes eucariotas possuem sequências de DNA que não são traduzidas. Por último, este método não permite identificar qual a origem genética de enzimas com diferentes mobilidades electroforéticas que poderão ser consequentes de substituições, adições ou deleções de aminoácidos (Crick, 1979; Simpson e Withers, 1986; May, 1992).

### 3. Interpretação genética dos zimogramas

O número de bandas de um zimograma depende do número de genes codificantes, dos seus estados alélicos (homozigótico ou heterozigótico), da estrutura quaternária da enzima e da sua compartimentação subcelular. Um outro factor a ter em conta é o grau de ploidia, que poderá reflectir-se não só no acréscimo do número de bandas, como também na variação da sua espessura e intensidade de coloração (Castro, 1989).

A metodologia utilizada no estudo da hereditariedade das isoenzimas é, em tudo semelhante à seguida para os caracteres mendelianos monogénicos, embora, relativamente a diversos marcadores morfológicos, as isoenzimas apresentem a vantagem de estarem sob o controlo de alelos codominantes.

As proteínas identificadas por electroforese podem ser formadas por uma ou mais cadeias polipeptídicas, designando-se por monoméricas se constituídas apenas por uma cadeia polipeptídica, diméricas se formadas por duas subunidades, cada uma consistindo numa cadeia polipeptídica simples, tetraméricas se formadas por quatro subunidades, etc.

No caso mais simples, uma enzima monomérica codificada por um *locus* (isto é, monogénica) com dois alelos poderá originar o aparecimento de indivíduos com três fenótipos distintos (Fig. 1): bandas simples nos dois tipos de homozigóticos e duas bandas no

heterozigótico, ambas resultantes da presença de dois diferentes produtos proteicos codificados pelos dois alelos.

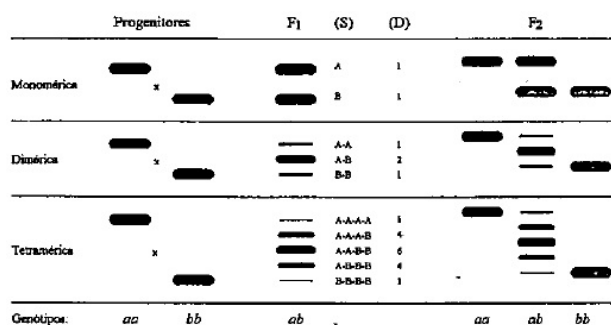
Nas enzimas multiméricas os produtos génicos dos *loci* combinam-se ao acaso para produzir a forma enzimática activa. Assim, para uma enzima dimérica, codificada por um *locus* com dois alelos, o fenótipo isoenzimático do heterozigótico apresentará três bandas (Fig. 1).

As bandas formadas por subunidades polipeptídicas diferentes, são designadas bandas heteroméricas. No caso das enzimas monoméricas não se forma naturalmente uma banda heteromérica. Nas enzimas diméricas, codificadas por um *locus*, o heterozigótico irá produzir uma banda heteromérica (AB) e nas tetraméricas o heterozigótico irá produzir três bandas heteroméricas: AAAB, AABB e BBBB (Fig. 1).

Da associação casual das subunidades em formas multiméricas resultam diferentes tipos de moléculas que formam distintas bandas com diferente intensidade de coloração e/ou largura. Do desenvolvimento da expressão binomial  $(A+B)^n$ , onde A e B representam os polipéptidos especificados pelos alelos *a* e *b*, e *n* o número de polipéptidos da enzima activa, é possível calcular o número de bandas expectável, as proporções isoenzimáticas relativas e a constituição em subunidades de cada banda. Assim, no caso de uma enzima tetramérica codificada por um *locus*, com os alelos *a* e *b* em iguais proporções, teremos:

$$(A+B)^4 = A^4 + 4A^3B + 6A^2B^2 + 4AB^3 + B^4$$

que traduz um perfil de cinco bandas nas proporções relativas de 1:4:6:4:1 (Fig. 1).



**Figura 1** - Diagramas de zimogramas de enzimas monoméricas, diméricas e tetraméricas controladas por um *locus* dialélico. O alelo *a* especifica a subunidade polipeptídica A e o alelo *b* especifica a subunidade polipeptídica B (S), constituição em subunidades de cada isoenzima; (D), quantidade relativa em cada banda (adaptado de Wendel e Weeden, 1990).

Nos casos em que as enzimas são codificadas por mais de um gene (isto é, policistrónicas) e estando localizadas no mesmo compartimento subcelular, se os polipéptidos especificados pelos alelos se associam de forma casual em produtos multiméricos, será possível o aparecimento de heteromultímeros de natureza intragénica.

O número de bandas (*n*) expectável num sistema multigénico depende do número de subunidades diferentes (*S*) e do número de subunidades que constituem a enzima (*Q*), podendo ser determinado através da fórmula (Shannon, 1968):

$$n = \frac{(S+Q-1)!}{(Q!)(S-1)!}$$

Assim, por exemplo, no caso de uma enzima dimérica codificada por dois *loci* heterozigóticos, da associação casual das subunidades, resultará um fenótipo composto por dez bandas.

Para além da complexidade originada pela existência de vários genes codificantes, frequentemente, torna-se difícil a interpretação dos zimogramas pela ocorrência de determinado tipo de fenómenos de origem genética e não genética (Weeden e Wendel, 1990):

- i) ausência de codominância;
- ii) as bandas heterodímeras podem migrar para posições que não são intermédias das bandas homodímeras, ou mesmo, em casos excepcionais, podem migrar para uma zona exterior aos limites definidos por estas;
- iii) ocorrência de "alelos nulos", que são variantes sem actividade enzimática;
- iv) ocorrência de modificações das proteínas após a tradução, originando o aparecimento de bandas adicionais;
- v) introdução de artefactos durante a preparação das amostras ou durante a electroforese;
- vi) ocorrência de bandas duplas ou conjuntos de bandas ("bandas sombra" ou "bandas fantasma"), cujo comportamento genético depende, no entanto, de um único alelo.

## 4. Áreas de estudo

Apesar das limitações anteriormente referidas a electroforese de isoenzimas tem sido um instrumento analítico utilizado e muito útil em várias áreas de estudo, nomeadamente:

### 4.1. Identificação varietal

É possível detectar dois tipos de variação quando se comparam os zimogramas de diferentes indivíduos:

#### 1) Variação intervarietal:

Os estudos de variação intervarietal baseiam-se na detecção de diferenças qualitativas e quantitativas entre zimogramas de diferentes variedades ou cultivares da mesma espécie.

Considera-se que existe variação qualitativa quando uma determinada banda isoenzimática, caracterizada pela sua taxa de migração, está presente no zimograma de uma cultivar ou variedade mas ausente no zimograma

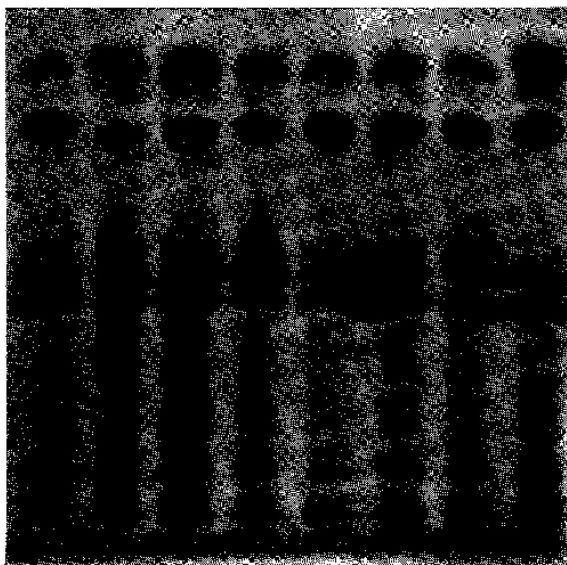




**Figura 2** - Zimogramas de fosfatase ácida da folha de diferentes cultivares de *Vigna unguiculata* obtidos por focagem isoelectrica. Observam-se três zimogramas diferentes: as populações 1, 2, 3, 4, 6 e 7 possuem zimogramas idênticos, pertencendo os outros dois tipos às populações 5 e 8 (Reis, 1994).

de uma outra variedade ou cultivar. As bandas deste tipo são designadas **polimórficas**, e o seu número determina o valor de um sistema isoenzimático na identificação varietal (Fig.2).

Verifica-se variação quantitativa quando uma determinada banda presente nos zimogramas de duas cultivares ou variedades diferentes (banda monomórfica) difere pela intensidade de coloração (Fig. 3). A variação quantitativa, ao contrário da variação qualitativa, não proporciona diferenças evidentes, pelo que a sua utilização na identificação varietal tem menor interesse. Além disso, a expressão das diferenças quantitativas é normalmente afectada por variações ambientais e ontogénicas, o que dificulta a sua interpretação.



**Figura 3** - Zimogramas de fosfatase ácida de cotilédones de diferentes cultivares de *Vigna unguiculata* obtidos por focagem isoelectrica. Observa-se apenas variação quantitativa (Reis, 1994).

## ii) Variação intravarietal:

Considera-se que existe variação intravarietal quando se observam distintos zimogramas entre indivíduos da mesma cultivar ou da mesma variedade.

Nas cultivares das espécies propagadas por via vegetativa, o fenótipo isoenzimático deverá ser extremamente uniforme e estável, pelo que, não será de esperar variação intravarietal, pois tanto os genótipos homocigóticos como os heterocigóticos são estabilizados ou "congelados" por esse processo de multiplicação. Os indivíduos dessas cultivares possuem o mesmo genótipo, pelo que a sua análise não requer uma amostragem muito exaustiva.

Nas espécies autogâmicas, reproduzidas por via seminal, as cultivares, na sua maioria, são formadas por mais de um genótipo, mesmo que a selecção tenha sido conduzida com o objectivo de obter um fenótipo morfológica e fisiologicamente uniforme, pelo que é expectável alguma variabilidade intravarietal para alguns sistemas enzimáticos, embora para outros possa existir grande uniformidade.

Nas espécies alogâmicas, estando as populações em polinização livre, a heterocigosidade e a variabilidade intravarietal são elevadas. Neste caso, não interessa seleccionar pela uniformidade isoenzimática em um ou mais *loci*, devido aos efeitos adversos que esta selecção poderá ter no desempenho agronómico. Uma alternativa possível, para distinguir variedades e cultivares, é a comparação das frequências alélicas isoenzimáticas (Hayward e Mcdam, 1977; Nielson, 1980; Ostergaard e Nielsen, 1981; Bailey, 1983), o que pressupõe não só o conhecimento do controlo génico das isoenzimas como também o estudo de um grande número (>100) de indivíduos (Simpson e Withers, 1986). Contudo, a comparação de variedades com base nas frequências alélicas não satisfaz totalmente as exigências impostas pelos organismos legais de certificação.

Nalgumas espécies alogâmicas é possível e economicamente viável a produção de híbridos, com a exploração do vigor híbrido ou *heterosis*, resultando estes do cruzamento controlado entre linhas puras. Os padrões isoenzimáticos das linhas puras ou dos híbridos resultantes do seu cruzamento deverão ser bastante uniformes permitindo portanto aferir a pureza de lotes comerciais de semente, sendo possível detectar a contaminação por pólen estranho na geração referente à produção da semente híbrida ou, nas gerações antecedentes, referentes à produção das linhas puras.

## 4.2. Estudos de sistemática e evolução

Para além da identificação varietal a electroforese de isoenzimas permite investigar e clarificar outros problemas no âmbito da sistemática.

A contribuição mais importante da electroforese de isoenzimas nos estudos de sistemática vegetal relaciona-se com a possibilidade de permitir quantificar as semelhanças e diferenças genéticas existentes entre populações e *taxa*. Este tipo de estudo poder-se-á realizar pela comparação directa dos zimogramas

ou, de forma mais correcta, através do cálculo de parâmetros estatísticos (percentagem de *loci* polimórficos, número médio de alelos por *locus*, número médio de *loci* polimórficos por indivíduo, etc.), após a compreensão do controlo genético das isoenzimas.

Contudo, deve salientar-se que a divergência isoenzimática não está normalmente associada com a especiação, podendo ocorrer divergência nos *loci* isoenzimáticos não acompanhada por processos de especiação e, reciprocamente, pode verificar-se especiação sem uma concomitante divergência nos *loci* isoenzimáticos (Gottlieb, 1984). Também as diferenças de natureza morfológica que permitem reconhecer diferentes *taxa* dentro de uma espécie ocorrem frequentemente sem uma correspondente divergência isoenzimática, fenómeno bastante notório quando se comparam as espécies domesticadas com os respectivos progenitores selvagens, pelo que se considera que a selecção, para características relacionadas com a domesticação, embora possa ser responsável por rápidas alterações fenotípicas, estas não são normalmente acompanhadas por mutações nos *loci* que especificam para as enzimas (Crawford, 1990).

Embora este aspecto constitua factor limitante no que se refere à utilização da electroforese de isoenzimas em taxonomia, existem diversos trabalhos que exemplificam a sua importância na resolução de alguns problemas taxonómicos difíceis. Assim, por exemplo, Jefferies e Gottlieb (1982) estudaram duas espécies diplóides de *Salicornia* que sob o ponto de vista morfológico são quase indistinguíveis, mas que ocupam *habitats* ligeiramente diferentes (embora por vezes se encontrem juntas na natureza). Os referidos autores não detectaram variação alozimática entre os indivíduos de cada espécie nem indícios de hibridação, contudo, verificaram a existência de diferenças isoenzimáticas entre as duas espécies, suficientes para a sua consideração como *taxa* distintos.

Em organismos diplóides os dados obtidos com a electroforese de isoenzimas podem ser utilizados no estudo da importância da hibridação na formação de novas espécies. Uma vez que os alelos de um *locus* produzem diferentes aloenzimas, sendo a sua expressão codominante, é possível verificar se uma planta híbrida expressa ou não as aloenzimas características dos progenitores. No entanto, a utilização desta metodologia pressupõe que:

- i) as espécies tidas como progenitoras ainda existam;
- ii) os alelos das espécies progenitoras para as isoenzimas em estudo sejam diferentes exibindo, preferencialmente, diferenças de natureza qualitativa;
- iii) não tenha ocorrido a divergência genética nem das espécies progenitoras nem do presumível híbrido.

A hipótese de origem híbrida de uma espécie será rejeitada caso o presumível híbrido não apresente ambos os alelos específicos das espécies que são tidas como progenitoras ou, no caso em que apresente alelos que não se encontram nas espécies parentais (Crawford, 1990).

As isoenzimas constituem, também, uma ferramenta muito importante nos estudos sobre a origem dos poliplóides, permitindo realizar o enquadramento genético de uma determinada espécie como alopólípide ou autopolípide.

#### 4.3. Marcadores genéticos e estudo de características de interesse agronómico

As isoenzimas são marcadores ideais para a construção de mapas genéticos dos cromossomas das espécies vegetais e algumas estão positivamente correlacionadas com determinados genótipos com valor agronómico devido à existência de ligação génica. Para algumas espécies, nomeadamente o milho (Goodman *et al.*, 1980; Goodman e Stuber, 1983; Wendel *et al.*, 1986), o tomateiro (Tanskley e Rick, 1980; Tanskley, 1983) e o trigo (Hart, 1983), estão documentados mapas extensivos de marcadores isoenzimáticos.

Os marcadores isoenzimáticos podem ser utilizados para detectar os genes desejados nas populações em segregação, com base no facto de o *locus* isoenzimático marcador identificar ou "marcar" um segmento cromossómico e permitir, o seu acompanhamento através das várias manipulações genéticas desenvolvidas no âmbito de programas de melhoramento. Segmentos cromossómicos homólogos, que possuem alelos alternativos no *locus* marcador podem ser identificados em diferentes indivíduos (ou linhas) e comparados pelos seus efeitos na expressão das características a seleccionar.

**Assine, Leia e Divulgue**

# Agroforum

**A sua Revista de Divulgação Agrária**

O Desenvolvimento Rural só é possível se **Formação, Investigação, Técnicos e Agricultores** estiverem em permanente contacto

Assim, por exemplo, no tomateiro a utilização como marcador de uma aloenzima de fosfatase ácida (*Aps-1*) que está ligada a um gene para a resistência aos nemátodes (Rick e Fobes, 1974; Rick e Tanksley, 1983; citados por Simpson e Withers, 1986), permitiu avanços significativos nos trabalhos de melhoramento neste âmbito. Também Weeden e Marx (1984) demonstraram que na espécie *Pisum sativum* o gene que especifica uma forma da enzima fosfoglucomutase (*Pgm-p*) pode ser utilizado como marcador para o gene recessivo *mo*, o qual confere resistência ao vírus do mosaico amarelo do feijão.

## Referências bibliográficas

- Bailey, D. C. (1983) Isozymic variation and plant breeders' rights. In: Tanksley, S. D.; Orton, T. J. (Eds) Isozymes in Plant Genetics and Breeding (pp 425-440). Elsevier, Amsterdam.
- Castro, L. F. T. (1989) Isoenzimas do *Pinus pinaster* Ait. numa Perspectiva de Aplicação ao Melhoramento Genético da Espécie. Tese de Doutorado. Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real.
- Crawford, D. J. (1990) Enzyme electrophoresis and plant systematics. In: Soltis, D. E.; Soltis, P. S. (Eds) Isozymes in Plant Biology (pp 146-164). Chapman and Hall, London.
- Crick, F. (1979) Split genes and RNA splicing. *Science*, 204:264-271.
- Goodman, M. M.; Stuber, C. W.; Newton, K.; Weissinger, H. H. (1980) Linkage relationships of 19 isozyme loci in maize. *Genetics*, 96:697-710.
- Goodman, M. M.; Stuber, C. W. (1983) Maize. In: Tanksley, S. D.; Orton, T. J. (Eds) Isozymes in Plant Genetics and Breeding (pp 1-33). Elsevier, Amsterdam.
- Gottlieb, L. D. (1977) Electrophoretic evidence and plant systematics. *Ann. Missouri Bot. Gdn.*, 64:161-180.
- Gottlieb, L. D. (1982) Conservation and duplication of isozymes in plants. *Science*, 216:373-380.
- Gottlieb, L. D. (1984) Electrophoretic analysis of the phylogeny of the selfing populations of *Clarkia xantiana*. *Pl. Syst. Evol.*, 147:91-102.
- Hart, G. E. (1983) Hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L. em Thell.). In: Tanksley, S. D.; Orton, T. J. (Eds) Isozymes in Plant Genetics and Breeding (pp 35-56). Elsevier, Amsterdam.
- Hayward, J. L.; McAdam, N. J. (1977) Isoenzyme polymorphism as a measure of distinctiveness and stability in cultivars of *Lolium perenne*. *Z. Pflzücht.*, 79:59-68.
- Jefferies, R. L.; Gottlieb, L. B. (1982) Genetic differentiation of the microspecies *Salicornia europea* L. (*sensu stricto*) and *S. ramosissima* J. Woods. *New Phytol.*, 92:123-129.
- Markert, C. L.; Moller, F. (1959) Multiple forms of enzymes: tissue, autogene and species specific patterns. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 45:753-763.
- May, B. (1992). Starch gel electrophoresis of allozymes. In: Hoelzel, A. R. (Ed.) Molecular Genetic Analysis of Populations, a Practical Approach (pp 1-27). Oxford University Press, New York.
- Nielson, G. (1980) Identification of all genotypes in tetraploid ryegrass (*Lolium* spp.) segregating for four alleles in a PGI-enzyme locus. *Hereditas*, 92:49-52.
- Ostergaard, H.; Nielsen, G. (1981) Cultivar identification by means of isozymes. I. Genotypic survey of the PGI-2 locus in tetraploid ryegrass. *Z. Pflzücht.*, 87:121-132.
- Reis, C. M. G. (1994) Caracterização Isoenzimática de Populações de *Vigna unguiculata* (L.) Walp. Dissertação de Mestrado. Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa.
- Shannon, L. M. (1968) Plant isoenzymes. *Ann. Rev. Pl. Physiol.*, 19:187-210.
- Simpson, M. J. A.; Withers, L. A. (1986) Characterization of plant genetic resources using isozyme electrophoresis: a guide to the literature. IBPGR, Rome.
- Tanksley, S. D.; Rick, C. M. (1980) Isozyme linkage map of tomato: applications in genetics and breeding. *Theor. Appl. Genet.*, 57:161-170.
- Tanksley, S. D. (1983). Molecular markers in plant breeding. *Plant Mol. Biol. Rep.*, 1:3-8
- Tanksley, S. D.; Orton, T. J. (1983) Isozymes in Plant Genetics and Breeding. Elsevier, Amsterdam.
- Weeden, N. F. (1983) Evolution of plant isozymes. In: Tanksley, S. D.; Orton, T. J. (Eds) Isozymes in Plant Genetics and Breeding (pp 177-208). Elsevier, Amsterdam.
- Weeden, N. F.; Marx, G. A. (1984) Chromosomal location of twelve isozyme loci in *Pisum sativum*. *J. Hered.*, 75:365-370.
- Wendel, J. F.; Stuber, C. W.; Edwards, M. D.; Goodman, M. M. (1986) Duplicated chromosomal segments in maize (*Zea mays* L.): further evidence from hexokinase isozymes. *Theor. Appl. Genet.*, 72:178-185.
- Wendel, J. F.; Weeden, N. F. (1990). Visualization and interpretation of plant isozymes. In: Soltis, D. E.; Soltis, P. S. (Eds) Isozymes in Plant Biology (pp 5-45). Chapman and Hall, London.

<sup>1</sup> No caso dos marcadores morfológicos, em que existe uma interação do tipo dominante/recessivo, a distinção dos diferentes genótipos só é possível pela realização de cruzamentos-teste e observação das descendências.

<sup>2</sup> O termo "alelos nulos" refere-se aos alelos para os quais não se verifica a produção de um produto proteico activo. Tal pode dever-se a várias causas, nomeadamente: ausência da cópia génica, ausência de transcrição, ausência de tradução ou inactividade do produto proteico (May, 1992).

\*Eng. Agrícola, Professor Adjunto da ESACB

Declaro que pretendo ser assinante da Revista **Agroforum** por 1 ano (2 números)

A partir do nº \_\_\_\_\_ Para o efeito envio:

Cheque nº \_\_\_\_\_ s/banco \_\_\_\_\_

Nome: \_\_\_\_\_ Nº de Cont.: \_\_\_\_\_

Morada \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Continente e Ilhas - 750\$00

# Sistemas *in vitro* de multiplicação de plantas: presente e futuro (I)

José Carlos Gonçalves (\*)  
Maria Teresa Coelho (\*\*)



## Resumo

Referem-se alguns dos aspectos históricos que mais contribuíram para o desenvolvimento do conhecimento na área da cultura de tecidos vegetais, bem como a grande diversidade de aplicações e utilização destas metodologias, desde os estudos fisiológicos, interacções substâncias/planta, produção de metabolitos secundários, manipulação genética e melhoramento até à sua utilização como uma poderosa metodologia na multiplicação de plantas, quer por rebentamento adventício, axilar e embriogénese somática. Faz-se uma descrição sucinta dos aspectos que maior impacto têm vindo a ter com a utilização destas metodologias nos diferentes grupos de culturas vegetais, nomeadamente nas culturas extensivas, hortícolas, ornamentais, fruteiras e florestais.

## 1. Introdução

Os princípios fundamentais que suportam a possibilidade de cultivar tecidos vegetais em condições artificiais estão contidos na teoria celular proposta por Schleiden e Schwann. De facto, postula esta teoria, que a célula

vegetal tem capacidade de autonomia e mesmo de totipotência e, como tal, capacidade de regenerar até se obter uma nova planta completa.

A primeira tentativa de cultivar células e/ou tecidos vegetais, surgiu com Haberlandt em 1902. Embora não tenha sido bem sucedido, este investigador é hoje considerado como o fundador da cultura de tecidos vegetais em meios de cultura artificiais.

Em 1927, Went conseguia isolar a primeira das várias substâncias de natureza auxínica, que promovem crescimento celular. Quimicamente identificou-se como sendo ácido 3-indol acético e, logo que se começaram a verificar os efeitos desta substância nos tecidos vegetais, três autores, White, Nobécourt e Gautheret publicam em 1939, independentemente, resultados obtidos na cultura de tecidos vegetais *in vitro* por longos períodos de tempo, sendo estes trabalhos considerados como pioneiros. Desde então, o ritmo das descobertas foi sendo cada vez maior.

Em 1955, Miller, Skoog e colaboradores conseguem isolar e identificar uma substância que se formava após autoclavagem do leite de coco e que tão extraordinários resultados estava a permitir obter, à qual foi dado o nome de cinetina (Miller *et al.*, 1955).

Os numerosos ensaios de associação de auxinas com citocininas e a apresentação de novas formulações nutritivas cada vez mais adaptadas às necessidades fisiológicas das células vegetais propostas, entre outros, por Heller (1953), Murashige e Skoog (1962), Schenk

e Hildebrandt (1972) e Greshoff e Doy (1972), permitiram que fosse possível estabelecer *in vitro*, uma cada vez maior diversidade de células, tecidos e órgãos pertencentes a diferentes espécies.

Estas técnicas foram rapidamente aplicadas a estudos de morfogénese, permitindo a comparação do desenvolvimento da estrutura da planta obtida *in vitro* com o da planta crescendo em ambiente natural e, como tal, significativos acréscimos do conhecimento nas áreas de histogénese e organogénese. Com base nestes estudos cedo se verificaram as potencialidades destes sistemas de regeneração *in vitro* na propagação de plantas, o que mais tarde se viria a chamar de micropropagação ou propagação *in vitro*. A sua primeira aplicação com grande sucesso foi feita por Morel (1964) para a obtenção de plantas isentas de vírus e propagação clonal de orquídeas.

## 2. Sistemas de cultura de tecidos e suas aplicações

Foi com base na utilização dos diferentes sistemas de cultura de tecidos que foi possível aprofundar e obter novas linhas de investigação. Assim, as culturas de *calli*, que podem ser obtidas quer directamente dos explants iniciais, quer de células já em cultura, são hoje utilizadas como excelentes meios para obtenção de organogénese indirecta (George e Sherrington, 1984; Pierik, 1987), de rebentamento adventício, quer por embriogénese somática quer por cultura de células em suspensão; são um extraordinário meio no campo do melhoramento, através da obtenção de variabilidade somaclonal (Ahuja, 1987) e tendo ainda aplicação no campo da fisiologia, patologia e criopreservação.

A cultura de células em suspensão, é hoje utilizada para a produção de metabolitos primários e secundários de grande aplicação industrial; é, teoricamente, um extraordinário sistema para propagação de plantas em larga escala; no campo da fisiologia permite estudar o comportamento da célula isolada, sendo assim quebradas todas as interacções a nível tecidual; no campo da patologia tornou possível o estudo da interacção parasita/célula ao nível da acção de toxinas nas membranas e organitos, em ambiente controlado e livre de qualquer outro contaminante.

A cultura de protoplastos tem permitido uma elucidação na especificidade e modo de acção de fungos e bactérias no metabolismo celular, em particular nas bases genéticas da resposta de resistência ou de susceptibilidade das plantas a um factor específico, já que, a parede celular, que por vezes pode ser impeditiva dessa relação, está ausente. Estes sistemas têm permitido ainda significativos avanços no campo da genética e melhoramento já que por fusão é possível a obtenção de híbridos somáticos, com a consequente supressão de barreiras de incompatibilidade sexual, permitindo a obtenção de novas espécies aloplóides. Os sistemas de protoplastos constituem ainda um óptimo sistema para aplicação da tecnologia de DNA recombinante

e consequente obtenção de plantas transformadas (Lindsey e Jones, 1989).

A cultura de anteras e/ou grãos de pólen tem sido um sistema utilizado, cada vez com maior êxito, para a produção de linhas homocigóticas por duplos haplóides e mesmo para a obtenção de plantas haplóides por androgénese, com grande aplicação em programas de melhoramento.

Todos os sistemas atrás referidos podem ser considerados como sistemas de cultura desorganizados (George e Sherrington, 1984), já que em todos eles as células passam por uma fase de desdiferenciação, aumentando o volume tecidual com total ausência de estruturas organizadas e contendo apenas um limitado número de diferentes células especializadas. Ao contrário, os sistemas de cultura organizados, baseiam-se na continuidade do crescimento e preservação das estruturas histológicas já existentes, dependendo exclusivamente do tipo de estrutura em cultura e do tipo de pré-determinação genética que as células receberam (George e Sherrington, 1984).

A cultura de órgãos determinados, isto é, que estão destinados a possuir um tamanho e forma definidos, tais como folhas, flores e frutos, têm permitido o estudo de efeitos de reguladores de crescimento no desenvolvimento destes órgãos, mas é, sem dúvida, a cultura de órgãos com crescimento indeterminado, ou seja, cujo crescimento é potencialmente ilimitado, tais como tecidos meristemáticos apicais de caules ou de raízes, que maior aplicação e impacto tem provocado na propagação vegetativa.

De especial importância se reveste a utilização de meristemas e ápices caulinares, já que são o sistema até hoje mais utilizado na propagação vegetativa e isto porque, apesar de todos os sistemas já referidos permitirem a regeneração de plantas completas, a propagação *in vitro* por gomos apicais e/ou axilares apresenta os mais baixos níveis de variabilidade genética, garantindo assim uma elevada manutenção da estabilidade genotípica e, consequentemente, fenotípica, dos indivíduos assim obtidos, embora as taxas de multiplicação sejam, em geral, inferiores aos sistemas que fazem uso de culturas desorganizadas. Dois tipos de cultura têm sido utilizados, dependendo do tamanho do explant inicial. Assim, a cultura de meristemas, consiste na utilização da extremidade do ápice, constituído exclusivamente por células meristemáticas, com dimensão entre 0.2 e 1 mm, de grande aplicação na obtenção de plantas isentas de vírus (Boxus e Druart, 1986) e a cultura de ápices caulinares, que consiste na utilização de explants iniciais com dimensões que podem ir até aos 10 mm de comprimento. Se as condições de cultivo forem as indicadas para a espécie, ambos os tipos de cultura vão permitir o desenvolvimento de pequenos rebentos. Com tratamentos apropriados, os rebentos assim obtidos podem ser induzidos a desenvolver raízes, concluindo-se assim a obtenção da planta completa ou podem ser utilizados como fonte de obtenção de explants secundários, para assim aumentar o número de rebentos disponíveis para enraizamento e posterior aclimatização.

## 2.1. A micropropagação

De acordo com a terminologia proposta pela Associação Internacional de Cultura de Tecidos, entende-se por micropropagação ou propagação *in vitro*, a propagação de plantas em meios de cultura de formulação definida, mantidas em ambiente artificial controlado, utilizando contentores de plástico ou vidro, com manipulação em condições assépticas (IAPTC, 1985).

Foram os trabalhos de Murashige (1974) e posteriormente de Debergh e Maene (1981) que estabeleceram os princípios gerais de um sistema de micropropagação, tendo sido definidas cinco fases: Fase 0: Selecção da planta mãe e preparação do explant; Fase 1: Estabelecimento de uma cultura asséptica; Fase 2: Fase de multiplicação; Fase 3: Preparação para o crescimento em ambiente natural; Fase 4: Transferência para o ambiente natural.

Teoricamente são vários os métodos hoje disponíveis para desenvolver sistemas de propagação *in vitro*. Entre eles podemos referir os sistemas de rebentamento axilar, utilizando como explant primário meristemas, ápices caulinares ou gomos nodais, sistemas de organogénese e/ou embriogénese directa, isto é, directamente do explant e, também por organogénese e/ou embriogénese indirecta, isto é, passando por uma fase de *calli*, podendo depois estes *calli* ser também utilizados para obtenção de culturas de células em suspensão e de protoplastos com posterior regeneração da planta completa.

Estes sistemas têm vindo a obter uma cada vez maior aplicação, quer em espécies herbáceas, quer em espécies lenhosas e o facto de se assistir a uma cada vez maior utilização e aplicação dos sistemas de propagação em geral e de clonagem em particular, segundo metodologias *in vitro*, é testemunho mais do que suficiente para demonstrar as inúmeras vantagens potenciais. (Para conhecimento mais detalhado destes aspectos ver artigo no nº 4 da *Agroforum*)

## 3. Particularidades das espécies lenhosas

É opinião generalizada que existe uma maior dificuldade no estabelecimento de sistemas de propagação *in vitro* de espécies lenhosas do que de espécies herbáceas. Alguns factores que contribuem para tal são a forte influência genotípica inter e intra-específica no tipo de respostas regenerativas, a contaminação das culturas por agentes patogénicos endógenos, a inibição do crescimento por fenóis e polifenóis libertados pelos explants e, finalmente, a dificuldade no estabelecimento em cultivo de explants provenientes de material com características fisiológicas adultas.

Como consequência da forte influência genotípica, é sabido que para cada uma das espécies que se pretende clonar, se torna necessário desenvolver um sistema específico, isto é, o que resulta bem para uma espécie, pode já não funcionar para outra. E em

adição a esta variação interespecífica, assiste-se ainda, por vezes, a uma forte variação intraespecífica de clone para clone. Quando se pretendem desenvolver sistemas para diferentes géneros, estas dificuldades surgem com muito mais relevância.

Também a contaminação bacteriana das culturas *in vitro*, logo na fase de estabelecimento ou posteriormente durante a fase de proliferação, é um grave problema. Tal facto, que pode ser consequência de processos de desinfecção deficientes e, então, há que os corrigir, é muitas vezes resultado de actividade bacteriana endógena, dos próprios tecidos e, como tal, não é possível de eliminar pelos processos de desinfecção normais. Quando tal acontece, há que ter em conta aspectos de sanidade da planta mãe que fornece os explants ou utilizar sistemas de estabelecimento que diminuam esse risco, por exemplo utilizando como explants meristemas ou ápices meristemáticos, sistemas de proliferação que favoreçam o rápido alongamento caulinar com baixas concentrações de citocininas, ausência de luz entre outros e, se necessário, utilização mista destas metodologias associadas ao emprego de antibióticos no meio de cultura.

O terceiro factor, inibição do crescimento por libertação de fenóis para o meio de cultura pelos explants, apesar de na maioria dos casos não poder ser evitado, é possível minimizar os seus efeitos. Assim vários sistemas podem ser definidos tendo por base a remoção dos compostos fenólicos do meio de cultura à medida que vão sendo libertados, a alteração do potencial redox ou, ainda, por redução da actividade das fenolases ou dos substratos. Na prática, alguns destes sistemas têm sido conseguidos através da inclusão no meio de cultura de anti-oxidantes, como por exemplo o ácido ascórbico, o ácido cítrico e o hidróclorato de cisteína ou de substâncias com capacidade de absorção de substâncias fenólicas como o carbono activo ou a polivinilpirrolidina; outra solução consiste na passagem sucessiva do explant por meios líquidos com anti-oxidantes antes de serem colocados no meio de cultura ou, ainda, por transferências sucessivas do explant para novo meio de cultura.

Finalmente, o quarto aspecto referido, dificuldade de estabelecimento de material vegetal de características adultas é, sem dúvida, o que maiores dificuldades tem levantado aos investigadores, em particular em géneros como *Junglans*, *Castanea* e *Quercus*, entre outros, em que a maturidade é atingida muito tardiamente. Por esta razão torna-se necessário utilizar ou desenvolver metodologias que permitam obtenção de material vegetal com características juvenis, sendo as mais utilizadas até ao momento a aplicação de citocininas ao nível da planta ou durante o estabelecimento em cultura, enxertias em série, utilização de rebentos de toça e podas severas (Greenwood, 1986).

No caso da utilização de rebentos obtidos a partir de toças e da base do tronco ou resultantes de podas severas, eles têm sido largamente utilizados, apesar de não se ter ainda perfeito conhecimento se, o aspecto

juvenil dos rebentos é resultado de um processo de rejuvenescimento ou apenas de uma actividade meristemática de tecidos juvenis que permanecem na planta (Greenwood, 1986). Espécies como a *Pinus radiata* L., *Pinus pinaster* L. e *Picea abies* Karst. (St-Claire *et al.*, 1985; Franclet, 1981) nas Gimnospérmicas, têm vindo a ser propagadas com este tipo de material vegetal. Também nas Angiospérmicas, várias são as espécies em que se utiliza este tipo de material vegetal para iniciar sistemas de propagação *in vitro*, como por exemplo castanheiro (Vieitez *et al.*, 1983; Gonçalves, 1991), carvalho (Vieitez *et al.*, 1985) e sobreiro (Manzanera e Pardos, 1990).

A acrescentar a estas dificuldades juntam-se outras, comuns a todas as espécies que são propagadas por estas metodologias, tais como: necessidade de equipamento laboratorial especializado, riscos de contaminação que podem inviabilizar grande quantidade de culturas, desenvolvimento de métodos específicos para cada espécie, o tamanho inicial das plantas é muito pequeno, são muito susceptíveis a perdas de água e, para além de não serem fotossinteticamente autossuficientes, algumas metodologias não garantem estabilidade genética. Perante tudo isto é, assim, indispensável, quando se inicia um projecto de multiplicação de plantas por cultura de tecidos, ter em conta os seguintes pressupostos:

- i) possibilidade de obtenção de taxas de regeneração elevadas;
- ii) capacidade das plantas obtidas *in vitro* resistirem ao transplante e desenvolverem-se no campo, segundo as expectativas ou ainda melhor;
- iii) existir uma certa compatibilidade entre os sistemas adoptados e os sistemas de multiplicação convencionais;
- iv) as características seleccionadas deverão justificar economicamente, ou de qualquer outro modo, o uso de sistemas de propagação por cultura de tecidos.

Com base nestes pressupostos, pretendemos continuar esta apresentação referindo de uma forma sucinta, mas tão actual quanto possível, os aspectos que consideramos mais relevantes das metodologias que hoje são utilizadas para a multiplicação *in vitro* de diferentes espécies vegetais. E como consequência da grande diversidade de técnicas, que resultam das especificidades próprias dos diferentes sistemas culturais, faremos essa apresentação tomando como referência exemplos considerados determinantes para as culturas extensivas, hortícolas, ornamentais, fruteiras e florestais.

#### 4. Culturas extensivas

Como resultado dos significativos acréscimos de investimento que se têm vindo a registar no decorrer das duas últimas décadas na área da biotecnologia vegetal, em particular por grandes instituições de investigação e empresas multinacionais, também as espécies de produção extensiva e das quais depende

em grande parte a própria alimentação humana, quer directa quer indirectamente, têm vindo a sofrer um forte incremento tendo em vista a sua manipulação e obtenção por métodos *in vitro*. Uma das razões que levou os investigadores a só recentemente se dedicarem ao estudo do comportamento destas espécies, quando em condições *in vitro*, deve-se ao facto de elas serem tradicionalmente propagadas por semente (a cana-do-açúcar é excepção). E como é sabido, a obtenção de sementes é, sem dúvida, simples e extraordinariamente barata, pelo que as possíveis estratégias de micropropagação têm necessariamente de ser limitadas às técnicas *in vitro* menos onerosas e com maior capacidade de multiplicação. Para a maioria das espécies essa metodologia é a embriogénese somática.

A pergunta que se coloca é saber como esta tecnologia poderá por si só, ou associada a outras, competir face ao preço de produção de semente por via convencional. Como atrás se referiu, esta apresentação não pretende descrever exaustivamente todo o progresso já feito, pelo que vamos analisar um pouco mais em detalhe duas culturas que se consideram como modelo na aplicação destes sistemas, a luzerna (*Medicago sativa*) e cana-do-açúcar (*Saccharum* spp).

A luzerna é uma espécie autotetraplóide de polinização cruzada, com acentuada depressão pela consaguinidade. As culturas comerciais são, por isso, produzidas por sementes obtidas de populações sintéticas, nas quais centenas de diferentes genótipos são cruzados a fim de se obter, após algumas gerações, semente certificada, quer para forragem, quer para silagem. O processo leva 3 ou mais anos, durante os quais o grau de heterozigocidade decresce. Até à década de 70 várias tinham sido as tentativas para estabelecer sistemas de propagação vegetativa, em particular para a produção de plantas mãe produtoras de semente (Davies, 1971), no entanto sem assinalável êxito.

A utilização de sistemas de embriogénese somática em luzerna, foi pela primeira vez referidos por Saunders e Bingham em 1972 e, desde então, tem-se registado progressos consideráveis. Os resultados obtidos indicam que através de selecção recorrente, são possíveis de obter elevados graus de regeneração a partir de linhas com fraca capacidade para tal (Brown, 1988), o que de resto não é muito surpreendente, dada a significativa heterozigocidade já referida das cultivares. Estudos recentes, vieram também mostrar que é possível controlar o sistema embriogénico via hereditariedade citoplásmica (Walton e Brown, 1988). Com estes conhecimentos passou a ser possível obter linhas celulares de fraca heterozigocidade, a partir das quais se poderá iniciar um processo de multiplicação em larga escala. Este processo de multiplicação de linhas celulares somáticas em larga escala tornou-se possível através da utilização de bioreactores. Estas máquinas são desenvolvidas por forma a permitirem um controle simultâneo do pH, oxigénio dissolvido no meio de cultura e outros, potencial de oxidação-redução, temperatura e agitação, tendo também possibilidades de substituição contínua de meio. Uma vez conseguido o sistema ideal de

obtenção de embriões, um sistema constituído por géis, nutrientes e uma membrana, pode ser utilizado para encapsular e proteger o embrião, obtendo-se assim, uma completa semente artificial (Fujji *et al.*, 1988), que pode ser mantida até à sua plantação directa no campo, onde os ensaios de avaliação estão já em fase adiantada de implementação.

A previsão para a utilização e divulgação comercial destas sementes artificiais está prevista para os próximos 5 a 10 anos. Poderão ser, assim, rapidamente introduzidas no mercado novas cultivares obtidas pelos métodos de melhoramento convencional ou quase de certeza, como resultado das técnicas de transformação obtidas por engenharia genética (Shahin e Kanaka, 1986).

Em relação à cana-do-açúcar, trata-se de uma espécie de multiplicação vegetativa obrigatória; devido às grandes dimensões dos rebentos de multiplicação, as áreas de viveiros atingem dimensões significativas, com todas as consequências que daí advêm, necessidade de mão-de-obra, tratamentos fitossanitários, fertilizações etc.. Nesta espécie os primeiros estudos foram desenvolvidos na área da regeneração de plantas por organogénese via *callus* (Heinz e Mee, 1969) e recentemente, tornou-se também possível a regeneração de plantas através de embriogénese somática (Ho e Vasil, 1983), com uma estabilidade genotípica bastante significativa.

Um estudo feito pela Associação de Produtores de Cana-do-Açúcar do Hawai, mostrou que a obtenção de plantas por micropropagação é ainda mais cara do que por sistemas convencionais (27 a 16% dependendo do método utilizado). Destes custos, 90% são atribuídos à mão-de-obra. Mas afirmam também, que apesar do maior custo das plantas micropropagadas, esta técnica leva grande vantagem quando se necessita de substituir um campo de plantas mãe, o que se pode traduzir num ganho de 2 anos.

A embriogénese somática associada à tecnologia de sementes artificiais, parece também nesta espécie vir a ganhar cada vez maior consistência, uma vez que, como já foi referido, o factor mão-de-obra é determinante nos sistemas de micropropagação que fazem uso da organogénese e no caso da embriogénese somática ela pode ser fortemente reduzida. Contudo, até ao momento, tal como acontece com muitas outras monocotiledóneas, não existe ainda um eficiente e fiável sistema de produção de embriões somáticos em larga escala.

## 5. Culturas hortícolas

Para o segundo grupo de plantas que referimos, hortícolas, a utilização da cultura de tecidos data desde os clássicos estudos de White (1934). Como resultado de intensos estudos de investigação com estas espécies, têm vindo a ser desenvolvidas uma gama variada de técnicas de micropropagação para a maioria das espécies com interesse económico neste grupo. Muitos destes sistemas envolvem o uso de

tecidos meristemáticos vegetativos, mas também tem sido frequentemente referida a regeneração de plantas a partir de cultura de células e/ou protoplastos. Também neste grupo e para a maioria das espécies, a utilização dos sistemas *in vitro* para obtenção de plantas directamente para a produção, continua a não ser competitiva face aos métodos tradicionais de multiplicação. Isto deve-se, em parte, ao facto de a grande maioria destas espécies serem propagadas por semente. Assim, onde a micropropagação de espécies hortícolas pode, e parece ser um dos seus aspectos mais promissores, sofrer um forte incremento, diz respeito à sua utilização como suporte da tecnologia da produção de sementes, isto é, produção de linhas progenitoras específicas para a produção de sementes híbridas, obtidas quer por melhoramento convencional quer por engenharia genética, como por exemplo em tomate (*Lycopersicon esculentum*), espargo (*Asparagus officinalis*), pepino (*Cucumis sativus*), bróculos (*Brassica oleracea*) entre outras (Doré, 1974; Anderson e Carstens, 1977), para além de casos particulares onde existem grandes dificuldades na aplicação de métodos convencionais, ou no caso das espécies de propagação vegetativa obrigatória, como acontece com a batata.

A manipulação *in vitro* da batateira foi iniciada há já bastante tempo, tendo como grande curiosidade o estudo fisiológico do processo de formação dos tubérculos. De facto, com a manipulação de constituintes e condições do meio de cultura, em particular de citocininas, açúcares, duração do período de luz e temperatura, tem sido possível a formação de microtubérculos cujo peso e número são variáveis segundo as variedades e/ou cultivares (Levy, 1985). Apesar de alguns factores limitantes, tais como dormência e certa fragilidade, estes propágulos são utilizáveis no campo em plantações de grande densidade e com um rendimento que se pode considerar aceitável. Este interesse é tanto maior, pois que, por esta metodologia é possível garantir sanitariamente este material de propagação, na medida em que são eliminados os riscos de contaminações virais, que assumem especial significado neste género, bem como todas as manipulações durante a germinação. A título exemplificativo, uma multiplicação *in vitro* durante um único ano, seguida de 4 anos de multiplicação convencional, permite obter 10 milhões de tubérculos a partir de 10 tubérculos mãe, ou seja 100 vezes mais do que executando todo o processo por multiplicação convencional (Levy, 1985). Assim, é de fácil constatação a importância que este sistema pode assumir no caso de se tratar de tubérculos super elite ou da operação de lançamento de uma nova cultivar.

Também neste grupo de plantas não podemos deixar de referir os importantes avanços que têm vindo a ser registados na obtenção de sementes artificiais, via embriogénese somática e posterior encapsulação, nomeadamente em cenoura (*Daucus carota*) (Kitto e Janick, 1985), aipo (*Apium graveolens*) (Redenbaugh *et al.*, 1986), entre outras.



## 6. Culturas ornamentais

O grupo das ornamentais é, por excelência, o grupo de plantas onde as técnicas de micropropagação tiveram o maior impacto, quer sob o ponto de vista científico quer sob o ponto de vista económico. Tudo isto, provavelmente como consequência do elevado valor intrínseco do produto final por unidade. Este êxito começou em 1960 quando Morel, por razões fitossanitárias, estabeleceu culturas de meristemas de orquídeas, a fim de obter material vegetativo isento de viroses que provocam importantes danos neste género. Como consequência disto foi de imediato constatado o enorme potencial na multiplicação em larga escala deste género que tão grande valor económico tem.

Outro factor que, eventualmente, contribuiu para o sucesso destas metodologias nas ornamentais, tem a ver com a importância que a obtenção de quimeras (plantas constituídas por tecidos de duas ou mais origens, que têm uma coexistência perfeitamente integrada, geralmente provocada por diferenças genéticas) assume nestas espécies, em particular nas ornamentais folhosas, por exemplo a *Ficus benjamina* "Golden King" e "Golden Princess", a *Ficus decora* "Belgaplant", e em géneros como *Cordylíne*, *Alpinia*, *Bougainvillea* etc., que podem ser micropropagadas com elevado grau de manutenção destas particularidades. Para nos apercebermos do impacto destas técnicas na multiplicação de ornamentais, apresentamos as seguintes tabelas que traduzem o número de plantas produzidas em cada um dos grupos que referimos (Tabela 1), bem como a sua distribuição por tipos de ornamentais (Tabela 2) e por géneros (Tabela 3).

Neste grupo de plantas é referência obrigatória a orquídea, género *Cymbidium*, mais que não fosse por ter sido a primeira planta a ser micropropagada sob um ponto de vista comercial. A utilização da cultura de meristemas como sistema de propagação clonal vinha assim permitir não só a obtenção de plantas isentas de vírus como também a produção em larga escala, o que de imediato se reflectiu nos preços, tornando estas espécies acessíveis a um maior número de pessoas.

É no entanto importante referir que se têm vindo a registar grandes abusos na aplicação destas metodologias, nomeadamente o não cumprimento das normas técnicas de isolamento de meristemas, o que se traduz em consequências, por vezes dramáticas para os produtores desse material supostamente certificado, contribuindo assim para uma disseminação em larga escala de um certo número de doenças, pelo que, nunca é demais insistir para o cumprimento das normas estabelecidas bem como a indexação periódica do material vegetal produzido.

Em relação às flores de corte, as três espécies mais importantes são o craveiro (*Dianthus caryophyllus*), o crisântemo (*Chrysanthemum morifolium*) e a gerbera (*Gerbera* spp.) que são facilmente propagadas *in vitro* e com elevadas taxas de multiplicação. Estudos recentes em França, apresentam evidências que confirmam as vantagens económicas na produção *in vitro* de craveiro, com ganhos na ordem dos 30 a 40%,

**Tabela 1** - Número de plantas micropropagadas por agrupamento vegetal.

Agrupamentos vegetais	Milhões de plantas
Ornamentais	157.436.792
Fruteiras	19.427.600
Culturas extensivas	2.415.500
Hortícolas	1.377.825
Florestais	1.289.500

Adaptada de Pierik, 1991.

**Tabela 2** - Número de plantas ornamentais micropropagadas em 1988 em 18 países europeus.

Categorias	Milhões de plantas
Plantas de vaso	92.337.417
Flores de corte	37.840.557
Bolbosas	13.161.960
Orquídeas	5.287.990
Lenhosas árvores/arbustos	3.889.290
Perenes de jardim	2.976.050
Várias	1.943.528
Total	157.436.792

Adaptada de Pierik, 1991.

**Tabela 3** - Géneros/espécies mais frequentemente micropropagados.

Género/Espécie	nº países c/ prod. >100.000 pl
<i>Ficus</i>	9
<i>Syngonium</i>	8
<i>Spathiphyllum</i>	7
<i>Gerbera</i>	7
<i>Rosa</i>	6
<i>Philodendron</i>	6
<i>Saintpaulia</i>	6
<i>Neprolepsis</i>	6
<i>Cordylíne</i>	6
<i>Anthurium</i>	3
<i>Cymbidium</i>	3

Adaptada de Pierik, 1991.

para além da garantia fitossanitária, comparativamente aos sistemas clássicos de multiplicação; no entanto a principal saída das plantas micropropagadas continua a ser o fornecimento de material de qualidade para os propagadores convencionais. A erradicação de viroses, no caso do craveiro, nem sempre necessita de termoterapia, já que ela é possível através da manipulação do meio de cultura, embora sempre dependente do tipo de vírus, da cultivar e das técnicas de cultura utilizadas, continuando a vitrificação a ser uma das desordens fisiológicas mais preocupantes quando se utilizam sistemas *in vitro* de multiplicação (Ziv, 1990).

No caso do crisântemo a sua multiplicação em larga escala é possível tanto por caulogénese axilar como adventícia e apesar das potencialidades dos sistemas adventícios serem incomparavelmente maiores em termos de taxas de regeneração, deve-se ter em

conta as desvantagens desta técnica, já que podem induzir instabilidade genética bem como segregação de quimeras, o que poderia trazer como consequência as perdas das características morfológicas que tornam essas cultivares importantes sob o ponto de vista econômico. Estes sistemas adventícios envolvem, por isso, ajustamentos e controles rigorosos dos meios de cultura, durante toda a fase de estabelecimento e multiplicação.

Em relação à gerbera, o maior obstáculo à sua propagação convencional é a relativa baixa taxa de multiplicação, que se traduz em valores da ordem das 7 a 15 estacas por ano, bem como os problemas fitossanitários (principalmente os ataques de *Phytophthora cryptogea*), de tal forma que a multiplicação de gerbera é já, na sua quase totalidade, feita por micropropagação. Estas culturas são iniciadas a partir de meristemas como explants iniciais retirados sem perda da planta mãe, com uma manutenção das características fenotípicas na ordem dos 100%. A principal dificuldade que surge com esta espécie tem a ver com a procura um pouco sazonal deste género, bem como o restrito período de crescimento, o que exige uma criteriosa programação tendo como base o perfeito conhecimento das necessidades do mercado, bem como os parâmetros da multiplicação *in vitro* desta espécie. Nesse aspecto é importante a manipulação dos meios de cultura, em particular das citocininas, já que, por vezes, com a necessidade de aumentar as taxas de multiplicação aumentam-se as concentrações deste regulador de crescimento, podendo provocar alterações ao nível do crescimento e da própria floração, bem como na qualidade geral da planta. Estes aspectos são tanto mais importantes quanto na maioria das situações esta diminuição da qualidade não é passível de avaliação durante a permanência *in vitro* das plantas, vindo-se apenas a manifestar na fase de aclimatização traduzindo-se em reduções drásticas na taxa de sobrevivência.

No grupo das ornamentais folhosas é de destacar o género *Ficus*, no qual a micropropagação teve extraordinário impacto, sendo neste momento a superprodução o principal problema. As médias de produção atingem as 10.000 microestacas por m<sup>2</sup> sendo a sua qualidade boa e de crescimento mais rápido do que as estacas enraizadas pelos métodos convencionais.

Nesta área das ornamentais, um importante avanço no sentido de uma maior redução dos custos de produção, tem a ver com a utilização de sistemas hidropónicos para crescimento das plantas micropropagadas. Estes sistemas têm vindo a ser utilizados por viveiristas, que produzem já plantas por hidropónia como produto final, e que lhes permite assim uma maior rentabilização dos seus equipamentos, tirando todas as vantagens do rápido crescimento das plantas regeneradas *in vitro*, para o seu comércio directo ou então para a obtenção de plantas mãe para a produção de estacas.

Neste grupo existem ainda alguns géneros para os quais não estão ainda definidas as condições ideais de micropropagação, como acontece por exemplo para o bambú, certas coníferas, para os géneros *Paeonia*, *Cyclamen*, o mesmo se passando nas palmeiras ornamentais,

bem como em espécies em que a exsudação de substâncias para os meios de cultura continua ainda a ser um grave problema, como acontece com os géneros *Delphinium*, *Strelitzia* e *Phalaenopsis*.

## Referências bibliográficas

- Ahuja, M. R. (1987) Somaclonal variation. In: Bonga, J. M.; Durzan, D. J. (Eds) Cell and Tissue Culture in Forestry (pp 272-285) Martinus Nijhoff Pub, Dordrecht.
- Anderson, W. C.; Carstens, J. B. (1977) Tissue culture propagation of broccoli, *Brassica oleracea* (Italica group), for use in F1 hybrid seed production. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 102:69-73.
- Boxus, P.; Druart, P. (1986) Virus-free trees through tissue culture. In: Bajaj, Y. P. S. (Ed) Biotechnology in Agriculture and Forestry (pp 24-30) Springer-Verlag, Berlin.
- Brown, D. C. W. (1988) Germplasm determination of *in vitro* somatic embryogenesis in alfalfa. *HortScience*, 23:526-531.
- Davies, W. (1971) Hybrid alfalfa production. U. S. Patent #3,570,181.
- Debergh, P. C.; Maene, L. (1981) A scheme for commercial propagation of ornamental plants by tissue culture. *Sci Hort.*, 14:335-345.
- Doré, C. (1974) Production de plantes homozygotes mâles et femelles à partir d'anthers d'asperge, cultivées *in vitro* (*Asparagus officinalis*). *Compt Rend. Acad. Sci. Paris*, 278D:2135-2138.
- Francllet, A. (1981) Rajeunissement et propagation végétative de lignieux. *Annales Afocel* (Ed.) (pp.12-39).
- Fujii, J.; Slade, D.; Redenbaugh, K.; Walker, K. (1988) Artificial seeds for plant propagation. *Trends in Biotech.*, 5:335-339.
- George, E. F.; Sherrington, P. D. (1984) Plant Propagation by Tissue Culture. Exegetics Ltd, England (710pp).
- Gonçalves, J. C. (1991) Influência de alguns factores na micropropagação de castanheiro (*Castanea Miller*). Tese de Mestrado. Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa, (113 p).
- Greenwood, M. S. (1986) Rejuvenation of forest trees. *Plant Growth Regulation*, 6:1-12.
- Greshoff, P. M.; Doy, C. H. (1972) Development and differentiation of haploid *L. esculentum* (tomato). *Planta*, 107:161-170.
- Heinz, D. J.; Mee, D. W. P. (1969) Plant differentiation from callus tissue of *Saccharum* species. *Crop Sci.*, 9:346-348.
- Heller, R. (1953) Recherches sur la nutrition minerale des tissus végétaux *in vitro*. *Ann. Sci. Nat. Bot. Biol. Veg.*, 14:1-22.
- Ho, W. J.; Vasil, I. (1983) Somatic embryogenesis in sugarcane (*S. officinarum* L.): growth and plant regeneration from embryogenic cell suspension cultures. *Ann Bot.*, 51:719-726.
- IAPTC (1985) Usage of Vertebrate, Invertebrate and Plant Cell, Tissue and Organ Culture Terminology. *Newsletter*, 45:15-22.
- Kitto, S. L.; Janick, J. (1985) Production of synthetic seeds by encapsulating asexual embryos of carrot. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 110:277-282.
- Levy, D. (1985) Propagation of potato by direct transfer of *in vitro* proliferated shoot cuttings into the field. *Sci. Hort.*, 26:105-109.

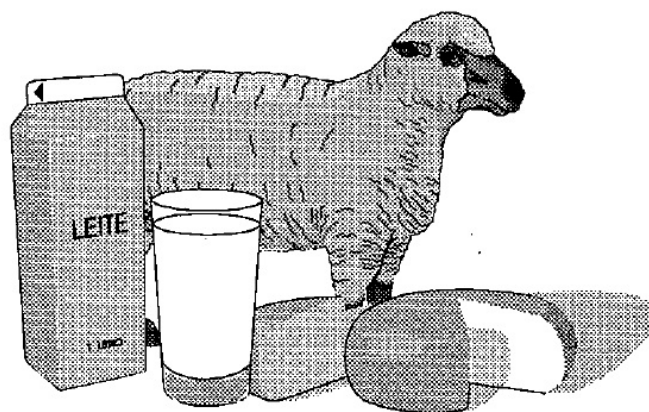
- Lindsey, K.; Jones, M. G. K. (Eds) (1989) *Plant Biotechnology in Agriculture*. Open University Press, Milton Keynes (241pp).
- Manzanera, J. A.; Pardos, J. A. (1990) Micropropagation of juvenile and adult *Q. suber* L.. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 21:1-8.
- Miller, C. O.; Skoog, F.; Von-Saltza, M. H.; Strong, E. M. (1955) Kinetin, a cell division factor from deoxyribonucleic acid. *J. Am. Chem. Soc.*, 77:1392.
- Morel, G. M. (1964) Tissue culture: A new means of clonal propagation of orchids. *Amer. Orch. Soc. Bul.*, 33:473-478.
- Murashige, T.; Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. *Physiol Plantarum*, 15:473-497.
- Murashige, T. (1974) Plant propagation through tissue culture. *Ann. Rev. Plant Phys.*, 25:135-166.
- Pierik, R. L. M. (1991) Commercial micropropagation in Western Europe and Israel. In: P. C. Debergh; Zimmermen, R. H. (Eds.) *Micropropagation* (pp 155-165) Kluwer Acad. Pub.
- Pierik, R. L. M. (1987) *In Vitro Culture of Higher Plants*. Martinus Nijhoff Pub., Dordrecht (344pp).
- Redenbaugh, K.; Paasch, B.; Nichol, J.; Kossler, M.; Viss, P.; Walker, K. (1986) Somatic seeds: encapsulation of asexual embryos. *Biototechnology*, 4:797-801.
- Saunders, J.; Bingham, E. (1972) Production of alfalfa plants from callus tissue. *Crop Sci.*, 12:804-808.
- Shahin, E. A.; Kaneko, K. (1986) Somatic embryogenesis and plant regeneration from callus cultures of nonbulbing onions. *HortScience*, 21:294-295.
- Schenck, R. V.; Hildebrandt, A. C. (1972) Medium and techniques for induction and growth of monocotyledoneous and dicotyledoneous plant cell cultures. *Can. J. Bot.*, 50:199-204.
- St.-Claire, J. B.; Kleinschmit, J.; Svolba, J. (1985) Juvenility and serial vegetative propagation of Norway spruce clones (*Picea abies* Karst.). *Silvae Gen.*, 42-48.
- Vieitez, A. M.; Ballester, A.; Vieitez, M. L.; Vicitcz, E. (1983) *In vitro* plantlet regeneration of mature chestnut. *J. Hort. Sci.*, 58(4):457-463.
- Vieitez, A. M.; San-José, M. C.; Vieitez, E. (1985) *In vitro* plantlet regeneration from juvenile and mature *Quercus robur* L.. *J. Hort. Sci.*, 60:99-106.
- Walton, P.; Brown, D. C. W. (1988) Screening of *Medicago* wild species for callus formation and the genetics of somatic embryogenesis. *J. Genet.*, 67:95-100.
- White, P. R. (1934) Potentially unlimited growth of excise tomato root tips in a liquid medium. *Plant Physiol.*, 9:585-600.
- Ziv, M. (1991) Vitrification: morphological and physiological disorders of *in vitro* plants. In: P. C. Debergh; Zimmermen, R. H. (Eds.) *Micropropagation* (pp 45-69) Kluwer Acad. Pub.

\* Biólogo, Prof. Adjunto da ESACB

\*\* Eng<sup>a</sup> Mult. Plantas, Técnica da ESACB

# Métodos imunológicos na detecção de fraudes em leite e queijo de ovinos

Valdemar Rebelo Osório e Castro \*



## 1. Introdução

A adulteração de leite de ovelha por leite de vaca é uma prática relativamente comum. Ela surge como consequência das flutuações sazonais na produção do leite ovino e também por motivos económicos, pois o leite bovino é mais barato. Certamente que o leite de ovelha falsificado vai ter alteradas as propriedades organolépticas do respectivo coágulo conduzindo à formação de queijos de inferior qualidade (Aranda *et al.*, 1988).

O desenvolvimento de métodos analíticos para a detecção de fraudes na mistura de leites e nos respectivos queijos tem grande interesse para os países que produzem ou importam queijo de ovelha. Entre os procedimentos de análise já propostos, baseados na composição lipídica ou proteica contam-se os métodos electroforéticos, cromatográficos e imunológicos (Ramos e Juarez, 1984).

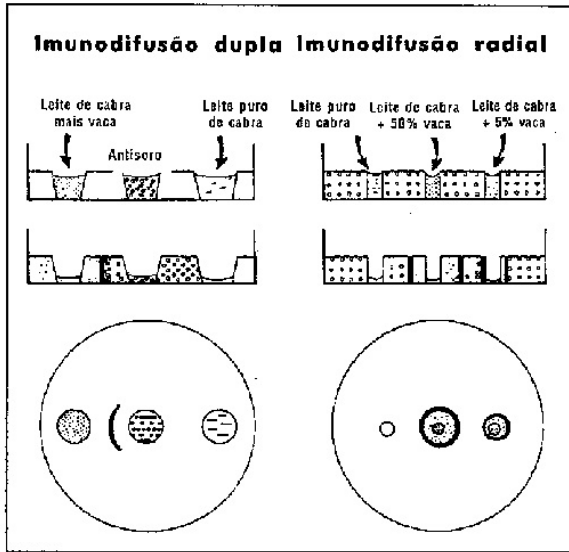
O grande número de publicações relacionadas com o assunto justifica uma revisão bibliográfica crítica como seguimento e complemento ao último estudo efectuado (Ramos e Juarez, 1984). Com esse objectivo pretendo discutir somente os métodos imunológicos utilizados nos últimos anos, na detecção das fraudes em leites e queijos, chamando a atenção para os aspectos fundamentais dos ensaios (imunogénio utilizado, objectivo técnico do método, natureza das amostras utilizadas, carácter qualitativo ou

quantitativo, sensibilidade e duração da análise). Os pormenores técnicos não serão considerados, pois podem ser examinados nas próprias publicações citadas e também em obras especializadas, como por exemplo o manual "Imunologia" (Ivan Roit, Jonathan Brostoff e David Male, 1989, Editora Manole, São Paulo, SP, Brasil).

## 2. Imunodifusão dupla

Durand *et al.* (1974) aplicaram o método da imunodifusão utilizando as imunoglobulinas e as lactoalbuminas dos leites bovino e caprino como imunogénios para preparar imunosoros aptos a detectarem aquelas proteínas em leites e queijos de ovelha. A determinação, baseada na intensidade da linha de precipitação obtida após difusão dos antigénio e anticorpo previamente aplicados a depressões produzidas em gel de agar (Fig. 1, adaptada de Levieux, D., 1977), torna possível obter informações semiquantitativas com uma sensibilidade relativamente alta (2,5% de leite de vaca na mistura).

Investigadores de vários países passaram a usar este procedimento na análise da adulteração de queijos. Foi possível aplicá-lo para o queijo Roquefort (Assenat, 1975), mesmo após um tempo de cura superior a 8 meses, conseguindo-se reconhecer níveis baixos de mistura de leite de vaca na ordem dos



**Figura 1** - A imunodifusão dupla e a imunodifusão radial na detecção de fraudes em leites. As placas com as várias depressões para analisar a adulteração de leite de cabra por leite de vaca são observadas em perfil na parte de cima. Na parte de baixo as mesmas placas vistas de cima para baixo permitem reconhecer as linhas de imunoprecipitação (imunodifusão dupla à esquerda, e imunodifusão radial à direita).

2.5%. Outros queijos de ovelha, particularmente os tradicionais de Itália (Carini e Busca, 1975), Espanha (Lorenzo, 1975) e Grécia (Kalatzopoulos, 1977), foram também analisados, com sucesso, para detectar misturas indesejáveis.

O inconveniente mais notório deste método, que o pode tornar inadequado ao fim em vista, está relacionado com a sensibilidade térmica das proteínas do soro. Desse modo, leite bovino previamente esterilizado, não é detectado na mistura de leites se forem utilizados os anticorpos preparados contra as imunoglobulinas e as lactoalbuminas. Por exemplo, a utilização do método a leite bovino esterilizado e ao respectivo queijo de vaca não fornece imunoprecipitação (Ramos, 1976).

### 3. Imunodifusão radial

Levieux (1977) preparou um novo anti-soro para analisar a pureza de leites de cabra e de ovelha. A IgG<sub>1</sub> (imunoglobulina G<sub>1</sub>) de leite de vaca, proteína não sintetizada pela glândula mamária, serviu de imunogénio em cabras e ovelhas na obtenção do respectivo anti-soro que, purificado em colunas de cromatografia (Sephadex G-100 e DEAE celulose) (Levieux, 1974), pode ser aplicado nas técnicas da imunodifusão radial e da inibição da hemaglutinação.

No método da imunodifusão radial uma placa de

gel de agar é previamente impregnada com o anticorpo e o antígeno (amostra de leite ou extrato de queijo) é colocado em pequenas cavidades abertas nesse gel para se difundir durante 3-4 h (Fig. 1). O complexo antígeno-anticorpo vai sendo formado mantendo-se a princípio solúvel, mas precipitando depois, à medida que mais anticorpo é complexado. O diâmetro do anel, que é visualizado no gel, é proporcional à concentração do antígeno o que permite estabelecer curvas padrão para a determinação quantitativa de misturas de leite bovino com os de ovino e caprino. É grande a sensibilidade dessa análise podendo-se chegar à detecção de 1% de leite de vaca na mistura. Contudo a sua aplicação a queijos é mais problemática exigindo correcções.

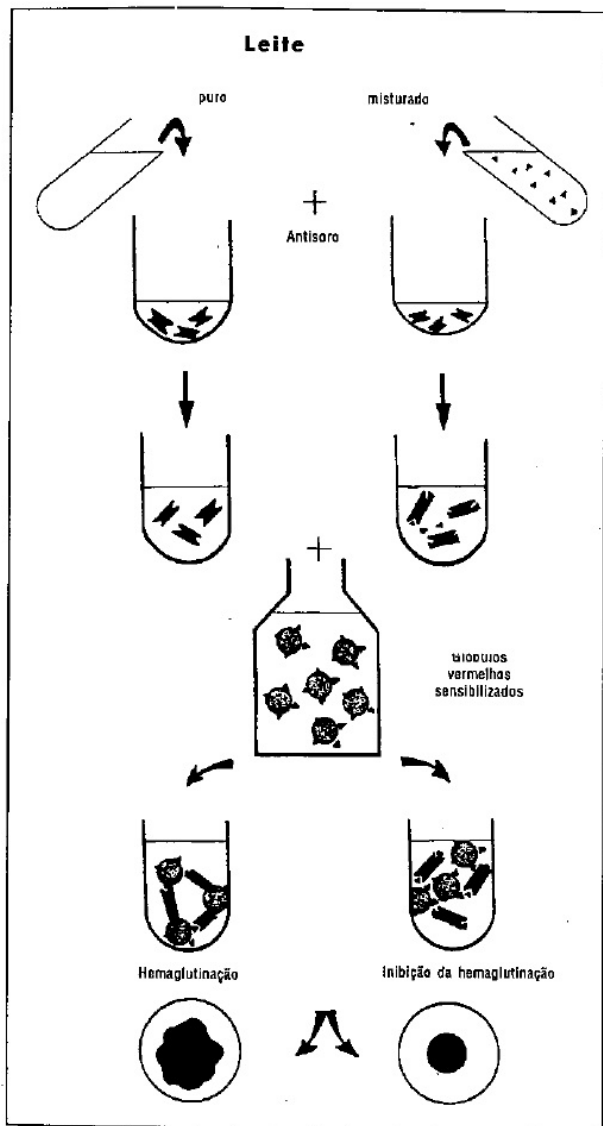
A imunodifusão radial dupla, tecnicamente similar ao método agora descrito, foi desenvolvida (Gombcz & colaboradores, 1981) para detectar leite de vaca em leite de cabra utilizando anti-soro comercial para caseína bovina. O limite de detecção foi de 5% de leite bovino na mistura e a aplicação a queijos também se mostrou promissora.

### 4. Inibição da hemaglutinação

Neste método, glóbulos vermelhos de galinha são normalmente sensibilizados com IgG bovino podendo, assim, ser facilmente aglutinados com anti-soro específico, mesmo em altas diluições. Contudo, na presença de leite de ovelha ou cabra adulterados com leite de vaca o anti-soro é neutralizado pelo antígeno bovino inibindo assim a aglutinação. Esta análise utiliza uma placa com pequenas cavidades (96, normalmente) dispostas em 8 séries de 12. Nas cavidades da 1ª sequência, por exemplo, é colocado o anti-soro em 10 diluições sucessivas (1/2, 1/4, 1/8, 1/16 ... 1/1024) sendo os controlos positivo (hemaglutinação presente) e negativo (ausência de hemaglutinação) preparados, respectivamente, na 11ª e na 12ª séries, sendo as outras cavidades utilizadas para os ensaios imunológicos com as amostras de leite e queijo adulterados. O limite de detecção é grande (1% para os leites e 4% para os queijos). O tempo de análise é menor (cerca de 30 minutos) do que no método da imunodifusão radial sendo, contudo, a determinação muito mais delicada (Levieux, 1978 e 1980). As figuras 2 e 3 ilustram este procedimento.

### 5. Imunoelectroforese (em foguete)

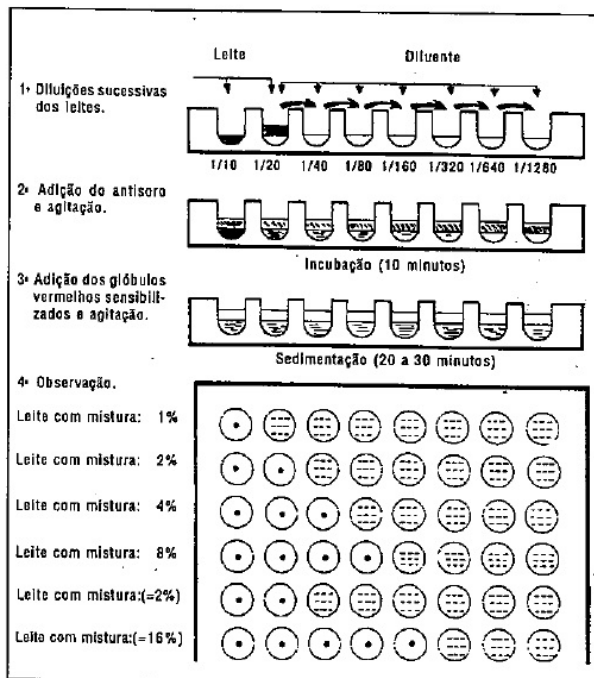
A imunoelectroforese foi utilizada para a determinação de leite de vaca misturado a leite de cabra (Radford, et al., 1981). O processo passa-se em uma placa de gel de agarose impregnada com anti-soro obtido



**Figura 2** - O princípio da inibição da hemaglutinação na detecção de fraudes em leites. Este esquema mostra como os antígenos correspondentes ao leite estranho ao se complexarem com os respectivos anti-corpos impedem que os glóbulos vermelhos previamente sensibilizados sofram a hemaglutinação. (Adaptação de Levieux, 1980).

de cabra, utilizando como imunogénio leite magro de vaca. As amostras de leite de cabra adulterado são aplicadas em uma das extremidades do gel e submetidas ao campo eléctrico pelo menos durante 3 h, a um pH adequado, a fim de permitir a mobilidade electroforética dos antígenos e assegurar a imobilização dos anticorpos impregnados. Com isso a precipitina formada durante o ensaio surge em forma de foguete cuja altura é proporcional à concentração do antígeno e portanto à concentração do leite de vaca na mistura.

É um método que permite estabelecer curvas padrão com amostras de leite caprino contendo, em mistura, de 1 a 10% de leite bovino. A sensibilidade



**Figura 3** - O princípio da inibição da hemaglutinação na detecção de fraudes em leites. Este esquema mostra os vários passos da prova imunológica conduzida nas várias cavidades da placa. A 4ª etapa permite observar o resultado final da análise, com a placa vista de cima para baixo, para leites com percentagens diferentes mas conhecidas de leite estranho (cavidades padronizadas) e para dois leites em análise. (Adaptação de Levieux, 1980)

é pois muito boa, sendo quase ausentes as reacções imunológicas cruzadas com o anti-soro obtido da cabra, o que não aconteceria se fosse usado anti-soro obtido de outro mamífero que não a cabra. Por outro lado o limite de detecção utilizando anti-soro obtido de coelho é somente de 5%.

De facto todos os métodos imunológicos têm como principal problema a resolver a preparação de um bom anticorpo para detectar antígenos específicos. Neste trabalho houve um avanço nesse sentido pois, através da imunização de caprinos com leite magro de vaca, foi possível obter um anti-soro específico para este leite com um mínimo de operações laboratoriais.

Este método é adequado também para o caso de leites pasteurizados, pois os resultados são similares aos obtidos com leites crus. Já para leites esterilizados, provavelmente, haverá problemas, devido à desnaturação térmica das proteínas do soro, que as tornam insensíveis aos respectivos anticorpos. O método é muito mais simples do que os processos imunológicos até agora citados, sendo possível aumentar-lhe a sensibilidade, controlando adequadamente a relação antígeno-anticorpo. É de se esperar também que, relacionando a área ocupada pela precipitina com a concentração do leite caprino na mistura e não simplesmente a

altura do "foguet" os aspectos quantitativos sejam mais rigorosos.

## **6. Imunoelectroforese (em contra corrente)**

Esta modalidade analítica foi aplicada à avaliação da qualidade de queijos de ovelha e de cabra (Elbertzhagen e Wenzel, 1982), utilizando a imunoelectroforese anteriormente descrita (Clarke e Freeman, 1967). São utilizadas placas de gel de agar impregnadas de tampão, a um pH adequado para conferir carga positiva ao anticorpo e negativa ao antigénio. O anticorpo é aplicado em uma extremidade do gel e o antigénio no extremo oposto. A diferença de potencial estabelecida permite a migração das citadas amostras em sentidos opostos até acontecer o encontro e a respectiva precipitação. Há uma semelhança com a técnica da imunodifusão mas a sensibilidade aumenta (10 a 20 vezes) particularmente se a revelação é feita com sal de prata.

Na investigação de caseína bovina em queijos de ovelha e de cabra, por este método, foi utilizado anti-soro contra essa proteína obtido a partir do coelho correctamente imunizado. Foi possível detectar nesses queijos níveis muito baixos de caseína bovina na ordem dos 0,1 a 0,2%. Além da grande sensibilidade obtida há que referir também a sua aplicabilidade para queijos adulterados com leite de vaca esterilizado, uma vez que a desnaturação da caseína não causa inibição imunológica com o respectivo anticorpo.

## **7. Imunoadsorção com enzima ligada (mancha imunológica)**

Quase todos os métodos até agora discutidos baseiam-se em reacções de precipitação entre proteínas do leite bovino com os respectivos anticorpos. As proteínas do soro não são termoestáveis o que limita a sua utilização para leites crus ou moderadamente aquecidos. Por outro lado a caseína, embora resistente ao calor, tem fraco poder antigénico, o que obriga a utilizar concentrações elevadas de antisoro para a sua detecção.

O método da mancha imunológica, no procedimento a seguir descrito, envolve também um anticorpo com afinidade pela caseína bovina mas em concentrações menores do que as utilizadas pelos outros métodos até aqui tratados. Para isso, a sua preparação exige uma imunoadsorção em colunas de cromatografia por afinidade em que caseína ovina imobilizada na sepharose 4B permite a remoção de anticorpos capazes de fornecer reacções cruzadas nos ensaios

visando à investigação das adulterações (Aranda et al., 1988).

Na análise de leite ou queijo de ovelha adulterado por leite de vaca as amostras são aplicadas em volumes muito baixos (1µl), sobre uma membrana de nitrocelulose de forma a obter-se uma pequena mancha em círculo para permitir a adsorção do material. A adição posterior do anti-soro contra a caseína bovina vai permitir a interacção antigénio-anticorpo nas amostras com caseína de leite de vaca. A lavagem exaustiva da película de nitrocelulose permite eliminar todos os componentes solúveis e reter o complexo antigénio-anticorpo, cuja concentração é indirectamente determinada pela aplicação de um anticorpo contra IgG associado a uma peroxidase. Após lavagens exaustivas a enzima retida junto com o anticorpo ligado é detectada utilizando o 4-cloro-1-naftol como substrato, cuja transformação é reconhecida pela cor lilás nos locais contendo caseína bovina.

É um método mais sensível do que as técnicas de imunoprecipitação em gel tendo, os autores que o propuseram, detectado de 0,1 a 10% de leite bovino em mistura com leite de ovinos, não apresentando o controlo, constituído por leite de ovelha puro, qualquer reacção colorimétrica. A análise de leites pasteurizados ou esterilizados conduz aos mesmos resultados que são obtidos com leite cru.

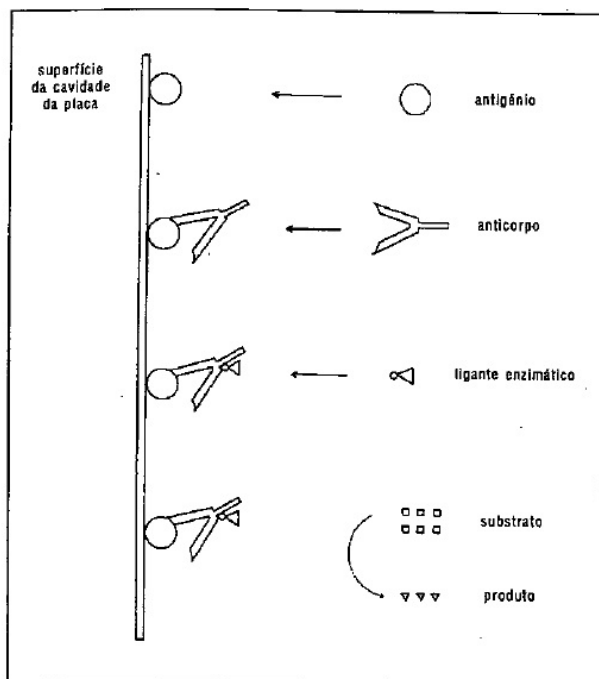
A detecção que este método refere é ainda de natureza semiquantitativa, não tendo havido por parte dos autores a preocupação de medir a intensidade do cromóforo visualizado nas películas de nitrocelulose. Provavelmente é difícil essa determinação o que vai requerer um estudo mais elaborado, plenamente justificável tendo em vista que o método é simples, económico e rápido.

A aplicação à determinação do grau de adulteração de queijos de ovinos por leite de vaca em diferentes percentuais foi realizada para queijos Manchego (de ovelha) em mistura com queijos Cheddar (de vaca). A detecção, embora possível, não é nem semiquantitativa devido à dificuldade de dispersão dos dois tipos de queijo. Também neste aspecto este método imunológico exige uma análise mais aprofundada.

Este método já é muito semelhante, em certos aspectos, aos métodos ELISA, descritos a seguir, que são muito mais práticos, quantitativos, e semi-automáticos permitindo a análise simultânea de muitas amostras em placas adequadas para as provas imunológicas.

## **8. Imunoadsorção com enzima ligada (ELISA indirecto)**

Neste método apresentado recentemente (Rodriguez et al., 1990) na aplicação à elucidação quantitativa da adulteração de leites e queijos de ovinos por leite bovino, o anti-soro é preparado em coelhos imunizados



**Figura 4** - As várias reacções fundamentais do método ELISA (indirecto). Em primeiro lugar o antígeno é adicionado à placa e em seguida são colocados os reagentes mencionados na figura, na ordem indicada de cima para baixo. Nas restantes versões da técnica do ELISA o procedimento é similar com as modificações descritas no texto.

contra caseína bovina sendo depois purificado por imunoabsorção em colunas de afinidade de Sepharose 4B. A biotilação (incorporação de biotina ao anticorpo) seguida de incubação longa com caseínas de ovinos e de caprinos, num processo denominado bloqueamento, permite obter o anti-soro específico para caseína bovina e minimizar os processos morosos, caros e delicados das cromatografias de afinidade contendo ligados os antígenos heterólogos. Com este procedimento os autores acima referidos conseguiram melhorar o processo de preparação de anticorpos com vista às aplicações desejadas.

Uma outra novidade é a introdução da técnica semi-automática de imunoabsorção com enzima ligada (ELISA) à detecção de fraudes em leites e queijos. Abstraindo os detalhes técnicos o método ELISA é realizado em microplacas apropriadas, contendo 96 cavidades, onde o anticorpo biotilado é adicionado, após prévia adsorção das caseínas antigénicas eventualmente contidas nas amostras a analisar. O complexo anticorpo-antígeno imobilizado nas cavidades é, então, detectado pela adição de extravidina-peroxidase, que tem uma forte afinidade pela biotina do anticorpo, através da Avidina (uma proteína da clara do ovo). Finalmente a adição do substrato específico (2,2'-azidobis-3-etilbenzotiazoleno) permite determinar a quantidade de enzima ligada, pela medida espectrofotométrica a 405nm do cromóforo

verde produzido. Todo este procedimento demora mais de 3h, mas permite a análise simultânea de várias amostras num processo que utiliza um instrumento adequado para torná-lo quase inteiramente automático.

Na análise de misturas de leites o método foi aplicado com pleno sucesso, permitindo determinar a inclusão de 1 a 50% de leite bovino em leite ovino. A curva padrão determinada mostra-se linear, particularmente a partir de 10% de leite de vaca na mistura. Os resultados com leite bovino pasteurizado, esterilizado e tratado a temperaturas muito elevadas (leite UHT) são essencialmente semelhantes aos obtidos com leite cru o que confirma, mais uma vez, não ser a imunoreactividade das caseínas de leite de vaca afectada pelo aquecimento. Também na análise dos queijos o método é adequado, tendo sido possível detectar queijo bovino quando em mistura com queijo caprino nos teores compreendidos entre 1 e 50%. Neste caso, há também nestes limites, uma proporcionalidade entre a densidade óptica a 405 nm e o percentual de queijo bovino na mistura.

Outras determinações, baseadas também no ELISA indirecto, foram aplicadas na detecção de leite caprino em misturas de leites e em queijos (Rodrigues, et al, 1991) e na análise de misturas de leite bovino em leite de ovelha (Garcia et al, 1990), apresentando, em ambos os casos, bom nível de sensibilidade. A Figura 4 ilustra a sequência de reacções desta prova imunológica.

## 9. Imunoabsorção com enzima ligada (ELISA "sandwich")

O método ELISA em "sandwich" foi aplicado na determinação quantitativa de leite caprino em leite ovino (Garcia *et al.*, 1993) através de uma metodologia parecida com a apresentada anteriormente. Neste caso os anticorpos foram produzidos em coelhos imunizados com proteínas de soro de leite de cabra e depois purificados por cromatografia de afinidade para eliminar a antigenicidade contra proteínas de soro de leite bovino e ovino. Os anticorpos foram então biotilados para posterior utilização nas provas imunológicas.

Este método difere do anterior no que diz respeito à técnica empregada na preparação do anticorpo, substituindo o processo de bloqueamento pela cromatografia de imunoabsorção que é mais trabalhosa e dispendiosa. A análise imunológica também é algo diferente da descrita anteriormente, embora em linhas gerais haja semelhanças. As diferenças fundamentais residem no facto da amostra a analisar ser adicionada à placa do ensaio imunológico após prévia imobilização do anticorpo de captura (não biotilado) e só então é que o anticorpo biotilado entra em contacto com o antígeno. Desse modo surge uma "sandwich" em



que o antigénio ocupa a posição central do conjunto imobilizado. A enzima (ExtraAvidinaperoxidase) adicionada depois, liga-se fortemente ao anticorpo biotinilado, através da alta afinidade existente entre a biotina do anticorpo e a Avidina associada à peroxidase. A catálise da transformação do substrato (2,2' - azinobis-3-etileno-benzotiazolino), que é adicionado por último, fornece um cromóforo que é detectado espectrofotometricamente a 405 nm. A análise demora mais de 5 horas mas, pode ser conduzida com várias amostras em simultâneo e de um modo semiautomático.

Este método permite detectar leite caprino em leite ovino, quantitativamente, em teores compreendidos entre 0.5 e 100%. É extraordinária a sensibilidade da análise nos limites compreendidos entre 0.5 e 20% onde se devem situar os teores normais das fraudes. Com amostras de leite caprino pasteurizado a resposta imunológica é praticamente igual à do leite cru o que não acontece com o leite esterilizado em que os respectivos valores são 30% menores do que os do leite cru. Assim sendo, havendo mistura de leite caprino esterilizado a leite ovino, aquele vai ser detectado em menor percentagem.

Esta mesma técnica foi também recentemente utilizada (Levicux, e Venien, 1994) para detectar misturas de leite de vaca em leite de ovelha e cabra. Neste caso porém, foram aplicados anticorpos monoclonais contra o antigénio  $\beta$ -lactoglobulina bovino.

É a primeira vez que um anticorpo monoclonal é produzido e utilizado nestas provas imunológicas. A escolha da  $\beta$ -lactoglobulina como imunogénio apresenta-se como vantajosa em relação às outras proteínas do leite pois é particularmente resistente à proteólise que ocorre durante a maturação dos queijos (Amigo *et al.*, 1991). Além disso a sua concentração no leite não oscila, significativamente, por alterações nas pastagens ou por condições patológicas (Larson e Kendall, 1957).

A preparação de anticorpos policlonais, específicos para a  $\beta$ -lactoglobulina bovina, não é fácil, pois a estrutura das  $\beta$ -lactoglobulinas dos ruminantes é muito semelhante. Daí os autores terem optado em utilizar a técnica do híbridoma e através de adequada selecção e clonagem conseguiram produzir anticorpos contra  $\beta$ -lactoglobulina bovina em grandes quantidades, sem necessidade de recorrer às demoradas e dispendiosas purificações por cromatografia de afinidade.

Os anticorpos preparados (MAb 17 e MAb 102) foram utilizados no processo ELISA ("sandwich"), servindo o MAb 17 como anticorpo de captura e o MAb 102, após conjugação à peroxidase, como detector de alta afinidade da B-Ig previamente fixada ao MAb 17. O substrato utilizado é o ortofenilenodiamina cuja transformação catalisada pela peroxidase fornece um cromóforo medido a 490 nm.

Os autores optimizaram as condições para uma boa prova imunológica que se revelou altamente específica

sensível e reprodutível. Na aplicação à análise de misturas de leite bovino em leites ovino e caprino é possível chegar ao limiar de 0,5% de adulteração o que é muito bom pois os níveis da falsificação são certamente superiores. O método não foi utilizado na análise de adulteração de queijos mas é de se esperar que seja muito efectivo, ainda mais tendo em conta que a  $\beta$ -lactoglobulina bovina é resistente à proteólise da maturação como foi já referido. Embora as provas imunológicas sejam lentas como as de todos os processos ELISA há que não esquecer o grande número de amostras que podem ser simultaneamente analisadas.

## 10. Imunoadsorção com enzima ligada (ELISA competitivo)

O método ELISA competitivo utilizando um anticorpo monoespecífico para a  $\alpha_{s1}$ -caseína bovina foi aplicado na determinação de leite bovino em leite e queijo de ovinos (Rolland *et al.*, 1993). Estes investigadores conseguiram preparar um anticorpo monoespecífico para a  $\alpha_{s1}$ -caseína bovina, portanto sem possibilidade de formação de complexos antigénio-anticorpo com proteínas homólogas de ovinos ou caprinos. Isso só foi possível porque a sequência primária da  $\alpha_{s1}$ -caseína bovina é diferente da da ovina. Particularmente o fragmento correspondente aos resíduos dos aminoácidos desde o 141 a 148 existente na  $\alpha_{s1}$ -caseína bovina não faz parte da  $\alpha_{s1}$ -caseína ovina e o resíduo 148 é diferente na  $\alpha_{s1}$ -caseína caprina (Brignon *et al.*, 1989).

O peptídeo correspondente à sequência 140-149 da  $\alpha_{s1}$ -caseína bovina (QELAYFYPEL), sintetizado em fase sólida (Calas *et al.*, 1985), foi directamente utilizado como imunogénio na produção de anticorpos policlonais monoespecíficos em coelhos. O anticorpo obtido revelou-se com actividade imunogénica relativamente ao peptídeo ligado à resina da fase sólida e relativamente à própria  $\alpha_{s1}$ -caseína bovina, não reconhecendo imunologicamente as proteínas homólogas ovinas ou caprinas. Assim, de um modo extremamente simples foi possível preparar um anti-soro monoespecífico sem necessidade das cromatografias de imunoadsorção dispendiosas e lentas normalmente utilizadas por outros investigadores.

A aplicação à prova imunológica deste ELISA difere um pouco, no seu procedimento, do apresentado nos métodos ELISA anteriormente mencionados. No processo agora em consideração, as cavidades das placas de ensaio são previamente sensibilizadas com  $\alpha_{s1}$ -caseína bovina e após completa saturação com gelatina e hidrolisado de gelatina dos locais não ocupados, as microplacas são conservadas a -20 °C até posterior utilização. As amostras a analisar, uma vez devidamente preparadas, são adicionadas às microplacas nas respectivas cavidades

juntamente com o anti-soro total de coelho previamente preparado e deixadas incubar durante a noite. Estabelece-se então uma competição entre o antígeno adsorvido previamente nas cavidades e o próprio antígeno da amostra (se o houver evidentemente) pelo anticorpo que lhe é específico. Após essa longa incubação e lavagens sucessivas é adicionado anti-IgG marcado com fosfatase alcalina. O substrato, paranitrofenilfosfato, detecta esta enzima fornecendo paranitrofenol, que é medido espectrofotometricamente a 405 nm. Deste modo o antígeno da amostra pode ser quantificado pela sua capacidade de inibir a ligação dos anticorpos ao antígeno previamente adsorvido nas cavidades. O processo é demorado, mas como nas outras versões do ELISA permite examinar várias amostras simultaneamente e de um modo semiautomático.

Pela descrição sumária do ELISA competitivo compreende-se que valores altos de densidade óptica a 405 nm são obtidos para pequenas percentagens de leite bovino nas misturas de leites. O método apresenta-se altamente sensível permitindo uma curva padrão linear desde 0.125 a 64% (v/v) correspondente a percentagens de leite bovino em leite ovino, achando-se o leite 100% bovino, testado nas mesmas condições experimentais, perfeitamente na linha recta da calibração. Em relação aos queijos de ovelha (Roquefort) preparados a partir de leite de ovinos misturado com leite de vaca, a calibração é também rigorosamente linear, nos limites entre 0.5% a 25% (v/v), não sendo alterada pelo tratamento térmico do leite (115 °C, 15 min) nem pelo tempo de maturação do queijo, até 8 meses.

Este método foi apresentado à Comissão das Comunidades Europeias, Direcção Geral de Agricultura, VI-D-1, Produtos Lácteos, em 08 de Maio de 1992. Considerando a sua sensibilidade, especificidade, facilidade de execução, economia de instrumentação sofisticada, tem grandes hipóteses de vir a substituir o método da isoelectrofocalização (Jornal Oficial das Comunidades Europeias, 20.03.1992 nº 174/23-32) como método oficial da Comunidade Europeia na análise da adulteração de leites e queijos de ovelha com o de outras espécies.

## 11. Conclusões finais

Na evolução da metodologia para a detecção de fraudes em leites e queijos conseguiu-se chegar a um método semiautomático, o método ELISA, (nas suas várias modalidades), que se constitui numa técnica robusta, económica, sensível e de rápida operacionalidade. Permite também tratar muitas amostras em simultâneo, em placa, de um modo fácil e com economia de reagentes, pois as quantidades utilizadas (de anticorpos, particularmente) são muito pequenas, ao contrário do que acontece nos métodos mais tradicionais.

## Referências bibliográficas

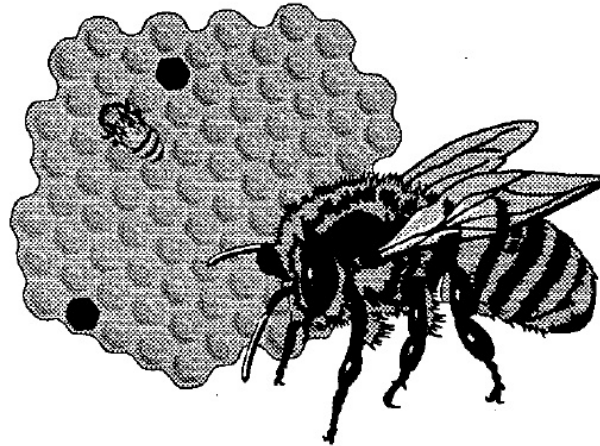
- Amigo, L., Ramos, M., Martin-Alvarez, P. J. & Barbosa, M. (1991). "Effect of the technological parameters on electrophoretic detection of cow's milk in ewe's milk cheese". *Journal of Dairy Science*, 74: 1482-1490.
- Aranda, P.; Oria, R. & Calvo, M. (1988) "Detection of cow's milk in ewes' milk and cheese by an immunodotting method". *Journal of Dairy Research*, 55:121-124.
- Assenat, L. (1975) "De l'adaptation du procédé d'immunodiffusion à l'identification des adultérations du lait de brebis et du fromage de Roquefort". *Réunion Laboratoire*, Tours.
- Brignon, G.; Mahe, M.F.; Grosclande, F. & Ribadeau-Dumas, B. (1989) "Sequence of caprine  $\alpha_{s1}$ -casein and characterization of those of its genetic variants which are synthesized at a high level,  $\alpha_{s1}$ -CnA, B and C. Protein sequences and *Data Analysis*", 2:181-188.
- Calas, B.; Mery, J.; Parello, S. & Cave A. (1985) "Solid-phase Synthesis using a new polyacrylic resin. synthesis of the fragment 14-21 of the amino acid sequence of histone H4". *Tetrahedron*, 41: 5331-5339.
- Carini, S. & Busca, M. (1975) "Riconoscimento del latte vaccino del latte e neiformaggi di pecora". *Il Latte*, 3: 3-5.
- Clarke, H.G.M. & Freeman, T.A. (1967) "A quantitative immunoelectrophoresis method". *Protides Biol. Fluids Proc. Colloq.*, 14: 503-509.
- Durand, M.; Meusnier, M.; Delahaje, J. & Prunet, P. (1974) "Détection de l'addition frauduleuse de lait de vache dans les laits de chèvre et de brebis par la méthode de l'immunodiffusion en gelose". *Boll.Ac.Vet.*, 47: 247-258.
- Elbertzhagen, H. & Wenzel, E. (1982) "Detection of bovine milk in sheeps milk cheese by means of immunoelectrophoresis". *Z. Lebensm. Unters Forssh.*, 175: 15-16.
- Garcia, T.; Martin, R.; Rodriguez, E.; Morales, P.; Hernandez, E. & Sanz, B. (1990) "Detection of bovine milk in ovine milk by an indirect enzyme-linked immunosorbent assay". *Journal Dairy Sci.*, 73: 1489-1493.
- Garcia, T.; Martin, R.; Morales, P.; Gonzalez, I.; Sanz, B. & Hernandez, P. (1993) "Sandwich ELISA for detection of caprine milk in ovine milk". *Milch Wissenschaft*, 48(10): 563-566.
- Gombcz, E.; Hellwing, E. & Petuely, F. (1981) "Immunological detection of cow's milk casein in ewe's milk cheese". *Z. Lebensm. Unters Forsch.*, 172: 178-181.
- Kalatzopoulos, G. (1977) "Method for determining the kind of milk used for cheese or yogurt-making". *Hemica Hronica*, 42(1): 41-45.
- Larson, B. L. & Kendall, K. A., (1957). "Protein production in the bovine. Daily production of the specific milk proteins during the lactation period". *Journal of Dairy Science* 40: 377-386.
- Levieux, D. (1974) "Immunoglobulines bovines et brucellose.(I) Purification des immunoglobulines et préparation de leurs antisérums spécifiques". *Ann.Rech. Vet.*, 5: 329-342.
- Levieux, D. (1977). "New technique for detecting adulteration of goat's and ewe's milk". *Dossiers de l'Elevage*, 2: 37-46.
- Levieux, D. (1978) "Detection immunologique des mélanges de laits de diverses espèces". *XX Congrès Intern. de Laiterie*, Paris 15 ST.
- Levieux, D. (1980) "The development of a rapid and sensitive method based on hemagglutination inhibition, for the measurement of cow milk goat milk". *Ann. Rech.Vet.*, 11(2): 151-156.
- Levieux, D. & Venien, A., (1994). "Rapid, sensitive two site ELISA for detection of cows' milk in goats' or ewes' milk using monoclonal antibodies". *Journal of Dairy Research* 61: 91-99.

- Lorenzo, J. (1975) "Detección del fraude en la leche de oveja". *Alimentaria*, 65: 31-33.
- Radford, D.V.; Tchan, Y.T. & Mc Phillips, J. (1981) "Detection of cow's in goat's milk by immunoelectrophoresis". *Australian Journal of Dairy Technology*, 35: 114-146.
- Ramos, M. (1976) "Aplicación del método inmunológico a la detección de leche de vaca en queso manchego." *Rev. Esp. de Lechería*, 101: 147-154.
- Ramos, M & Juárez, M. (1984) "Update on existing analytical methods for detecting mixtures of cows', ewes' and goats' milk". *IDF Bulletin* 181.
- Rodríguez, E.; Martín, R.; García, T.; Hernández, P.E. & Sanz, B. (1990) "Detection of cows' milk in ewes' milk and cheese by an indirect enzymatic-linked immunosorbent assay (ELISA)". *Journal of Dairy Research*, 57: 197-205.
- Rodríguez, E.; Martín, R.; García, T.; Azcona, J.I.; Sanz, B. & Hernández, P.E. (1991) Indirect ELISA for detection of goats' milk in ewes' milk and cheese. *Int. J. Food Science Technol.*, 26: 457-465.
- Rolland, M. P., Bitri, L. & Besançon, P. (1993). "Polyclonal antibodies with predetermined specificity against bovine aSI - casein: application to the detection of bovine milk in ovine milk and cheese". *Journal of Dairy Research* 60: 413-420.

\*Bioquímico, Professor Coordenador da ESACB

# Bacteriosis y virosis apícolas

Miguel Hermoso de Mendonza Salcedo (\*)



## 1. Introducción

Las enfermedades bacterianas y víricas de la abeja han perdido en los últimos años parte de su protagonismo en la Patología Apícola, debido al auge de parasitosis como la Varroasis y de micosis como la Ascosferosis.

Sin embargo, no han desaparecido de nuestros colmenares, y pese a las mejoras en el manejo, en las prácticas higiénicas y a la eficacia de los tratamientos, las loques siguen amenazando a la cría, y las virosis ven aumentar su incidencia vehiculadas por *Varroa*.

## 2. Las loques

Enfermedades infectocontagiosas de origen bacteriano, que afectan exclusivamente a las larvas, causando su muerte y debilitando considerablemente las colonias.

Las dos loques son muy distintas en su etiología, su epidemiología y la gravedad de sus manifestaciones, pero se pueden estudiar conjuntamente en los aspectos de tratamiento y prevención. Ambas son de declaración obligatoria en España.

### 2.1. Loque americana, o maligna

Se manifiesta en la cría operculada como enfermedad primaria (no necesita factores predisponentes) y grave, de presentación epizootica y no estacional.

Su agente es *Bacillus Sarvae*, bacilo Gram+, aerobio, móvil y esporulado, con gran resistencia por tanto en el medio (cuadros, miel, reservas de polen, etc.) y ante agentes físicos y desinfectantes. Produce potentes enzimas proteolíticas y libera sustancias inhibitoras para otras bacterias. Se cultiva con facilidad en medios convencionales (Agar Sangre).

Sólo son sensibles las larvas; las abejas adultas resisten a la infección, aunque tienen un importante papel como reservorios y portadores.

Las larvas se infectan por vía oral a los 3-5 días con los esporos vehiculados por las nodrizas, que germinan rápidamente en su tubo digestivo, pero no enferman hasta después del operculado (> 6 días), cuando el aumento de la tensión de O<sub>2</sub> durante la fase de prepupa permite la multiplicación de las formas vegetativas.

La infección se difunde por las nodrizas, que al retirar las larvas enfermas se contaminan de esporos, los cuales son transmitidos a las larvas sanas durante las actividades de alimentación y aseo.

El contagio entre colmenas se produce merced al pillaje (propiciado por la debilidad numérica de las colonias enfermas), la deriva de las pecoreadoras jóvenes (aún muy contaminadas), los zánganos, las polillas de la cera, y la intervención humana: suplementación con miel contaminada, intercambio de cuadros contaminados, etc.

La presentación es epizootica, y su morbilidad en el colmenar depende mucho de la rapidez con que se

intervenga; la mortalidad en las colmenas afectadas puede ser del 100% en la cría operculada, lo que en épocas de gran actividad llevaría a la desaparición de la colonia.

Las larvas afectadas adquieren un color de amarillento a pardo, mueren con la probóscide extendida y pronto se desintegran por completo en una masa viscosa, filante y maloliente (en colmenas muy infectadas se percibe el olor incluso antes de abrirlas).

Los opérculos de las larvas muertas se oscurecen y se hunden, y son pronto perforados y luego eliminados por las nodrizas. La cría en el panal toma así un aspecto irregular, "salpicado", mientras las larvas en putrefacción se van desecando y se reducen a escamas muy adheridas a las paredes de la celdilla.

El comienzo de la infección es insidioso, y su detección requiere una inspección detenida de la cámara de cría, en la que sólo se aprecian los opérculos hundidos y perforados, pero aún no la puesta dispersa ni el olor característico. La textura viscosa y filante de los cadáveres es fácilmente demostrable mediante la prueba del palillo.

Sin embargo, pronto se hacen evidentes a la inspección externa, tanto la reducción de actividad de la colmena como el hedor de la enfermedad, y a la interna, los fallos de puesta.

El diagnóstico de campo suele efectuarse mediante la prueba del palillo, que se introduce en las celdillas sospechosas y arrastra al retirarlo una hebra de material viscoso.

El diagnóstico laboratorial se establece mediante tinción Gram del material patológico, observándose prácticamente en pureza esporos y/o formas vegetativas bacilares. El aislamiento se puede efectuar fácilmente a 37°C en Agar Sangre o Agar BHI, y la identificación en galerías bioquímicas, como API 50 CHB.

## 2.2. Loque europea o benigna

Se manifiesta en la cría abierta como enfermedad factorial, de presentación enzoótica y estacional (primavera).

Su agente es *Melissococcus pluton*, un coco Gram +, habitualmente lanceolado y agrupado en cadenas, inmóvil, no esporulado y anaerobio-microaerófilo, de difícil cultivo. Fermenta glucosa y fructosa con gran producción de ácido láctico. Muy resistente a las condiciones externas (desecación, luz solar, putrefacción). A menudo este microorganismo va acompañado por otras bacterias: *Streptococcus faecalis*, *Bacillus alvei*, *Bacillus eurydice*.

Sólo son sensibles las larvas, que se infectan, enferman y mueren entre los 3 y 6 días, antes de la operculación.

Como en la loque americana, son las nodrizas las que acarrean la infección, que se extiende mediante los mismos mecanismos.

Sin embargo, siendo a diferencia de aquélla un proceso factorial, para el desarrollo de la enfermedad son imprescindibles, a más de la presencia de *M.*

*pluton*, diversos factores debilitantes de la colonia, como condiciones climáticas adversas, penurias alimentarias o alimentación suplementaria inadecuada (rica en azúcar y escasa en proteína, que suele estimular la cría), debilidad o vejez de la reina, otras enfermedades de la abeja adulta, etc.

Los frecuentes altibajos climáticos de la primavera propician una presentación estacional, que habitualmente es esporádica, afectando de forma apreciable sólo a las colmenas debilitadas; no obstante, una vez se introduce la infección en un colmenar, se mantiene enzoótica durante mucho tiempo.

También a diferencia de la loque americana, el proceso tiende a ser autolimitante, pues si incide en una colmena con poca cría, las nodrizas suelen ser suficientes para atenderla y la supervivencia de larvas infectadas es elevada, con lo que la población se restablece, aunque con abundantes adultos portadores y a costa, por tanto, de mantener la infección en forma enzoótica.

Por otra parte, en una colonia con mucha cría, las nodrizas sobrecargadas de trabajo eliminan rápidamente las larvas que presenten la más mínima alteración, por lo que la infección puede ser eliminada antes de instaurarse de forma permanente.

Las larvas afectadas toman un color grisáceo o parduzco, se tornan flácidas, adoptan posturas extrañas y mueren, tomando una consistencia blanda sin perder su integridad, y emiten un olor agrio (por el ácido láctico), que sólo se percibe al abrir la colmena; no se adhieren a la celdilla y son extraídas con facilidad, y si se desecan *in situ*, se reducen a una escama suelta y no adherente.

Al afectar a larvas no operculadas, el aspecto disperso de la puesta en la cámara de cría se evidencia antes que en la loque americana, pero al ser menor su repercusión en la población y la actividad de la colmena, es fácil que el proceso pase inadvertido y sólo se revele durante una inspección interna.

La prueba del palillo tiene valor diferencial para distinguirla de la loque americana; al retirar el palillo no se extrae material filante.

El diagnóstico laboratorial, dadas las dificultades del aislamiento, se basa en la microscopía. La maceración de larvas o escamas secas, tras fijación y tinción Gram, permite observar las típicas cadenas de *M. pluton*; si ofrece dudas, la disección de larvas enfermas muestra manchas lechosas en la membrana peritrófica del intestino medio, que resultan ser verdaderas colonias de *Melissococcus*.

Aunque con poca frecuencia, pueden aparecer brotes mixtos de loque americana y europea, y surgir la duda de que los bacilos o esporos presentes en las larvas afectadas sean de *Bacillus larvae* o bien de *Bacillus alvei*. La adición al medio de cultivo de ácido nalidixico a 3 microgramos/ml inhibe eficazmente el crecimiento de *B. alvei* y no afecta a *B. larvae*.

La prevención de las loques se basa en evitar los factores predisponentes y controlar los mecanismos

de contagio, así como en el recambio sistemático de cuadros viejos (40% anual) y en proporcionar reinas jóvenes (sustitución cada 2 años), y en una inspección sistemática que permita el diagnóstico precoz.

El tratamiento curativo sólo se aplicará en loque europea, cuando estén afectados menos de la mitad de los cuadros de la cámara de cría, so pena de favorecer la supervivencia de larvas infectadas y por ende la permanencia y/o la extensión de la infección. En caso de loque americana o infecciones más virulentas por europea, se quemarán los cuadros de cría y se flameará la caja.

Ante la aparición de un brote se debe iniciar inmediatamente un tratamiento preventivo en todo el colmenar, para evitar la extensión del proceso.

El tratamiento se efectúa con terramicina (para loque europea y americana) y sulfatiazol sódico (sólo para loque europea), quimioterápicos ambos que ya existen comercialmente en asociación, lo que permite con un solo producto combatir ambas enfermedades.

Se recomienda su aplicación como polvo, que se distribuirá entre los cuadros. Así se evita que las abejas lo almacenen con la miel y se incrementen los residuos de cara al consumo humano, lo que sí sucede cuando se administra bajo forma líquida.

Recientes trabajos en Argentina han mostrado la aparición de resistencias a la terramicina y el sulfatiazol, y las consiguente pruebas de sensibilidad *in vitro* parecen mostrar la utilidad potencial de la eritromicina y la ampicilina entre otros antibióticos, aunque aún están por determinar su toxicidad para las abejas y los residuos aceptables en la miel.

La miel procedente de colmenas con loque es utilizable para consumo humano, pero no debe usarse para suplementar otras colonias, so pena de introducir la enfermedad.

### 3. Septicemia, hafniosis y otras bacteriosis

La septicemia es una enfermedad infecciosa de las abejas adultas, causada por *Pseudomonas apisepitica*, que se caracteriza por adinamia, incapacidad de vuelo y alteraciones de los elementos formes de la hemolinfa.

Son especialmente sensibles las obreras, en las que penetra por los estigmas respiratorios, especialmente los torácicos. La infección natural parece ocurrir por mojadura del tórax al recoger agua para la colmena en lugares húmedos y pantanosos.

La abeja afectada presenta escasa movilidad y capacidad de vuelo, desprende un mal olor característico y muere con rapidez; la hemolinfa, normalmente opalescente, presenta un aspecto lechoso, y los cadáveres, aunque sean recientes, se desintegran al manipularlos. Aunque las bajas pueden ser abundantes, el proceso rara vez llega a destruir alguna colonia.

Más grave puede ser la hafniosis, provocada por la enterobacteria *Hafnia alvei*, que cursa con septicemia y fuertes diarreas en abejas adultas y es capaz de

exterminar del 30 al 90% de las colonias de un colmenar. Sin embargo, sólo se detecta habitualmente en climas nórdicos mucho más fríos, y cada vez más se observa asociada a nosemiasis, varroasis u otros procesos intercurrentes.

Otras bacteriosis como la espiroplasmosis son aún más raras en nuestro clima, y ciertamente podemos asegurar que las bacteriosis más importantes y más frecuentemente diagnosticadas entre nosotros son aún las loques.

### 4. Las virosis

Los cuadros considerados virósicos más frecuentes en nuestro ámbito son uno muy próximo a la llamada *parálisis crónica*, y otro que podemos asimilar a la cría ensacada.

Ambas enfermedades están causadas por ribovirus próximos a los *Picornaviridae*.

### 5. Parálisis crónica

Enfermedad vírica muy contagiosa de las abejas adultas, que se manifiesta por cuadros de gravedad variable que incluyen dos formas clínicas: la parálisis típica, con abultamiento del abdomen, temblores y dislocación de alas y patas, ataxia e incapacidad de volar, diarrea y muerte, y la enfermedad de las ladronas negras, con alopecia y comportamiento de pillaje, seguidos posteriormente de temblores, parálisis y muerte.

La infección se produce habitualmente por vía parenteral, bien mediante inoculación por algún parásito (*Varroa jacobsoni* o *Acarapis woodi*), bien a través de los pelos o quetas rotos; pero se admite que también puede penetrar por vía oral, a través de soluciones de continuidad en la pared del tubo digestivo.

Parece haber un componente genético de susceptibilidad al virus que explicaría la predominancia de una u otra forma clínica o la presencia conjunta de ambas en una determinada colmena.

En ambas formas clínicas, las abejas infectadas son expulsadas de la colmena por las guardianas; las afectadas de parálisis no ofrecen resistencia y se limitan a arrastrarse y morir por las inmediaciones.

Las "ladronas negras", en cambio, se resisten tenazmente a la expulsión, perdiendo las quetas al ser aferradas por las guardianas, y como aún pueden volar, se organizan en grupos de pillaje.

Así extienden la infección a otras colmenas en las refriegas provocadas al intentar forzar la entrada, en las que hay abundantes oportunidades de rotura de quetas, y por ende, de penetración del virus.

La gravedad del proceso es extremadamente variable, oscilando entre el exterminio de una colmena, que puede quedar desierta de población adulta, aunque esté repleta de cría y miel, y brotes autolimitantes de escasa duración, pero a menudo recidivantes.

La invasión de *Varroa* ha aumentado claramente la incidencia y la gravedad de los brotes, al ser un eficazísimo vector por alimentarse sucesivamente sobre varias abejas adultas, pero su presencia no es imprescindible; de hecho, en las zonas cálidas de la isla de La Palma, en Canarias, se dan brotes muy graves en ausencia de *Varroa*, infrecuentes por otra parte en las zonas de laurisilva, de temperatura mucho más fresca.

El papel predisponente de las altas temperaturas, que parece aumentar la patogenicidad del virus, se ha constatado también en los brotes en la Península, así como el de la alta densidad de población, que probablemente favorece la transmisión al intensificar el contacto corporal y la rotura de quetas entre las abejas.

Por tanto, cabe esperar la máxima incidencia de esta virosis en colmenas muy pobladas y en pleno verano, y más aún si están infestadas de *Varroa*.

El diagnóstico laboratorial de esta virosis, como el de cualquier otra, ofrece múltiples dificultades. El primer paso es obviamente excluir las etiologías bacterianas, lo que se puede conseguir por los métodos bacteriológicos convencionales.

En cuanto a diagnóstico etiológico, los métodos serológicos son los más utilizados, pero dado lo poco que se sabe sobre la variabilidad antigénica de estos virus y la distribución geográfica de sus variantes, su especificidad es al menos discutible.

De hecho, ha ocurrido que dos centros de referencia tan importantes como Rothamsted en Gran Bretaña y Oberursel en Alemania, ofrezcan resultados totalmente dispares sobre la misma muestra, procedente del mismo brote.

Por tanto, especialmente en el campo se depende sobre todo del diagnóstico clínico y epidemiológico; es pues preciso diferenciar de las intoxicaciones por pesticidas. Estas suelen afectar parejamente a todo el colmenar, mientras las virosis afectan de forma desigual a las distintas colmenas, pero la última palabra debe decirla el laboratorio.

Tampoco son muchas las medidas de lucha que cabe utilizar, excepto las de manejo y las puramente higiénico-sanitarias.

Dada la estrecha correlación de las manifestaciones de virosis con altas densidades de población en las colmenas, puede ser una buena medida preventiva el partir las colonias o bien colocar alzas en la época de máximo riesgo.

La prevención del pillaje previene también la difusión del proceso, caso de que se presente, y en brotes declarados, cuando ya existe pillaje por "ladronas negras", en colmenas muy debilitadas puede ser una buena medida cerrarlas y eliminar las abejas que queden dentro, e incluso utilizar una colmena despoblada como trampa para capturar a las pilladoras.

Al igual que en las loques, la miel de colmenas afectadas es apta para consumo humano, pero no debe emplearse para suplementar la alimentación de las abejas. Las colmenas despobladas deben ser desinfectadas mediante flameado.

## 6. Cría ensacada

Es una enfermedad vírica poco contagiosa de las larvas, que afecta también en menor medida a las nodrizas. Suele infectarse la larva de dos días, en celdilla abierta, através de la jalea real suministrada por nodrizas infectadas, pero la enfermedad se manifiesta en las larvas operculadas.

El virus inhibe la producción de quitinasa de la larva, necesaria para digerir la cutícula durante las mudas, por lo que el fluido segregado por la epidermis para romper con su presión la cutícula previamente desquitinizada, se acumula entre la epidermis y la vieja cutícula y oprime a la propia larva, causando su muerte.

La larva queda vertical en su celdilla, su cabeza y tórax se ennegrecen y su cuerpo se oscurece progresivamente. Las nodrizas pronto roen el opérculo y extraen el cadáver; al hacerlo se contagian y el virus se aloja en sus glándulas hipofaríngeas, con lo que infectan a las nuevas larvas con su jalea real.

Sin embargo, el virus reduce tanto la funcionalidad de las glándulas como la vitalidad de la abeja, por lo que cada una infecta pocas larvas y difícilmente llega a participar en la recolección, aunque pueden infectar por trofalaxia a las recolectoras, que a su vez contaminan las reservas.

La enfermedad, en consecuencia, tiende a ser autolimitante, y no suele pasar de afectar varias celdillas en un sólo cuadro de cría, pero merced a los alimentos contaminados, la infección puede mantenerse enzoótica en las colonias afectadas.

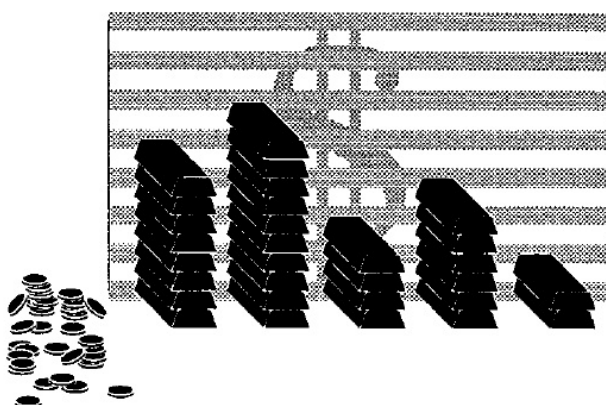
## Referencias bibliográficas

- Alippi AM. Detection of *Bacillus larvae* in mixed populations of bacterial spores from larval remains. *Microbiologia* 1992; 8: 115-118.
- Alippi AM. Sensibilidad *in vitro* de *Bacillus larvae* frente a diferentes agentes antimicrobianos. *Vida Apícola* 1994; 66: 20-24.
- Alonso JM, Cardenal JA, Hermoso de Mendoza J, Rey JM, Anton JM, Gil MC, Naranjo G, Gomez A, Hermoso de Mendoza M. Bacteriosis apícolas: las loques en la apicultura española. *Nuestra Cabaña* 1991; 222: 83-86.
- Bailey L. Virosis. *Patología de las Abejas*. Zaragoza. Acribia. 1984. pp 10-27.
- Flores JM, Puerta F, Bustos M, Padilla F, Campano F. Virosis. Algunas consideraciones sobre la situación actual. *Vida Apícola* 1994; 65: 39-43.
- Francki RIB, Fauquet CM, Knudson DL, Brown F. Classification and Nomenclature of Viruses. Wien. Springer-Verlag. 1991.
- Gliniski Z, Kauko I., Buzcek J, Gacek G. *Hafnia alvei* infection of the honeybee, *Apis mellifera* L. *Medycyna Weterynaryjna* 1994; 50: 74-77.
- Llorente Martínez J. Virosis. *Cuadernos de Apicultura* 1991 - 11; 13-14.
- Puerta Puerta F, Bustos Ruiz M, Hermoso de Mendoza M, Galisteo Martínez I. Las virosis en la apicultura española. *Vida Apícola* 1986; 19: 12-15.
- Puerta Puerta F, Bustos Ruiz M, Hermoso de Mendoza M, Galisteo Martínez I. Iniciación a la Patología Apícola. *Noticias Neosan* 1987; 223: 79-92.
- Puerta F, Flores JM, Jimenez AJ, Bustos M, Padilla F. Enfermedades secundarias a la parasitación por *Varroa* en *Apis mellifera*. *Vida Apícola* 1990; 43: 54-59.

\* Médico Veterinario, Professor Doutor da Faculdade de Medicina Veterinária da Estremadura, Cáceres

# Avaliação de projectos de investimento na perspectiva da colectividade

Deolinda Maria Fonseca Alberto (\*)



## 1. Introdução

A utilização de programas de desenvolvimento regional como instrumentos de política económica acentuou-se após a data da adesão de Portugal à União Europeia, tendo-se assistido à progressiva implementação de programas específicos sectoriais e regionais.

A recente reforma dos fundos estruturais e a criação do fundo de coesão, principais fontes de financiamento destes programas, veio obrigar a uma maior concentração das dotações orçamentais nas zonas mais deprimidas e à sua utilização mais racional, de modo a aumentar a eficácia da sua intervenção.

A atenuação dos desequilíbrios regionais (principal objectivo da política regional da União Europeia) vai implicar uma coordenação das políticas e instrumentos financeiros, nacionais e comunitários. Assim, os financiamentos serão canalizados, prioritariamente, para acções integradas em programas de desenvolvimento regional.

A concretização de uma estratégia de desenvolvimento é feita através da implementação de projectos, que se enquadrem no referencial subjacente ao modelo de desenvolvimento adoptado.

A existência de projectos alternativos visando o mesmo fim, aliada à escassez de recursos produtivos, implica a adopção de uma técnica de apoio à decisão que permita seleccionar a opção mais adequada à consecução dos objectivos de desenvolvimento pré-definidos.

A multiplicidade de objectivos a atender no planeamento regional, "a natureza, por vezes conflitual das suas inter-relações" (Avillez, 1984) e as imprecisões na definição dos custos e benefícios sociais de um projecto, dificulta, senão impossibilita, o estabelecimento de uma metodologia de avaliação objectiva e de aplicação universal.

"Como consequência surgiram, na prática, uma multiplicidade de métodos e critérios de avaliação, que correspondem a formas diferentes de tentar superar as insuficiências da teoria" (Barata, 1987).

Seguidamente iremos abordar as principais metodologias utilizadas.

## 2. Bases teóricas da avaliação de projectos

Um projecto pode ser encarado como uma proposta de aplicação, num determinado momento, de um conjunto de recursos produtivos relativamente escassos, com vista a gerar no futuro um certo volume de bens e serviços, o qual se destina a cobrir determinados objectivos, empresariais, económicos ou sociais.

Uma vez que a escassez de recursos não permite a implementação de todos os projectos possíveis, torna-se necessário proceder à sua análise e posterior avaliação no sentido de se optar por aqueles que



apresentam uma maior aderência aos objectivos da entidade promotora, seja pública ou privada.

Deste modo, os métodos de avaliação de projectos constituem técnicas fundamentais no planeamento da actividade económica.

A avaliação de projectos pode ser efectuada segundo três ópticas distintas:

- financeira
- económica
- social

Na avaliação financeira, através da análise do cash-flow actualizado, pretende-se inferir da rentabilidade financeira que o projecto apresenta para o investidor.

Neste tipo de análise a decisão sobre a aceitação de um projecto ou a escolha entre projectos mutuamente exclusivos é tomada, unicamente, em função do lucro que o investidor prevê vir a obter; nada garante que a afectação de recursos proposta no projecto escolhido seja a mais eficiente do ponto de vista da sociedade.

De modo geral, os lucros auferidos pelas empresas não reflectem os custos e benefícios do ponto de vista da colectividade, isto porque o sistema de preços de mercado pode não reflectir o valor real dos factores de produção utilizados e dos produtos obtidos.

Este facto reveste-se de particular importância nos países em desenvolvimento devido ao subemprego de recursos, nomeadamente trabalho, e à acentuada intervenção estatal nos mercados, quer criando mecanismos proteccionistas face ao mercado externo quer favorecendo, internamente, situações de monopólio público ou privado.

Ultrapassando a óptica puramente empresarial, na avaliação económica os projectos são analisados do ponto de vista da sociedade sendo "os custos e benefícios de um projecto avaliados em relação a até que ponto eles dificultam ou facilitam a consecução dos objectivos da sociedade em questão" (Squire e Van-der-Tak, 1975).

É lícito admitir que o desenvolvimento económico e social constitui um dos principais objectivos de qualquer sociedade.

Analisar o contributo de cada projecto para o desenvolvimento económico, assegurando assim uma eficiente afectação dos escassos recursos produtivos de que a sociedade dispõe é o objectivo da avaliação económica.

Para se proceder à avaliação económica é necessário identificar todos os custos e benefícios de um projecto, incluindo os efeitos externos, e valorizá-los através de um sistema de preços - preços de eficiência (preços de referência da avaliação económica) que reflecta o valor que lhes é atribuído pela sociedade.

Assim, os benefícios são contabilizados em função da contribuição do projecto para os objectivos económicos do país e os custos são valorizados atendendo ao custo de oportunidade dos recursos utilizados.

O objectivo deste sistema de preços de eficiência é "tornar o projecto coerente com a estratégia de desenvolvimento adoptada" (Pimpão, 1985).

Segundo a teoria neoclássica, o sistema de preços que asseguraria uma óptima afectação de recursos e maximizaria o bem estar social seria o sistema de preços associado à situação ideal de concorrência perfeita.

Considerando que o sistema de preços que vigora no comércio internacional é o que mais se aproxima da situação de concorrência perfeita, é comum utilizarem-se os preços internacionais como os preços de referência da avaliação económica.

Para bens não negociáveis no mercado mundial, há necessidade de recorrer a outros critérios para a sua valorização.

O valor a atribuir a determinado bem deveria reflectir a preferência, manifestada pela sociedade no seu consumo, em vez de outro bem alternativo; dado que este procedimento se mostra impraticável, a valorização do bem é feita em função do custo dos factores utilizados na sua produção.

O mesmo se aplica a recursos básicos não transaccionáveis internacionalmente "utilizando-se neste caso uma técnica de decomposição do custo da sua própria produção" (Abecassis e Cabral, 1983).

Uma vez efectuada a valorização dos custos e benefícios obtém-se um "cash-flow" económico do projecto que servirá de apoio à decisão sobre a sua implementação. Se os benefícios, a preços de eficiência, forem superiores aos custos, então a afectação de recursos proposta pelo projecto contribui para uma aproximação à situação de concorrência perfeita e consequentemente a implementação do projecto traduzir-se-á por um contributo positivo para os objectivos da sociedade.

Na referência anteriormente feita aos objectivos da sociedade, focou-se essencialmente a questão do crescimento; no entanto, existe um outro objectivo que importa considerar, a equidade, ou seja, o modo como o rendimento é distribuído pelos membros da sociedade. Analisar o impacto da afectação de recursos proposta por cada projecto no padrão redistributivo, é o objectivo da avaliação social, actualmente considerada como o principal meio de intervenção, das autoridades políticas, na redistribuição dos rendimentos.

A valorização de um projecto a preços de eficiência pode conduzir a um padrão redistributivo não aceitável pelo governo. Deste modo, há que substituir os preços eficientes por um outro sistema, preços de referência da avaliação social, que reflectem a distribuição de rendimentos proposta pelo governo.

"Os preços de referência da avaliação social medirão, assim, a contribuição do projecto para os objectivos socio-económicos do governo" (Barros, 1985).

Para a determinação destes preços de referência, torna-se necessário reportar todos os benefícios e custos sociais a uma "medida" comum, o numcrário.

As metodologias de avaliação propostas pelo Banco Mundial e pela OCDE indicam como numcrário "o valor dos recursos reais livremente disponíveis para o sector público" (Squire e Van-der-Tak, 1975).

Feita esta valorização é possível analisar a contribuição do projecto para a melhoria do bem-estar social dos membros da sociedade, avaliada em função de um indicador que revela as preferências individuais - o excedente do consumidor.

A informação recolhida durante as fases de análise económica e social de um projecto, visa auxiliar o decisor na escolha da melhor alternativa. "A avaliação apenas fornece a base factual sobre a qual se apoia a decisão, não se sobrepondo à decisão em si" (Lichfield, 1975).

No entanto, para que a decisão possa ser tomada numa base racional, as vantagens e desvantagens absolutas e relativas de um projecto devem ser inseridas numa estrutura lógica.

Essa estrutura é "o resultado da adopção de uma metodologia de avaliação, definida como um conjunto de regras que se destinam a transformar as múltiplas facetas de um projecto, em afirmações sobre o bem-estar social, com a finalidade de ajudar o decisor na escolha do melhor projecto" (Delft e Nijkamp, 1977).

As metodologias de avaliação económica e social de projectos podem dividir-se em dois grandes grupos: monetárias e não monetárias, consoante a decisão sobre o projecto se faça recorrendo a um único indicador monetário que sintetiza toda a informação referente ao projecto ou a vários indicadores de natureza diversa.

### 3. Métodos monetários de avaliação

De acordo com os métodos monetários de avaliação, os fluxos de custos e benefícios de um projecto são valorizados através de um sistema de preços de referência (anteriormente definido) e actualizados por uma taxa de desconto social determinada por critérios macroeconómicos.

Feita a valorização, é atribuído a cada projecto um valor que reflecte o seu benefício social líquido sendo através deste indicador que se determina a contribuição de cada projecto para a função objectivo - maximização do bem-estar social.

A utilização destes métodos implica que todos os efeitos de um projecto sejam convertidos em unidades monetárias de modo a que possam ser comparados entre si.

Este facto levanta alguns problemas práticos, uma vez que certos efeitos dificilmente são quantificáveis, principalmente os de impacto social e ambiental.

De entre os métodos monetários de avaliação merece especial destaque a análise custos - benefícios, não só por ser o de utilização mais divulgada, mas também porque os métodos desenvolvidos posteriormente adoptam (parcialmente) os mesmos pressupostos teóricos.

Com o desenvolvimento de outros métodos monetários de avaliação, nomeadamente a análise custo-eficácia, o "planning balance sheet" e a matriz de objectivos resultados tentou-se ultrapassar algumas das limitações que a análise custos-benefícios apresentava, das quais são de salientar a construção da função de preferência social, a escolha da taxa de actualização e a não

contemplanção de efeitos qualitativos.

Os problemas concretos que se colocam na avaliação de projectos no âmbito do planeamento regional e urbano exigem que a metodologia a adoptar obedeça às seguintes características:

- i) seja clara e eficaz, ou seja, capaz de proporcionar ao decisor uma referência objectiva para a tomada de decisão;
- ii) seja aplicável em situações multiactor, contemplando a possibilidade dos decisores não apresentarem uniformidade de critérios;
- iii) permita a inclusão de efeitos quantitativos, qualitativos e intangíveis;
- iv) contemple os efeitos sectoriais e cumulativos das alternativas em análise;
- v) possibilite o tratamento de toda a informação disponível considerada útil para a tomada de decisão;
- vi) permita ter em atenção objectivos previamente definidos e susceptíveis de serem hierarquizados, de uma forma explícita, pelo decisor ou pela comunidade;
- vii) atendendo à disparidade de critérios de avaliação e à natureza múltipla dos objectivos, o resultado do processo de avaliação não deve ser expresso por um indicador único.

Em face destes pressupostos facilmente se conclui que os métodos monetários de avaliação não são os mais indicados sendo de salientar algumas limitações.

Com estes métodos a decisão é tomada em função de um critério unidimensional. Os projectos são avaliados através de uma função de utilidade ou de bem-estar social que atribui a cada projecto um determinado valor. A valorização desta função levanta dois problemas, a escolha do numerário e a quantificação dos efeitos na unidade escolhida.

Esta quantificação exige que "seja possível transformar a medida de cada efeito em termos de numerário, o que implica a existência de preços de referência" (Fayette, 1979).

Assim, todos os efeitos do projecto são traduzidos por um valor monetário, o que é limitativo, uma vez que, dada a natureza multidimensional do planeamento, existem efeitos não mensuráveis e externalidades que não são contemplados na avaliação.

Outro aspecto que reduz a aplicabilidade destes métodos no planeamento regional e urbano reside no facto da valorização ser feita segundo o critério de um único decisor, enquanto que no planeamento a estrutura de decisão é multiactor.

### 4. Métodos multicritério

Os métodos multicritério de apoio à decisão assumem-se como alternativa aos métodos monetários de avaliação e, pelas suas características, encontram no planeamento regional e urbano um óptimo campo de aplicação.

As razões deste facto assentam em três factores chave: elevado número de alternativas possíveis todas

elas envolvendo várias componentes, económica, social, ambiental, de organização espacial; relevância dada aos impactos de índole social e estrutura decisional complexa, envolvendo órgãos locais, regionais e centrais.

Os métodos multicritério rejeitam a abordagem unidimensional da avaliação (anteriormente referida) e propõem uma metodologia compreensiva, em que a decisão é tomada atendendo ao comportamento dos projectos perante um conjunto de critérios que cubram todas as facetas do planeamento.

Os critérios de decisão são de natureza muito variável: financeiros, económicos, sociais, ambientais, de gestão do espaço, políticos.

Resultam da explicitação de pontos de vista que o decisor considere importantes como factores de diferenciação entre alternativas e pretendem descrever e formalizar as preferências dos vários actores face às opções que lhes são colocadas.

Os critérios a utilizar na avaliação de projectos agrupam-se em três categorias:

- exequibilidade
- desejabilidade
- veto

Os critérios de exequibilidade traduzem o realismo da opção em análise face às restrições institucionais, económicas, sociais existentes. O seu "valor" resulta do confronto entre os recursos que cada projecto mobiliza e o volume total de recursos de que a sociedade dispõe, o que permite inferir acerca das possibilidades de realização de cada alternativa.

Os de desejabilidade, directamente relacionados com os objectivos do projecto, pretendem descrever o comportamento de cada alternativa e mostrar qual a sua contribuição na resolução das questões às quais o projecto pretende dar resposta.

Os critérios de veto permitem rejeitar alternativas cujos efeitos não contribuam para os objectivos definidos ou não alcancem os limites mínimos fixados para os critérios de desejabilidade.

A informação disponível foi um factor condicionante da escolha dos critérios, no entanto, com o desenvolvimento de técnicas que permitem o tratamento de informação qualitativa, a escolha dos critérios depende, essencialmente, da natureza do projecto a avaliar.

Como exemplo apresentamos um conjunto de critérios, explicitados por área temática, de possível utilização no planeamento regional:

económicos:

- nível de investimento
- taxa de rendibilidade
- contribuição para a balança de pagamentos

sociais:

- nível do emprego
- formação profissional
- distribuição do rendimento

tecnológicos:

- introdução de novas tecnologias
- produção de novos bens/serviços ou melhoria na qualidade dos bens/serviços já fabricados
- reconversão de zonas industriais em declínio

ambientais:

- poluição industrial
- ruído
- degradação de áreas naturais

planeamento do espaço:

- localização
- densidade populacional
- acessibilidades

A natureza multidimensional dos critérios de avaliação levanta o problema das unidades em que os impactos são valorizados. A par de critérios cujos resultados se exprimem em unidades reconhecidas (monetárias ou físicas), existem outros que apenas traduzem uma classificação ou informação.

Assim, o "valor" de cada critério pode ser traduzido numa escala quantitativa ou qualitativa consoante os efeitos que o critério pretende medir sejam quantificáveis ou não.

É na utilização de escalas qualitativas, ordinais ou nominais, e no posterior tratamento da informação não mensurável que reside uma das principais vantagens da avaliação por critérios.

Antes de se proceder à avaliação propriamente dita e dada a multiplicidade de unidades através das quais os efeitos estão expressos, é necessário tratar os dados de modo a ser-lhes retirada a componente dimensional subjacente a cada critério; esta homogeneização da informação é feita recorrendo às operações de estandardização e normalização.

Terminada a fase de modelização, que conduz à construção da matriz de avaliação e antes de se proceder à escolha da melhor alternativa, é necessário atribuir ponderações aos critérios constituintes da matriz.

Na atribuição das ponderações deve-se atender ao facto dos critérios terem sido escolhidos em função dos vários objectivos que se pretendem alcançar com a implementação do projecto; desses objectivos uns serão prioritários, pelo que deverá haver uma relação directa entre a prioridade dada a cada objectivo, pela estrutura decisional, e a ponderação atribuída aos critérios que medem a contribuição dos projectos em análise para a sua prossecução. A importância relativa de cada critério reflecte-se, assim, na ponderação que lhe é atribuída.

A selecção do melhor projecto é feita com base no comportamento de cada alternativa em relação ao conjunto de critérios escolhidos.

Esta selecção pode ser feita segundo diversas técnicas, isto porque na metodologia multicritério existem numerosos métodos desenvolvidos para dar resposta a problemas

concretos. O método de utilização mais divulgado é o ELECTRE.

## 5. O método ELECTRE

Apresentado inicialmente por Benayoun e Roy, o método ELECTRE (Élimination et Choix Traduisant la Réalité) foi sendo posteriormente desenvolvido dando origem a uma família de métodos, ELECTRE I, II, III e IV.

Considerando o conjunto das alternativas possíveis (conjunto A), o método ELECTRE parte do pressuposto de que um projecto é o melhor quando é superior a todos os outros segundo todos os critérios de avaliação; e é bom quando é superior aos outros projectos em relação ao maior número de critérios.

Os projectos alternativos são analisados dois a dois, sendo eliminadas, numa primeira fase, as opções que são dominadas por outras, constituindo-se assim um subconjunto de (A) constituído pelas "boas" alternativas.

Numa segunda fase, estas "boas" alternativas são confrontadas entre si e através de um processo de eliminação e escolha selecciona-se aquela que, perante os objectivos pré-fixados, apresenta um comportamento mais favorável.

O ELECTRE é um método discreto de subordinação de síntese, em que a relação de subordinação entre projectos alternativos é formalizada através da análise de concordância.

A análise de concordância toma como dados de partida os impactos das várias alternativas segundo cada critério (elementos que se encontram na matriz de avaliação) e as ponderações atribuídas a cada critério.

A verificação da relação de dominância assenta na definição dos índices de concordância, que permite inferir acerca da importância dos critérios em relação aos quais uma alternativa domina a outra, e de discordância, que exprime a amplitude das disparidades entre os projectos e segundo os vários critérios.

A conjugação da concordância e discordância por pares de alternativas permite identificar e excluir aquelas que são dominadas por outras até chegar à alternativa dominante que será a escolhida.

O carácter multidimensional do ELECTRE permitindo que na avaliação de projectos sejam considerados todos os pontos de vista que, de algum modo, possam constituir factores de diferenciação entre os projectos em análise, incluindo intangíveis e externalidades, aliado à relativa simplicidade operacional e facilidade de análise, assume-se como a principal vantagem deste método.

Parece-nos que a sua principal limitação reside na incerteza associada à ponderação dos critérios que se reveste de carácter subjectivo, uma vez que depende da importância que o decisor atribui a cada objectivo. Não podendo ser eliminado este problema pode, no entanto, ser atenuado recorrendo-se à análise de sensibilidade para testar a estabilidade da escolha.

## 6. Caso estudo

### 6.1. Enquadramento regional do projecto

O caso estudo que iremos apresentar refere-se à implantação de uma unidade agro-industrial de transformação e conservação de frutas e hortícolas na NUT Cova da Beira.

Uma vez que a análise de projectos na óptica da colectividade deverá estar estreitamente relacionada com a estratégia de desenvolvimento e com as políticas de âmbito global, regional e sectorial formuladas, começaremos por identificar os principais objectivos de desenvolvimento propostos para esta região.

De acordo com o Plano de Desenvolvimento Regional podemos resumir esses objectivos em 6 itens:

1. **Melhoria das acessibilidades e dos níveis de cobertura em infraestruturas básicas e equipamento;** pretende-se dotar a região de um sistema de transportes e telecomunicações eficaz e aumentar os actuais níveis de cobertura em infraestruturas básicas.
2. **Modernização, expansão e reconversão da base produtiva;** apoiando preferencialmente as unidades produtivas que utilizem matérias primas locais em detrimento daquelas que pouco contribuem para o VAB regional.
3. **Equilíbrio e funcionalidade da rede urbana;**
4. **Valorização dos recursos humanos;** fomentando acções de formação profissional e orientando-as para as necessidades do sistema produtivo.
5. **Melhoria da qualidade de vida e correcção dos desequilíbrios regionais;** incentivando acções que contribuam para a fixação dos recursos humanos e de capital, nomeadamente aumentando a oferta de serviços culturais e de lazer e dotando a região de infraestruturas e equipamentos (de saúde, ensino, desportivos, etc.) que contribuam para a melhoria das condições de vida das populações.
6. **Defesa do património e protecção do quadro natural.**

Em síntese, podemos afirmar que o desenvolvimento da região passa pela promoção dos sectores produtivos, assente na implementação de acções em áreas específicas como as infraestruturas, captação de investimentos, valorização dos recursos endógenos, rejuvenescimento e formação profissional do tecido produtivo e diversificação da base produtiva, fundamentalmente nas zonas rurais.

### 6.2. Proposta metodológica para avaliação de projectos de investimento integrados em programas de desenvolvimento regional

Seguidamente iremos propor uma metodologia de avaliação por critérios para análise do projecto anteriormente referido. Serão explicitados os critérios que nos parecem relevantes e faremos a articulação dos efeitos gerados

pelo projecto com os objectivos de desenvolvimento definidos para a região.

### Principais critérios de avaliação

Os critérios de avaliação a utilizar devem reflectir a multiplicidade de efeitos gerados com a realização do projecto.

No sentido de facilitar o tratamento da informação disponível consideramos útil agrupar os efeitos por categorias relevantes e definir para cada uma, indicadores susceptíveis de "medir" os impactos considerados.

#### A. Efeitos económicos

Nos efeitos económicos devemos considerar os aspectos que se prendem com a viabilidade financeira do projecto em si e com o seu impacto na economia regional e nacional.

Tratando-se de um investimento produtivo (unidade agro-industrial para transformação de frutas e hortícolas) e no sentido de encontrar a melhor aplicação para as disponibilidades financeiras, pensamos que deve ser feito, previamente, um estudo de viabilidade financeira do projecto, recorrendo-se para isso às técnicas clássicas da análise financeira - determinação do VAL (valor actualizado líquido) e da TIR (taxa interna de rentabilidade) do projecto.

Os efeitos potenciais do projecto na economia regional estão estreitamente relacionados com o objectivo da "melhoria da qualidade de vida e correcção dos desequilíbrios regionais". Para a "medição" destes efeitos propomos os seguintes critérios:

**1. Valor Actualizado Líquido Económico (VALE)**, cujo montante é dado pela diferença entre o valor actual dos benefícios líquidos gerados pelo projecto ao longo da sua vida útil e o valor actual dos custos de investimento.

$$VALE = \sum_{t=0}^n R_t - D_t - S_t(1+i)^{-t} - \sum_{t=0}^n I_t(1+i)^{-t}$$

em que:

**R<sub>t</sub>** = valor anual bruto da produção a preços de eficiência económica;

**D<sub>t</sub>** = despesas anuais de exploração a preços de eficiência económica;

**S<sub>t</sub>** = custos anuais de investimento e despesas de conservação/substituição, efectuados pelos particulares, a preços de eficiência económica;

**I<sub>t</sub>** = custos anuais do investimento colectivo e respectivas despesas de conservação/substituição a preços de eficiência económica;

**i** = taxa de actualização económica;

**t** = vida útil do projecto.

**2. Importância do VAB (valor acrescentado bruto) e o montante que é efectivamente retido na região.**

A tradução operacional deste critério poderá ser o *rátio* rendimento regional/capital investido, citado por Avillez (1984).

$$R/I = \frac{\sum_{t=0}^n (Y_t + W_t + X_t)(1+q)^{-t}}{\sum_{t=0}^n I_t(1+q)^{-t}}$$

em que:

**Y<sub>t</sub>** = valor do cash-flow líquido financeiro anual retido na região onde se localiza o projecto;

**W<sub>t</sub>** = valor dos salários pagos retido anualmente na região;

**X<sub>t</sub>** = valor dos cash-flows líquidos obtidos e dos salários pagos pelas unidades fornecedoras de inputs e transformadoras de outputs do projecto que são retidos anualmente na região;

**I<sub>t</sub>** = custos do investimento colectivo inicial;

**q** = taxa de actualização expressa pelo custo de oportunidade do capital.

#### 3. Nível de adequação dos sectores dinamizados pelo projecto às prioridades regionais e nacionais.

O projecto que estamos a analisar encontra-se perfeitamente enquadrado nas prioridades regionais uma vez que vai dinamizar o sector primário, mais concretamente os subsectores frutícola e hortícola, para os quais a região da Cova da Beira está particularmente vocacionada; assim este projecto vai permitir o aproveitamento e valorização dos recursos endógenos o que irá provocar um acréscimo no VAB regional com o consequente aumento no stock de capital.

#### B. Efeitos sobre a produção

Estes efeitos estão directamente relacionados com o objectivo de "modernização, expansão e reconversão da base produtiva".

Neste caso interessa realçar qual o sector da actividade industrial que será beneficiado pelo projecto e se a matéria prima a laborar é ou não proveniente da região, devendo-se dar prioridade aos projectos que incorporem o máximo de matérias primas locais.

Pensamos que a implantação da unidade agro-industrial tem efeitos positivos uma vez que diversifica a base produtiva numa região dominada pela indústria têxtil e labora exclusivamente matéria prima proveniente da região.

#### C. Efeitos comerciais

##### 1. Efeitos na balança comercial

O critério a utilizar será o saldo de divisas gerado pelas operações produtivas num ano normal de funcionamento.

##### 2. Regularização do circuito comercial interno

- Os critérios que melhor exprimem este efeito são:
- redução do número de agentes intervenientes no circuito de comercialização com o conseqüente reflexo na sua eficácia e diminuição do diferencial de preços entre produtores e consumidores;
  - diversificação dos mercados;
  - diversificação do produto final de modo a atenuar as oscilações anuais dos preços dos produtos em fresco.

#### D. Efeitos sobre o emprego

O critério será a redução do desemprego ou do subemprego directo e induzido, diversificação das oportunidades de trabalho e o seu carácter de permanência, devendo-se dar prioridade à criação de postos de trabalho não sazonais ou complementares de sazonais existentes. Neste caso iria haver criação de postos de trabalho permanentes.

#### E. Efeitos sobre as condições de vida dos agricultores

Estes efeitos são "medidos" através do aumento do rendimento dos produtores e assalariados rurais. Interessa analisar se o projecto terá ou não impacto ao nível da produção, quer seja por via do acréscimo da produção, introdução de novas actividades nos sistemas de produção e garantia de preços.

No caso particular da unidade agro-industrial este grupo de efeitos revela-se extraordinariamente importante devido ao facto dos serviços oficiais estarem a desenvolver um programa de experimentação de novas espécies, o que vai permitir a modernização dos sistemas tradicionais de agricultura da região; ao mesmo tempo a diversificação das culturas vai atenuar o risco inerente à actividade agrícola.

Por outro lado, a industrialização vai permitir conquistar segmentos de mercado, o que também terá reflexos positivos ao nível dos rendimentos dos agricultores, uma vez que será possível vender mais e a preços mais vantajosos.

#### F. Efeitos sobre o desenvolvimento do sector agrícola

São vários os critérios que permitem traduzir estes efeitos, citaremos apenas aqueles que nos parecem ser os mais importantes:

- manutenção do habitat rural;
- contribuição para a fixação das populações rurais;
- acções de vulgarização e número de agricultores abrangidos;
- promoção de acções de formação profissional.

Estes critérios prendem-se aos objectivos de "valorização

dos recursos humanos" e "defesa do património e protecção do quadro natural".

Os critérios anteriormente propostos não esgotam a multiplicidade de critérios a ter em conta na análise de projectos no planeamento regional; contudo, a metodologia proposta é suficientemente flexível para permitir, no decurso do processo de análise, a introdução de novos critérios tidos como relevantes.

Como reflexão final pensamos que é possível e desejável o aprofundamento dos métodos teóricos de apoio à decisão em situações de múltiplos objectivos e actores.

No entanto, a teoria não deve sobrepor-se ao contexto específico da tomada de decisão; o desenvolvimento só será conseguido se houver uma conjugação das aspirações e actuações da população, órgãos locais, nacionais e estruturas de planeamento.

É certo que a tarefa dos especialistas não ficará simplificada, mas quem poderá negar que estas novas perspectivas não correspondem às necessidades do mundo contemporâneo?

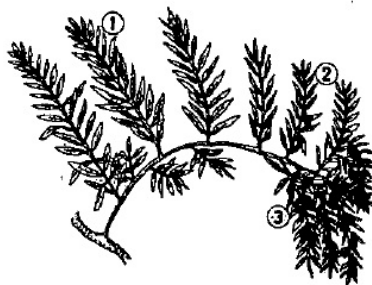
### Referências bibliográficas

- Abecassis, F.; Cabral, N. (1983) *Análise Económica e Financeira de Projectos*. F.C.G., Lisboa.
- Avillez, F. (1984) *Avaliação de Projectos de Desenvolvimento Agrícola e Rural do Ponto de Vista da Colectividade*. I.G.C., Oeiras.
- Barata, J. M. (1987) *A Taxa de Actualização Social*. U.T.L., Lisboa.
- Barros, C. (1985) *As Metodologias de Avaliação de Projectos a Preços de Referência*. U.T.L., Lisboa.
- Delft, A.; Nijkamp, P. (1977) *Multicriteria Analysis and Regional Decision Making*. Martinus Nijhoff Publishing, The Hague.
- Fayette, J. (1979) *Avaliação de projectos e análise multicritério*. *Planeamento*, vol 2, nº 1, Lisboa.
- Lichfield, N. (1975) *Evaluation in the Planning Process*. Pergamon Press, Oxford.
- Pimpão, A. (1985) *Planeamento Macroeconómico e Planeamento Empresarial*. U.T.L., Lisboa.
- Squire, L.; Van-der-Tak, H. G. (1975) *Economic Analysis of Projects*. John Hopkins Press, Baltimore.

\*Eng.ª Agrónoma, Prof. Adjunta da ESACB

# A poda da oliveira

António Maria dos Santos Ramos (\*)  
Luís Manuel Sousa da Silva dos Santos (\*\*)  
Margarida Maria de Jesus Candeias (\*\*\*)



## 1. Introdução

A oliveira atravessa hoje em dia, tal como os restantes sectores da agricultura nacional, uma gravíssima crise em resultado de um abaixamento do rendimento dos olivais, a que nem as actuais ajudas comunitárias têm obstado.

Esse abaixamento dos rendimentos deve-se à conjugação de diversos factores negativos, entre os quais salientaremos os seguintes:

- elevada idade dos olivais;
- baixas densidades;
- árvores de grande porte;
- localização em zonas marginais e/ou de difícil acesso;
- baixo índice de mecanização da colheita;
- baixa frequência de regas, fertilizações e tratamentos fitossanitários;
- concorrência com os outros óleos vegetais (que se deve apenas ao seu baixo preço e não a uma melhor qualidade do produto).

Estes factores são ainda agravados por uma indústria transformadora de carácter sazonal, tradicional e, em muitos casos, com equipamento obsoleto e uma organização comercial deficiente, com pouca ou nenhuma intervenção dos produtores.

Para enfrentar este desafio, ou seja, ultrapassar a crise instalada no sector, são necessárias, concerteza, medidas político-administrativas, nomeadamente de:

- certificação e demarcação de zonas características de reconhecida especificidade e qualidade;
- controlo qualitativo dos azeites importados;
- promoção ao consumo e exportação, baseada na qualidade de um produto natural e uma das gorduras mais saudáveis na alimentação humana.

Para além destas medidas, o desafio de fazer sair o sector da crise passará também pela tomada de consciência dos próprios olivicultores de que é necessária uma maior aplicação dos conhecimentos técnico-científicos disponíveis e pôr de lado certos princípios tradicionais da exploração do olival errados, pois vão contra os hábitos de frutificação e a fisiologia da oliveira.

Uma das técnicas culturais em que mais se evidencia esse facto é a poda do olival. A alteração da poda tradicional para um sistema de poda que respeite os hábitos e a fisiologia da oliveira nem sequer significa um acréscimo dos custos dessa operação, muito pelo contrário.

Claro que os problemas do sector não se resolverão só com a mudança do tipo de poda, dado que alguns olivais idosos, dispersos, marginais e de difícil acesso continuarão a ser úteis, mas apenas no embelezamento da paisagem e como coberto em sistemas de pastoreio.

Mesmo nos olivais "recuperáveis", a mecanização da colheita, as fertilizações e, eventualmente, a rega, a reconversão varietal (por reenxertia) e os tratamentos fitossanitários serão também decisivos para alterar a tendência negativa actual.

Por outro lado, as novas plantações, ainda demasiado jovens para que possam ter um papel imediato na melhoria do sector, têm já compassos mais apertados, cultivares mais adequadas, rega, fertilizações e os restantes cuidados culturais comuns à generalidade da exploração das espécies fruteiras. Contudo, mesmo após a sua entrada em plena produção, serão insuficientes para que possamos descurar os olivais existentes, apesar das suas reconhecidas limitações.

É nesse sentido que surge este trabalho que, baseando-se na proposta de alteração da poda tradicional para um sistema de poda mais "racional", pode dar um contributo positivo na melhoria desses olivais, permitindo aplicar neles alguns conhecimentos técnico-científicos que os ajudem na sua recuperação física e económica.

## 2. Aspectos fisiológicos da oliveira

Dos diversos aspectos da fisiologia da oliveira, os que mais nos interessam para o estudo da poda são os hábitos de frutificação da espécie, a repartição dos fotoassimilados pelas diversas "sinks" (pontos de consumo) e as relações de competição que se estabelecem entre as diferentes funções da planta (relações "sink-sink").

### 2.1. Hábitos de frutificação

A oliveira é uma espécie que frutifica apenas nos raminhos novos, aqueles que cresceram no ano anterior, que se localizam nas zonas periféricas da copa.

Em condições normais, os gomos axilares nas folhas desses raminhos sofrem diferenciação floral, enquanto o gomo terminal permanece foliar e assegura o prolongamento do ramo.

Deste modo, a zona produtora de um ano é a que cresceu no ano anterior e a que cresce nesse ano é a que vai produzir no ano seguinte, numa forma contínua e sempre na periferia da árvore.

Assim, existe uma forte interdependência entre crescimento e produção, pelo que se torna delicada a manutenção de um equilíbrio regular entre estas duas funções. Caso haja uma produção exagerada num ano, o crescimento é muito fraco, formam-se poucos gomos, a diferenciação floral é afectada e, no ano seguinte, há pouca produção. Havendo pouca produção, haverá maior crescimento, maior número de novos gomos florais e, por conseguinte, maior produção.

Estarão, portanto, criadas as condições para a ocorrência de um fenómeno característico de alternância de colheitas, tradicionalmente designado por "safra e contra-safra".

Este fenómeno de alternância de colheitas é há muito conhecido de todos os olivicultores, sendo considerado como uma particularidade típica da oliveira, embora seja comum a muitas outras espécies fruteiras arbóreas. Embora a investigação continue a desenvolver esforços para eliminar esta tendência, ainda não se conhecem estratégias definidas para a sua eliminação, podendo-se, por enquanto, apenas atenuá-la através da poda e da utilização equilibrada das outras técnicas culturais, como as fertilizações, regas, etc.

### 2.2. Repartição dos fotoassimilados

Tal como as outras plantas, a oliveira, utilizando a energia luminosa (fotossíntese), produz nas folhas as substâncias orgânicas (fotoassimilados) que irá distribuir por todas as funções que a planta tem de realizar e que constituem locais de consumo.

As principais funções consumidoras de fotoassimilados ("sinks") são as seguintes:

- crescimento:** na extremidade dos raminhos e das raízes;
- produção (diferenciação floral e crescimento do fruto):** nas axilas das folhas que se encontram na porção de raminho que cresceu no ano anterior;
- reservas:** acumulação nas partes lenhosas permanentes (ramos, pernasadas, tronco e raízes);
- manutenção:** parte energética que a planta precisa de dispendir, a fim de assegurar todas as outras funções vitais (energia obtida essencialmente a partir da respiração).

Uma vez que a produção de fotoassimilados é limitada, a sua utilização por parte das diversas "sinks" está sujeita a um certo controlo interno, que é regulado pelos níveis das diferentes substâncias hormonais, consoante a época do ciclo biológico. Contudo, essa regulação não é absoluta e existem sempre fortes possibilidades de que a competição entre as diferentes funções da planta possa levar a desequilíbrios que, pelas características dos hábitos de frutificação da espécie, levam, como atrás vimos, à alternância de colheitas (safra e contra-safra).

### 2.3. Relações "sink-sink"

O nosso interesse, como utilizadores (exploradores...) da oliveira, é ter a máxima produção e qualidade possível. Para isso, a nossa natural tendência deverá ir no sentido de aumentar a parte dos fotoassimilados que se destina à produção e diminuir a parte relativa aos outros gastos.

Contudo, dadas as características dos hábitos de frutificação da espécie, a condição primordial que devemos respeitar para evitar a entrada em alternância reside, precisamente, em garantir com regularidade crescimentos equilibrados. Desta forma, não podemos aumentar a parte dos fotoassimilados destinada à produção, à custa da parte destinada aos crescimentos.



Uma vez que não podemos eliminar os gastos com o crescimento, só nos restará tentar diminuir as despesas com as reservas e a manutenção, a fim de beneficiar a produção sem prejudicar o equilíbrio crescimento/produção.

As reservas são essenciais para a sobrevivência das plantas em caso de sofrerem qualquer calamidade (natural ou provocada pela acção do homem ou animais), mas os gastos energéticos com esta "sink" podem ser reduzidos sem prejuízo desta capacidade. Dado que as reservas se constituem nas partes lenhosas do caule e da raiz da árvore, os gastos nesta "sink" poderão limitar-se pela redução do peso relativo das estruturas lenhosas com carácter permanente na planta, isto é, quanto mais grossos e alongados forem o tronco e as pernas (principais e secundárias), maior a quantidade de energia armazenada pela planta e "desperdiçada" em termos de produção.

Os processos degradativos que, como a respiração, contribuem para a obtenção da energia necessária para a manutenção da planta, são também fundamentais para que esta desempenhe convenientemente todas as suas funções vitais. As árvores mais idosas e de maiores dimensões gastarão mais energia por cada unidade de matéria seca criada, traduzindo-se também por um maior "desperdício" em termos produtivos.

### 3. Poda tradicional

#### 3.1. Aspectos gerais

A oliveira é, desde as mais remotas civilizações que se estenderam pela bacia mediterrânica, uma das culturas mais carregadas de tradicionalismo e misticismo. Dentro dessa carga de tradicionalismo, as práticas culturais têm sido, também, perpetuadas ao longo dos séculos, sendo, ainda hoje em Portugal, herdadas de geração em geração.

Entre todas essas práticas culturais, a poda não só conseguiu conservar-se e transmitir-se em sistemas definidos, como também vinculados a zonas determinadas. A diferença entre umas e outras árvores de cada zona, aparte os factores do meio físico e cultural, só pode ser devida a uma diferença específica no que se refere a detalhes de execução e no critério das distintas proveniências dos podadores. Desta forma, podemos dizer que os sistemas e costumes da poda tradicional são infinitos.

Perante a diversificação dos sistemas de poda, que conduzem a formas e estruturas das árvores muito diferentes, temos que reconhecer que estas práticas não estão, na maioria dos casos, justificadas pela adaptação do sistema empregue ao meio e à planta.

O que caracteriza essencialmente a poda tradicional (independentemente das variações de pormenor atrás referidas) é o facto de se deixarem as oliveiras com grande arborescência, logo, com grande percentagem de estruturas lenhosas permanentes, apresentando, deste modo, gastos energéticos elevados em reservas e manutenção, não obstante se procurar um certo equilíbrio entre a produção e o crescimento.

Dá, ser este um sistema que contribui fatalmente para uma diminuição da produção e um envelhecimento e desvitalização progressivos, que faz com que muitos olivais tenham baixa produtividade, podendo vir a ser considerados como marginais.

Com efeito, durante os períodos juvenil e de maturidade, o sistema radicular desenvolve-se mais do que a parte aérea, mas, após atingir o período adulto, a parte aérea tende a crescer mais rapidamente do que o sistema radicular até que se atinja um certo equilíbrio, altura em que a oliveira apresenta a sua máxima capacidade produtiva. Dado que a parte aérea continua com uma tendência para crescer mais do que as raízes, a manutenção desse equilíbrio (que se pretende o mais prolongado possível) só será possível através da poda.

A entrada no período de decrepitude, em que as produções vão diminuindo progressivamente, varia com as cultivares, os métodos de cultivo, as condições climáticas adversas e a falta de cuidados culturais, entre outros factores.

Em Portugal, o aumento dos custos de produção, essencialmente da mão-de-obra (com a conseqüente diminuição dos cuidados dispensados ao olival), associado ao facto de se manterem os olivais em sistemas de poda tradicionais, com elevadas arborescências e grande peso das estruturas lenhosas de carácter permanente, contribuíram decisivamente para que muitos olivais tivessem entrado, talvez prematuramente, naquela fase.

#### 3.2. Utilização da motosserra

Tradicionalmente, a poda era executada com tesoura e serrote, sendo, por isso, muito exigente em mão-de-obra.

Com a crescente escassez de mão-de-obra e o conseqüente aumento do custo deste factor de produção, esses meios começaram a ser sucessivamente substituídos por outros mais rápidos e expeditos, como a machada e a motosserra.

Na procura imediata da redução dos custos da poda, a introdução da motosserra mostrou-se bastante positiva, mas num conjunto tão diversificado de "podas tradicionais", esta introdução não teve em conta as características próprias da planta (cultivar, arborescência, etc.) e a sua ligação com o meio (clima, solo, etc.), tendo-se verificado que, do ponto de vista fisiológico, a introdução da motosserra acabou por vir a acentuar alguns aspectos negativos que eram já próprios dos sistemas de poda tradicionais.

Será de referir em particular a utilização abusiva da motosserra, especialmente no tipo de poda a que podemos chamar de "arreas", em que as oliveiras são sujeitas a uma limpeza quase total de todos os ramos mais jovens, normalmente em posição vertical no interior da copa, ficando com uma elevada proporção de pernas e ramos grossos praticamente desprovidos de vegetação, deixando-se apenas alguns raminhos pendentes na sua extremidade.

Este é o tipo de poda que, além de provocar inúmeras feridas na árvore ("portas" abertas à penetração dos mais variados agentes patogénicos, como é o caso da

tuberculose ou ronha da oliveira (*Pseudomonas syringae* ssp. *savastanoi*) e deixar as madeiras excessivamente expostas à radiação solar, às chuvas e geadas (podendo deteriorar-se rapidamente), irá, como resposta, apelar às reservas da planta para que esta se possa regenerar.

Além da falta de produção provocada pela própria poda, a rebentação que se obtém é muito vigorosa, com carácter juvenil e, conseqüentemente, não produtiva, resultando sempre, no mínimo, dois anos sem produção. Um ano excepcionalmente produtivo ao 3º ou ao 4º ano dificilmente compensará este inconveniente.

Além deste aspecto, a rebentação excessivamente vigorosa e compacta que se obtém acaba por ter, logo no 1º ano, um efeito completamente contrário àquele que se pretendia quando se fez a poda, que era o de favorecer a penetração da luz no interior da copa. O não (re)conhecimento deste efeito perverso acaba por levar os olivicultores a efectuar nova intervenção, drasticamente semelhante à anterior, ao fim de 5 ou 6 anos.

O mais curioso desta situação é que os olivicultores têm um sentido apurado para aquilo que é necessário fazer, só que, na prática, actuam em sentido inverso. Todos eles sabem que a oliveira produz na rama e não na madeira, mas quando vão podar só deixam as madeiras; dizem que querem rejuvenescer a oliveira, mas ao podar daquele modo apenas rejuvenescem temporariamente a rama e acabam por contribuir para envelhecer ainda mais a árvore; referem a necessidade de arejar a copa, mas o resultado que obtém é um maior adensamento da ramagem.

#### 4. Poda racional

Para que se obsto à progressiva decrepitude dos nossos olivais (tradicional) haverá, pois, que alterar o tipo de poda e a atitude perante a necessidade e a acção de podar e pôr em prática um sistema de poda racional.

Por "sistema de poda racional", entende-se todos os tipos de poda (e modos de podar) que respeitem os hábitos de frutificação e a fisiologia da oliveira, ou seja, que ponham em prática todo o conhecimento científico disponível sobre a planta e o ambiente que a envolve.

Para que respeite os hábitos de frutificação e a fisiologia da oliveira, qualquer tipo de poda deve "perseguir" os seguintes objectivos:

- equilibrar o crescimento e a frutificação, evitando a tendência para a alternância de colheitas e alargando o período produtivo;
- não desvitalizar ou envelhecer prematuramente a árvore, retardando tanto quanto possível a entrada na fase de decrepitude;
- ser de custo económico e facilmente exequível por uma larga gama de operadores, de preferência a partir do solo;

- preservar o máximo possível de raminhos novos em ramos jovens, a fim de garantir a manutenção da produção, mesmo nos anos de poda, contrariando assim a tendência para a alternância;
- eliminar ao máximo os gastos "não produtivos" com as reservas e a manutenção, diminuindo tanto quanto possível a arborescência da árvore, especialmente quando esta se deve a estruturas lenhosas permanentes de grandes proporções;
- reduzir o número de cortes na planta, a fim de reduzir a disseminação das doenças, em especial da tuberculose;
- eliminar, tanto quanto possível, as pernadas e os ramos cujos lançamentos mais jovens se encontram total ou parcialmente secos, devido à acção adversa dos factores climáticos ou dos agentes patogénicos;
- ter em conta o principal factor limitante, a água, cuja absorção e transporte na planta exige um gasto energético proporcional à distância entre as raízes e as folhas.

Para concretizar estes objectivos, a oliveira tem que ser podada de forma mais regular e menos drástica, procurando que toda a copa fique arejada e iluminada, através da eliminação apenas de alguns ramos, especialmente os mais vigorosos. Assim, a radiação solar penetrará sem provocar danos e os ramos que são deixados não se desenvolvem com demasiado vigor, mantendo a oliveira numa maior harmonia.

Em Elvas, no Departamento de Olivicultura da Estação Nacional de Fruticultura "Vieira da Natividade", tem-se adoptado e divulgado uma poda racional introduzida em 1976 por técnicos e podadores da região espanhola de Jaen, que consiste em fazer uma distribuição equilibrada das pernadas e uma intervenção ligeira no interior da copa, não pretendendo modificar a estrutura ou o volume das árvores, procurando-se apenas o seu desadensamento. As Tabelas 1 e 2 ilustram alguns dos resultados mais salientes dos ensaios de poda realizados nessa época.

Tabela 1 - Ensaio de poda em Monforte (1976).

Tipo de poda	Tempo médio de poda (min/árvore)	Prod. média no 1º ano (Kg/árvore)	Prod. média 4 colheitas (Kg/árvore)
Jaen normal	10	8.3	17.9
Jaen severa	10	7.6	17.4
Tradicional	45	1.8	16.5

Em Castelo Branco, na Escola Superior Agrária, tem-se vindo a realizar, desde 1992, um tipo de poda que persegue os mesmos objectivos. Contudo, a primeira intervenção tem sido mais drástica, no sentido de rebaixar e eliminar tanto quanto possível as estruturas lenhosas permanentes, para rejuvenescer um pouco as árvores (que se encontravam já num estado adiantado

de entrada na fase de decrepitude) e permitir que qualquer pessoa, nomeadamente os alunos, a possam aprender e executar facilmente a partir do solo.

**Tabela 2** - Ensaio de poda em Elvas (1976).

Tipo de poda	Custo médio de poda (esc/árvore)	Prod. média no 1º ano (Kg/árvore)	Prod. média 3 colheitas (Kg/árvore)
Jaen	5	13.9	19.6
Tradicional	25	8.0	15.6

Desde então, tem-se generalizado gradualmente este tipo de poda a todo o olival e em 1995 iniciou-se a segunda intervenção, a começar pelas oliveiras podadas há mais tempo. Esta intervenção foi menos drástica, limitando-se a fazer a "gestão" das pernas das que evoluíram a partir da zona anteriormente intervencionada (continuando a fazer a poda a partir do solo), favorecendo o desadensamento do interior da copa, mas sem a abrir completamente aos raios solares. Neste sentido, serão eliminados prioritariamente os ramos mais idosos, nomeadamente os deixados na intervenção anterior e respeitadas os mais jovens, principalmente os que rebentaram após a última poda.

## 5. Ensaio de poda

Para que o assunto fosse convenientemente estudado, foi instalado em 1993 um ensaio de poda, em Castelo Branco (Qta da Sra de Mércules, Escola Superior Agrária de Castelo Branco) e em Elvas (Herdade do Reguengo, Departamento de Olivicultura), utilizando 60 oliveiras podadas tradicionalmente e 60 com poda racional (120 oliveiras ao todo, 60 em Castelo Branco e 60 em Elvas). Em Castelo Branco, todas as 60 oliveiras (30 por modalidade de poda) eram da cultivar Galega, enquanto em Elvas eram 20 oliveiras (10 por modalidade de poda) de cada uma das seguintes cultivares: Galega, Cordovil de Castelo Branco e Bical de Castelo Branco.

Em Castelo Branco e em Elvas o tipo de poda racional utilizado foi o que se descreveu anteriormente. O tipo de poda tradicional em Castelo Branco foi o das chamadas "arreas", com limpeza total do interior e quase total das "abas" (raminhos pendentes nas extremidades das pernas) tal com é realizado, na prática, em diversas regiões do país; em Elvas, o tipo de poda tradicional utilizado foi já um pouco melhorado, com limpeza do interior, mas preservando intactas as abas.

A poda foi, em todos os casos, efectuada com motosserra.

Os resultados globais deste ensaio serão obtidos ao fim de 6 anos, mas podem apresentar-se desde já os referentes à execução da poda e à 1ª produção, ou seja, a produção do ano de realização da poda (Tab. 3 e 4).

**Tabela 3** . Resultados comparativos de dois sistemas de poda em Castelo Branco

Tipo de poda	Tempo efectivo de poda (seg./árvore)	Relação rama/madeira	Produção em 1993 (Kg/árvore)
Tradicional	259.0a	2.7a	0.08b
Racional	39.8b	0.88b	10.4a

Os valores em cada coluna com letras distintas diferem significativamente ( $P \leq 0.05$ ).

**Tabela 4** . Resultados comparativos de dois sistemas de poda em Elvas

Tipo de poda	Tempo efectivo de poda (s/árvore)	Relação rama/madeira	Produção em 1993 (Kg/árvore)
Tradicional	303.9a	11.1a	8.0b
Racional	164.5b	7.1b	22.4a

Os valores em cada coluna com letras distintas diferem significativamente a ( $P \leq 0.05$ ).

Da análise destes resultados, fica bastante evidente a diferença entre os dois tipos de poda, diferença mais notória em Castelo Branco dado que as intervenções, nos dois tipos de poda, foram mais drásticas e as árvores em Elvas estavam em muito melhor estado vegetativo e produtivo.

Dois ilações fundamentais poderão tirar-se desde já:

- a poda racional é menos morosa, portanto, menos dispendiosa, resultando numa redução dos custos de produção;
- no ano de poda, a quebra de produção é menos afectada na poda racional e isso está inversamente relacionado com a eliminação de raminhos novos (quanto maior for o valor da relação rama/madeira, maior essa eliminação em proporção com a quantidade de lenha grossa eliminada).

## 6. Considerações finais

Não queremos terminar sem, no entanto, referir que, por si só, esta alteração do tipo de poda não resolverá todos os problemas com que o nosso olival se debate hoje em dia. Se às ajudas que já hoje vêm da União Europeia (à produção e/ou ao consumo), às novas plantações, à mecanização da colheita e a uma mais criteriosa e racional aplicação de outros factores de produção, tais como rega, fertilizações e tratamentos fitossanitários, soubermos juntar os conhecimentos científicos que neste trabalho foram expressos, então poderemos estar a contribuir para que a situação actual de desânimo face à olivicultura possa ser invertida.

Estamos conscientes também de que as alterações dos hábitos tradicionais dos agricultores nacionais são difíceis e, à partida, podemos referir dois aspectos que poderão dificultar a aplicação prática dos princípios aqui enunciados:

- o primeiro diz respeito à alteração da arborescência das oliveiras, o que aparentemente os levará a pensar numa diminuição da produtividade dos olivais. Pensamos que poderá haver uma certa redução das grandes produções dos anos de safra, mas a regularidade dessas produções, com a diminuição da alternância, será o bastante para as compensar. Se fosse praticável o aumento da densidade nos olivais, em resultado daquela diminuição das copas, seria possível, mesmo, melhorar ainda mais a produtividade nos olivais tradicionais;

- o segundo aspecto relaciona-se com a colheita e com o hábito dos olivicultores em utilizar escadas altas, necessitando de pernas fortes para as amparar com segurança, ao mesmo tempo que gostam de se mover com facilidade no interior da copa, o que é dificultado pela existência de ramos mais ou menos bem desenvolvidos. Contudo, pensamos que isto é um problema que provém essencialmente de uma certa relutância natural perante as inovações e que se poderá ultrapassar facilmente quando as suas vantagens forem mais evidentes; isto passará também pela utilização de material mais leve e adequado.

(<sup>1</sup>) Eng.<sup>o</sup> Agrónomo, Prof. Adjunto da ESACB

(<sup>2</sup>) Eng.<sup>o</sup> Agrónomo, Assistente de Investigação, Chefe do Dep. de Olivicultura da Estação Nacional de Fruticultura "Vieira Natividade"

(<sup>3</sup>) Aluna estagiária do Curso de Eng.<sup>o</sup> de Produção Agrícola da ESACB

# Sistemas in vitro de multiplicação de plantas: presente e futuro (II)

José Carlos Gonçalves \*  
Maria Teresa Coelho\*\*



## Resumo

Referem-se alguns dos aspectos históricos que mais contribuíram para o desenvolvimento do conhecimento na área da cultura de tecidos vegetais, bem como a grande diversidade de aplicações e utilização destas metodologias, desde os estudos fisiológicos, interações substâncias/planta, produção de metabolitos secundários, manipulação genética e melhoramento até à sua utilização como uma poderosa metodologia na multiplicação de plantas, quer por rebentamento adventício, axilar quer por embriogénese somática. Faz-se uma descrição sucinta dos aspectos que maior impacto têm vindo a ter com a utilização destas metodologias nos diferentes grupos de culturas vegetais, nomeadamente nas culturas extensivas, hortícolas, ornamentais, fruteiras e florestais.

## 7. Fruteiras

Foi no início da década de 70 que as técnicas de micropropagação, que no campo das ornamentais se afirmavam já como potenciais concorrentes aos sistemas

convencionais de multiplicação, começaram a ser implementadas ao nível da propagação comercial de fruteiras. A aplicação inicial teve a ver com espécies de pequenos frutos, tais como morangueiro e framboesa, bem como no grupo dos porta-enxertos, em particular de pessegueiro. Estas aplicações iniciais dependiam do valor potencial destas metodologias no que diz respeito às garantias fitossanitárias do material vegetal assim propagado, nomeadamente no que diz respeito à isenção de viroses para o morangueiro e framboesa e, para o caso dos porta-enxertos, para além do aspecto fitossanitário, também o melhor e mais rápido crescimento do material micropropagado. À medida que foram sendo desenvolvidos e aperfeiçoados novos métodos para uma cada vez maior diversidade de espécies, também gradualmente foi aumentando o impacto na aplicação comercial e de especial importância o mercado respeitante à obtenção de cultivares com o seu próprio sistema radicular, evitando assim a enxertia e, como tal, uma mais rápida entrada em produção.

Actualmente, a micropropagação de espécies fruteiras, constitui o segundo maior grupo de produção, depois das ornamentais (Tab. 1), sendo a Itália o maior produtor, logo seguida pelos Estados Unidos, isto no que se refere a fruteiras de climas temperados. Na Tabela 4 indicam-se os valores da produção para 1988 quer de porta-enxertos quer de cultivares com sistema radicular próprio em Itália.

**Tabela 4** - Número de plantas micropropagadas em Itália, no grupo das fruteiras, em 1988.

GÉNERO/ESPÉCIE	Porta-enxertos	C/ raízes próprias
<i>Prunus persica</i>	9.787,000	110,000
<i>Citrus spp</i>	2.500,000	-
<i>Malus</i>	400,000	6,000
<i>Pyrus</i>	353,500	870,000
<i>Prunus domestica</i>	280,000	50,000
<i>Prunus avium</i>	215,000	18,000
<i>Prunus armeniaca</i>	140,000	4,100
<i>Actinidia chinensis</i>	100,000	463,000

Adaptada de Pierik, 1991.

Contudo, estes valores de produção alteram-se rapidamente, de acordo com as necessidades e flutuações do mercado, bem como da tecnologia disponível.

Os métodos de micropropagação possíveis para este tipo de plantas são os de rebentamento axilar, adventício e embriogénese somática, mas dentre eles é sem dúvida o de rebentamento axilar o mais utilizado, por razões que anteriormente já foram referidas e que têm a ver com a garantia da estabilidade genotípica do material propagado e que neste grupo assume especial importância. No entanto em algumas espécies, nomeadamente em videira, cultivar "Seyval" (Kruri e Worley, 1977) e nogueira (Tulecke e McGranham, 1985), os protocolos de embriogénese somática estejam em rápida definição.

Em relação aos géneros micropropagados tem sido a macieira o mais trabalhado, tendo sido também a produção clonal de porta-enxertos a primeira aplicação comercial. Este facto foi de tal modo importante que durante a década de 70 muitos laboratórios foram construídos especificamente para multiplicar *in vitro* porta-enxertos de macieira, sendo depois alargado o tipo de espécies a trabalhar. Mas também cedo se constatarem os custos destas plantas micropropagadas comparativamente a determinados métodos de multiplicação convencional, nomeadamente a amontoa. Como resultado disto, tem-se vindo a registar uma mudança de estratégia por parte das empresas, em particular nos Estados Unidos, deixando estas de produzir plantas para venda directa ao produtor do campo, mas sim produzindo plantas mãe para fornecer aos viveiristas tradicionais.

Outra importante novidade que trouxe a micropropagação de pomóideas foi a possibilidade de obter cultivares com o seu próprio sistema radicular. E apesar de alguns ensaios terem já confirmado algumas potencialidades deste sistema de produção, torna-se ainda necessário avaliar com certo rigor para uma grande maioria de cultivares. Webster e colaboradores publicaram em 1985 os resultados de estudos comparativos entre 4 cultivares de macieira com sistema radicular próprio e enxertadas sobre porta-enxertos M106 e M9. Dos seus resultados deduz-se uma resposta muito genótipo-dependente por parte da cultivar, quer no que diz respeito à produção, quer no porte e desenvolvimento da planta. Nas cultivares em que se assiste a um maior

vigor no crescimento, torna-se necessário o seu controlo através da acção de inibidores de crescimento, como por exemplo a daminozida, que parece também estimular a floração: Depreende-se, assim, que a utilização de cultivares enraizadas em substituição da tradicional associação de porta-enxerto/garfo, continua a necessitar de um estudo mais detalhado e quase caso a caso, mas a ser uma realidade ela só será possível pela micropropagação, como resultado da quase total incapacidade rizogénica das cultivares por parte dos enraizamentos convencionais.

Em relação ao grupo de espécies normalmente englobadas na designação frutos secos, onde se incluem importantes géneros/espécies como a nogueira (*Juglans spp*), a amendoeira (*Prunus dulcis*), o pistácio (*Pistacia spp*), a aveleira (*Corylus avellana*) e o castanheiro (*Castanea spp*) a situação tem, em geral, apresentado maiores dificuldades no que diz respeito à aplicação das metodologias já desenvolvidas à escala comercial, já que estes géneros/espécies têm apresentado certas dificuldades, quer para o seu estabelecimento *in vitro*, quer para as restantes fases da sua micropropagação, de tal forma que só muito recentemente se começaram a ter resultados consistentes. Uma das razões para que tal aconteça, entre outras, tem a ver com o facto do material vegetal para o estabelecimento apenas poder ser obtido a partir de plantas mãe de características fenotípicas já totalmente conhecidas, isto é, com material adulto e, como já foi referido, a utilização de material adulto dificulta todo o processo de rejuvenescimento, característica indispensável a qualquer sistema de multiplicação.

## 8. Florestais

Por último, mas não menos importante por isso, vamos fazer algumas considerações acerca da aplicação destas metodologias às espécies florestais.

A importância deste grupo de plantas para o nosso planeta é por demais evidente, pelo que é desnecessário fazer considerações. De facto, entre 29 a 34% da área global do nosso planeta é ocupado por florestas. Desta área cerca de 60% são gimnospermas e cerca de 38% angiospermas sendo globalmente admitido que o ritmo de destruição da floresta, por acção do homem, é hoje superior ao ritmo de regeneração, quer natural, quer artificial. Se juntarmos a isto os rápidos e desastrosos efeitos de certas pragas, doenças e incêndios, podemos admitir a situação como muito crítica a médio prazo. Como tal, existe uma urgente necessidade de inverter tal situação, o que só poderá ser conseguido não só intensificando o ritmo de florestação, mas mais do que isso, recorrendo à utilização de espécies melhoradas que possam ser multiplicadas por métodos baratos e rápidos. Actualmente, os programas de melhoramento de espécies florestais, bem como os métodos de propagação clonal disponíveis que permitiriam, assim, reproduzir grande quantidade de plantas com características seleccionadas e expressas de uma maneira uniforme, muito por consequência de vários factores intrínsecos às próprias espécies,

oferecem limitadas condições para se atingirem tais objectivos.

Os benefícios potenciais, e também os riscos, da utilização de plantas clonadas nos programas de florestação têm sido amplamente difundidos, sendo admitidos ganhos na ordem dos 10% comparativamente a plantas obtidas a partir de sementes de famílias seleccionadas (Kleinschmit, 1974). Contudo, é também admitido que, para a obtenção de maiores ganhos genéticos é indispensável a utilização e a compatibilização dos sistemas de propagação sexual e vegetativa. E isto porque, se a reprodução sexual é importante para a introdução de novos genes bem como para ganhos genéticos ao nível das características controladas por genes aditivos, só a reprodução vegetativa permitirá a multiplicação de famílias elite, ou mesmo de indivíduos "plus" dentro da família, que exibam ganhos significativos controlados por genes não aditivos, já que a grande maioria das espécies florestais tende a ser fortemente alogâmica.

Em relação à propagação vegetativa, tema que nos interessa, os tradicionais métodos utilizados com maior rentabilidade, de enraizamento de estacas, de enxertia ou de amontoa, ou são difíceis de conseguir ou são de todo impensáveis quando se fala em termos de milhões de plantas necessárias para florestar. De facto, a estacaria, método que poderia, mesmo assim, permitir obter o maior número de plantas em condições mais baratas, está muito dependente da capacidade rizogénica da estaca que por sua vez é dependente da idade da planta mãe donde é extraída e que, neste caso, terá que ter atingido já a idade adulta. Ora, em geral, a % de enraizamento, a velocidade de enraizamento, o comprimento e o número de raízes, bem como as taxas de sobrevivência ao primeiro e mesmo anos posteriores, decrescem directamente com a idade da planta mãe, em especial a partir dos 10 anos (Greenwood, 1986).

Surge então, com especial importância, a utilização dos sistemas de cultura de tecidos aplicados à multiplicação de plantas em que, como já foi por várias vezes referido, uma das potenciais vantagens tem a ver com os valores das taxas de multiplicação possíveis de obter. Assim, enquanto uma estaca enraizada pode produzir uma única planta, a partir da qual, alguns anos mais tarde, outras estacas poderão ser obtidas, isto se admitirmos o enraizamento por estaca como possível, com as técnicas de micropropagação o número de plantas possíveis de obter altera-se de uma forma altamente significativa. Os trabalhos pioneiros na cultura de tecidos vegetais de espécies lenhosas, iniciados na década de 40, foram desenvolvidos a partir de tecidos cambiais de *Ulmus campestris*, permitindo a obtenção de gemas adventícias (Gautheret, 1940), tendo as primeiras plantas totalmente regeneradas *in vitro* sido obtidas em 1970 por Winton em faia (*Populus tremuloides*) e nas gimnospérmicas por Sommer e colaboradores em 1975 em *Pinus palustris*.

Desde então a multiplicação assexuada de lenhosas utilizando sistemas de cultura de tecidos tem vindo a ser possível por três metodologias: (i) promovendo a quebra de dormência de gomos axilares; (ii) produção

de gomos adventícios; (iii) embriogénese somática. As primeiras duas levam à obtenção de plantas via organogénese através da formação de rebentos unipolares, isto é, só com parte aérea, os quais têm que ser posteriormente enraizados. A embriogénese somática, por seu lado, leva à formação de estruturas bipolares (embrionárias) por uma série de fases em tudo idênticas às de formação de um verdadeiro embrião zigótico. Em relação a estas três metodologias possíveis de utilizar, o seu potencial de produção aumenta proporcionalmente com a ordem de apresentação, tendo no seu conjunto permitido produzir plantas de mais de 70 espécies de angiospérmicas e cerca de 30 espécies para as gimnospérmicas, apesar de para a maioria delas continuar a serem ainda necessários muitos ajustamentos dos diferentes factores intervenientes, por forma a ser possível a sua aplicação em termos comerciais.

Em relação às duas primeiras metodologias referidas, organogénese via rebentamento axilar ou adventício, as maiores dificuldades que se levantam à sua divulgação e concretização tem a ver com a própria manipulação *in vitro* dos explants, que são obtidos de árvores adultas, logo com problemas de juvenilidade/maturidade, com a libertação frequente de substâncias de natureza fenólica a que anteriormente já nos referimos, bem como com a relativa limitação nas taxas de multiplicação que traz implicações ao nível dos custos de produção. Assim, surge mais uma vez a embriogénese somática como metodologia verdadeiramente alternativa e possível de solucionar as dificuldades já referidas para os outros métodos. De facto, as suas vantagens são múltiplas, tais como, ausência de uma fase de indução e desenvolvimento de um sistema radicular taxas de multiplicação incomparavelmente superiores, relembremos a possibilidade de utilização de biorreactores, em que uma célula embriogénica origina uma planta, constitui um verdadeiro sistema de rejuvenescimento o seu armazenamento é altamente simplificado, permite pensar no desenvolvimento de sementes somáticas artificiais para além destas suspensões celulares servirem para sistemas de obtenção de protoplastos que têm utilização directa na aplicação de técnicas de engenharia genética, já que se há grupo de plantas em que mais urgente se torna a redução de tempo necessário para qualquer programa de melhoramento ele é o das lenhosas florestais. E apesar de um cada vez maior número de espécies ser possível de propagar por este método, no entanto e mais uma vez, estas metodologias de embriogénese somática continuam ainda muito ao nível dos laboratórios de investigação. Um dos principais problemas prende-se com a viabilidade dos embriões somáticos obtidos. Por exemplo em *Picea abies*, estima-se que menos de 1% dos embriões induzidos se desenvolvem em plantas completas (Becwar *et al.*, 1989). Contudo o potencial existe, uma vez que os investigadores estimam uma média de 700 embriões por grama de *callus*, o que de facto falta é aumentar esta taxa de viabilidade.

Importantes são também os estudos acerca das performances das árvores no campo. Os dados disponíveis

permitem afirmar que, regra geral, as plantas micropropagadas se apresentam com valores superiores nos parâmetros de avaliação comparativamente a plantas provenientes de sementes (McCown e McCown, 1987), isto para as angiospérmicas, já que para as gimnospérmicas só nos últimos cinco anos se iniciaram estudos comparativos. Em geral, características como a sobrevivência, taxa de crescimento, plagiotropismo e susceptibilidade a doenças têm uma correlação muito directa com a qualidade do rebento-regenerado *in vitro*. Um problema crucial tem sido a qualidade dos sistemas radiculares entre as microplantas e as provenientes de semente e, apesar de se registarem algumas diferenças quantitativas em termos morfológicos (McClelland *et al.*, 1990), cálculos efectuados em função da área radicular, não mostraram diferenças no que diz respeito à absorção de azoto e fósforo (McKeand e Allen, 1984). Também a translocação de  $^{32}\text{P}$  e  $^{86}\text{Rb}$  é semelhante em microplantas e plantas seminais de *Thuja occidentalis* (Bender *et al.*, 1987).

Outro aspecto importante, e que começa a assumir uma cada vez maior importância em termos comerciais, tem a ver com a produção de pés mãe micropropagados de génotipos "plus", para a posterior obtenção de material vegetativo para propagação por estacaria, estacas estas que se tornam, assim, disponíveis em número significativamente maior, como também apresentam uma muito maior aptidão para a rizogénese.

Resulta de tudo isto que apesar das dificuldades ainda existentes, é inquestionável a importância progressiva que as técnicas de micropropagação têm vindo a assumir no campo florestal. Esta importância é condicionada por factores comerciais e de oportunidade quer a curto prazo quer a médio prazo. A curto prazo a sua aplicação deverá estender-se à multiplicação de génotipos superiores, seleccionados pela qualidade da madeira, de resistência a doenças e a poluentes, tolerância à seca e à geada, quer para plantação directa quer para a produção de plantas mãe, bem como de espécies raras ou ameaçadas de extinção, em que o problema dos custos é amplamente justificado. A médio prazo, a sua aplicação a espécies em que os custos não sejam explicitamente justificados, irá certamente depender do desenvolvimento que os métodos de embriogénese somática vierem a apresentar.

Espécies como o choupo, cerejeira brava, pau-brasil, eucalipto, pinheiro radiata, pseudotsuga, entre outras, são hoje já comercialmente propagadas em muitos laboratórios, estando para breve a comercialização de outras espécies. E de facto os mercados para madeira e derivados estão em franca expansão, o que irá permitir investimentos para a rentabilização dos métodos de micropropagação. Nas angiospérmicas, espécies como o carvalho, nogueira, cerejeira e castanheiro, apresentam-se como essências economicamente viáveis, enquanto que o mercado de papel, de pasta e de madeira a partir de gimnospérmicas está em franco crescimento. Além do mais, no futuro, as intervenções silvícolas serão vistas cada vez mais numa perspectiva de cultura intensiva, diferindo no entanto no que diz

respeito ao período de rotação e à natureza do produto final. Este aspecto, regime intensivo, só será possível através da utilização de árvores superiores e aqui, a aplicação de biotecnologias de melhoramento e propagação terá, sem margem para dúvidas, um papel primordial.

## 9. Custos da micropropagação

Tal como qualquer outra actividade económica, a multiplicação de plantas por cultura de tecidos a nível comercial tem, como objectivo principal, a obtenção de lucro. Dependente do tipo de empresa, esse lucro poderá ser realizado logo à saída do material vegetal do laboratório, ou então após a sua aclimatização em estufa. E este aspecto é, por si só, determinante nas estratégias comerciais, já que no segundo caso, por exemplo, as preocupações de rentabilidade do produto nas fases intermédias não existem, embora contribuam. Em qualquer dos casos admitem-se quatro pontos como fundamentais, na estratégia de qualquer empresa:

- i) financiamento;
- ii) conhecimento do mercado e condições de acesso;
- iii) investigação e desenvolvimento;
- iv) gestão da produção.

i) **Financiamento.** Na maioria dos casos, a utilização de plantas obtidas *in vitro* está integrada em muitos ramos de negócios hortícolas em sentido lato, e assume tais proporções e competição, que apesar de recentes, só empresas com uma gestão verdadeiramente eficaz vão conseguir sobreviver. Em termos de investimento, importância cada vez maior está a ser dada aos gestores e, em termos de investimento inicial de infraestruturas e equipamentos apontam-se valores de 26 a 39 mil contos, capital este que deverá duplicar nos 5 anos seguintes, daí a importância das condições de financiamento e de gestão, sendo cada vez mais aconselhável que nestas sociedades estejam também envolvidos investidores com conhecimentos na área agrícola e ou biotecnológica.

ii) **Conhecimento do mercado e condições de acesso.** A produção laboratorial deverá constar de um número de espécies e cultivares que sejam consumidas em larga escala e a um preço competitivo. Questões relevantes nesta área são: Quem produz? Como se desenvolvem as plantas nas diferentes fases? Quais os problemas fitossanitários? Regulamento de patentes? Que cultivares podem substituir outras, caso surjam dificuldades? Poderão as plantas obtidas *in vitro* abrir um novo mercado para determinada cultivar? (Outra estação, outro tamanho, menor intervenção, melhores crescimentos, nova apresentação, ...). A possibilidade rápida de resposta a estas e outras questões poderá ser importante no desempenho de qualquer empresa.



iii) **Investigação e desenvolvimento.** Por investigação em laboratórios comerciais entende-se o desenvolvimento quer de aspectos técnico-fisiológicos, como sejam definição de meios de crescimento, métodos de manipulação, condições de crescimento, etc., quer de aspectos relacionados com o planeamento da produção, como sejam cálculos de custos e definição de estratégias para a sua redução, bem como o controle de todos os problemas que vão surgindo durante o decorrer da produção, tais como variações aos resultados esperados, aparecimento de alterações fisiológicas, contaminações etc., ficando de fora, como seria de esperar, a investigação fundamental. Isto não deve, no entanto, significar que a equipa responsável não deva estar bem informada acerca das novas descobertas e isto a um nível para além da simples leitura de publicações científicas, como sejam as participações em congressos, simpósios e colaboração com instituições de investigação.

iv) **Gestão da produção.** Actualmente, a maioria dos laboratórios comerciais produz herbáceas, ornamentais e porta-enxertos, tendo estes grupos de plantas uma significativa importância económica que já foi anteriormente referida. E a gestão desta produção deve ser encarada com base nos conhecimentos do mercado, bem como no perfeito conhecimento das capacidades de produção da empresa e das espécies a trabalhar. É isto porque o desenvolvimento destes sistemas de multiplicação requer a intervenção de vários operadores nas diferentes fases de execução, de meios, de esterilização, de manipulação do material vegetal, para além do conhecimento que se deve ter ao nível das densidades nos frascos de cultura, das condições nas câmaras de crescimento e de todo o processo de aclimatização. É facilmente se compreende a importância destes aspectos se apresentarmos como simples exemplo a preparação dos meios de cultura. Se um operador para preparar 10 litros de meio leva 1 hora, é evidente que a preparação de 20 litros não vai levar 2 horas e no entanto essa quantidade irá permitir multiplicar o dobro de plantas que, evidentemente, deverão ter mercado assegurado.

Considerando que tem sido o elevado custo das plantas obtidas por sistemas *in vitro*, o principal factor condicionante da sua expansão a nível comercial, é compreensível que se venha a registar um forte incremento no desenvolvimento de metodologias e procedimentos que permitam uma acentuada redução desses custos. Estes esforços têm-se centrado na possibilidade de reduzir a componente mão-de-obra, uma vez que ela é responsável por 60 a 85% dos custos totais de produção com maior significado na fase de multiplicação, que deve ser ainda acrescida dos custos de preparação, esterilização e distribuição dos meios de cultura. A redução de custos nesta fase só será possível ou com acréscimos nas taxas de multiplicação ou com a automatização no processo de divisão das culturas. Em relação ao

primeiro aspecto, a manipulação dos suplementos hormonais nos meios de cultura tem-se mostrado bastante limitada, motivo pelo qual se dá hoje mais importância à possibilidade de culturas contínuas, através da substituição automatizada de meio líquido (Tisserat e Vandercook, 1985) e ao controle dos gases ambientais (Kozai *et al.*, 1987), por forma a permitirem a micropropagação sob condições fotoautotróficas, isto é, onde todos os compostos carbonatados sejam derivados da fixação do CO<sub>2</sub> (Kozai, 1991), contrariamente ao que acontece nos actuais sistemas em que eles são obtidos a partir da sacarose adicionada ao meio. Com base nestes princípios, novos equipamentos têm vindo a ser desenvolvidos, como por exemplo o "Mistifier" (Weathers e Giles, 1987), o "Mega-Yield System" de Farrel (1987) e o "Phytocultor System" (Boxus e Pacques, 1987), apresentados na Hortimation Exhibition, Tóquio, em 1988. O segundo aspecto prende-se com o desenvolvimento da robótica. Um destes primeiros protótipos foi desenvolvido em França, por Deleplanque e colaboradores em 1985, o qual podia detectar e transferir plantas de eucalipto. Teoricamente tinha capacidade para transferir 1000 plantas/hora, cerca de 3,6 s/planta, embora não haja publicação de registos na prática. Posteriormente, consideráveis progressos foram conseguidos por um robot construído pela Toshiba Corporation (Fujita, 1989), que permite a detecção, corte e transferência do segmento nodal, num tempo de cerca de 10 s. É provável que a aplicação destes equipamentos e mesmo o aumento das suas performances estejam em franco progresso, mas a informação disponível é muito escassa e vaga, já que estão envolvidos direitos de patentes e de extrema confidencialidade o que é comum a todas as tecnologias de ponta.

Um promissor futuro parece ser a automatização de todo o processo de micropropagação por embriogénese somática. Como já se referiu, a manipulação das suspensões de células ou de propágulos embriogénicos, pode ser processada por biorreactores, restando otimizar a fase de transplante ou de fabrico de sementes somáticas embrionárias.

Finalmente, na fase de aclimatização das plantas regeneradas *in vitro*, a redução de custos está intimamente relacionada com os progressos que estão a ser obtidos no âmbito da mecanização das empresas produtoras de plantas em estufa, bem como na sua colocação no mercado e que podem ser adaptadas para a manipulação das plantas micropropagadas.

## 10. Nota final

Resulta de tudo o que foi dito que continua a existir um longo caminho a percorrer, para que a aplicação de modernas tecnologias à multiplicação de plantas possa ser largamente divulgada. Este sucesso está directamente dependente da investigação quer ao nível dos factores envolvidos no controlo dos diferentes sistemas de micropropagação, quer ao nível

do melhoramento das espécies vegetais. E, neste campo, que requer significativos investimentos, tempo e tecnologia de ponta, tornam-se ainda necessários muitos estudos ao nível da fisiologia do desenvolvimento das plantas bem como do respectivo controlo molecular.

A concretização destes objectivos torna-se cada vez mais importante se tivermos em consideração que as previsões de acréscimos demográficos para o nosso planeta apontam para uma quase duplicação nos próximos 60 anos, com particular incidência nos chamados países do terceiro mundo, onde se prevê como necessários aumentos da produção na ordem dos 30%.

A produção de alimento, a redução global dos agentes poluentes e a recuperação da integridade do planeta apresentam-se, assim, como os maiores desafios neste quase início do terceiro milénio.

É inquestionável o importante papel que a biotecnologia vegetal deverá desempenhar na resolução de muitos destes problemas, permitindo a obtenção de mais e melhor alimento, contribuindo para a diminuição de poluentes, através da eliminação ou drástica redução da aplicação de pesticidas, herbicidas e fertilizantes, contribuindo para o melhoramento global do ambiente e diminuição do efeito de estufa que deverá resultar de uma reflorestação global em larga escala. E tudo isto para que se não comprometa o direito a uma vivência feliz e saudável por parte das gerações presentes e futuras.

## Referências bibliográficas

- Becwar, M. R.; Noland, T. L.; Wyckoff, J. L. (1989) Maturation, germination and conversion of Norway spruce (*Picea abies* L.) somatic embryos to plants. *In Vitro Cell Dev. Biol.*, 25:575-580.
- Bender, L.; Harry, I. S.; Yeung, E. L.; Thorpe, T. A. (1987) Root histology and nutrition uptake and translocation in culture tissue plantlets and seedlings of *Thuja occidentalis* L. *Trees*, 1:232-237.
- Boxus, P.; Paques, M. (1987) Propagation of woody plants in a culture medium containing hydrolyzed agar to prevent vitrification. Belgian Patent, nº 904661.
- Deleplanque, H.; Bonnet, P.; Portaire, J. P. G. (1985) An intelligent robotic system for *in vitro* plantlet production. *Rovisec*, 5:305-314.
- Farrel, M. A. (1987) Liquid medium system for plant micropropagation. In: Hoet Hennessy (Ed.) *Electronics and Management of Plants*, Paris, 32.
- Fujita, N. (1989) Application of robotics to mass propagation system. *In Vitro Cell Dev. Biol.*, 2:22-47.
- Gautheret, R. J. (1940) Recherches sur le bourgeonnement du tissu cambial d'*Ulmus campestris* cultivé *in vitro*. *C. R. Acad. Sci. Paris*, 210:632-634.
- Greenwood, M. S. (1986) Rejuvenation of forest trees. *Plant Growth Regulation* 6:1-12.
- Kleinschmit, J. (1974) A programme for large-scale cutting propagation of Norway spruce. *NZ. J. For. Sci.*, 4:359-366.
- Kozai, T.; Hayashi, M.; Hirose, Y.; Kodama, T.; Watanabe, I. (1987) Development of the acclimatization unit for accelerating the plantlet growth and the test cultivation. *J. Agric. Meteorol.*, 42:349-359.
- Kozai, T. (1991) Micropropagation under photoautotrophic conditions. In: P. C. Debergh; Zimmermen, R. H. (Eds.) *Micropropagation* (pp 447-469) Kluwer Acad. Pub.
- Kurl, W. R.; Worley, J. F. (1977) Formation of adventitious embryos in *callus* cultures of "Seyval", a french hybrid grape. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 102:360-363.
- McClelland, M. T.; Smith, M. A. L.; Carothers, Z. B. (1990) The effects of *in vitro* and *ex vitro* rooting initiation on subsequent microcutting root quality in three woody plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 23:115-123.
- McCown, D. D.; McCown, B. H. (1987) North American hardwoods. In: Bonga, J. M.; Durzan, D. J. (Eds.) *Cell and Tissue Culture in Forestry*, Vol. 3 (pp.247-260). Martinus Nijhoff, Dordrecht.
- McKeand, S. E.; Allen, H. L. (1984) Nutritional and root development factors affecting growth of tissue culture plantlets of loblolly pine. *Physiol. Plant.*, 61:523-528.
- Pierik, R. L. M. (1991) Commercial micropropagation in Western Europe and Israel. In: P. C. Debergh; Zimmermen, R. H. (Eds.) *Micropropagation* (pp 155-165) Kluwer Acad. Pub.
- Sommer, H.E.; Brown, C.L.; Kormanik, P.P. (1975). Differentiation of plantlets in longleaf pines (*Pinus palustris* Mill) tissue cultured *in vitro*. *Bot. Gaz.*, 136: 196-200
- Tisserat, B.; Vandercook, C. E. (1985) Development of an automated plant culture system. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 5:107-117.
- Tulcke, W.; McGranaham, G. (1985) Somatic embryogenesis and plant regeneration from cotyledons of walnut, *Juglans regia* L.. *Plant Sci.*, 40:57-63.
- Weathers, P. J.; Gilcs, K. (1987) A novel method of *in vitro* culture adaptable to many varieties of plants. In: Hoet Hennessy (Ed.) *Electronics and Management of Plants*. Paris, 45.
- Webster, A. D.; Oehl, V. D.; Jackson, J. E.; Jones, O. P. (1985) The orchard establishment, growth and precocity of four micropropagated apple scion cultivars. *J. Hort. Sci.*, 60:169-180.
- Winton, L. L. (1970) Shoot and tree production from aspen cultures. *Amer. J. Bot.*, 57:904-909.

\* Biólogo, Prof. Adjunto da ESACB

\*\* Eng<sup>o</sup> Mult. Plantas. Técnica da ESACB

# Uso da palha para fins energéticos

José Nunes \*  
Bohumil Havrland \*\*  
Daniel Procházka \*\*\*



## 1. Introdução

A aplicação dos processos de conversão termoquímica (combustão, gaseificação e pirólise) da biomassa para a produção de energia a partir de recursos biomássicos, apresenta-se actualmente do ponto de vista técnico e económico bastante interessante.

Destes processos, para a combustão directa e a gaseificação com ar, dispõe-se de tecnologias em comercialização pelo sector industrial, enquanto que, para a produção de gás de médio poder calorífico (gaseificação com oxigénio ou vapor), o desenvolvimento atingiu a fase de demonstração.

No que respeita à obtenção de combustíveis líquidos pelo processo de pirólise, este apresenta-se com potencialidades de mercado mas necessita ainda de mais investigação e de uma maior dinamização e valorização dos combustíveis obtidos.

A valorização da biomassa como fonte de energia através de processos termoquímicos é também atractiva do ponto de vista ambiental, uma vez que os combustíveis alternativos produzidos não contêm enxofre nem azoto, minimizando assim os níveis de emissões de  $SO_2$  e  $NO_x$ . Além disso é possível consumir quantidades significativas de hidrocarbonetos sem aumento significativo de  $CO_2$  em termos de balanço no ciclo do carbono,

minimizando assim também o impacto em termos de efeito de estufa (LNETI, 1994).

Do ponto de vista histórico, ainda não há muito tempo que a actividade agrícola assegurava todas as necessidades energéticas exclusivamente pelos seus próprios recursos. Estima-se que 30 a 40 % da terra agrícola era utilizada para cobrir as necessidades da energia para tracção, mão-de-obra e aquecimento das casas.

Desde o fim da 2ª Guerra Mundial até 1973, ano da 1ª crise petrolífera, o combustível mais utilizado foi o thich-fuel-oil e só nos casos em que existiam, numa indústria, resíduos lenhosos resultantes do processo fabril, é que se utilizavam esses resíduos como combustível.

O excesso da produção de produtos alimentares à escala mundial ou regional, em conjunto com o peso excessivo para a economia nacional representado pelas importações de energia leva à necessidade de repensar os sistemas tradicionais de aprovisionamento de energia ao mais alto nível: neste caso, a agricultura pode funcionar como um produtor activo e efectivo da energia para a economia nacional. Quando se atingir este objectivo, o sector agrícola ganha emprego (postos de trabalho) e meios financeiros que tem perdido pelo decréscimo das vendas como produtor de alimentos.

Atendendo ao estado actual de desenvolvimento da tecnologia utilizada para a gaseificação de biomassa e apresentado-se a palha como um produto (combustível)

abundante e subaproveitado, pareceu-nos ser interessante efectuar um conjunto de ensaios utilizando esta tecnologia para a realização da sua valorização energética.

São pois as principais conclusões desses ensaios experimentais que apresentamos neste trabalho.

## 2. Aproveitamento actual da biomassa

No que toca à biomassa, Portugal, apresenta recursos interessantes pois uma quantidade muito elevada de resíduos, provenientes das diferentes operações silvícolas nas várias espécies que compõem o património florestal, encontra-se anualmente disponível.

Através de um estudo realizado em 1985, o potencial de resíduos da floresta disponível em Portugal para fins energéticos, foi estimado em 3.3 milhões de toneladas verdes anuais (cerca de 1.8 milhões de toneladas secas), (A.D.LITTLE, 1985). Estes resíduos disponíveis representam um potencial energético de 0.865 Mtcp (tomando para poder calorífico da madeira seca o valor de 4300 kcal/Kg).

Este quantitativo de energia representa, relativamente aos consumos de 1992, cerca de:

- 5% da energia importada;
- 6.6% do petróleo importado;
- 7.3 % da energia final utilizada;
- 21 % da energia consumida na indústria para fins energéticos.

Estes valores dizem respeito apenas à biomassa constituída por resíduos florestais e resíduos provenientes da indústria de transformação da madeira.

Para além destes resíduos é também de considerar a contribuição em termos energéticos, que poderá resultar do aproveitamento da designada biomassa agrícola. Esta é constituída, quer por resíduos provenientes da agricultura, quer por resíduos resultantes de processos ligados à actividade agro-industrial, como sejam: cascas de amêndoa, noz, arroz, uva, bagaço de azeitona, palha, etc., os quais podem ser utilizados localmente pelas indústrias geradoras na produção da sua própria energia. No entanto, alguns dos problemas que se colocam com

a utilização para fins energéticos da biomassa em geral, tais como, elevados conteúdos em humidade e baixa densidade, poderão ser agravados com alguns dos resíduos agrícolas acima referidos, implicando custos e gastos de energia adicionais, quer na secagem, quer nos sistemas de transporte e alimentação.

O principal aspecto económico da viabilidade de utilização destes combustíveis é, indiscutivelmente, o desconhecimento do grau de elasticidade do seu preço em relação a um aumento da procura. Esta elasticidade deve ser verificada localmente, já que o custo do transporte limita o raio económico de recolha.

Apesar do contínuo aumento do número de utilizadores deste tipo de combustível, observado nos últimos anos, o preço actual do KJ obtido a partir de resíduos vegetais é francamente inferior ao resultante do fuelóleo (após as correções necessárias para os tornar comparáveis), tendo, geralmente, os investimentos necessários a esta substituição, períodos de amortização de cerca de 1 ano.

O principal aproveitamento da biomassa está orientado para a transformação e/ou combustão de resíduos lenhosos. O seu efeito é, em todos os sentidos (energético, económico e ecológico) incontestável, apesar de algumas formas não terem sido reconhecidas e dinamizadas até agora.

Segundo dados do Instituto de Maquinaria Agrícola (PRAGA 6 - REPY, Eng<sup>o</sup>. Sladky) naquele País, uma parte da palha (cerca de 15 - 20 %) pode ser conduzida para fora da agricultura. Pela venda desta quantidade de palha seria possível cobrir parte das perdas que a agricultura sofre em consequência do excesso da produção de alimentos.

A perspectiva do aproveitamento da palha para fins energéticos é apoiada pelo nível tecnológico crescente do equipamento que pode ser utilizado na colheita e armazenamento da biomassa: máquinas de colheita automotrizes de alta capacidade e equipamento de combustão com elevada eficiência e um nível de emissões aceitável, equipadas com aparelhos de dosagem automática.

## 3. Avaliação da biomassa como recurso energético

A transformação energética mais apropriada do ponto de vista técnico depende, fundamentalmente, das características da biomassa: a sua percentagem

Tabela 1 - Transformação energética de diversos produtos

Tipos de biomassa	H <sub>2</sub> O (%)	C/N	Processos de transformação
Plantas e resíduos lenhosos	< 35	—	Termoquímicos
Plantas e resíduos com elevado conteúdo lenhoso	—	> 30	Termoquímicos
Plantas e resíduos celulósicos	> 35	—	Fermentação alcoólica
Plantas e resíduos com elevado conteúdo de açúcar	15-90	—	Fermentação alcoólica
Plantas e resíduos para fermentação	> 35	20-30	Digestão anaeróbica
Resíduos de origem animal	70 - 90	20-30	Digestão anaeróbica

(Segundo FAO 22/80)

em água e a sua relação carbono/nitrogénio (C/N). Como se pode observar na Tab. 1, para se aplicar os processos de transformação termoquímica, os requisitos mais importantes são uma alta relação C/N e uma baixa percentagem de teor de humidade, o que se verifica tanto na lenha como na palha.

A energia produzida a partir da biomassa (por combustão ou gaseificação) é uma das mais eficientes (tecnológica e economicamente) formas das energias renováveis, quando comparada com a energia SOLAR, EÓLICA, HIDRÁULICA e GEOTÉRMICA. Devemos também tomar em conta a facilidade relativa do seu armazenamento o que, na maioria dos casos, não é possível. O poder calorífico superior da biomassa (palha) em condições normais, oscila entre 17 a 18 MJ/Kg - valor este bastante interessante para a realização da sua valorização energética.

Uma forma interessante para análise do potencial energético da palha é a sua comparação com o combustível fóssil mais utilizado - o fuelóleo. Em condições normais, 3 Kg de palha correspondem a 1 Kg de fuelóleo o que leva a concluir que cerca de 306 Kg de palha produzem aproximadamente 1 MWh, admitindo uma eficiência média das instalações térmicas da ordem dos 85 % (Gundtoft, S., 1990).

#### **4. Possibilidades de aproveitamento energético da palha de colza**

A palha de colza é considerada como resíduo de baixo valor fertilizante pelo que não se utiliza nas camas dos animais nem se incorpora no solo. As práticas de liquidação ou transformação utilizadas até agora, nem sempre são convenientes do ponto de vista fitossanitário.

Os rendimentos da palha de colza variam entre 3 e 6 t/ha - em função da tecnologia de colheita e da variedade. Porém, o rendimento próprio da parte aérea da planta sem grão é maior, sendo fundamentalmente reduzido pela altura de corte da ceifeira-debulhadora.

A colza é uma das plantas que apresenta mais perspectivas de uso universal. É certo que a área cultivada vai crescer num futuro próximo tendo em conta o acréscimo de produção dos óleos vegetais, bio-combustíveis e bio-lubrificantes. Podemos então contar com um acréscimo na produção de palha de colza o que implica a necessidade de um aproveitamento razoável.

Há mais razões para confirmar que o aproveitamento da palha de colza como combustível pode ser o mais adequado. O papel importante que representam as necessidades energéticas da agricultura e o facto de já estar bem desenvolvida a sua tecnologia: colheita, transporte e armazenamento. Esperam-se algumas dificuldades com o processo da sua queima assim como na própria organização da linha tecnológica.

Neste contexto é extremamente importante uma característica favorável que a palha de colza apresenta: é possível reduzir rapidamente a sua humidade (em 2 dias de secagem apresenta um valor inferior a 20%) o que reduz os custos da sua produção, transporte e armazenamento. Em vista da transformação da produção agrícola e das restrições à produção animal, espera-se que uma parte da capacidade de armazenamento que tem sido ocupada pelo feno fique disponível para armazenar a palha energética. Portanto, não será necessário fazer investimentos para o armazenamento. O arranjo ou transformação da palha (produção de briquetes) pode ser feito com equipamento simples com um investimento de capital e custos operacionais baixos.

Pode-se então, esperar que algumas empresas agrícolas com área suficiente, sejam capazes, a partir de uma maior área semeada de colza, de assegurar a maioria do seu consumo de energia e ainda de contribuir positivamente para o balanço energético da região ou do país.

Até agora, tem havido alguns problemas com o uso energético da palha de colza, nomeadamente:

- a tecnologia ainda não se tornou completa quanto ao equipamento necessário;
- limitações à poluição do ambiente que, nalguns casos, são ultrapassados (teor de cinza nas emissões no caso de fornos sem separadores);
- escassez dos equipamentos adequados de combustão;
- alto risco de incêndios na biomassa armazenada;
- elevado consumo de mão-de-obra (no caso de equipamento não automatizado).

#### **5. Processo de queima e constituição do espaço de combustão**

A combustão directa da biomassa é a técnica de valorização energética mais generalizada. Fundamentalmente, ela processa-se em três fases: (i) secagem; (ii) libertação de matérias voláteis e sua combustão; (iii) combustão do carbono fixo (Juanico, 1989).

Para a realização da combustão têm sido utilizadas fornalhas equipadas com grelhas inclinadas fixas, quando se trata de combustível com certa dimensão, grelhas planas com alimentação inferior por parafuso sem-fim para combustíveis granulados e, finalmente sistemas de injeção de pó, em suspensão, com ou sem grelha fixa plana ou inclinada, sistema este ainda pouco utilizado (Nunes, 1993).

A esmagadora maioria dos fabricantes, tendo por intenção assegurar para os seus produtos alta fiabilidade e rendimento, baixo nível de emissões poluentes e reduzida formação de condensados, prescreve para os seus produtos, combustíveis de baixo teor de humidade. Claro que manter um baixo teor de humidade é mais

diffícil no caso de massa lenhosa do que na palha. Porém, em ambos os casos, é necessário armazenamento sob coberto com possibilidades de arejamento (Nunes, 1991).

Uma propriedade importante dos combustíveis produzidos a partir de biomassa é a elevada percentagem de compostos que se gaseificam a temperaturas compreendidas entre 100 e 200° C. No material lenhoso essa percentagem é superior a 70 %, enquanto que na palha ultrapassa os 80 %. Isto significa que estas matérias ardem com chamas de alguns metros de comprimento (as chamas produzidas pelo coque só têm alguns centímetros).

O facto acima mencionado tem um papel importante para a construção dos espaços de combustão, pois estes devem ter maiores dimensões e as suas superfícies de transmissão do calor devem ficar no lugar que normalmente é atingido pela extremidade da chama - caso contrário criam-se fuligens e ocorre a carbonização dessas superfícies. Um dos inconvenientes dos combustíveis de biomassa (em comparação com os fósseis) é que eles são exigentes quanto à sua alimentação assim como à regulação da potência. Resolve-se este problema fazendo o equipamento trabalhar em regime óptimo durante o tempo indispensável para produzir uma quantidade de calor necessária que pode ser armazenada num acumulador - recipiente com água quente de capacidade conveniente.

Como requisitos importantes para o equipamento de combustão da palha destacam-se:

- a sua operação deve ser simples possibilitando uma alimentação segura sem ignições reversas e explosões espontâneas;
- fácil remoção da cinza, manutenção simples e fácil;
- alto rendimento de combustão (95 - 100 %) e de transmissão da energia para o fluído (70 - 80%, no futuro ainda mais);
- alta qualidade de combustão com um teor mínimo de emissões nocivas nos gases de combustão (CO, hidrocarbonetos aromáticos, NO<sub>x</sub>) assim como a queima completa dos gases combustíveis e o tempo suficiente de contacto dos gases de combustão com as superfícies de transmissão de calor;
- longevidade suficiente.

## **6. Processo de gaseificação. Aplicação ao caso da palha**

A gaseificação consiste na transformação da biomassa em gases, com baixo e médio valor energético. Trata-se de um processo, onde uma reacção em presença de um agente oxidante, realizada em fases sucessivas consoante a temperatura aumenta, conduz em primeiro lugar, a uma pirólise entre os 300-500°C, com libertação de matérias voláteis e formação de carvão, seguida da fase de reacção gasosa dos voláteis a cerca de 600°C e gaseificação final, a 700°C, do carvão.

Os processos de gaseificação são vários e ocorrem em geradores cuja tecnologia tem evoluído bastante nos últimos tempos.

De entre os processos de valorização energética o que melhor eficácia tem apresentado, quando se trata de utilizar a palha, é a gaseificação. Para a realização da combustão directa é necessário um grande espaço de combustão o que obriga os sistemas de queima a apresentarem enormes dimensões e consequentemente a serem bastante caros.

Deste modo, dadas as vantagens comparativas da tecnologia de gaseificação em relação à tecnologia de combustão realizámos uma série de ensaios experimentais utilizando alguns tipos de geradores de gaseificação, com a finalidade de definir e testar a eficiência e a qualidade de produção do gás a partir de palha.

Por existir uma grande variedade de tecnologias utilizadas no processo de gaseificação foi nosso propósito utilizar aquelas que à partida se nos apresentaram mais adequadas e que na República Checa têm já apresentado resultados bastante positivos para outros tipos de biomassa.

Os geradores testados compõem-se de um cilindro de aço que se enche de biomassa. Na parte inferior do gerador entra radialmente, de um lado, o gás para o espaço de combustão juntamente com o ar, enquanto que no lado oposto sai o gás produzido. Uma parte do gás é utilizada para assegurar a pirólise. Na parte inferior do gerador fica o espaço destinado à remoção das cinzas e inqueimados. Um esquema deste tipo de gerador apresenta-se na figura 1- gerador A.

Outro tipo mais complexo, com o fluxo inverso de gás, leva o gás, depois de ter saído do espaço de combustão para a parte superior do gerador. O gás é arrefecido pelo ar que passa por outro canal ao longo de toda a superfície do gerador em sentido inverso para entrar no espaço de combustão, na parte inferior do gerador. Um esquema deste tipo de gerador apresenta-se também na Figura 1- gerador B.

O pré-aquecimento do ar antes deste chegar ao espaço de combustão, bem como outras características relacionadas com o design do gerador B faz com que o rendimento deste gerador suba até 80 % e que as condições de gaseificação da palha sejam melhores.

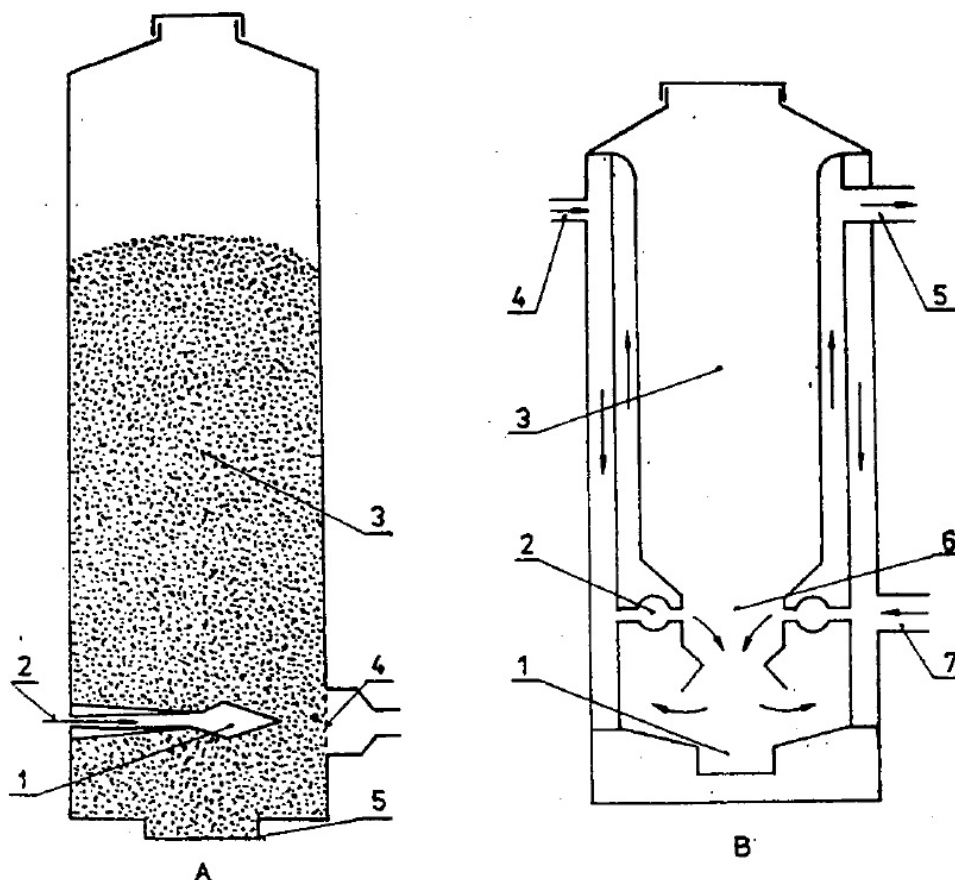
Dos resultados experimentais obtidos após a realização de vários ensaios com estes dois tipos de geradores concluímos:

- 1 - a tecnologia dos geradores utilizados apresenta-se adequada para a realização da gaseificação da palha;
- 2 - o gerador de fluxo inverso apresenta um rendimento mais elevado e uma melhor qualidade do gás produzido;
- 3 - o design do gerador apresenta-se adequado para a realização da gaseificação pelo que se recomenda para fins de produção de gás a partir da palha de colza;
- 4 - os gases combustíveis resultantes deste processo, podem ser armazenados (mas não comprimidos por razões económicas) e utilizados em equipamentos

que se podem localizar em lugares distintos dos locais de produção;

5 - os gases obtidos podem ser utilizados na indústria, substituindo os combustíveis derivados do petróleo,

para aquecimento doméstico, para queima em turbina a gás para a produção de energia eléctrica e queima em motores de combustão interna para a produção de energia eléctrica ou mecânica.



A: **Gasogénio de tipo GOHIN-POULENC**; 1 - espaço de combustão incompleta, 2 - entrada do ar, 3 - recipiente da biomassa, 4 - saída do gás, 5 - depósito da cinza  
 B: **Gasogénio de fluxo inverso do gás**: 1 - depósito da cinza, 2 - câmara de pré-aquecimento do ar, 3 - recipiente da biomassa, 4 - entrada do ar adicional, 5 - saída do gás, 6 - espaço de combustão incompleta, 7 - entrada principal do ar

**Figura 1** - Gasogénios de produção do gás pobre

## Referências bibliográficas

- A. D. Little (1985) Resíduos florestais para a produção de energia em Portugal. Relatório final. Tecninvest S.A.R.L. Lisboa.
- Gundtoft, S. (1990) Straw as fuel in Denmark. Comunicação apresentada no colóquio "Biomassa para a energia-Equipamentos e Tecnologias disponíveis". Centro da Biomassa para a Energia. Coimbra.
- Juanico, M. (1989) A biomassa como fonte de energia em geradores de calor. Encontro Nacional de Aproveitamento Energético de Resíduos Florestais. Figueira da Foz.
- LNETI, (1994) Biomassa-opção energética. Laboratório Nacional de Engenharia e Tecnologia Industrial. Departamento de Energias Convencionais. Lisboa.

Nunes, J. (1991) Disponibilidades em combustíveis residuais na Região de Castelo Branco. Relatório do Projecto em Energia. Instituto Superior Técnico (IST). Lisboa.

Nunes, J. (1993) Combustão de biomassa em fornalhas ciclone. Tese de Mestrado. Instituto Superior Técnico (IST). Lisboa.

\* Engenheiro Mecânico, Professor Adjunto da ESACB

\*\* Professor Coordenador da ESACB

\*\*\* Estudante Estagiário da UNIVERSIDADE DE PRAGA - REPÚBLICA CHECA

# Enfermedades fungicas de la Abeja

Dr. Juan Manuel Alonso\*



## Ascosferosis

### definición, sinonimia e importancia

Micosis invasiva que afecta a las larvas de los insectos apoideos, causando su muerte y momificación, producida por especies del género *Ascospaera*.

También denominada cría calcárea o pollo escayolado, criação calcificada o simplemente ascosferose, chalkbrood (inglés), couvain platreux (francés).

Su distribución es mundial, aunque es mayor su incidencia en las zonas templadas del planeta. Destaca entre las micosis y las enfermedades apícolas en su conjunto por su **importancia económica**, sobre todo desde mediados de los años 80 en que se constató una mayor gravedad en los brotes:

- **mortalidad de larvas**, pérdida de población, debilitamiento de colonias y predisposición para otras enfermedades.
- **descenso de producción directa** (capacidad pecoreadora, colecta de miel y polen) e **indirecta** (descenso de polinización de cultivos).
- **gastos de lucha** (tratamientos infructuosos, desinfección de material, reposición de material, etc.).

## Etiología

Aunque han sido varias las especies fúngicas que se han asociado a esta enfermedad en la abeja melífera

desde su primera descripción (*Ascospaera major*, *A. proliperda*, *Arrhenosphaera cranei*) lo cierto es que sólo *Ascospaera apis* se aísla reiteradamente en brotes de campo. Así lo demuestra, en el caso de España, el estudio que realizamos para nuestra Tesis Doctoral sobre 47 brotes de la enfermedad con muestras procedentes de 11 Comunidades Autónomas.

*A. apis* es una especie fúngica con **dimorfismo sexual**, cuyo micelio masculino y femenino se conjugan originando estructuras reproductivas denominadas ascocistos. En el interior de éstos, se encuentran las ascas o aglomerados de esporas. Cuando se rompe la pared de los ascocistos se liberan numerosas esporas, que en las adecuadas condiciones de humedad y temperatura (en torno a 30°C) gemnaran produciendo nuevo micelio de uno u otro signo.

Las **ascosporas** representan la **forma de resistencia** en el medio ambiente (a pH, temperatura, desecación, presión osmótica y desinfectantes) y la forma infectante, es decir, la que penetrará en las larvas por ingestión. sin embargo, una vez que estas esporas germinen en el tubo digestivo de las larvas, será el **micelio** que de ellas se origine el que propiamente desarrollará la **acción patógena invasiva**

Este ciclo sucesivo de micelio-ascosporas-micelio se puede reproducir en el laboratorio sobre medios de cultivo artificiales (Agar Sabouraud, Agar malta, Agar PDA y sobre todo en el Agar MY20) y será la base para un diagnóstico específico de la enfermedad.



## Epidemiología

Ahora bien, ¿ es suficiente la presencia de este hongo para que la enfermedad se desencadene en una colmena? Debemos afirmar tajantemente que no. En estudios realizados por varios equipos de investigación, incluido el nuestro, se ha comprobado que el hongo puede estar presente en las colmenas sin que ello signifique que esté enferma o que se vaya a producir un brote de la enfermedad. Sería un estado de infección latente o portador. Es por tanto necesario para que la enfermedad se presente cierto grado de acumulación de material infectante en las colmenas, como ha comprobado el equipo del Dr. Puerta.

¿ Dónde persiste el hongo cuando la enfermedad no está presente? Son numerosos los reservorios que se han citado, pero destacan el propio intestino de las abejas adultas, el material apícola, y las reservas de miel y polen.

Pero además, esto nos lleva a la idea del carácter factorial de la enfermedad. Es necesario que concurren diversos factores predisponentes y desencadenantes para que la presencia del hongo se traduzca en enfermedad. En esencia se trata de todas aquellas causas que debilitan la colmena en su población y manco por una parte, y que favorecen la proliferación del hongo por otra. Un análisis pormenorizado de estos factores predisponentes sería prolijo, pero en resumen podemos citar:

- **genéticos:** heredabilidad de predisposición, conducta higiénica (evita la acumulación de material contaminante).
- **Otras enfermedades (debilidad).** Destacan las intoxicaciones por pesticidas-insecticidas (p.ej. diflubenzurón), que bien podrían intervenir como intoxicaciones agudas ( descenso brusco de población, cría mal atendida), bien como intoxicaciones crónicas (acción sobre la cría con alargamiento del ciclo biológico, favoreciendo el desarrollo del hongo).
- **climáticos y microambiente** (temperatura: enfriamiento de la cría, óptimos para el hongo; humedad elevada). Coincide con cierta estacionalidad - primavera y otoño -, también influida por la presencia de cría.
- **nutricionales:** escasez de alimentos, cualitativa y cuantitativa.
- **manejo:** excesiva extracción de polen, gran producción de enjambres, suplementación precoz con azúcares, reinas viejas o mal fecundadas (puesta irregular, zanganeras), cualquier práctica que ocasione desequilibrios entre nodrizas y cría.
- **Abuso en el empleo de antibióticos:** este aspecto no está todavía aclarado por completo, pero podría tratarse de que estos antibióticos eliminaran competidores para el hongo en el tubo digestivo de las larvas.

En ensayos realizados por nosotros hemos observado que la sola presencia de quimioterápicos de uso apícola (tetraciclina, sulfamidas o fumagilina) no favorece el desarrollo del hongo, lo cual apoyaría ese posible mecanismo de competencia citado.

A estos factores habría que añadir todos aquéllos que favorezcan la **transmisión de la enfermedad** entre colmenas infectadas y colmenas libres del hongo. Los mecanismos por los que acontece dicha transmisión son los siguientes:

- 1) Deriva
- 2) Zánganos
- 3) Pillaje (abejas jóvenes)
- 4) Trashumancia de colmenas
- 5) Transacciones comerciales
- 6) El propio apicultor y el utillaje apícola (cepillos, rasquetas, guantes, vestimenta, etc.).

Una vez que la infección se ha introducido en una colmena, los propios mecanismos biológicos que en ella tienen lugar se encargan de diseminarla: alimentación de las larvas por las nodrizas, conducta limpiadora, trofalaxia (conducta social de flujo nutritivo), contacto de larvas sanas con restos de muda contaminados.

## Patogenia

En el desarrollo de la infección y de la enfermedad se pueden diferenciar las siguientes etapas:

- 1 - **infección:** se va a producir por ingestión de esporas con el alimento; se ha intentado reproducir la enfermedad por ingestión de micelio o por vía epicuticular con esporas, pero el resultado no se asemeja a la enfermedad natural.
- 2 - **germinación** de las esporas en el intestino medio de la larva y producción de micelio; esta germinación no suele producirse en los 3 primeros días de vida de la larva, ya que es inhibida por el pH ácido de la jalea real con que son alimentadas.
- 3 - **proliferación del micelio** en intestino medio (mesodeo), atravesando las paredes de éste. El hongo sólo atraviesa las paredes del mesodeo, en tanto que las paredes de las porciones anterior y posterior del intestino, estomodeo y proctodeo respectivamente, no son atravesadas. Esto se asocia al origen embrionario de dichos segmentos, ectodérmico, y por tanto con recubrimiento cuticular quitinoso. Esta fase ha de producirse antes del día 6 de vida de la larva, ya que a partir de este momento el tubo digestivo que estaba cerrado caudalmente al exterior, se abre y se produce la defecación, eliminando así las esporas y el micelio originado de ellas.
- 4 - **invasión de tejidos larvarios y competición por los nutrientes** con la consiguiente muerte de la larva. En esta etapa igualmente se observa que el hongo no penetra las estructuras con recubrimiento quitinoso, como es el caso de las tráqueas.
- 5 - **irrupción del micelio en la superficie de la larva**, tras atravesar la cutícula. Al desecarse los tejidos muertos de la larva, se produce la típica momificación. Las momias pueden mostrar dos típicas apariencias:

momia blanca (micelio de un solo signo, aspecto de algodón) y momia negra (micelio de dos signos, conjugación y formación de ascocistos, de pared oscura).

Esta última etapa nos sugiere la cuestión siguiente: cómo el hongo que suele evitar las estructuras quitinosas -con recubrimiento cuticular- en su invasión de la larva, es capaz de atravesar la estructura más típicamente quitinosa, la propia cutícula? La acción del hongo a este respecto tiene una doble vertiente, enzimática y mecánica, mecanismos que actuarían conjuntamente y que muestran la adaptación del hongo al ciclo biológico de la larva de abeja.

En nuestra Tesis Doctoral incluimos un estudio de las actividades enzimáticas que *Ascosphaera apis* desarrolla encontrando, además de diversas actividades proteolíticas (gelatinasa, caseinolítica, varias aminopeptidasas), sobre carbohidratos (glucogenolítica, amilolítica, celulolítica) y lipolíticas (fosfatasas y estererasas), la presencia en un alto porcentaje de cepas (75%) de actividad acetilglucosaminidásica, capaz de degradar parcialmente la quitina.

## Clinica

Las manifestaciones que observamos en una colmena enferma incluyen:

- Presencia de cadáveres larvarios (momias) en la piquera y en el suelo alrededor de la colonia (detectadas las larvas enfermas o muertas son extraídas por las abejas limpiadoras).
- Disposición dispersa de la cría en los cuadros: cría salteada (común a cualquier alteración/enfermedad de la cría) y operculos roídos por las abejas limpiadoras.
- Posibilidad de oír un sonido característico, de tableteo, al agitar los cuadros.
- Momias en posición vertical dentro de las celidillas, con extremo cefálico dirigido hacia el opérculo, recubiertas de micelio blanco o acompañado de cuerpos fructíferos (ascocistos).

## Diagnostico

El diagnóstico de campo basado en los síntomas antes citados es fácil, si bien cabe la posibilidad de confusión con la aspergilosis, no obstante, mucho menos frecuente. Además es posible, cuando el grado de infección por *Ascosphaera* de la colmena es bajo, que los citados síntomas pasen desapercibidos. De cualquier forma el apicultor suele reconocerla cuando se presenta en su apiario.

El diagnóstico de ascosferosis en el laboratorio es fácil, aunque más complicado es determinar la especie concreta de *Ascosphaera* de que se trata. Ya dijimos

que la que aislamos normalmente es *A. apis*, pero la posibilidad, aunque muy rara, de que intervenga otra no debe descartarse a priori. Para ello se recurre a:

- 1) La observación a la lupa de las larvas afectadas, detectándose las estructuras del hongo, o a más aumentos con montaje entre porta y cubre de raspados de larvas.
- 2) la identificación de la especie de *Ascosphaera* se realiza fundamentalmente por el criterio morfométrico, midiendo al microscopio los diámetros de las estructuras reproductivas, ascocistos y ascas, y la longitud y grosor de las esporas, aunque también puede completarse estudiando al S.E.M. la estructura de la pared de los ascocistos, y tras el cultivo del hongo realizando pruebas de cruzamiento con cepas de especie conocida, dado el carácter heterotálico - existencia de dos signos - ya citado.

## Lucha

A este respecto preferimos el término general de lucha, al más limitado de tratamiento, pues entendemos que aunque en un futuro se pueda disponer de quimioterápicos eficaces y específicos, el control o la eliminación de la enfermedad pasan por la aplicación de otras medidas higiénicas no menos importantes e imprescindibles.

Prueba de que todavía no existe un tratamiento idóneo, es la realización de frecuentes estudios acerca de sensibilidad *in vitro* del hongo frente a quimioterápicos, es decir, en condiciones de laboratorio. En estos estudios varios compuestos han mostrado su eficacia, como el benomilo, vinclozolina, captan, clortalonil y el grupo de los imidazólicos (nilconazol, isoconazol, etc.), pero no se ha extendido su empleo todavía al no haberse completado los estudios en colmenas pobladas (resíduos, toxicidad para adultas y cría, creación de resistencias, etc.) o no haberse mostrado plenamente eficaces como para justificar su empleo.

La lucha debe basarse en medidas de tipo preventivo y de control que persiguen 4 objetivos:

- 1º Evitar la penetración del agente en colonias sanas;
- 2º Incrementar la resistencia de las colmenas a la enfermedad;
- 3º Evitar la acumulación del agente en las colonias;
- 4º Adecuar el manejo para reducir condiciones predisponentes.

En el primer objetivo, la medida básica sería el control sanitario del material apícola y del ganado que adquirimos, así como durante la trashumancia, informándonos del estado sanitario de los colmenares próximos. Es esencial la colaboración entre los distintos productores, al menos en materia sanitaria.

**Resistencia de las colmenas:** como ya indicamos existen diferencias de resistencia entre colmenas, tanto por predisposición genética de la cría, como sobre

todo por la distinta conducta higiénica de las poblaciones de nodrizas. Con esta conducta las abejas eliminan el opérculo de las celdillas en que existen larvas enfermas o muertas, y las extraen de la colonia, con lo que además evitan que las esporas del hongo se acumulen y sirvan de elemento infectante para otras.

Esto nos lleva a que incluso puede producirse una curación espontánea.

En experiencias realizadas por nuestro equipo, se observaron notables diferencias entre colmenas en cuanto a la extracción de larvas muertas (desde 4,8% a 62%). Ello es razón suficiente como para recomendar que la selección de colonias no se haga sólo atendiendo a criterios productivos, sino también a esta capacidad higiénica de las propias abejas y en ese camino parecen ir nuevas investigaciones que se están realizando.

En qué se puede traducir esto a nivel de colmenar? En favorecer el cambio de reinas en colonias donde persiste la enfermedad, aunque con el tiempo se deberían crear apiarios seleccionados por su resistencia que suministrasen reinas que transmitiesen dicho carácter a su descendencia.

**Evitar la acumulación del hongo:** con renovación periódica de cuadros de cera (40% anual) y desinfección periódica del material apícola.

**Limitar factores predisponentes:** como indicamos anteriormente son numerosos los factores que se han asociado a la enfermedad, pero a efectos prácticos las medidas debieran centrarse en no forzar excesivamente el ritmo productivo de las colonias, ni de población (obtención de núcleos) ni de extracción de miel y polen.

**Control:** Una vez iniciado un brote, aislamiento de colonias enfermas, eliminación sistemática de cuadros o incluso de colonias más afectadas, y desinfección del material mediante flameado de superficies. Otra opción es desinfección con formaldehído al 4% durante 30 minutos.

## Aspergilosis

- Mucha menor frecuencia que ascosferosis.
- Agentes responsables: *Aspergillus fumigatus*; *A. flavus*.
- Afecta a larvas y adultas.
- Posible zoonosis: inflamaciones de vías respiratorias y alergias en el hombre.
- Enfermedad factorial (humedad muy elevada, el hongo prolifera incluso sobre los cuadros y las superficies internas de la caja) y esporádica (de rara presentación).
- Contagio: por ingestión de al menos contaminados con esporas del hongo que germinan en el intestino invadiendo el cuerpo el micelio.
- Acción patógena: mecánica (invasión por hifas) y tóxica (incorridinación motora e incapacidad de vuelo en abejas adultas). Las larvas se endurecen (consistencia pétrea).
- Diagnóstico: preferible el laboratorial, por posible

confusión con ascosferosis en la cría y con intoxicaciones y virosis en las adultas. Observación microscópica de raspados de larva, detectándose la presencia de estructuras típicas (conidióforos).

- Lucha: no existe tratamiento eficaz. Se recomienda la desinfección de material (flameado) y medidas preventivas, así como fundir la cera.

## Referências bibliográficas

- Alonso, J.M. (1991). La Ascosferiosis en *Apis mellifera* L. en España. Caracterización etiológica de brotes de la enfermedad en once comunidades autónomas. Resumen de Tesis Doctoral. Universidad de Extremadura. Cáceres. 40 pp.
- Alonso, J.M., Puerta, F., Hermoso de Mendoza, J., Rey, J., Gil, M.C., Hermoso de Mendoza, M. (1993). Las ascosferosis de la abeja melífera en España. estudio micológico de 47 brotes de la enfermedad. *Rev. Iberoamer. Micol.* 10: 39-46.
- Alonso, J.M., Puerta, F., Hermoso de Mendoza, J., Rey, J., Gil, M.C., Hermoso de Mendoza, M. (1994). Perfil enzimático y variabilidad subspecífica de *Ascosphaera apis*. *Rev. Iberoamer. Micol.* 11: 32-36.
- Alonso, J.M., Puerta, F., Rey, J., Hermoso de Mendoza, J., Cardenal, J.A., Gil, M.C., Hermoso de Mendoza, M. (1993). *Ascosphaera*: Efecto *in vitro* sobre el crecimiento del hongo de algunos quimioterápicos de uso apícola. *Vida Apícola* 62: 41-44.
- Alonso, J.M., Rey, J., Puerta, F., Hermoso de Mendoza, J., Hermoso de Mendoza, M., Flores, J.M. (1993). Enzymatic equipment of *Ascosphaera apis* and the development of infection by this fungus in *Apis mellifera*. *Apidologie* 24: 383-390.
- Bamford, S. (1987). Studies on the infection of honeybee larvae with *Ascosphaera apis*. Ph.D. Thesis. Plymouth Polytechnic. Plymouth. 200 pp.
- Bamford, S., Heath, L.A.F. (1989). The infection of *Apis mellifera* larvae by *Ascosphaera apis*. *J. Apic. Res.* 28(1): 30-35.
- Bissett, J. (1988). Contribution toward a monograph of the genus *Ascosphaera*. *Canad. J. Botan.* 66: 2541-2560.
- Cardenal, J.A., Alonso, J.M., Hermoso, J., Rey, J., Hermoso, M. (1990). Eficacia de fungicidas frente a la micosis. Estudios *in vitro* con *Ascosphaera apis*. *Vida Apícola* 43: 47-53.
- Carrera, P., Sommaruga, A., Vailati, G. (1987). The development of *Ascosphaera apis* within larvae of *Apis mellifera ligustica*. *J. Apic. Res.* 26: 59-63.
- Gilliam, M. (1989). Aspectos generales sobre el pollo escayolado y estrategias para su control. *Vida Apícola* 36: 18-24.
- Heath, L.A.F. (1985). Occurrence and distribution of Chalkbrood disease of honeybees. *Bee Wld.* 66(1): 9-15.
- Liu, T.P. (1987). Fine structure of the sporocysts of *Ascosphaera apis* during development as revealed by the Scanning Electron Microscope. *Mycopathologia* 100: 155-158.
- Puerta, F., Alonso, J.M., Flores, J.M., Bustos, M., Padilla, F. (1991). Tropismos tisulares de *Ascosphaera apis* en la abeja productora de miel, *Apis mellifera*. III Reun. Soc. Esp. Anat. Pat. Veter. 6-8 Junio, Cáceres.
- Puerta, F., Flores, J.M., Bustos, M., Padilla, F., Campano, F. (1994). Chalkbrood development in honeybee brood under controlled conditions. *Apidologie* 25: 540-546.
- Puerta, F., Flores, J.M., Pellín, P., Bustos, M., Padilla, F. (1990). Influencia de la dosis infectante en la aparición de la Ascosporeosis y notas sobre su desarrollo. *Rev. Iberoamer. Micol.* 7(1): 14.
- Vey, A. (1990). Recent studies on Ascosporeosis. En: *Proced. Intern. Symp. Recent. Res. Bee Pathol. Apimondia*. Septiembre 1990. Gent, Belgium.

\*Unidad de Enfermedades Infecciosas y Epidemiología. Facultad de Veterinaria. UEX. Cáceres.

# Predição de volumes e perfil do tronco para pinheiro bravo na região de Castelo Branco

Cristina Alegria\*



## Resumo

No presente estudo testaram-se 22 modelos de equações de volume, 7 modelos de equações de volume percentual em função da altura da desponta, 9 modelos de equações de volume percentual em função do diâmetro da desponta e 16 modelos de equações de perfil do tronco. Para o efeito, recolheram-se dados referentes a 146 árvores (1588 observações) em povoamentos de pinheiro bravo (*Pinus pinaster* Aiton) na região de Castelo Branco, Portugal.

Resultou da análise estatística efectuada, para os 4 tipos de modelos referidos, a eleição da equação de volume de Spurr (1952) da variável combinada (eq.(7)), a eleição da equação de volume percentual em função da altura da desponta de Cao *et al.* (1980) (eq.(1)), a eleição da equação de volume percentual em função do diâmetro da desponta de Deusen *et al.* (1981) (eq.(4)) e a eleição da equação de perfil de tronco de Demaerschalk (1973) eq.(6).

Com base na equação de perfil de tronco eleita, ajustou-se ainda o sistema de equações compatíveis desenvolvido por Demaerschalk (1973).

Os resultados obtidos neste estudo apontam para uma certa consonância na hierarquização dos modelos testados comparativamente com outros estudos realizados por outros autores e para outras espécies e regiões.

## 1. Introdução

Segundo a informação disponível em 1992, pela Direcção-Geral das Florestas (D.G.F.), de entre os cerca de  $3.108 \times 10^6$  ha (34.9%) da floresta existente em Portugal são os povoamentos de pinheiro bravo a sua essência mais representativa com  $1.2523 \times 10^6$  ha (40.3%) (D.G.F., 1993). No distrito de Castelo Branco a floresta representa  $286.3 \times 10^3$  ha (42%), ocupando o pinheiro bravo  $190.8 \times 10^3$  ha (67%) (D.G.F., 1993), realçando a dominância desta espécie no panorama florestal do distrito. Em termos da sua distribuição geográfica é na chamada zona do pinhal, que liga em continuidade com a grande mancha de pinheiro bravo do centro do País, que a floresta de pinheiro da região tem a sua expressão plena.

No presente trabalho pretende-se, dada a reconhecida importância que a espécie tem no País e na região e porque a informação numa forma geral se encontra desactualizada e sem um grau de desagregação que permita a realização de estudos de detalhe, realizar o ajustamento de diversos modelos matemáticos de equações de volume, equações de volume percentual e equações de perfil do tronco e ainda de um sistema de equações compatíveis constituído pelas equações atrás referidas com o propósito de obter um conjunto de modelos mais actuais e flexíveis que ajudem à cubagem do pinheiro bravo no distrito de Castelo Branco, segundo

o seu volume total ou segundo volumes mercantis e/ou volumes por classes de aproveitamento do tronco.

O presente estudo encontra-se integrado num projecto mais amplo, em curso no Instituto Politécnico de Castelo Branco - Escola Superior Agrária, sobre "Estudos de crescimento e produção em povoamentos de *Pinus pinaster* Aiton na região da Beira Interior".

## 2. Modelos de predição de volumes da árvore individual

As Tabelas 2.1, 2.2 e 2.3 apresentam, respectivamente, uma resenha dos modelos mais divulgados em bibliografia sobre o assunto para o ajustamento de equações de volume, de equações de volume percentual e de equações de perfil de tronco.

A notação utilizada na apresentação dos diversos modelos foi a seguinte:

$a_i, b_i, f_i, g_i$  = coeficientes de regressão estimados a partir da amostra;

$D$  = DAP, diâmetro à altura do peito (cm);

$d$  = diâmetro do tronco (com casca ou sem casca) (cm) à altura  $h$ ;

$H$  = altura total (m);

$h$  = altura acima do solo (m) até ao diâmetro do tronco  $d$ ;

$hc$  = altura do cepo (m);

$K = \pi/[4*(100)^2] = \pi/40000$ , constante que quando multiplicada por  $D^2$  iguala a área basal da árvore em  $m^2$ ;

$VT$  = volume total da árvore (com ou sem casca) ( $m^3$ );

$vt$  = volume acima do cepo (com ou sem casca) ( $m^3$ );

$vm$  = volume (com casca ou sem casca) ( $m^3$ ) desde o solo até um diâmetro ou altura do tronco;

$VM$  = volume mercantil (acima do cepo) (com casca ou sem casca) ( $m^3$ ) até um diâmetro ou altura do tronco;

$p = H-h$ ;

$z = (H-h)/H$ , altura relativa da árvore;

$x = (H-h)/(H-1.3)$ ;

$R$  = percentagem do volume total da árvore abaixo de um diâmetro (tipo  $Rd$ ) ou altura do tronco (tipo  $Rh$ ).

Tabela 2.1 - Modelos de equações de volume de dupla entrada

Mod.	Referência	Equação	Observações
(1)	Schumacher e Hall (1933)	$VT = b_1 D^{b_2} H^{b_3}$	Mod. não lineares
(2)	Spurr (1952)	$VT = b_1 (D^2 H)^{b_2}$	
(3)	Honer (1965)	$VT = D^2 / (b_1 + b_2 / H)$	
(4)	Takata (s.d.)	$VT = D^2 H / (b_1 + b_2 D)$	
(5)	Burkhart (1977)	$VT = b_1 + b_2 D^{b_3} H^{b_4}$	
(6)	Stoate (1945)	$VT = b_1 + b_2 D^2 + b_3 D^2 H + b_4 H$	Mod. lineares
(7)	Spurr (1952)	$VT = b_1 + b_2 D^2 H$	
(8)	Spurr (1952)	$VT = b_1 D^2 H$	
(9)	Ogaya (1968)	$VT = D^2 (b_1 + b_2 H)$	
(10)	Naslund (s.d.)	$VT = b_1 D^2 + b_2 D^2 H + b_3 D H^2 + b_4 H^2$	
(11)	Meyer (s.d.)	$VT = b_1 + b_2 D + b_3 D^2 + b_4 D H + b_5 D^2 H + b_6 H$	
(12)	Meyer (s.d.)	$VT = b_1 + b_2 D + b_3 D^2 + b_4 D H + b_5 D^2 H$	
(13)	Spurr (1952)	$\log(VT) = b_1 + b_2 \log(D) + b_3 \log^2(D) + b_4 \log(H) + b_5 \log^2(H)$	

Tabela 2.2 - Modelos de equações de volume percentual

Mod.	Referência	Equação*	Observação
Equações de volume percentual em função da altura do despondo			
(1)	Cao et al. (1980)	$R = 1 + [b_1 (H-h)^{b_2} / H^{b_3}]$	Mod. não lineares
(2)	Cao et al. (1980)	$R = 1 - z + b_2 (z^2 - z) + b_3 (z^3 - z) + b_4 (z^4 - z) + b_5 (z^5 - z)$	
(3)	Matney e Sullivan (1980)	$R = 1 - [1 - \exp\{-b_1 \tan(b_2 H^{b_3} z)\}]^{b_4}$	
(4)	Reed e Green (1984)	$R = 1 + z^{b_1}$	
(5)	Parresol et al. (1987)	$R = \exp\{b_1 z^{b_2}\}$	
(6)	Parresol et al. (1987)	$R = \exp\{b_1 (p^{b_2} / H^{b_3})\}$	
(7)	Honer (1967)	$R = 1 + b_1 (h/H - 1) + b_2 (h^2/H^2 - 1)$	Mod. lineares
Equações de volume percentual em função do diâmetro de despondo			
(1)	Burkhart (1977)	$R = 1 + b_1 (d^{b_2} / D^{b_3})$	Mod. não lineares
(2)	Clutter (1980)	$R = 1 + b_1 d^{b_2} D^{b_3}$	
(3)	Matney e Sullivan (1980)	$R = 1 - [1 - \exp\{-b_1 \tan(b_2 H^{b_3} (d/D))\}]^{b_4}$	
(4)	Deusen et al. (1981)	$R = \exp\{b_1 (d/D)^{b_2}\}$	
(5)	Reed e Green (1984)	$R = 1 + b_1 d^{b_2} / (D^{b_3} H^{b_4})$	
(6)	Reed e Green (1984)	$R = 1 + b_1 (d/D)^{b_2} (b_2 H + b_3)^{b_4}$	
(7)	Parresol et al. (1987)	$R = \exp\{b_1 (d^{b_2} / D^{b_3})\}$	
(8)	Honer (1967)	$R = b_1 + b_2 [d^2/D^2] \{1 + hc/H\} + b_3 \{[d^2/D^2] \{1 + hc/H\}\}^2$	Mod. lineares
(9)	Cao et al. (1980)	$R = 1 + b_1 (d/D) + b_2 (d/D)^2 + b_3 (d/D)^3 + b_4 (d/D)^4 + b_5 (d/D)^5 + b_6 (d/D)^6$	

\* Todos os modelos se encontram sujeitos à restrição de  $R=1$  quando  $h=1$  ou  $d=0$ . Os modelos polinomiais apresentados por Cao et al. (1980) estão ainda sujeitos a outra restrição:  $R=0$  quando  $h=0$ .

Ao longo deste trabalho iremos adotar esta mesma notação. Caso seja necessário diferenciar alguma variável relativamente à circunstância de esta ter sido recolhida ou calculada com casca ou sem casca, ser-lhe-á indexada, respectivamente, a sigla *c/c* ou *s/c*.

Aos modelos de equações de volume lineares há ainda a acrescentar os sub-modelos originados das combinações lineares, com ordenada na origem, com duas variáveis e com três variáveis, da função:

$$VT=f(D, H, D^2, H^2, DH, D^2H, DH^2, D^2H^2)$$

### 3. Material e métodos

Os dados foram recolhidos em diversos povoamentos de pinheiro bravo do distrito de Castelo Branco, embora com maior incidência na zona do pinhal, e ao longo de três períodos de tempo distintos.

Na tabela que se apresenta em seguida podemos observar a intensidade de amostragem ocorrida por concelho e local para a recolha de dados em árvores abatidas.

A amostragem realizada no período I foi estabelecida segundo a amplitude das classes de frequência de *DAP* (*c/c*). A toragem foi realizada de 2.2m em 2.2m, cepo a 0.15m e desponta a 7cm *c/c*.

A amostragem do período II, em pinhal privado onde ocorriam cortes culturais, foi realizada segundo

a amplitude de *DAP*'s (*c/c*) e alturas totais. A toragem foi realizada de 2m em 2m, com excepção para o local Penha Garcia que foi realizada de 2.2m em 2.2m. O cepo realizou-se a 0.15m e a desponta a 7cm *c/c*.

A amostragem no período III, em pinhal privado, essencialmente onde ocorriam cortes de exploração e também nalguns casos cortes culturais, foi realizada proporcionalmente às classes de *DAP* (*c/c*), incluindo sempre as classes de menor e maior *DAP* *c/c*. A toragem foi realizada segundo aquela que era praticada no local pelo empresário florestal: toros de 2.0m ou 2.1m ou 2.2m ou 2.5m ou 2.6m, com o cepo variável entre 0.05m e 1.1m, e desponta variável.

Todos os dados recolhidos foram obtidos medindo os diâmetros até aos mm e as alturas até aos dm.

No conjunto dos dados de que dispomos, 146 árvores abatidas, para o ajustamento e validação dos modelos, amostraram-se árvores com *DAP*'s (*c/c*) compreendidos entre os 6.5cm e os 47.6cm e alturas totais compreendidas entre os 6.4m e os 24.1m.

O cálculo dos volumes parciais e total (*c/c*) (variáveis *vm* e *VT*) foi realizado usando a fórmula de Smalian para estimar o volume individual de cada toro, usando a fórmula do cilindro para avaliar o volume do cepo e usando a fórmula do cone para avaliar o volume da bicada (Avery e Burkhart, 1983).

No ajustamento dos modelos utilizou-se a técnica da análise de regressão com o objectivo de seleccionar de entre os vários modelos apresentados, para cada

**Tabela 2.3** - Modelos de equações de perfil do tronco

Mod.	Referência	Equação	Observações
(1)	Bruce et al. (1968)	$d=D[b_1x^{1.5}(10^{-1})+b_2(x^{1.5}-x^2)D(10^{-2})+b_3(x^{1.5}-x^2)H(10^{-3})+b_4(x^{1.5}-x^2)HD(10^{-5})+b_5(x^{1.5}-x^2)H^{1/2}(10^{-3})+b_6(x^{1.5}-x^{4.0})H^2(10^{-6})]^{0.5}$	
(2)	Kozak et al. (1969)	$d=D[b_1(h/H-1)+b_2(h^2/H^2-1)]^{0.5}$	
(3)	Kozak et al. (1969)	$d=D[b_1(1-2h/H+h^2/H^2)]^{0.5}$	
(4)	Demaerschalk (1972)	$d=D[b_1z^{b_2}]^{0.5}$	
(5)	Demaerschalk (1972)	$d=b_1D^{b_2}(H-h)^{b_3}H^{b_4}$	
(6)	Demaerschalk (1973)	$d=D\{b_1[1/(D^2H)]\}[(H-h)/H]^{b_2}+b_3\{[(H-h)/H]^{b_4}\}^{0.5}$	
(7)	Demaerschalk (1973)	$d=D[b_1(H-h)^{b_2}/(b_2H^{b_2+1}+b_4H^{b_2})]^{0.5}$	
(8)	Ormerod (1973)	$d=D[(H-h)/(H-1.3)]^{b_1}$	Mod. não lineares
(9)	Max e Burkhart (1976)	$d=D[b_1(h/H-1)+b_2(h^2/H^2-1)+b_3(u_1-h/H)^{2l_1}+b_4(u_2-h/H)^{2l_2}]^{0.5}$ com, $l_1=1, h/H \leq u_1; l_1=0, h/H > u_1; i=1,2$	
(10)	Max e Burkhart (1976)	$d=D[b_1(h/H-1)+b_2(h^2/H^2-1)+b_3(u_1-h/H)^{2l_1}]^{0.5}$ com, $l_1=1, h/H \leq u_1; l_1=0, h/H > u_1$	
(11)	Goulding e Murray (1976)	$d=\{[VT/(KH)][2z+b_1(3z^2-2z)+b_2(4z^3-2z)+b_3(5z^4-2z)+b_4(6z^5-2z)]\}^{0.5}$	
(12)	Bennett et al. (1978)	$d=D\{[(H-h)/(H-1.30)]+b_2\{[(H-h)(h-1.30)/H^2]+b_3[D(H-h)(h-1.30)/H^2]+b_4[D^2(H-h)(h-1.30)/H^2]+b_5\{[(H-h)(h-1.30)(2H-h-1.30)/H^2]\}}\}^{0.5}$	
(13)	Cao et al. (1980)	$d=\{[VT/(KH)][2z+b_1(3z^2-2z)+b_2(z-u_1)^{2l_1}+b_3(z-u_2)^{2l_2}]\}^{0.5}$ com, $l_1=1, z \geq u_1; l_1=0, z < u_1; i=1,2$	
(14)	Biging (1984)	$d=D\{b_1+b_2 \ln[1-(h/H)^{1/b_3}(1-\exp(-b_4/b_2))]\}$	
(15)	Parresol et al. (1987)	$d=D[b_1z^2+b_2z^3+b_3(z-u)^{2l}+b_4(z+2u)(z-u)^{2l}]^{0.5}$ com, $l=1, z \geq u; l=0, z < u; i=1,2$	
(16)	Bennett e Swindel (1972)	$d=b_1D(H-h)/(H-1.3)+b_2H(H-h)(h-1.3)+b_3H(H-h)(h-1.3)+b_4(H-h)(h-1.3)(H+h+1.3)$	Mod. linear

\* Nos modelos (13) e (15) a variável VT é estimada pelo modelo  $VT=b_0+b_1D^2H$ .

**Tabela 3.1** - Locais amostrados, nº de árvores abatidas e nº de observações (pares de valores (d,h))

MÊS e ANO	CONCELHO: LOCAIS	NºÁRV.	NºOBS.
Abr-Mar 87	IDANHA-A-NOVA: Penha Garcia (Ex. Mata Nacional de P.Garcia)	31	195
SUB-TOTAIS		31	195
Fev-Mar 89	CASTELO BRANCO: Almaceda	7	70
	OLEIROS: Oleiros	9	91
	PENAMACOR: Penamacor	10	85
	IDANHA-A-NOVA: Penha Garcia	7	47
	PROENÇA-A-NOVA: Proença-a-Nova S.Pedro do Esteval	7	61
		7	56
SUB-TOTAIS		47	410
Jul-Dez 89	OLEIROS: Barroca da Sobreira	6	49
	Silvasa	5	37
	Sendinho da Senhora1	5	47
	Sendinho da Senhora2	7	57
	CASTELO BRANCO: Almaceda	2	15
	Feiteiral	4	35
	Feiteira2	8	67
	PROENÇA-A-NOVA: Pedra do Altar	7	44
	Freixoerinho	2	17
	VILA VELHA RODÃO: Minas Ingadanais	5	39
	Rodeios	10	83
	Atalaia	7	69
SUB-TOTAIS		68	559
TOTAIS		146	1164

tipo de equações, aqueles que melhor predizem os volumes totais, volumes parciais e perfil do tronco para a espécie e região em estudo.

Para a selecção do "melhor" modelo realizou-se um estudo promenorizado de cada um dos modelos ajustados através da análise dos critérios "standard" para a determinação das suas performances. A BASE DE DADOS foi dividida em dois sub-conjuntos, por forma a obter ficheiros independentes para o ajustamento dos modelos (FASE DE AJUSTAMENTO) e para a sua posterior validação (FASE DE VALIDAÇÃO - validação cruzada), segundo uma amostragem estratificada por período e local. Cada sub-conjunto de dados é constituído de 73 árvores correspondendo a um nº de observações de 588 dados para o ajustamento e 576 dados para a validação.

O ajustamento dos modelos foi realizado no programa estatístico GENSTAT5 a partir de macros desenvolvidas por Tomé (1989) e Tomé (1991). O ajustamento das equações de volume foi realizado com 73 dados e o das equações de volume percentual e das equações de perfil do tronco foi realizado com 588 dados. No ajustamento das equações de volume percentual considerou-se a variável  $R=vm/VT$ .

O ajustamento dos modelos lineares foi realizado segundo o método dos mínimos quadrados ordinários. O ajustamento dos modelos não lineares foi realizado por regressão não linear, segundo um processo iterativo que requer o "input" de parâmetros iniciais. O GENSTAT5 permite a opção entre os métodos de Gauss-Newton e Newton-Raphson (adaptados às diferenças finitas) na resolução deste processo. No caso dos modelos não lineares mas linearizáveis utilizaram-se os coeficientes

de regressão estimados no ajustamento por regressão linear desse modelo linearizado, como parâmetros inicializadores ao processo. No caso dos modelos não lineares e não linearizáveis procedeu-se previamente à pesquisa de soluções iniciais (Genstat5 Committe, 1987).

Para o estudo dos modelos em questão durante a FASE DE AJUSTAMENTO, dentro de cada tipo de equações consideradas, procedeu-se ao cálculo de diversas medidas de ajustamento dos modelos, de diversas medidas da capacidade preditiva dos modelos, do estudo da colinearidade entre os preditores dos modelos e à análise de resíduos dos modelos.

As estatísticas consideradas na fase de ajustamento foram o coeficiente de determinação da regressão ( $R^2$ ), o coeficiente de determinação ajustado ( $R^2AJ$ ), o quadrado médio dos resíduos (QMR), os resíduos PRESS e APRESS e ainda o quadrado médio absoluto dos resíduos PRESS (QMARP).

Na selecção da melhor equação de regressão de entre todas as regressões possíveis de Y em função de um conjunto de variáveis independentes, considerou-se, para além do  $R^2$  e do QMR, a estatística de  $C_p$  Mallows (Conceptual Predictive Criteria) (Draper et al., 1981). No caso dos modelos lineares o valor da estatística  $C_p$  deve ser igual ou próxima do nº de parâmetros do modelo em análise. Esta estatística reflecte o compromisso de selecção entre os ajustamentos por defeito e os ajustamentos por excesso (Myers, 1986).

Averigou-se da inexistência de colinearidade através do cálculo do factor de inflação da variância máximo (FIVM) e do nº de condição da matriz (NCOND). A existência de multicolinearidade no modelo, i.e. a ocorrência de multidependências quasi-lineares (colinearidade) entre

os regressores verifica-se em consequência da existência de correlações entre as diversas variáveis  $X_i$ 's entre si (Myers, 1986). Segundo este autor, a matriz obtém-se escalando e centrando os regressores  $x_{ij}$  da matriz dos dados. Quando a diagonal do inverso daquela matriz for superior a 1 constatamos a existência de colinearidade, dando-nos o seu valor absoluto a sua ordem de grandeza. Estes elementos são as variâncias dos coeficientes de regressão e denominam-se de factores de inflação da variância, na medida em que a existência da colinearidade os inflacionou (Myers, 1986).

A análise de resíduos tradicional, já que os resíduos nem sempre têm um comportamento idêntico aos erros do modelo, reveste-se de algumas reservas quanto à sua utilização na medida em que a variância dos resíduos em torno de zero se torna menor à medida do seu afastamento do centro dos dados e por outro lado porque se verifica a existência de correlação dos resíduos entre si. No entanto, o estudo destes resíduos deve ser realizado com o objectivo de detectar discrepâncias entre o modelo postulado e os dados observados (Myers, 1986). Assim se procedeu ao cálculo da *média absoluta dos resíduos tradicionais* (MAR) como estatística indicadora da capacidade preditiva dos modelos.

Com o propósito de superar algumas limitações que os resíduos tradicionais apresentam recorreu-se também à estimativa de resíduos independentes dos dados. São exemplos os *resíduos Press* (*Prediction Errors Sum of Squares*) que são definidos supondo que se ajusta o modelo  $n$  vezes, suprimindo de cada vez uma das observações, o que permite gerar um conjunto de resíduos independentes aos dados (Myers, 1986). Outra forma de obter um conjunto de resíduos independentes dos dados é recorrer à validação cruzada, i.e. calcular os *erros de predição* do modelo a partir do *conjunto de dados de validação* (Myers, 1986). Assim, após o ajustamento de cada modelo calcularam-se, com o conjunto de dados para a validação (*FASE DE VALIDAÇÃO*), os *resíduos de predição* ( $rp$ ) para cada modelo, sendo  $rp_i$  o resíduo de predição para a observação  $i$  (valor observado menos o valor estimado pelo modelo). Escolheram-se as seguintes estatísticas de predição: *média dos quadrados dos resíduos de predição* ( $MQRp$ ), *percentagem de variação explicada pelo modelo* ( $R^2rp$ ), *média dos resíduos de predição* ( $Mrp$ ), esta medida permite detectar o enviesamento dos modelos (idealmente  $Mrp=0$ ), *variância dos resíduos de predição* ( $Vrp$ ), *média do valor absoluto dos resíduos de predição* ( $MARP$ ) (Tomé, 1988). As duas últimas medidas permitem avaliar o erro que em média se comete com a aplicação do modelo.

Na Tabela 3.2 podem ser visualizadas as fórmulas utilizadas no cálculo das estatísticas consideradas.

As estatísticas consideradas foram calculadas para os dados de base. Isto é, para as equações de volume foram calculadas em termos de volume total com casca (VT). Para as equações de volume percentual, na fase de ajustamento foram calculadas em termos de percentagem do volume total da árvore abaixo de um diâmetro ou altura de despona (R) e na

fase de validação foram calculadas em termos de volumes mercantis com casca (vm). Para as equações de perfil de tronco foram calculadas em termos de diâmetros com casca ao longo do tronco (d).

A partir das equações de perfil de tronco ajustadas realizou-se a reconstituição do perfil do tronco das árvores segundo a toragem praticada e procedeu-se à sua cubagem rigorosa. Após esta, calcularam-se também as estatísticas de predição da fase de validação em termos de volume total com casca (VT) e volume mercantil com casca (vm).

A ordenação dos modelos foi realizada com base nos valores das estatísticas obtidas na fase de ajustamento e na fase de validação. No caso das estatísticas FIVM e NCOND a análise foi realizada considerando por um lado os modelos lineares e por outro lado os modelos não lineares, visto a ordem de grandeza destas estatísticas não ser comparável. Com base na análise da colinearidade realizou-se a triagem dos modelos lineares e não lineares reduzindo o seu número a 5 modelos lineares e 5 modelos não lineares. A partir da capacidade de ajustamento e predição destes realizou-se a selecção final do melhor modelo. Paralelamente, por forma a ajudar a sistematizar a ordenação dos modelos, calcularam-se três índices de ordenação, respectivamente, segundo as componentes capacidade de ajustamento ( $R^2$ ,  $R^2AJ$ ,  $QMR$ ), análise da colinearidade (FIVM, NCOND) e capacidade preditiva (PRESS, APRESS, QMAR, MAR, MQRp, Mrp, Vrp, MARp, R<sup>2</sup>rp). Estes índices foram definidos como a média dos valores das estatísticas reduzidas consideradas em cada componente. As estatísticas reduzidas ficaram definidas no intervalo [0,1], onde o valor 0 corresponde ao pior modelo e o valor 1 corresponde ao melhor modelo. Após eleito o melhor modelo para cada tipo de equações em análise, reajustaram-se esses modelos à base de dados global.

A partir da equação de perfil de tronco eleita realizou-se o ajustamento do sistema de equações compatíveis. Segundo Byrne e Reed (1986) o factor primordial para a boa performance de um sistema de equações compatíveis depende da boa performance das equações suas constituintes, particularmente da sua equação de perfil de tronco. Este aspecto foi também observado por Tomé (1991). Cao et al. (1980) e Byrne e Reed (1986) observaram, também uma perda de precisão da equação de perfil de tronco na predição de diâmetros do tronco para assegurar que esta seja compatível.

## 4. Resultados e discussão

Apresentam-se na Tabela 4.1 as estatísticas calculadas para os modelos de equações de volume testadas. Há a referir que a equação (3) foi excluída à partida por apresentar singularidade, ou seja, os coeficientes de regressão estimados são muito instáveis, não constando assim da referida tabela.



**Tabela 3.2** - Critérios para a avaliação dos modelos

Estadísticas de Ajustamento - Fase de Ajustamento

$$R^2 = 1 - (SQR/SQT)$$

$$R^2_{AJ} = 1 - [(SQR/(n-p))/(SQT/(n-1))] = 1 - (QMR/QMT)$$

$$QMR = SQR/(n-p)$$

$$C_p = p[(s^2 - \delta^2)(n-p)]/\delta^2 = \sum_{i=1}^n (h_{ii}) + [(QMR - QMRK)(n-p)]/QMRK$$

onde:

SQR = soma dos quadrados dos resíduos;

SQT = soma dos quadrados total;

n = n° de observações;

p = k+1, n° de parâmetros do modelo, i.e. n° de variáveis independentes (X<sub>i</sub>'s) mais um;

n-p = n° de graus de liberdade;

QMR = quadrado médio dos resíduos;

QMT = quadrado médio total;

δ² = estimativa da variância dos erros do modelo máximo que será expresso pelo QMR do modelo máximo (QMRK);

s² = estimativa da variância dos erros do modelo específico que será expresso pelo QMR do modelo específico (QMR);

h<sub>ii</sub> = valor da matriz de projecção, que é uma medida estandarizada da distância do ponto x<sub>i</sub> a x̄. A matriz de projecção é definida por H = X(X'X)<sup>-1</sup>X', onde X é a matriz dos dados (Myers, 1986).

Avaliação de Colinearidade - Fase de Ajustamento

$$FIVM = \text{MÁX}(f_{ii}) = 1/(1 - R^2)$$

$$NCOND = \lambda \text{MÁX} / \lambda \text{MIN}$$

onde:

R² = coeficiente de determinação da regressão de x<sub>i</sub> nos outros regressores.

λMax e λMin são, respectivamente, o maior e o menor valores próprios da matriz x<sup>\*\*</sup> x\*.

Estadísticas de Predição - Fase de Ajustamento

$$\text{PRESS} = \sum_{i=1}^n RP_i^2; \quad \text{APRESS} = \sum_{i=1}^n |RP_i|; \quad \text{QMARP} = (\sum_{i=1}^n |RP_i|)/n;$$

$$\text{com } RP_i = (y_i - \hat{y}_i)/(1 - h_{ii}) = r_i/(1 - h_{ii})$$

$$\text{MAR} = (\sum_{i=1}^n |r_i|)/n$$

onde:

RP<sub>i</sub> = resíduo PRESS, i.e. o resíduo para y<sub>i</sub> quando esta observação foi excluída;

ŷ<sub>i</sub> = valor estimado para y<sub>i</sub> quando esta observação foi excluída;

r<sub>i</sub>; y<sub>i</sub> = r<sub>i</sub>, resíduo para y<sub>i</sub> (valor observado menos valor estimado);

h<sub>ii</sub> = valor da matriz de projecção, que é uma medida estandarizada da distância do ponto x<sub>i</sub> a x̄. A matriz de projecção é definida por H = X(X'X)<sup>-1</sup>X', onde X é a matriz dos dados (Myers, 1986).

Estadísticas de Predição - Fase de Validação

$$MQrp = (\sum_{i=1}^n rp^2)/n; \quad R^2_{rp} = 1 - (SQrp/SQT); \quad Mrp = (\sum_{i=1}^n rp_i)/n;$$

$$Vrp = (r_{oi} - \bar{rp})^2 / (n - 1); \quad MARp = (\sum_{i=1}^n |rp_i|)/n$$

onde:

rp = resíduo de predição para a observação i;

n = n° de observações do conjunto de validação;

SQT = soma dos quadrados total para o conjunto de dados de validação;

SQrp = soma dos quadrados dos resíduos de predição para o conjunto dos dados de validação.

Consideraram-se ainda nesta análise os sub-modelos originados das combinações lineares da função referida no item 2. De entre os 92 sub-modelos resultantes destas combinações realizou-se uma primeira triagem destes a partir do cálculo das estatísticas,  $R^2$ ,  $R^2AJ$ ,  $Cp$ ,  $QMR$ ,  $PRESS$ ,  $APRESS$ ,  $FIVM$  e  $NCOND$ . Foram critérios de exclusão dos sub-modelos o seu valor de  $Cp$  e  $FIVM$ . Assim, todos os sub-modelos que apresentassem um valor de  $Cp$  muito diferente do seu nº de parâmetros e/ou um valor de  $FIVM$  superiores a 15 (denotando existência de colinearidade) eram eliminados. Os 9 sub-modelos seleccionados, de 2 variáveis e de 3 variáveis, são os seguintes:

- (14)  $VT=b_0+b_1D+b_2D^2H$
- (15)  $VT=b_0+b_1H+b_2D^2H$
- (16)  $VT=b_0+b_1D^2+b_2D^2H^2$
- (17)  $VT=b_0+b_1H^2+b_2D^2H$
- (18)  $VT=b_0+b_1D^2H+b_2H^2D$
- (19)  $VT=b_0+b_1D+b_2H+b_3D^2H$
- (20)  $VT=b_0+b_1D+b_2H^2+b_3D^2H$
- (21)  $VT=b_0+b_1H+b_2D+b_3D^2H^2$
- (22)  $VT=b_0+b_1D^2+b_2H^2+b_3D^2H^2$

**Tabela 4.1 - Estatísticas - Equações de volume**

MOD.	QMR	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> AJ	Fase de ajustamento					
				PRESS	APRESS	QMARF	MAR	FIVM	NCOND
(1)	0.0022	0.9765	0.9758	0.2	2.2	0.0305	0.0267	553.2173	2549.0308
(2)	0.0022	0.9764	0.9761	0.2	2.1	0.0287	0.0266	524.7676	2096.9390
(4)	0.0023	0.9758	0.9754	0.2	2.2	0.0306	0.0277	27.1485	106.5545
(5)	0.0022	0.9765	0.9755	0.3	2.3	0.0311	0.0266	551.1735	2537.5493
(6)	0.0023	0.9762	0.9752	0.2	2.2	0.030	0.0272	35.9013	165.9529
(7)	0.0022	0.9759	0.9756	0.2	2.1	0.0286	0.0272	1.0000	1.0000
(8)	0.0023	0.9745	0.9745	0.2	2.2	0.0298	0.0287	1.0000	1.0000
(9)	0.0023	0.9750	0.9747	0.2	2.2	0.0295	0.0273	19.4722	75.8754
(10)	0.0023	0.9763	0.9752	0.3	2.2	0.0307	0.0262	242.1103	1898.1282
(11)	0.0023	0.9769	0.9751	0.3	2.4	0.0327	0.0265	1106.2064	13534.9111
(12)	0.0023	0.9768	0.9755	0.3	2.3	0.0315	0.0266	492.1437	5500.1880
(14)	0.0022	0.9762	0.9756	0.2	2.1	0.0283	0.0261	8.9675	33.8403
(15)	0.0023	0.9762	0.9755	0.2	2.2	0.0296	0.0274	2.9446	9.6749
(16)	0.0024	0.9749	0.9742	0.2	2.1	0.0290	0.0260	5.6998	20.7508
(17)	0.0023	0.9761	0.9754	0.2	2.2	0.0297	0.0274	2.8393	9.2490
(18)	0.0023	0.9761	0.9754	0.2	2.2	0.0300	0.0273	8.6717	32.6563
(19)	0.0023	0.9764	0.9754	0.2	2.2	0.0297	0.0267	10.3695	48.4889
(20)	0.0023	0.9764	0.9754	0.2	2.2	0.0298	0.0266	12.0070	53.7606
(21)	0.0023	0.9755	0.9744	0.2	2.2	0.0296	0.0259	10.0373	41.8322
(22)	0.0024	0.9754	0.9743	0.3	2.2	0.0296	0.0258	15.4747	64.5464

MOD.	Fase de validação				
	M <sub>rp</sub>	MA <sub>rp</sub>	MQ <sub>rp</sub>	R <sup>2</sup> <sub>rp</sub>	V <sub>rp</sub>
(1)	0.0115	0.0193	0.0012	0.9815	0.0012
(2)	-0.0184	0.0267	0.0016	0.9782	0.0013
(4)	-0.0025	0.0204	0.0012	0.9819	0.0012
(5)	0.0010	0.0012	0.0012	0.9816	0.0012
(6)	0.0017	0.0197	0.0012	0.9813	0.0012
(7)	0.0020	0.0207	0.0012	0.9809	0.0012
(8)	0.0107	0.0012	0.0012	0.9819	0.0011
(9)	0.0077	0.0014	0.0014	0.9794	0.0013
(10)	0.0020	0.0190	0.0012	0.9821	0.0012
(11)	-0.0002	0.0202	0.0011	0.9826	0.0011
(12)	0.0013	0.0011	0.0011	0.9825	0.0011
(14)	0.0017	0.0198	0.0013	0.9797	0.0013
(15)	0.0017	0.0201	0.0011	0.9821	0.0012
(16)	0.0019	0.0010	0.0010	0.9836	0.0011
(17)	0.0017	0.0204	0.0011	0.9823	0.0011
(18)	0.0017	0.0011	0.0011	0.9825	0.0011
(19)	0.0016	0.0194	0.0012	0.9809	0.0012
(20)	0.0015	0.0012	0.0012	0.9812	0.0012
(21)	0.0021	0.0190	0.0010	0.9841	0.0010
(22)	0.0021	0.0010	0.0010	0.9841	0.0010

É de referir que os modelos (8), (9) e (10) não apresentam ordenada na origem. Myers (1986) refere que o valor de  $R^2$  destes modelos não é comparável com os dos restantes modelos lineares com ordenada na origem. Este aspecto foi tido em consideração na selecção dos modelos avaliando-os apenas através dos restantes parâmetros estatísticos calculados.

A equação (13),  $\log(VT)=b_0+b_1\log(D)+b_2\log^2(D)+b_3\log(H)+b_4\log^2(H)$  foi o único modelo linear logarítmico testado e foi à partida eliminada por apresentar elevada colinearidade ( $FIVM=295.3905$  e  $NCOND=2614.6421$ ).

Dos modelos constantes da Tabela 4.1 seleccionaram-se, para uma análise mais detalhada, os 5 modelos lineares com menor nível de colinearidade, ou seja as equações (7), (8), (15), (16) e (17). Ordenaram-se os 5 modelos lineares e os 5 modelos não lineares, de acordo com as suas capacidades preditivas e de ajustamento, seleccionando-se como melhores modelos as equações (1) e (7).

Apresentam-se na tabela 4.2 as estatísticas calculadas para os modelos de equações de volume percentual em função da altura de despona testadas. As equações (3) e (4) foram eliminadas à partida por apresentarem singularidade, não constando da referida tabela.

De entre os modelos que constam da Tabela 4.2 seleccionou-se, de entre os modelos lineares e não lineares, aquele que apresentava melhor capacidade preditiva e de ajustamento, ou seja a equação (1).

Apresentam-se na Tabela 4.3 as estatísticas calculadas para os modelos de equações de volume percentual em função do diâmetro de despona testadas. As equações (3) e (6) foram eliminadas à partida por apresentarem singularidade, não constando assim da referida tabela.

De entre os modelos que constam da Tabela 4.3 seleccionou-se de entre os modelos lineares e não lineares aquele que apresentava melhor capacidade preditiva e de ajustamento, ou seja a equação (7).

Apresentam-se na Tabela 4.4 as estatísticas calculadas para os modelos de equações de equações de perfil do tronco. A equação (9) não convergiu e a equação

**Tabela 4.2 - Estatísticas - Equações de volume percentual em função da altura da desponta**

MOD. QMR	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> AJ	Fase de ajustamento					NCOND	
			PRESS	APRESS	QMARP	MAR	FIVM		
(1)	0.0008	0.9929	0.9929	0.5	11.4	0.0194	0.0192	321.4983	1741.6383
(2)	0.0009	0.9928	0.9928	0.5	10.7	0.0182	0.0181	2203.6934	1.5703E+07
(5)	0.0028	0.9766	0.9765	1.6	22.9	0.0389	0.0387	1.2945	2.8239
(6)	0.0026	0.9781	0.9781	1.5	22.5	0.0382	0.0379	147.2206	729.0392
(7)	0.0011	0.9909	0.9908	0.6	13.6	0.0231	0.0230	14.2266	54.8879

MOD. Mrp	Fase de validação				
	MARp	MQrp	R <sup>2</sup> rp	Vrp	
(1)	-0.0002	0.0057	0.0001	0.9980	0.0001
(2)	-0.0014	0.0060	0.0002	0.9974	0.0002
(5)	-0.0059	0.0127	0.0005	0.9922	0.0004
(6)	-0.0033	0.0122	0.0004	0.9934	0.0004
(7)	-0.0023	0.0076	0.0002	0.9972	0.0002

(15) foi eliminada por apresentar singularidade, não constando assim da referida tabela.

Dos modelos constantes da Tabela 4.4 selecionaram-se, para uma análise mais detalhada, os 5 modelos não lineares com menor nível de colinearidade, ou seja as equações (2), (3), (4), (6) e (8). De entre os 5 modelos não lineares e o único modelo linear selecionou-se, de acordo com as suas capacidades preditivas e de ajustamento para a descrição do perfil do tronco, como melhor modelo a equação (6).

**Tabela 4.3 - Estatísticas - Equações de volume percentual em função do diâmetro da desponta**

MOD. QMR	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> AJ	Fase de ajustamento					NCOND	
			PRESS	APRESS	QMARP	MAR	FIVM		
(1)	0.0102	0.9143	0.9140	6.1	43.7	0.0743	0.0736	227.9585	1169.1091
(2)	0.0102	0.9143	0.9140	6.1	43.7	0.0743	0.0736	230.0210	1171.1597
(4)	0.0064	0.9457	0.9456	3.8	28.1	0.0479	0.0476	1.0629	1.6432
(5)	0.0095	0.9199	0.9195	5.8	42.0	0.0714	0.0706	249.3318	1952.2416
(7)	0.0050	0.9581	0.9580	3.0	24.2	0.0411	0.0408	355.8515	2046.2075
(8)	0.0113	0.9051	0.9048	6.7	50.9	0.0866	0.0860	6.9832	25.8940
(9)	0.0063	0.9471	0.9466	3.7	27.7	0.0472	0.0467	1262.2716	265869.9688

MOD. Mrp	Fase de validação				
	MARp	MQrp	R <sup>2</sup> rp	Vrp	
(1)	0.0083	0.0253	0.0020	0.9599	0.0020
(2)	0.0083	0.0253	0.0020	0.9599	0.0020
(4)	-0.0058	0.0009	0.0009	0.9846	0.0009
(5)	0.0107	0.0252	0.0021	0.9579	0.0020
(7)	0.0010	0.0125	0.0007	0.9878	0.0007
(8)	-0.0047	0.0277	0.0022	0.9602	0.0022
(9)	-0.0049	0.0136	0.0009	0.9844	0.0009

Analisaram-se, também, as equações de perfil de tronco segundo a sua capacidade preditiva para os volumes total e parciais (respectivamente, VT e vm). De acordo com a Tabela 4.5, verifica-se que os bons modelos na reconstituição do perfil são também os bons modelos na predição de volumes.

Da análise global dos modelos seleccionados podemos observar que os resíduos de predição em diâmetro do tronco c/c obtidos da aplicação da equação de perfil (6) são bastante baixos e praticamente sem significado prático. Também os resíduos de predição em volume total com casca resultantes da aplicação da equação de volume (7) e os obtidos através da cubagem rigorosa segundo a reconstituição do perfil do tronco (6) são da mesma ordem de grandeza, sendo as estimativas de um modo geral obtidas por defeito. Tal aspecto pode resultar da boa capacidade da equação de perfil de

tronco em descrever o perfil do tronco. Relativamente aos resíduos de predição em volume mercantil com casca, observamos que a equação de volume percentual tipo Rh produz resíduos de maior ordem de grandeza absoluta, embora a dispersão destes seja menor e compensando-se em média melhor do que os resíduos produzidos pela equação de volume percentual tipo Rd. Os resíduos de predição em volume mercantil com casca obtidos através da cubagem rigorosa segundo a reconstituição do perfil do tronco através da aplicação da equação de perfil de tronco são de maior grandeza absoluta, embora a sua dispersão seja pequena e em média os resíduos se compensem a níveis idênticos ao da equação de volume percentual tipo Rh. É de salientar, no entanto, que as predições obtidas da aplicação das equações de

volume percentual são predominantemente por excesso ao contrário das da equação de perfil de tronco.

Apresentam-se em seguida as equações ajustadas com o conjunto de ajustamento e com o conjunto global dos dados:

$$\begin{aligned}
 VT &= 0.01177 + 0.000035319D^2H \\
 R &= 1 + [0.8084(H-h)^{2.44923}/H^{2.3744}] \\
 R &= \exp[-1.3923(d/D)^{4.4379}] \\
 d &= D[2400.49(1/(D^2H))((H-h)/H)^{74.9701} + 1.112139 \\
 &\quad ((H-h)/H)^{1.40299}]^{0.5}
 \end{aligned}$$

Observamos uma melhoria dos parâmetros de ajustamento e predição quando se procede ao ajustamento dos modelos eleitos ao conjunto de dados global. Saliente-se, no entanto, que os valores obtidos para as estimativas é semelhante em ambos os casos, o que demonstra a inexistência de colinearidade, tal como se pretendia.

O sistema de equações compatíveis ajustado foi desenvolvido por Demaerschalk (1973) e apresenta-se em anexo. A partir dos coeficientes de regressão da equação de volume eleita (a<sub>0</sub> e a<sub>1</sub>) determinaram-se os coeficientes da equação de perfil de tronco por

**Tabela 4.4 - Estatísticas - Equações de perfil de tronco**

MOD.	QMR	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> AJ	Fase de ajustamento					NCOND
				PRESS	APRESS	QMARP	MAR	FIVM	
(1)	2.4829	0.9772	0.9770	1519.4	611.6	1.0402	1.0208	149.2709	890.5717
(2)	3.4295	0.9683	0.9683	2034.1	703.7	1.1967	1.1908	6.7457	24.9425
(3)	6.1860	0.9427	0.9427	3648.6	1042.5	1.7729	1.7692	1.0000	1.0000
(4)	3.5138	0.9675	0.9675	2083.8	702.2	1.1942	1.1883	1.0026	1.1064
(5)	3.2114	0.9704	0.9703	1923.0	682.8	1.1612	1.1503	116.3713	709.0086
(6)	2.9043	0.9733	0.9731	1740.5	641.8	1.0916	1.0800	3.2998	11.9743
(7)	3.2893	0.9697	0.9696	1972.2	692.3	1.1774	1.1656	1075.3496	5152.0068
(8)	3.2969	0.9695	0.9695	1945.5	654.4	1.1130	1.1100	1.0000	1.0000
(10)	2.9229	0.9731	0.9729	1749.7	672.5	1.1436	1.1329	24.0801	122.0957
(11)	1.9303	0.9822	0.9821	1162.7	517.8	0.8806	0.8702	1583.0604	226392.6406
(12)	4.1733	0.9616	0.9614	2481.3	808.6	1.3752	1.3637	65.0972	393.7649
(13)	10.508	0.9034	0.9027	6267.7	1335.8	2.2717	2.2494	23.4575	102.4680
(14)	2.8256	0.9739	0.9738	1684.9	649.8	1.1051	1.0965	48.1442	203.7422
(16)	2.6174	0.9759	0.9758	1568.2	617.9	1.0508	1.0395	79.4398	385.1114

MOD.	Mrp	Fase de validação			
		MARp	MQRp	R <sup>2</sup> rp	Vrp
(1)	0.1250	0.9277	1.8403	0.9810	1.8279
(2)	0.2662	1.1095	2.7544	0.9721	2.6882
(3)	0.8077	1.6489	5.0865	0.9548	4.4419
(4)	0.2772	1.1198	2.9034	0.9706	2.8315
(5)	0.0816	1.1193	2.7399	0.9713	2.7380
(6)	0.1719	0.9571	2.0535	0.9789	2.0275
(7)	0.1567	1.1335	2.8744	0.9702	2.8547
(8)	0.2855	2.8417	2.8417	0.9701	2.7649
(10)	0.2558	1.0071	2.1195	0.9785	2.0577
(11)	0.0284	0.7794	1.4728	0.9850	1.4745
(12)	0.2109	1.3808	3.7695	0.9620	3.7315
(13)	-0.0199	2.1134	9.1798	0.8990	9.1954
(14)	0.2663	0.9859	2.1188	0.9786	2.0514
(16)	-15.1738	15.2581	589.0936	0.2084	359.4750

forma a assegurar a compatibilidade do sistema. Os parâmetros livres  $m_1$  e  $m_2$  foram determinados por regressão não linear.

Em seguida apresentam-se as equações do sistema ajustadas para o conjunto de dados global.

$$VT=0.01177+0.000035319D^2H$$

$$d=D[359215(1/(D^2H))((H-h)/H)^{2396}+1.132((H-h)/H)^{1518}]^{0.5}$$

O ajustamento da equação de perfil de tronco compatível revelou singularidade. Ao condicionar a equação de perfil de tronco de forma a assegurar a compatibilidade do sistema optimizámos o quadrado

médio dos resíduos em volume total com casca e suboptimizámos o quadrado médio dos resíduos em diâmetro do tronco com casca. Verificámos também que houve perda na capacidade de ajustamento e predição da equação de perfil de tronco quanto sujeita às restrições para se assegurar a compatibilidade do sistema.

Assim, realizou-se também o ajustamento do sistema condicionando os coeficientes da equação de volume ( $a_0$  e  $a_1$ ) a partir dos coeficientes da equação de perfil de tronco. Ou seja,

$$a_0=(\pi/40000)b_0/(b_1+1)$$

$$a_1=(\pi/40000)b^2/(b_3+1)$$

Em seguida apresentam-se as equações do sistema ajustadas para o conjunto de dados global.

$$VT=0.002482+0.00003635D^2H$$

$$d=D[2400.49(1/(D^2H))((H-h)/H)^{74.9701}+1.112139((H-h)/H)^{1.40299}]^{0.5}$$

Ao condicionar a equação de volume de forma a assegurar a compatibilidade do sistema optimizámos o quadrado médio dos resíduos em diâmetro do tronco com casca e sub-optimizámos o quadrado médio dos resíduos em volume total com casca.

**Tabela 4.5 - Estatísticas de predição - Equações de perfil de tronco**

Fase de validação - VT					Fase de validação - vm						
MOD.	Mrp	MARp	MQRp	R <sup>2</sup> rp	Vrp	MOD.	Mrp	MARp	MQRp	R <sup>2</sup> rp	Vrp
(1)	0.0018	0.0189	0.0009	0.9857	0.0010	(1)	0.0034	0.0143	0.0006	0.9889	0.0006
(2)	0.0014	0.0210	0.0011	0.9851	0.0011	(2)	-0.0062	0.0158	0.0007	0.9883	0.0007
(3)	0.0153	0.0226	0.0014	0.9783	0.0012	(3)	0.0007	0.0175	0.0010	0.9829	0.0010
(4)	-0.0005	0.0212	0.0011	0.9805	0.0011	(4)	-0.0006	0.0162	0.0007	0.9884	0.0007
(5)	-0.0019	0.0212	0.0015	0.9771	0.0015	(5)	0.0008	0.0161	0.0010	0.9818	0.0010
(6)	0.0020	0.0195	0.0011	0.9847	0.0011	(6)	0.0022	0.0147	0.0007	0.9882	0.0007
(7)	-0.0008	0.0233	0.0020	0.9697	0.0020	(7)	0.0019	0.0178	0.0013	0.9749	0.0013
(8)	0.0031	0.0013	0.0013	0.9802	0.0013	(8)	0.0040	0.0009	0.0009	0.9844	0.0008
(10)	0.0060	0.0206	0.0011	0.9847	0.0010	(10)	0.0034	0.0152	0.0007	0.9879	0.0007
(11)	-0.0007	0.0015	0.0000	0.9999	0.0000	(11)	0.0003	0.0071	0.0002	0.9973	0.0002
(12)	-0.0009	0.0225	0.0017	0.9721	0.0017	(12)	-0.0003	0.0172	0.0011	0.9790	0.0011
(13)	0.0125	0.0642	0.0148	0.8503	0.0148	(13)	-0.0044	0.0552	0.0154	0.8397	0.0154
(14)	0.0056	0.0201	0.0011	0.9847	0.0010	(14)	0.0038	0.0155	0.0007	0.9880	0.0007
16)	-1.1431	1.1431	5.7960	-0.0641	4.5517	(16)	-1.1115	1.1115	6.0380	-0.0589	4.8110

Verificámos que a capacidade preditiva da equação de volume não se modificou significativamente quando a equação de volume foi sujeita às restrições para se assegurar a compatibilidade do sistema.

É de recorrer ao sistema apenas quando se pretenda predições simultâneas de volumes mercantis com casca, volume total com casca e diâmetros do tronco com casca. Caso contrário, os modelos individuais estimam estas variáveis *per se* com maior eficiência.

## 5. Conclusões

Este estudo confirmou que as equações de perfil de tronco descritas sobre a forma de polinómios de grau elevado apresentam boa performance preditiva (p.e. equações (1) e (11)), conforme verificou Biging (1984), assim como, os polinómios segmentados (p.e. equação (10)) conforme observaram Byrne e Reed (1986). No entanto, estes modelos apresentam uma elevada colinearidade, característica esta indesejável. De facto, os polinómios apresentaram boa capacidade preditiva, embora também uma elevada colinearidade, motivo da sua exclusão.

Da análise de resíduos efectuada, confirmou-se a má capacidade preditiva e de ajustamento dos modelos que se apresentaram com singularidade, justificando a sua eliminação à partida.

Relativamente à hierarquização dos modelos obtida neste estudo é de realçar uma certa consonância comparativamente com outros estudos realizados por outros autores (Cao *et al.*, 1980; Biging, 1984; Tomé, 1991) e para outras espécies e regiões (respectivamente, *Pinus taeda* L., U.S.A., povoamentos mistos de coníferas, U.S.A.; *Eucalyptus globulus* Labill, Portugal). Este aspecto pode ser considerado de bastante interesse na medida em que em futuros estudos se poderá restringir grandemente o leque de modelos candidatos a analisar. Seleccionaram estes autores como modelos de equações de volume a equação (1), como modelos de equações de volume percentual de tipo *Rh* as equações (1) e (2) e de tipo *Rd* as equações (1) e (9) e como modelos de equações de perfil de tronco as equações (6), (10) e (14). É de referir, também, que alguns autores americanos usaram antes a equação de volume (7) em vez da (1) (p.c. Burkhardt, 1977; Deusen *et al.*, 1981).

No presente estudo, o principal motivo que levou à eleição dos modelos de equação de volume (7), de equação de volume percentual tipo *Rh* (1), de equação de volume percentual tipo *Rd* (4) e de equação de perfil de tronco (6), em detrimento de outros modelos atrás referidos, esteve na base dos seus níveis de colinearidade, aspecto que não foi tido em conta pelos autores estrangeiros.

## Referências bibliográficas

- Alegria, C. M. M. 1993. Predição do Volume Total, Volumes Mercantis, Perfil do Tronco e Sistemas de Equações Compatíveis para a *Pinus pinaster* Aiton no Distrito de Castelo Branco. Tese de Mestrado do Curso de Mestrado em Produção Vegetal do ano lectivo de 1989/90. ISA/UTL, Lisboa.
- Bennett, F. A. e B. F. Swindel. 1972. Taper Curves for Planted Slash Pine. *U.S.D.A. For. Serv., Res. Note SE-179*. (cit. in TOMÉ, J. A., 1991).
- Bennett, F. A., F. T. Lloyd, B. F. Swindel e B. W. Whitchoorne. 1978. Yields of veneer and associated products from unthinned, old-field plantations of slash pine in the north Florida and south Georgia flatwoods. *USDA For. Serv. Res. Pap. SE-176*. (cit. in Parresol, B. R. *et al.*, 1987).
- Biging, G. S. 1984. Taper Equations for Second-growth Mixed Conifers of Northern California. *For. Sci.*, 30: 1103-1117.
- Brister, G. H., J. L. Clutter e T. M. Skinner. 1980. Tree Volume and Taper Functions for Site-prepared Plantations of Slash Pine. *So. J. Appl. For.* 4 (3): 139-142. (cit. in Clutter, J. L. *et al.*, 1983).
- Bruce, D., R. O. Curtis e C. Vancoevering. 1968. Development of a System of Taper and Volume Tables for Red Alder. *For. Sci.* 14: 339-350. (cit. in Byrne J. C. e D. D. Reed. 1986; Clutter, J. L. *et al.*, 1983).
- Burkhardt, H. E. 1977. Cubic Foot Volume of Loblolly Pine to Any Merchantable Top Diameter. *So. J. Appl. For.* 1 (2): 7-9.
- Byrne J. C. e D. D. Reed. 1986. Complex Compatible Taper and Volume Estimation for Red and Loblolly Pine. *For. Sci.* 32 (2): 423-443.
- Cao, Q. V., H. E. Burkhardt e T. A. Max. 1980. Evaluation of Two Methods for Cubic Volume Prediction of Loblolly Pine to Any Merchantable Limit. *For. Sci.* 26: 71-80.
- Clutter, J. L. 1980. Development of Taper Functions from Variable-top Merchantable Volume Equations. *For. Sci.* 26: 117-120. (cit. in Clutter, J. L. *et al.*, 1983; Lynch, T. B., 1986).
- Clutter, J. L., J. C. Fortson, L. V. Pienaar, G. H. Brister e R. L. Bailey. 1983. *Timber Management. A Quantitative Approach*. John Wiley & Sons, New York.
- Demaerschalk, J. P. 1972. Converting Volume Equations to Compatible Taper Equations. *For. Sci.* 18: 241-245.
- Demaerschalk, J. P. 1973. Integrated Systems for the Estimation of Tree Taper and Volume. *Can. J. For. Res.* 3: 90-94.
- DGF. 1993. Áreas Florestais por Distritos. *Estudos e Informação* 303, Lisboa.
- Deusen, P. C. V., A. D. Sullivan e T. G. Matney. 1981. A Prediction System for Cubic Foot Volume of Loblolly Pine Applicable through Much of Its Range. *So. J. Appl. For.* 5: 186-189.
- Genstats Committe. 1987. *GENSTATS. Reference Manual*. Clarendon Press, Oxford.
- Goulding, C. J. e J. C. Murray. 1976. Polynomial Taper Equations that are Compatible with Tree Volume Equations. *N. Z. J. For. Sci.* 5: 313-322. (cit. in CAO, Q. V. *et al.*, 1980; BIGING, G. S., 1984).
- Draper, N. R. e H. Smith. 1981. *Applied Regression Analysis*. 2ª ed. John Wiley & Sons, Inc., New York.
- Honer, T. G. 1967. Standard Volume Tables and Merchantable Conversion Factors for the Commercial Tree species of Central and Eastern Canada. *For. Manage. Res. and Serv. Inst. Inform Rep. FMR-X-5*, 21p + Apêndices. Ottawa, Ontario. (cit. in CAO, Q. V. *et al.*, 1980).
- Kozak, A., D. D. Munro e J. H. G. Smith. 1969. Taper Functions and their Application in Forest Inventory. *For. Chron.* 45: 278-283.
- Loetsch, F., F. Zohrer e K. B. Haller. 1973. *Forest Inventory*. Vol. II. BLV Verlagsgesellschaft mbH, München.
- Matney, T. G. e A. D. Sullivan. 1980. Estimation of merchantable volume and height of natural grown slash pine trees. *Arid*

Land Resources Inventories Workshop, La Paz, Mexico, November 30-December 6, 1980. (cit. in PARRESOL, B. R. et al., 1987).

Max, T. A., H. E. Burkhart. 1976. Segmented Polynomial Regression Applied to Taper Equations. *For. Sci.* 22: 283-289. (cit. in CAO, Q. V. et al., 1980; BIGING, G. S., 1984).

Meyer, H. A. 1953. *Forest Mensuration*. Pennsylvania, 357 pp. (cit. in Loetsch, F. et al., 1973).

Myers, R. H. 1986. *Classical and Modern Regression With Applications*. 2ªed. PWS-KEN Publishing Company, Boston.

Naslung, M. 1947. Functions and Tables for Computing the Cubic Volume of Standing Trees. *Medd. Stat. Skogsforskn.* 36, 3: 1-53. Swed. (cit. in Loetsch, F. et al., 1973).

Naslung, M. e E. Hagberg. 1950. Volume Tables for Pine, Spruce and Birch in Southern Sweden. *Stat. Skogsforskn. Inst.*, 200 pp. Sweden. (cit. in Loetsch, F. et al., 1973).

Naslung, M. e E. Hagberg. 1951. Volume Tables for Pine, Spruce and Birch in Northern Sweden. *Stat. Skogsforskn. Inst.*, 153 pp. Sweden. (cit. in Loetsch, F. et al., 1973).

Ogaya, N. 1968. *Kubierungsformeln und Bestandesmassenformeln*. Thesis, univ. Freiburg i. Br., 85 pp. (cit. in Loetsch, F. et al., 1973).

Ormerod, D. W. 1973. A Simple Bole Model. *For. Chron.* 49: 136-138.

Parresol, B. R., J. E. Hotvedt e Q. V. CAO. 1987. A Volume and Taper Prediction System for Bald Cypress. *Can. J. For. Res.* 17: 250-259.

Reed D. D. e E. J. Green. 1984. Compatible Stem Taper and Volume Ratio Equations. *For. Sci.* 30: 977-990. (cit. in Tome, J. A., 1991; Byrne J. C. e D. D. Reed., 1986; Lynch, T. B., 1986).

Schumacher F. X. e F. Hall. 1933. Logarithmic Expression of Timber-tree Volume. *J. Ag. Res.* 47: 719-734. (cit. in Clutter, J. L. et al., 1983).

Spurr, H. 1952. *Forest Inventory*. Ronald Press, New York. (cit. in Loetsch, F. et al., 1973).

Stoate T. N. 1945. The Use of a Volume Equation in Pine Stands. *Aust. For.* 9: 48-52. (cit. in Loetsch, F. et al., 1973).

Takata, K. 1958. Construction of Universal Diameter-Height-Curves. *Jo. Jap. For. Soc.* 40, 1: 1-6. Jap. (cit. in Loetsch, F. et al., 1973).

Takata, K. 1958. On the Estimation of Mean Stand Height by Strand's Method. *Jo. Jap. For. Soc.* 40, 7: 305-307. Jap. (cit. in Loetsch, F. et al., 1973).

Tomé, J. A. 1991. Estimacão do Volume Total, de Volumes

Mercantis e Modelaco do Perfil do Tronco em *Eucalyptus globulus* Labill. Tese de Mestrado. ISA-UTL, Lisboa.

Tomé, M. M. 1989. Modelaco do Crescimento da rvore Individual em povoamentos de *Eucalyptus globulus* Labill. (1ª rotao) Região Centro Portugal. Tese de Doutoramento. ISA-UTL, Lisboa.

## Anexo

### Sistema de Equaces Compatíveis (Demaerschalk, 1973)

A partir da equaco de volume (7) introduziu as restries algébricas aos parâmetros da equaco de perfil de tronco (6) de forma a que esta fosse compatível com a equaco de volume:

Equaco de volume (eq.(7))

$$VT = a_0 + a_1 D^2 H$$

Equaco de perfil de tronco (eq.(6))

$$d^2/D^2 = b_1 [(H-h)^{b_2}/DH^{b_2+1}] + b_3 [(H-h)/H] b^4$$

onde,

$$b_1 = a_0(m_1+1)/(11/40000)$$

$$b_2 = m_1$$

$$b_3 = a_1(m_2+1)/(11/40000)$$

$$b_4 = m_2$$

Segundo Tomé (1991), os parmetros  $m_1$  e  $m_2$  no definidos, chamados parmetros livres, podem ser determinados através do método dos mínimos quadrados (e.g. regressão no linear).

\*Departamento Florestal, Instituto Politécnico de Castelo Branco - Escola Superior Agrária

# Síndrome de mortalidad neonatal en cabritos: datos para una primera aproximación al proceso

Joaquín M. Rey Pérez \*



## 1. Introducción

En relación con una serie de cambios acontecidos en los modelos tradicionales de explotación, durante estos últimos años ha venido presentándose una serie de patologías que afectan principalmente a los rumiantes neonatos.

Dentro de estos procesos, cabe señalar el síndrome de mortalidad neonatal de los pequeños rumiantes, conocido popularmente como «borracheira de los cabritos». Es este un síndrome que afecta a los pequeños rumiantes, y de forma especialmente grave a los cabritos durante los 10 primeros días de vida, caracterizado clínicamente por el desarrollo de un importante cuadro septicémico y/o toxémico, acompañado o no de diarrea, que los conduce a la muerte en un corto periodo de tiempo.

Este proceso, considerado en un principio de etiología sencilla, ha venido a presentarse con el tiempo más complejo de lo que cabría suponer, mostrando en muchos de los casos etiologías multifactoriales con múltiples interrelaciones entre los elementos que las determinan. Dentro los factores que pueden estar involucrados en la aparición de la enfermedad, se encuentran alteraciones de índole alimenticio, inmunitario, o higiénico, y secundariamente, factores de tipo microbiológico o parasitario.

Con el objeto de contribuir en la medida de lo posible al mejor conocimiento del proceso, hemos planteado los siguientes objetivos en el transcurso de nuestro trabajo:

- 1 -cuantificar económicamente las pérdidas anuales producidas en Extremadura por la enfermedad.
- 2 -evidenciar la relación existente entre la instauración del síndrome y las distintas formas de explotación y manejo presentes en Extremadura.
- 3 -caracterizar clínicamente y lesionalmente el proceso.
- 4 -identificar los distintos agentes etiológicos implicados.

## 2. Repercusiones económicas

La importancia actual de este proceso en Extremadura es enorme, al constituir una de las principales causas de pérdidas económicas en la especie caprina. Estas pérdidas están en relación con las bajas producidas en los animales recién nacidos durante la fase septicémica, a las que hay que añadir las derivadas de aquellos otros animales que, habiendo superado esta primera fase, sufren un importante retraso en el crecimiento y en los índices de conversión. Por otra parte, no podemos olvidarnos de las pérdidas indirectas relacionadas con los gastos en medicinas y honorarios profesionales.

Una primera aproximación a las pérdidas anuales ocasionadas en Extremadura por este proceso puede ser la siguiente:

### • Datos a tener en cuenta:

- a) - nº de reproductoras en Extremadura durante 1990 (\*) = 354139

- b) - hembras no preñadas o que desarrollan abortos de distinta etiología (\*\*) = 13% del total de reproductoras = 46038
- c) - prolificidad media en Extremadura (\*\*) = 1,35
- d) - nº total de cabritos nacidos = (a - b) x c = 415936
- e) - morbilidad de la enfermedad (\*\*\*) = 63,2% = 268872 cabritos enfermos
- f) - mortalidad de la enfermedad (\*\*\*) = 35,2% = 146409 cabritos muertos
- g) - precio medio del Kgr. de cabrito (Mercado Talavera, 1990) = 500 pts
- h) - tiempo medio de recuperación del cabrito diarreico (\*\*\*) = 15 días
- i) - precio medio de la leche (Dependiendo de graduación) (\*\*) = 68 pts./l.
- j) - consumo de leche por cada cabrito al día (\*\*) = 1,022 l.
- k) - peso a la venta (\*\*) = 9,5 Kgr.

**Fuentes:**

- (\*) = La Agricultura y la Ganadería Extremeñas en 1990. Facultad de Ciencias Económicas y Empresariales. Universidad de Extremadura. Caja de Badajoz.
- (\*\*) = M. González. Tesis Doctoral.
- (\*\*\*) = Datos propios.

• **Valoración:**

- 1) pérdidas derivadas de las muertes producidas en los animales recién nacidos.  
 $(N^{\circ} \text{ de animales muertos}) \times (\text{Precio medio del Kgr}) \times (\text{Peso a la venta}) = (146409) \times (500) \times (9.5) = 695.442.750$
- 2) pérdidas derivadas del retraso en el destete del cabrito sobreviviente.  
 $N^{\circ} \text{ de cabritos que sobreviven} = (N^{\circ} \text{ de enfermos}) - (N^{\circ} \text{ de muertos}) = 268872 - 146405 = 116463.$   
 $\text{Pérdidas} = (N^{\circ} \text{ de sobrevivientes}) \times (\text{Tiempo de recuperación}) \times (\text{Leche consumida}) \times (\text{Precio de la leche}) = (116463) \times (15) \times (1,022) \times (68) = 121.404.647$
- 3) gastos en medicinas y honorarios profesionales.  
 $(N^{\circ} \text{ cabritos enfermos}) \times (\text{Gasto por cabrito}) = (268872) \times (100) = 26.887.200$

TOTAL = 695442750 + 121404647 + 26887100 = 843.734.497 pts./ año

### 3. Características clínicas

Se ven afectados animales de entre 4-10 días de vida que, dependiendo del estado inmunitario presente a nivel local y general, desarrollarán una forma u otra de la enfermedad.

Atendiendo al curso del proceso, cabe distinguir dos formas de presentación:

#### a) forma aguda

Normalmente asociada con animales que han tenido un insuficiente aporte de inmunoglobulinas durante las primeras 24 horas de vida, o bien éstas no han podido ser absorbidas adecuadamente. Así, los animales afectados por este proceso, al carecer de un adecuado nivel inmunitario general, son proclives al padecimiento de procesos de tipo septicémico. Es la forma más frecuente y grave de presentación.

En un primer momento, normalmente entre el 3er y 4º día de vida, los animales se encuentran deprimidos y dejan de mamar (anorexia). En el transcurso de la exploración clínica se hacen evidentes síntomas tales como taquicardia y taquipnea, comenzando a presentarse un importante síndrome febril. La distensión abdominal es aparente, manifestando el animal claros síntomas de dolor a la palpación.



Una vez transcurrida esta primera fase, el animal empieza a tambalearse, se arrodilla y acaba postrado en decúbito esternal. Adopta entonces una postura de autoauscultación, no siendo infrecuente en este momento el decúbito lateral con parálisis flácida generalizada, pudiéndose desarrollar en casos esporádicos convulsiones y opistótonos.

En un plazo no superior a 3-4 días desde el comienzo del proceso, el animal acaba muriendo. La mortalidad es alta, y el escaso número de animales que consiguen sobrevivir desarrollan la forma subaguda.

#### b) forma subaguda

La fiebre es constante al comienzo del proceso, aunque conforme evoluciona éste, la temperatura alcanza valores francamente hipotérmicos.

El síntoma más constante en estos animales es la presencia de diarrea. En el transcurso de ella, las heces eliminadas son de consistencia pastosa y de color amarillo-verdoso.

Los animales afectados presentan una típica postura antiálgica consistente en la aproximación bajo el cuerpo de las cuatro extremidades, encogimiento del vientre y cifosis dorsal.





El desarrollo completo del proceso puede durar entre 7-10 días. Esta forma de la enfermedad es bastante menos letal que la descrita con anterioridad.



#### 4. Características lesionales

##### Estómago

Las lesiones en los compartimentos gástricos quedan restringidas de forma exclusiva al abomaso. Este órgano presenta en la mayoría de los casos una considerable distensión y un notable adelgazamiento parietal, haciéndose evidentes desde el exterior gran número de hemorragias en mucosa.

Al abrir el órgano, es característica la presencia



en la luz abomasal del contenido lácteo sin digerir, de intenso olor agrio o putrefacto, que al ser exteriorizado arrastra consigo parte de la mucosa adherida.

Dependiendo de la evolución del proceso, el tipo de inflamación desarrollada puede oscilar entre una simple gastritis catarral, al comienzo del proceso, hasta una mucho más frecuente gastritis necrótico-hemorrágica, con abundante presencia de petequias y equimosis repartidas por la práctica totalidad de la pared abomasal.

##### Intestino

El contenido de las asas intestinales es de consistencia pastosa y color blanco-amarillento, tornándose líquido y de color oscuro conforme avanzamos en sentido caudal. Es frecuente la presencia de gas en algunas asas.

Las alteraciones intestinales están representadas por una viva congestión general, más intensa en tramos duodenales y yeyunales, así como por el éstasis sanguíneo de los vasos mesentéricos y portales.

Esta congestión, ligera en un primer momento, evoluciona rápidamente hasta una enteritis hemorrágica grave, con pérdida final del estrato mucoso.

##### Ganglios linfáticos mesentéricos

En la mayoría de los casos se ha observado una enorme hiperplasia linfoide generalizada de la cadena ganglionar mesentérica, con fusión de los nódulos linfoides implicados. Este proceso afecta principalmente a los tramos finales de la cadena ganglionar (yeyuno e íleon), haciéndose patente al corte la presencia de líquido en la médula del ganglio.



## SNC

Puede hacerse evidente una congestión con abundante exudado mucoso, que en ocasiones puede llegar a mucopurulento, circunscrito a los espacios subaracnoideos y surcos cerebrales.

## 5. Características microbiológicas

### Escherichia coli

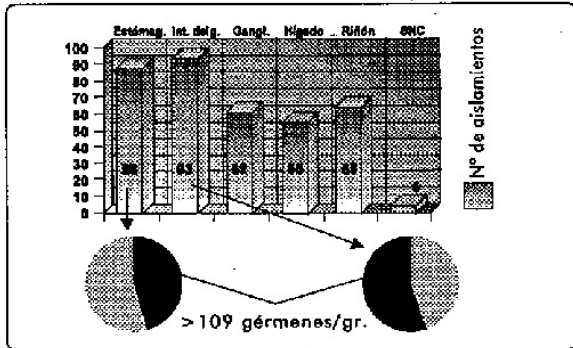


Figura 1 - Nº total de aislamientos de *E. coli* realizadas en los distintos órganos

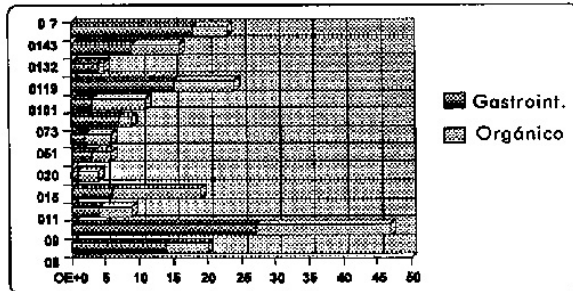


Figura 2 - Frecuencia absoluta de presentación de los serotipos de *E. coli* en los distintos órganos

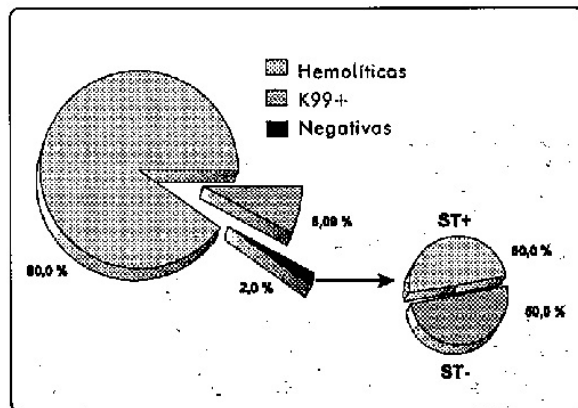


Figura 3 - Principales características de las cepas aisladas

Tabela 1 - Serotipos de *E. coli* aisladas y localización orgánica de los mismos.

SEROTIPO	LOCALIZACION ORGANICA
08: K+: H-	Yeyuno
08: K+: H9	Hígado
09: K+: H-	Estómago, yeyuno, ganglios mesent. e hígado
09: K32: H-	Estómago, yeyuno, ganglios mesent. e hígado
011: K98: H15	Estómago e hígado
015: K54,96,10: H1 (#)	Estómago, yeyuno, ganglios mesent. e hígado
020: K104: H30	Yeyuno y riñón
051: K-: H27	Yeyuno y riñón
073: K53,93: H46	Riñón
0101: K36: H9	Yeyuno e hígado.
0119: K-: H4	Hígado
0132: K-: H28	Estómago e hígado
0138: K-: H28	Estómago y yeyuno
0143: K-: H4	Estómago, duodeno y riñón
0?: K37: H-	Yeyuno
0?: K?: H3 1	Hígado
0?: K103: H9	Yeyuno
0? K-: H25	Gangl. mesent.

(#) La combinación K54,96,10, es la primera vez que se establece.

### Otros enteropatógenos

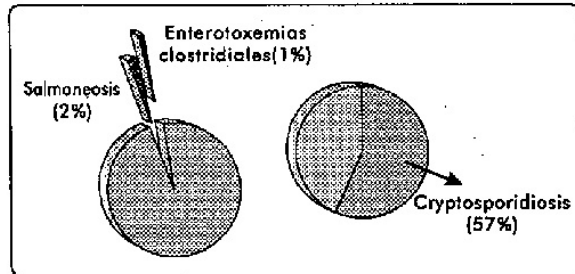
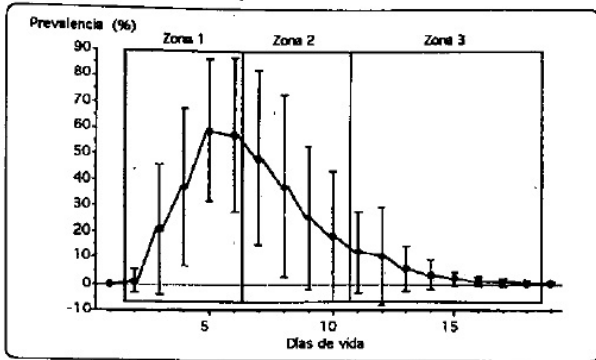


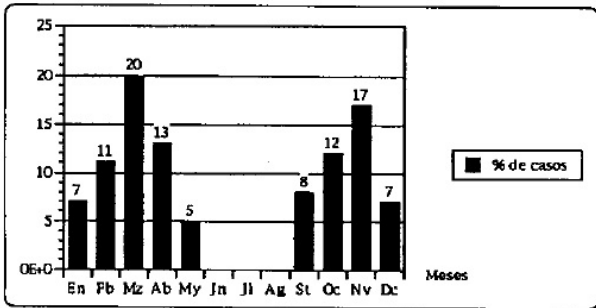
Figura 4 - Porcentaje de presentación de otros enteropatógenos en el proceso investigado

## 6. Características zootécnicas y epidemiológicas

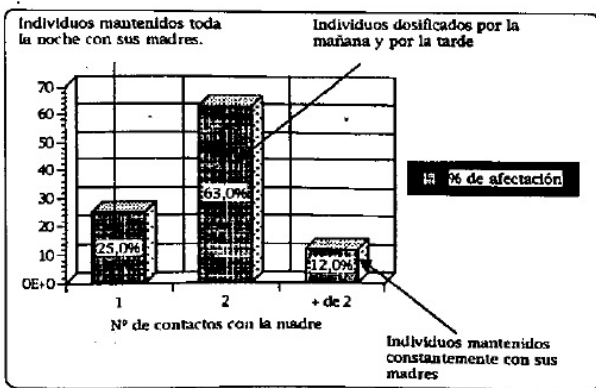
A partir de las observaciones realizadas, se ha podido constatar que la presencia de la enfermedad en un determinado colectivo se encuentra en relación directa con la higiene general del mismo. En un principio la enfermedad se origina en un número reducido de animales, a partir de los cuales, y siguiendo una progresión aritmética, se ve afectada la totalidad del colectivo en un corto periodo de tiempo. Es pues importantísimo el efecto multiplicador experimentado por el germen a lo largo del tiempo, siendo las heces de los animales enfermos las principales responsables de la diseminación del proceso en un determinado colectivo.



En el transcurso de la investigación se ha constatado una mayor incidencia del proceso en la paridera que coincide con los meses de Marzo y Abril (56% de los casos), en detrimento de la desarrollada en los meses otoñales, si bien estos índices parecen equilibrarse en los últimos años, no desarrollándose diferencias significativas.

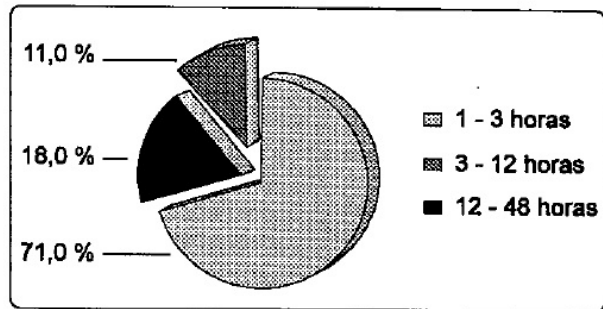


Así mismo, la presentación de la enfermedad parece encontrarse en relación inversa al número de tomas de leche realizadas por cada animal a lo largo de un día. La mayor incidencia se presenta en animales alimentados dos veces al día, en los que el intervalo entre toma y toma oscila entre 9-12 horas, mientras que los índices menores se dan en aquellos individuos mantenidos "teteando" pequeñas cantidades de leche durante toda la jornada.



Nos ha llamado la atención poderosamente el estrecho vínculo existente entre momento y persistencia de la primera dosificación calostrada, con la aparición y

posterior curso de la enfermedad en un determinado animal. De esta forma, los animales más gravemente afectados serán aquellos que por alguna circunstancia no hayan podido acceder libremente a los calostros durante los 2 primeros días de vida, desarrollándose en ellos frecuentemente cuadros septicémicos. Más del 71% del total de casos estudiados, se corresponden con individuos que como máximo han sido mantenidos 1-3 horas con la madre después del nacimiento, pasando inmediatamente después al chivero.

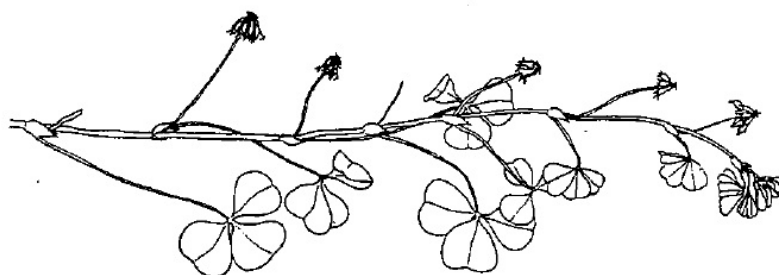


Los cuadros entéricos son más frecuentes en animales que, habiendo recibido calostros, no han sido dosificados de forma adecuada, o no durante el tiempo necesario. En aquellas explotaciones donde existe la costumbre de administrar calostros conservados a lo largo de la primera semana de vida, disminuyen drásticamente todos los problemas entéricos.

\* Catedra de Patología Infecciosa y Epidemiología. Facultad de Veterinaria. Universidad de Extremadura - 10071 Cáceres. España

# O efeito da *Cymadothea trifolii* Wolf na produtividade de 4 espécies de trevo

Pedro Sequeira (\*)



## Resumo

O efeito da doença "sooty blotch ou black blotch", causado pelo fungo *Cymadothea trifolii* Wolf (estado conidial: *Polythrincium trifolii* Kunze), na produtividade, foi investigado em quatro espécies de trevo: trevo morango (*Trifolium fragiferam* L. cv. palestine), trevo dos prados (*Trifolium pratense* L. cv. quinquelt), trevo branco (*Trifolium repens* L.) e *Trifolium glomeratum* L.

Foi encontrada variação significativa no trevo dos prados e trevo morango; baixa variação no trevo branco e nenhuma variação na produtividade no *T. glomeratum* L.

## 1. Introdução

O fungo causador da doença conhecida por "sooty blotch ou black blotch" que literalmente poderemos traduzir por borrão negro está largamente espalhado na América do Norte, Europa e Austrália e, aparentemente, como Wolf (1935) chama atenção, é capaz de atacar a maioria de espécies de *Trifolium* sp.

Em Portugal podem-se encontrar registos que nos dizem que o fungo no seu estado imperfeito, *Polythrincium trifolii* Kunze e Schm. foi identificado pela 1ª vez em Portugal em folhas de espécies de trevo em Colares, Sintra (Câmara, 1913), tendo sido posteriormente referenciado em folhas de *Trifolium incarnatum* L. (Câmara, 1928), de *T. repens* L. (Câmara e Luz, 1939) de *T. alexandrinum* e *T. repens* L. no Algarve (Câmara, 1947), *T. nigrescens* Viv. na Cova da Piedade (Dias e Câmara, 1953), *Trifolii incarnatum* L. na Tapada da Ajuda (Costa, 1959), *Trifolii tomentosum* L. em Carcavelos (Costa, 1962), *Trifolii resupinatum* L. na Serra da Arrábida e *Trifolii tomentosum* L. em Castelo Branco (Dias e Lucas, 1962), *Trifolii pratense* L. no Ribatejo (Sousa e Lucas, 1972) e *Trifolii incarnatum* L. cv. Dixie no Alentejo (Sousa e Lucas, 1974).

Na Austrália onde este trabalho foi efectuado, identificou-se o fungo pela primeira vez no estado de Nova Gales do Sul em folhas de *Trifolium incarnatum* L. (Butler, 1953).

A doença (black blotch) tem sido considerada de pouca importância económica nas pastagens à base de trevos, embora em caso de severo ataque possa causar a queda das folhas (Elliot 1952; Butler 1953).

Mais recentemente aumentou o interesse sobre a doença (Black blotch) devido a trabalhos de investigação realizados em Inglaterra e na Nova Zelândia que indicam que o fungo *Cymadothea trifolii* Wolf (forma perfeita), *Polythrincium trifolii* Kunze (forma imperfeita),

**Tabela 2** - Perda em matéria seca (%).

Tratamento	Taxa de infecção	Espécies	Total	Folha	Caule	Raiz
Alto	0	<i>T. repens</i>	4.00	1.0	5.5	12
	12	<i>T. fragiferum</i>	10.91	5.26	11.76	15.79
	36	<i>T. pratense</i>	24.00	23.53	17.65	31.25
Baixo	0	<i>T. glomeratum</i>	0.00	1.00	6.00	0.00
	0	<i>T. repens</i>	3.00	1.00	6.00	9.00
	5	<i>T. fragiferum</i>	5.17	5.26	0.00	15.78
	12	<i>T. pratense</i>	5.09	5.00	5.26	5.00
	0	<i>T. glomeratum</i>	0.00	3.00	1.00	0.00

peso seco (Tab. 2). Poder-se-á dizer que foram conseguidos baixos níveis de infecção para essas duas últimas espécies de trevo, mas isso poderá ser explicado pela impossibilidade de obter medições contínuas, visto todos os tratamentos terem sido colhidos ao mesmo tempo. Contudo, como frisa Burdon (1980), os agentes patogénicos podem ter um efeito significativo na biologia da população dos seus hospedeiros, mesmo em situações onde a doença não aparenta ser causadora de muitos danos.

Os resultados obtidos permitem deduzir que se registou pequena ou nenhuma infecção para o *Trifolium repens* L., parecendo assim existir uma certa contradição, já que o fungo foi isolado desta mesma espécie. Provavelmente necessita-se de mais tempo para se obter infecção no trevo branco, do que em outras espécies de trevo, mesmo com a ajuda das bactérias (*Pseudomonas* sp.), encontradas e usadas no ensaio. Miller e Wells (1983), descobriram que uma bactéria de crescimento lento, a *Pseudomonas andropogonis* pode atacar o trevo branco. Contudo, esses autores não se referem à subsequente colonização pelo fungo *Cymadothea trifolii* Wolf das lesões causadas por outra espécie de *Pseudomonas*, a *Pseudomonas syringae*.

Perante isto poderemos questionar a necessidade de uma bactéria específica para dar o mesmo tipo de comportamento

**Tabela 3** - Médias de peso seco (g).

Espécie	Parâmetro	Taxa de infecção c/ tratamento			F-test
		Alto	Baixa	Controlo	
<i>T. repens</i>	Folha	0.2055ns	0.2058ns	0.2080ns	0.38
	Caule	0.1964*	0.1945*	0.2072*	4.50
	Raiz	0.1953*	0.2013*	0.2200*	25.22
	TOTAL	0.5972	0.6015	0.6255	8.73
<i>T. fragiferum</i>	Folha	0.1928*	0.1913*	0.2020*	10.48
	Caule	0.1710*	0.1928*	0.1868*	25.38
	Raiz	0.1915**	0.1903**	0.2217**	127.59
	TOTAL	0.5553**	0.5743**	0.6105**	56.74
<i>T. pratense</i>	Folha	0.1705ns	0.2005*	0.2145**	49.73
	Caule	0.1720ns	0.1823*	0.1995**	58.16
	Raiz	0.1577ns	0.2003*	0.2050**	82.55
	TOTAL	0.5003ns	0.5830*	0.6190**	180.83
<i>T. glomeratum</i>	Folha	0.2080ns	0.2023ns	0.2100ns	1.69
	Caule	0.1958ns	0.2058*	0.2085*	6.60
	Raiz	0.2033ns	0.1885*	0.1875*	10.69
	TOTAL	0.6070ns	0.5965ns	0.6060ns	1.92

ns: não significativo ao nível  $P < 0.05$ ; \* significativo ao nível  $P < 0.05$ , \*\* significativo ao nível  $P < 0.01$

à *Cymadothea trifolii* Wolf no trevo branco. Por outro lado, quanto ao trevo dos prados (*T. pratense* L.) conseguiu-se infecção, tendo sido encontradas diferenças significativas, o que está de acordo com o trabalho de Oxtoby e Lelliot (1966). O *Trifolium fragiferum* L. segue o mesmo padrão que o trevo dos prados, embora o nível de infecção seja menor e a perda em matéria seca também seja menor. No que diz respeito ao *E. glomeratum* L. os sintomas de infecção não foram muito evidentes, o que poderá ser explicado pela não susceptibilidade desta espécie de trevo ao fungo. De facto não encontramos na literatura publicada até hoje registos de

ataque deste agente patogénico a esta espécie de trevo.

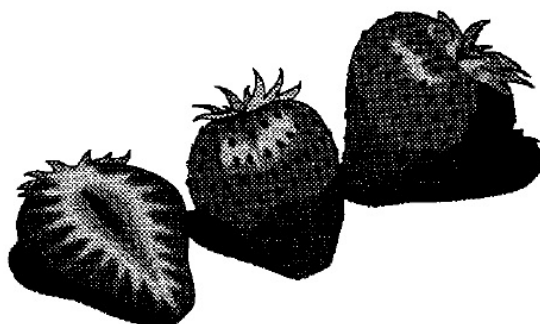
## Referências bibliográficas

- Bayliss-Elliot, J.S.; Stanfield, O.P. (1924) Life history of *Polythrincium trifolii* Kunze. *Trans. Brit. Myco Society*, 9:218-228.
- Burdon, J. J. (1980) Variation in disease-resistance within population of *Trifolium repens* L. *Journal of Ecology*, 68:737-744.
- Butler, F. C. (1953) Anthracnose and sooty blotch of red clover. *Agric. Gaz. N.S. W.E. Australia*, 64:368-386.
- Câmara, S.M. (1913) *Mycoflora Lusitaniae*, V, 63.
- Câmara, S.M. (1928) *Mycoflora Lusitaniae*, VII, 26.
- Câmara, S.M. e Luz, G.C. (1939) *Mycetes Aliquot Lusitaniae*, II.
- Câmara, S.M. (1947) *Mycetes Aliquot Lusitaniae*, III.
- Camp, R. R.; Whittingham, W. F. (1972) Host-parasite relationships in sooty blotch disease of white clover. *American Journal of Botany*, 59: 1057- 1067.
- Costa, P.M. (1959) *Species Aliquae Mycologicae Lusitaniae* V, pág. 229. Separata "Portugaliae Acta Biol. (B)", 6(3).
- Costa, P.M.E. (1962) *Species Aliquae Mycologicae Lusitaniae* VI. Separata "Portugaliae Acta Biol. (B)", 7(4): 28.
- Dias, M.R. e Câmara, S.M. *Fungi Lusitaniae* IV.
- Dias, S.R.M. e Lucas, T.M. (1962) *Fungi Lusitaniae* VI. Separata de *Agronomia Lusitana* 24(1).
- Elliot, E. S. (1952) Diseases, insects, and other factors in relation to red clover failure in West Virginia. *Bull. W. Va Agri. Exp. State*, 31: 286.
- Frax, L. C. (1967) New hosts of black blotch of clover in Britain. *Trans. Brit. Mycology Society*, 50(1):155.
- Gitaatix7 R. D.; Miller, J.; Wells, H. D. (1983) Bacteria leaf spot of white clover in Georgia. *Plant Disease*, 67:913-914.
- Lewis, G. C.; Thomas, B. J. (1991) Incidence and severity of pest and disease damage to white clover foliage. *Annals of Applied Biology*, 118(1): 1-8.
- Newton, J. E.; Betts, J. E.; Draine, H. M.; Saba, N. (1970) White clover research. *Britain Grassland Society*, 309.
- Oxtoby, J.; Lelliot, R. A. (1966) Bacterial leaf spot of red clover, caused by *Pseudomonas syringae*, in Great Britain. *Plant Pathology*, 15: 129-130.
- Sousa Dias, M.R. (1972) *Fungi Lusitaniae* XXIII. Separata de *Agronomia Lusitana*, 33: 180-181.
- Sousa Dias, M.R. e Lucas, M.R. (1974) *Fungi Lusitaniae* XXIV. Separata de *Agronomia Lusitana*, 35(2): 142.
- Wolf, F. A. (1935) Morphology of *Polythrincium* causing sooty blotch of clover. *Mycologica*, 27:58-73.
- Wong, E.; Flux, D. S.; Latch, G. C. M. (1971) The oestrogenic activity of white clover (*Trifolium repens* L.). *New Zealand Journal of Agri. Research*, 14:639-645.

\* Eng. Agrónomo. Assistente da ESACB

# Influência do tipo de polietileno utilizado em cobertura do solo de morangueiro, cv. Oso Grande

Fernanda Delgado (\*)  
Ana Isabel Matias (\*\*)



## Resumo

Uma das técnicas culturais imprescindíveis na cultura do morangueiro é a cobertura de solo ou "paillage". O polietileno preto (PEP) foi nos últimos anos o mais utilizado, tendo sido mais recentemente introduzido o polietileno castanho (PEC), colocados no solo antes, durante ou após a plantação. Os estudos efectuados incidiram ao nível da caracterização da cv. Oso Grande em termos de fenologia, precocidade, qualidade e homogeneidade produtiva, com a utilização de PEP e PEC em cobertura do solo, de forma a encontrar aquele originava melhores condições em termos de temperaturas óptimas de produção. Os ensaios foram efectuados em estufa, no concelho de Odemira, na época de Outono/Inverno. O PEC mostrou-se vantajoso na maioria dos aspectos observados: precocidade de produção, nº de frutos colhidos, produção total e produção comercial.

## 1. Introdução

Até à campanha de 90/91, a cv. californiana Oso Grande nunca tinha sido utilizada no nosso País. Não se conheciam pormenores da sua morfologia e da sua adaptabilidade às condições edafo-climáticas portuguesas. Sabia-se sim, que se tratava de uma cultivar mais precoce, do que todas as outras cultivares normalmente utilizadas em estudos produtivos nacionais.

Este trabalho pretendeu iniciar estudos com esta cultivar introduzindo à partida a técnica da "paillage", fundamental na cultura precoce do morangueiro.

Foi também com este trabalho que se introduziu um novo tipo de polietileno (PE) de cor castanha (PEC), o qual se comparou com o polietileno preto (PEP), vulgarmente utilizado na produção de morango. As razões para a utilização do PEC foram: originar desvios médios de temperatura em relação ao solo nu superiores ao PEP e, o facto de exibir uma óptima adaptação a culturas semiprecoces em túnel e campo aberto.

Os objectivos do ensaio incidiram em estudos de caracterização da cv. Oso Grande em termos de fenologia, precocidade, qualidade, quantidade e homogeneidade produtiva, com a utilização do PEP e PEC em cobertura do solo, de forma a encontrar o que originava melhores condições em termos de temperaturas óptimas de produção.

Os ensaios foram efectuados em estufa, no concelho de Odemira na época de Outono/Inverno.

**Tabela 1** - Tipos de "Paillage"

Tipo de polietileno	Propriedades inerentes da radiação		Acção sobre a fotossíntese	Desvios médios de temp. em relação ao solo nu	Propriedades mecânicas e durabilidade	Propriedades agronómicas		Destino em função das técnicas culturais
	Absorção pelo solo	Difusão pelo solo				Precocidade	Efeito herbicida	
Preto	Fraca	Fraca	Não	+3 a +4°C	Muito boas	Fraca	Bom	Culturas de estação em campo aberto
Castanho	Boa	Fraca	Não	+4 a +5°C	Médias	Boa	Bom	Culturas semi-precoces em túnel e campo aberto

## 2. Material e métodos

### 2.1. Material vegetal

Plantas frescas da cv. Oso Grande obtidas em viveiro de baixa altitudes tipo F3.

### 2.2. Material auxiliar

- Termohigrógrafo.
- Termómetros de solo, à profundidade de 15cm.
- Balança e régua.
- Polietileno castanho (PEC) de 30 µm de espessura e polietileno preto (PEP) de 50 µm de espessura, ambos com uma largura de 1,80 µm.

A plantação foi efectuada no dia 5 de Outubro de 1990. Os estolhos apresentavam-se com as raízes cortadas, com um comprimento de cerca de 7 cm e de duas a três folhas. O sistema de plantação foi manual, o compasso de 28 cm na linha e 25 cm na entrelinha, com quatro linhas de plantação dispostas em quincôncio.

Para cada modalidade de plástico (PEC e PEP) observaram-se 100 plantas com cinco repetições, distribuídas aleatoriamente ao longo da estufa.

A "paillage" foi colocada manualmente após a plantação, no dia 25 de Novembro de 1990.

As observações efectuadas incidiram sobre:

- morfologia e caracterização da cultivar Oso Grande.
- número de frutos colhidos.
- produção comercializável.

## 3. Resultados e Discussão

### 3.1. Morfologia e caracterização da cv. Oso Grande

**Planta:** grande desenvolvimento vegetativo, porte denso. Folhas fortes de verde intenso. Pedúnculos

**Tabela 2** - Período de colocação da "Paillage"

Período de Paillage relativo à plantação	Vantagens	Inconvenientes
Antes	Preparação do solo na altura desejada Aquecimento do solo	Plantação manual
Simultânea	Ganho de tempo Possibilidade de mecanização da plantação	Necessita um bom controlo de irrigação no início Risco de infestantes desde a plantação
Depois	Melhor eficiência de irrigação no início Possibilidade de mecanizar a plantação Assegura um solo estável	Controlo de infestantes

Fonte: Roudillac et al, 1987.

grandes. Flores bem visíveis de porte erecto. Produtividade elevada.

**Fruto:** geralmente cónico alongado, e por vezes arredondado. Cor vermelho intenso, muito brilhante. Bom aroma. Resistente ao transporte. Frutos grandes e bonitos.

**Colheita:** precoce.

**Características particulares:** adapta-se bem a culturas em túneis pequenos. Resistente a doenças e pragas.

### 3.2. Número de frutos colhidos e produção comercializável

**Frutos colhidos:** entende-se a totalidade dos frutos, tendo sido rejeitada uma parte como deformados e refugo.

**Frutos deformados:** são aqueles que apresentam resultados de uma deficiente polinização.

**Frutos de refugo:** não são comercializáveis apresentando danificações da epiderme (rachados, podres, queimados do sol) ou do cálice (sem cálice, cálice seco).

**Produção comercializável:** entende-se por produção comercializável a quantidade de frutos colhidos excluindo os deformados e refugo.

Nas figuras 1, 2, 3 e 4 estão representados os valores obtidos para cada um dos parâmetros quantitativos

avaliados para o factor em estudo, isto é, o tipo de polietileno.

Podemos observar pelas figuras que é a modalidade PEC que origina maior número de frutos colhidos, na maioria do período produtivo avaliado. Os valores dos factores frutos deformados e frutos de refugo também na sua totalidade foram inferiores na modalidade PEC, apesar de as evidências as conotarem como características varietais não influenciáveis por este tipo de técnica cultural.

Podemos observar-se pela Figura 4 que em geral, a modalidade PEC apresenta uma produção comercializável superior.

#### 4. Observações finais

Pelo facto de se tratar de uma cv. de pecíolos grandes (10 cm), registou-se uma maior facilidade de colheita e uma menor incidência de doenças derivadas de excesso de humidade.

Na sequência de um maior número de frutos colhidos com PEC, a cv. Oso Grande apresenta na mesma modalidade uma maior produção em gramas.

Em face das normas de qualidade para morango adoptadas para o nosso País pelo Instituto de Qualidade Alimentar, esta cultivar apresentou todos os frutos comercializáveis dentro da categoria extra, apesar de ter sido no PEC que houve maior % de frutos com calibres superiores (35-40mm).

As características morfológicas e organolépticas do fruto desta cultivar, estão de acordo com as preferências dos consumidores do mercado nacional, ajustando-a como uma óptima cultivar para cultura precoce.

#### Referências bibliográficas

- Brazanti, E.C. (1989) La fresa. Edições Mundi-Prensa. Madrid.  
 Bringhurst, R.S. (1989) Variedades de fresas. *Agrícola Vergel*, 87:129-130.  
 Garnaud, J.C. (1978) Fraisier et plastiques. *Revue horticole*, 190:29-40.  
 Roudeillac, P. (1987) La Fraise. Techniques de production. CTIFL. Maucé et Renou. Paris.

\* Eng. Agrónomo, Prof. Adjunta da ESACB  
 \*\* Eng. Téc. de Prod. Agrícola da ESACB.

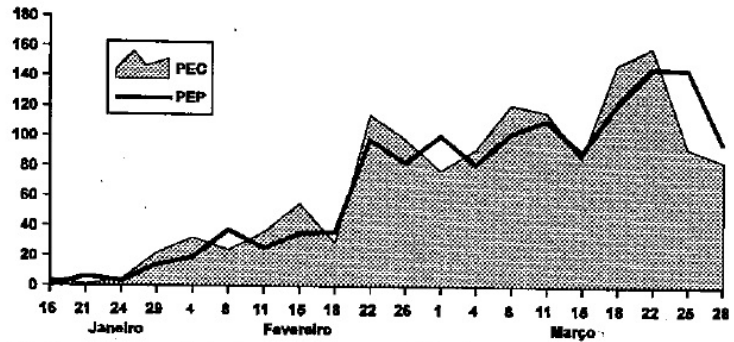


Fig. 1 - Número de frutos colhidos em 100 plantas na cv. Oso Grande com a utilização do plástico castanho (PEC) e preto (PEP).

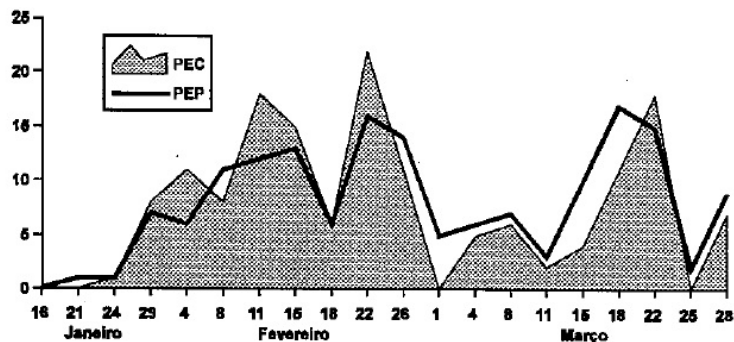


Fig. 2 - Número de frutos deformados em 100 plantas na cv. Oso Grande com a utilização do plástico castanho (PEC) e preto (PEP).

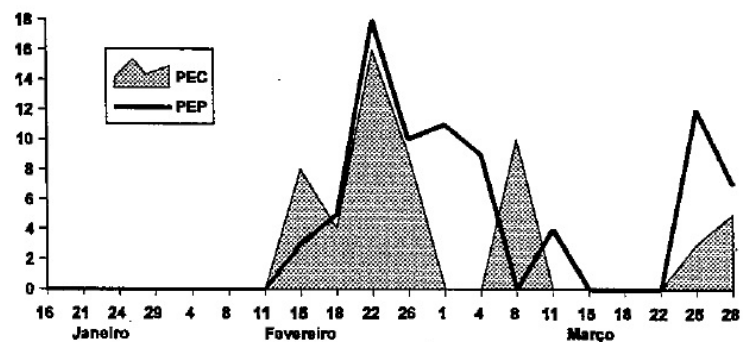


Fig. 3 - Número de frutos refugo em 100 plantas na cv. Oso Grande com a utilização do plástico castanho (PEC) e preto (PEP).

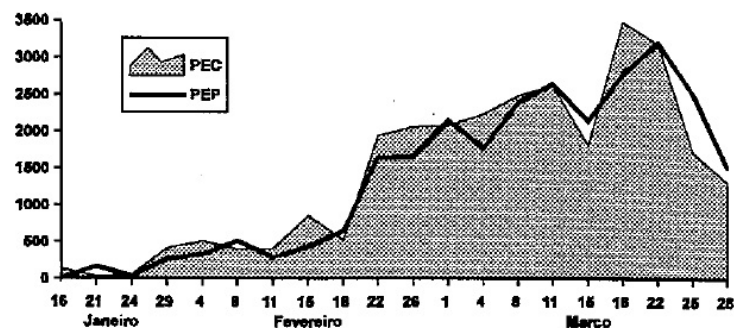
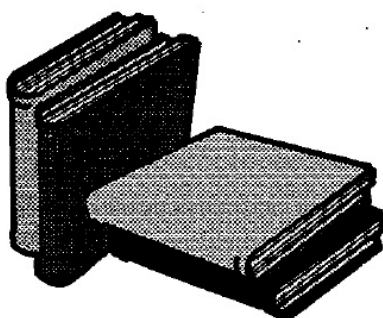


Fig. 4 - Produção comercializável (g) em 100 plantas na cv. Oso Grande com a utilização do plástico castanho (PEC) e preto (PEP).



# Uma perspectiva de utilização da Classificação Decimal Universal (CDU)

Maria Eduarda Pereira N. Rodrigues (\*)



## Resumo

O presente artigo diz respeito à classificação dos documentos na Biblioteca da Escola Superior Agrária de Castelo Branco (BESACB). Algumas referências são também feitas ao processo de indexação na medida em que classificar um documento é também indexá-lo. Finalmente dá-se uma breve explicação sobre qual o objectivo de aplicação de duas classificações distintas a um mesmo fundo documental.

## 1. Introdução

É um dado assumido em termos de biblioteconomia, a necessidade de utilizar numa biblioteca uma linguagem de tipo categorial ou classificação. Isto prende-se, naturalmente, com a dupla finalidade que preside à sua utilização, ou seja, por um lado a arrumação do documento pelo técnico, por outro lado a sua fácil localização pelo utilizador.

Há vários tipos de classificações que se utilizam de acordo com os objectivos, tipo de utilizador e tipo de

biblioteca. As classificações utilizam-se, portanto, na medida da especificidade de cada biblioteca ou centro de documentação. Por outro lado não faz muito sentido que, bibliotecas que possuem a mesma tipologia se sirvam de linguagens documentais diferentes, pois o trabalho de conversão de umas linguagens para as outras será muito maior, uma vez que se porão problemas de compatibilidade que implicarão dificuldades de comunicação.

Genericamente poderemos então dizer que a classificação utilizada numa biblioteca permite descrever e identificar o conteúdo de um documento do ponto de vista do assunto e, ao mesmo tempo, integrá-lo no conjunto de documentos que a esse mesmo assunto respeitam. Essa identificação é feita através de uma linguagem simbólica, já que as classificações se servem de notações (códigos) e não de palavras ou frases da linguagem natural.

Assim, do ponto de vista do objectivo, podemos dizer que a classificação é constituída por um conjunto de regras que presidem à ordenação ou que determinam uma ordem ideal para os objectos, enquanto que do ponto de vista do processo, será o acto de agrupar os objectos ou os conceitos que tenham algo em comum consequentemente aproximando-os ou afastando-os uns dos outros. Neste sentido a classificação deve ser muito clara e inequívoca a fim de não comprometer o seu sentido prático **arrumar/localizar**, como já atrás foi referido.

Como instrumento básico de trabalho diário, a classificação deve ainda possuir uma flexibilidade

que permita a introdução, em todo o tempo, de novas matérias, a fim de não se desactualizar ou por outra, de poder ser actualizada. E isto é tão mais importante quando pensamos na rapidez com que se desenvolvem novos processos tecnológicos e científicos, abrindo as portas à constituição de novas ciências e à abertura de novos ramos do conhecimento dentro de domínios do saber já conhecidos e estudados.

## 2. Classificação/Indexação

Na BESACB a classificação utilizada para cumprimento da dupla finalidade **arrumar/localizar** é a Classificação AGRIS/CARIS. Esta emana da FAO e cobre assuntos cujo âmbito se insere nas Ciências Agrárias, Veterinárias e afins. Parece-nos importante referir que em Portugal esta classificação se utiliza em praticamente todas as bibliotecas de instituições de ensino e investigação no âmbito das Ciências Agrárias.

A Tabela de Classificação AGRIS/CARIS é um dos instrumentos de trabalho que utilizamos para atribuição das cotas na BESACB. Esta, como a maioria das Classificações, compõe-se de duas partes fundamentais que embora formalmente muito distintas são na prática indissociáveis. Por um lado, a Tabela propriamente dita, constituída por notações alfanuméricas de três dígitos (ex.: A01-Agricultura) e respectiva informação descritiva especificando o âmbito de aplicação da notação em causa. Por outro lado, um índice alfabético de assuntos que funciona quase como um sentido inverso, ou seja, remetendo-nos do assunto que pretendemos para a notação que lhe corresponde (ex: Fisiologia da Nutrição de Ovinos, ver L51). A combinação destas duas partes permite a arrumação do documento, na prateleira que lhe respeita.

No entanto, a utilização desta Tabela de Classificação não dispensa de forma nenhuma a utilização de outras ferramentas de trabalho no domínio da indexação, entre as quais se destacam as listas estruturadas de termos, vulgarmente conhecidas por tesouros. Outros instrumentos haveria, mas não iremos referi-los pois sairíamos do âmbito deste pequeno artigo.

Os tesouros colmatam por assim dizer a lacuna deixada em aberto pelas classificações relativamente aos assuntos dos documentos. Isto porque as classificações nos remetem para um assunto genérico sendo que, por vezes, reflectem apenas uma parte do saber contido nos documentos, por exemplo aquele que está mais representado. Claro que isto tem a ver com a quantidade de notações alfanuméricas que teríamos de colocar em determinada publicação a fim de representarmos todos os assuntos nela contidos. Como logicamente se depreende, tornar-se-ia complicadíssimo ao utilizador interiorizar um tão grande número de notações e julgamos até que um pouco enfadunho. Quase nos atreveríamos a afirmar que provocaria um certo desinteresse.

As classificações devem ser simples sem deixarem de ser objectivas, e portanto não devem permitir que

o utilizador as apreenda como herméticas ou desprovidas de sentido. Nessa medida, a utilização de uma linguagem de tipo combinatório (aquela que é veiculada pelo tesouro), em que o utilizador se serve de termos ou expressões da linguagem natural que conhece e domina para recuperar a informação, apresenta-se como uma vantagem. Esta vantagem é tanto mais óbvia quanto mais específico é o assunto e maior a incapacidade da classificação dar uma resposta prática. Parece-me pois que daqui se pode inferir que enquanto a classificação nos remete para a localização da espécie na estante a partir do seu assunto genérico, o termo de indexação (descriptor) extraído do tesouro nos remete para a localização do assunto no conjunto do fundo documental.

No tesouro estão contidos todos os termos de indexação a partir dos quais o utilizador pode recuperar o(s) documento(s) que trata(m) do(s) assunto(s) que lhe interessa(m). E isto é válido tanto para o catálogo manual como para o catálogo automatizado.

No caso concreto do Tesouro AGROVOC, este não só contém os termos de indexação (descriptores), organizados por ordem alfabética, como também estabelece relações entre estes termos, relações essas que são de tipo hierárquico, contendo termos genéricos e termos específicos ou, relações de associação, dando a lista de termos que, em determinado contexto se poderão relacionar com aquele que nós pretendemos e ao mesmo tempo remete-nos para termos que se utilizam em vez de outros, estabelecendo a lista de termos não descriptores. Esta estrutura vai permitir ao indexador alargar o campo de visão relativamente a um determinado assunto, sem no entanto perder de vista o princípio de que a um conceito específico apenas corresponde um único termo de indexação.

Por este motivo não queríamos deixar de referir aqui a importância da utilização conjugada destes dois instrumentos de trabalho que no caso da BESACB são a Tabela de Classificação AGRIS/CARIS e o Tesouro AGROVOC. É importante prestar um pequeno esclarecimento relativamente à menção específica do Tesouro AGROVOC e que tem a ver com o facto de que embora nos sirvamos de outros Tesouros, o AGROVOC é aquele que melhor responde às exigências do nosso fundo bibliográfico.

Parece-nos agora oportuna a referência à CDU: Classificação Decimal Universal. Não vamos alargar-nos sobre os seus objectivos. Estes são basicamente os mesmos que servem a todas as classificações, seria portanto repetitivo falar novamente deles. A CDU é uma linguagem de classificação que, como o próprio nome indica, foi universalmente aceite. Divide o saber em classes, mais precisamente em 9 classes principais, sendo que cada classe se vai subdividindo em 9 subclasses. Esta divisão pode prolongar-se indefinidamente.

O facto de ser uma classificação decimal dá-lhe a possibilidade de se ir adaptando e actualizando, relativamente aos diversos campos do saber. A CDU através da possibilidade de utilização de auxiliares permite dar um certo grau de especificidade aos assuntos, no entanto pela sua estrutura decimal quanto mais específica o assunto, mais complicadas e longas se tornam as

suas notações com os inconvenientes que daí advém em termos de tamanho das notações.

Assim as notações CDU são constituídas por extensões contínuas de fracções decimais, seguindo uma ordem que vai do geral para o particular portanto quanto mais extensa for a notação, mais preciso será o assunto do documento (ex.: para óleo de palma teríamos qualquer coisa como 665.353.3). A apresentação decimal dividida por grupos de três algarismos prende-se com a necessidade de facilitar o aspecto visual das notações. De qualquer forma não gostaria de deixar de referir que a classificação CDU levada às últimas consequências na exaustividade dos assuntos, torna-se muito difícil de manipular quer do ponto de vista de utilizador, quer do ponto de vista do técnico.

Esta referência à estrutura da CDU, neste ponto particular, prende-se um pouco com a opção que se tem na BESACB, como adiante se explicará.

### 3. A opção da biblioteca da ESACB

Com a criação da Base Nacional de Dados Bibliográficos (PORBASE) na segunda metade da década de 80 e com a distribuição pela Biblioteca Nacional de um software de gestão de Bibliotecas (Mini-Micro CDS/ISIS versões PORBASE) a preços muito acessíveis, iniciou-se em Portugal uma nova era para as bibliotecas portuguesas, em termos de automatização. Os problemas que até aí se resolviam numa perspectiva que raramente ultrapassava o âmbito local passaram a ter uma outra dimensão e a palavra "cooperação" ganhou em importância e significado, tornando-se muito cara aos documentalistas. No entanto, se é verdade que tudo isto veio facilitar o trabalho aos técnicos por outro lado obrigou à realização de alguns ajustes e à adaptação de alguns procedimentos de trabalho porque cooperar, pelo que implica em termos informáticos, obriga à utilização de regras e códigos comuns. Assim numa primeira fase, trata-se de acertar agulhas em termos de catalogação, mas quase em simultâneo surge a questão das variadíssimas linguagens de tipo categorial e combinatório utilizadas pelas diversas bibliotecas que aderiram à PORBASE.

A Biblioteca Nacional vai então definir alguns critérios de participação na PORBASE sendo que um deles obriga à utilização da CDU: Classificação Decimal Universal como linguagem de classificação comum a todas as bibliotecas cooperantes.

Se em algumas bibliotecas isto não causou grandes constrangimentos até porque já era utilizada, em termos de Ciências Agrárias já não foi assim.

À primeira vista tratava-se simplesmente de utilizar outra classificação ou então ficar excluído da PORBASE.

Então, após longa reflexão chegámos à conclusão de que poderíamos utilizar as duas classificações com dois sentidos diversos. Por um lado utilizar a Classificação AGRIS/CARIS, no trabalho efectivo da BESACB, por outro e para participarmos num projecto de cooperação tão importante quanto o é a

PORBASE dar início ao processo de introdução simultânea da CDU o que em termos de aplicação informática não apresenta qualquer problema, já que existem espaços físicos diferentes para as duas.

Esta solução por nós adoptada não é completamente pacífica pois para muitos isto é considerado como um duplicar de trabalho, já que há que verificar em termos de assunto qual é notação CDU que corresponde à notação AGRIS. No entanto e do nosso ponto de vista, que foi sempre o mesmo em relação a este assunto o único trabalho é o de escrever duas notações, o que não nos parece seja muito cansativo. Senão vejamos:

- tanto a atribuição de notações classificatórias como a escolha de termos de indexação obedecem à mesma metodologia. Esta não é mais do que aquela que é preconizada pela NP3715 e assenta fundamentalmente na análise do conteúdo do documento. Isto é tão válido para a atribuição das notações classificatórias como para a atribuição dos termos de indexação.

Assim, numa primeira fase temos a análise do documento e a definição do seu conteúdo, numa segunda fase a identificação e selecção dos conceitos representativos desse conteúdo e finalmente na terceira fase, a representação desses conceitos por meio de termos de indexação no caso da linguagem combinatória e/ou de notações no caso da linguagem de tipo categorial. É tão simples quanto isso, pelo que nos parece que é perfeitamente possível aproveitar o trabalho desenvolvido para atribuir a notação AGRIS/CARIS e termos de indexação AGROVOC e aplicá-lo à atribuição da notação CDU, uma vez que esse trabalho já está feito e apenas é feito uma única vez. Parece-nos pois, que o preço da cooperação não é assim tão elevado.

É por demais evidente que muitas vezes o que determina a facilidade da realização de tarefas são os procedimentos internos. Assim e para que se tornasse mais fácil a equiparação dos assuntos em termos das duas tabelas, estabeleceu-se uma tabela de correspondência para os assuntos mais genéricos o que vem de facto facilitar todo o trabalho.

E poderemos ainda referir que uma vez que a CDU não se utiliza na BESACB com a finalidade de **arrumar/localizar**, tornamos a sua utilização o mais simples possível tentando utilizar na maioria dos casos apenas os primeiros três dígitos o que nos dá um nível de assunto muito genérico. Esta foi a solução encontrada na BESACB que mantendo-se fiel ao seu fundo documental especializado, não deixou porém de participar na Base Nacional de Dados Bibliográficos-PORBASE.

### 4. Conclusão

Quanto à finalidade deste trabalho importa salientar que o que se pretende com a utilização da Classificação Decimal Universal não é proporcionar aos utilizadores desta biblioteca ou de outras bibliotecas afins mais um ponto de acesso ao documento pelo assunto, mas sim cooperar com a PORBASE e conseqüentemente, abrir a toda a comunidade de utilizadores um ponto

de acesso por assunto que é comum a todas as Bibliotecas Cooperantes.

Por todas estas razões, considera-se fundamental quer a alimentação da Base Nacional de Dados Bibliográficos através do envio periódico de registos em suporte magnético, já que não trabalhamos "on line", quer a possibilidade de pesquisa no catálogo da mesma base pelo assunto, já que utilizamos todos a mesma linguagem de tipo classificatório, a CDU.

## Referências bibliográficas

Agrovoc Thesaurus [S.l.: s.n.], 1982. Edição provisória em português.

CDU. Classificação Decimal Universal: Tabela de autoridade. 2ª ed. Lisboa: Biblioteca Nacional, 1990.

Informação técnica. Nº2. Lisboa: Biblioteca Nacional, 1988. NP 3715. 1989 - Documentação. Método para análise de documentos, determinação do seu conteúdo e selecção de termos de indexação. [Lisboa]. IPQ. 10 p.

NP 4036. 1992- Documentação. Tesouros Monolíngues: directivas para a sua construção e desenvolvimento. Lisboa. IPQ. 54 p.

Prince-Perciballi, Ingrid - AGRIS/CARIS: sistema de classificação. Trad. por Maria Eduarda Pereira N. Rodrigues. [Lisboa: FAO. Centro Nacional AGRIS, 1995]

prNP.405. 1988 - Documentação. Referências bibliográficas. [Lisboa]. IPQ. 45 p.

\* Bibliotecária-Técnica Superior da ESACB

## Novos cursos da ESACB

# Engenharia de Ordenamento dos Recursos Naturais

### 1. Natureza do curso

Curso de bacharelato (3 anos) ministrado pela Escola Superior Agrária de Castelo Branco.

### 2. Objectivos gerais

Formação de técnicos com capacidade de se inteirarem de problemas relacionados com a inventariação, caracterização, gestão e solução de problemas ambientais, directamente relacionados com os recursos naturais, de natureza agro-biológica.

### 3. Breve descrição do plano curricular

#### 3.1. Formação de base

Inclui disciplinas consideradas de formação inicial, tais como Matemática, Probabilidades e Estatística, Climatologia, Química Geral e Química Orgânica, Biologia, Microbiologia, de modo a fornecer aos alunos uma formação de base, necessária à prossecução nas áreas mais específicas.

Inclui disciplinas de cariz técnico, (Informática, Topografia, Desenho Técnico) com utilização de ferramentas informáticas de desenho assistido por computador, que possibilitem aos alunos uma formação técnica avançada, vocacionada para a elaboração, interpretação e execução de projectos de infraestruturas de ordenamento ambiental, parques, jardins, arruamentos, decorações exteriores, bem como à análise de impacte ambiental de outras infraestruturas, nomeadamente no ambiente rural.

#### 3.2. Formação de campo

É dada especial ênfase às disciplinas de base, como sejam a Botânica e Zoologia, essenciais na definição do biótipo ambiental.

As novas tecnologias de cartografia, fotointerpretação de fotografias aéreas, ortofotomapas, são leccionadas na disciplina de Detecção Remota como complemento da Topografia.

Disciplinas vocacionadas para a recolha, análise e interpretação de dados, Estatística Computacional.

O curso inclui disciplinas técnicas sobre o meio ambiente, tais como Hidrologia, Parques e Jardins, Poluição e Conservação, Recursos Naturais, disciplina vocacionada para o estudo de várias temáticas, nomeadamente recursos cinegéticos, piscícolas, energias alternativas e à análise de diversos factores, agrícolas, industriais e humanos, tais como erosão, traçado de redes viárias ou redes de distribuição de energia sobre o meio ambiente.

#### 3.3. Formação específica

Inclui disciplinas de âmbito técnico específico dentro da área dos Recursos Naturais, tais como a Concepção, Análise e Projecto de Infraestruturas, Análise do Impacte Ambiental de diversas condicionantes agrícolas, industriais e humanas sobre o ambiente. É dada especial ênfase aos Sistemas Informáticos de Planeamento, disciplina vocacionada para a utilização das novas tecnologias informáticas, tais como os Sistemas de Informação Geográfica - SIG.

A preocupação com o enquadramento humano é expressa pelas disciplinas de Sociologia e Extensão, Economia dos Recursos Naturais.

### 4. Mercado de trabalho

Prevê-se que as principais saídas profissionais dos Bacharéis em Engenharia de Ordenamento dos Recursos Naturais sejam:

- **Administração Pública:**  
Câmaras Municipais (Planos Directores Municipais e Serviços Municipalizados); Gabinetes de Apoio Técnico; Ministério da Agricultura; Ministério do Ambiente; Ministério do Planeamento e Ordenamento do Território.
- **Empresas:**  
Núcleos Empresariais Regionais; Indústrias Agro-Alimentares; Empresas de Agro-Turismo; Empresas de Obras Públicas; Empresas de Construção Civil; Empresas do Sector Florestal; Gabinetes de Estudos e Projectos; Viveiristas.
- **Profissionais Liberais.**

# Teses e dissertações de docentes da ESA

## Elementos para a Protecção Integrada em Cerejeira

João Pedro Martins da Luz  
Engº Agrónomo  
Instituto Superior de Agronomia  
Grau de Mestre, 1992.

### Resumo

A mosca-da-cereja (*Ragoletis cerasi* L.) considerado o principal fitófago da cerejeira na Europa, atinge na região da Cova da Beira (Portugal) níveis de infestação dos frutos de 7%-8%, nas cultivares semitardias e tardias.

Neste trabalho elaboraram-se as curvas de voo de *R. cerasi* de 1988 a 1990, em cinco pomares da Cova da Beira, situados a cotas de altitude entre 520m e 725m. Os voos mais temporões iniciaram-se no princípio de Maio, embora as primeiras larvas só fossem detectadas a 1 de Junho.

A armadilha mais sensível para a captura de adultos foi a armadilha Rebell e por isso deverá ser indicada para os estudos de monitorização da mosca-da-cereja.

Com a utilização de insecticida dimetoato deverá ser feita só uma ou nenhuma intervenção, consoante aparecem ou não, 15 dias antes da colheita, adultos nas armadilhas Rebell. As armadilhas deverão ser colocadas nas árvores a partir de 15 de Abril.

Durante três anos (1988-1990) foi realizada uma prospecção dos ácaros presentes nas folhas. Dentro do grupo dos fitófagos foi muito frequente a presença de *Brevipalpus pulcher* Can. & Franz. e de eriofídeos, principalmente *Rhinotergum cerasifoliae* Petanovic que foi reconhecido pela primeira vez em Portugal. Salienta-se também o número bastante elevado de ácaros predadores (*Amblyseius* spp.) e de indiferentes (micetófagos e saprófagos) como o *Orthotydeus californicus* Banks.

## Caracterização Isoenzimática de Populações de *Vigna unguiculata* (L.) Walp

Carlos Manuel Gaspar dos Reis  
Engº Agrícola  
Instituto Superior de Agronomia  
Grau de Mestre, 1993.

### Resumo

Pretendeu-se fazer a caracterização isoenzimática de algumas populações de *Vigna unguiculata* (L.) Walp. Estudaram-se amostras de 24 populações distribuídas por três subespécies (subsp): *unguiculata*, *cylindrica* e *sesquipedalis*. As amostras da subespécie (subsp.) *unguiculata* pertenciam às cultivares: "Amarelo", "Arroz", "Comum", "Gigante de Marialva" e "Cream".

A obtenção dos padrões isoenzimáticos foi realizada por focagem isoeléctrica, tendo-se utilizado extractos de cotilédones e de tecidos vegetativos de plântulas com cerca de 15 dias. As análises comparativas foram conduzidas para os sistemas enzimáticos fosfatase ácida (ACP) e peroxidase (PRX).

Em cotilédones foram detectadas apenas bandas de ACP. Em plântulas foram reveladas bandas de ACP para os órgãos raíz, caule e folhas mas no caso do sistema PRX detectámos actividade isoenzimática apenas em raízes.

Os zimogramas de ACP de cotilédones não apresentaram bandas polimórficas; no caso da folha detectaram-se 10 bandas polimórficas correspondendo-lhes três diferentes padrões isoenzimáticos. Os zimogramas de PRX da raíz evidenciaram 6 bandas polimórficas mas, dada a baixa frequência da maioria, apenas uma delas se apresenta com interesse nos estudos comparativos. Com base nos resultados obtidos, é possível fazer a distinção da subsp. *sesquipedalis* e da cultivar "arroz" da subsp. *unguiculata* relativamente às restantes populações estudadas. Verificou-se a existência de uma maior proximidade genética entre as subsp. *unguiculata* e *cylindrica*, relativamente à subsp. *sesquipedalis*.

## Combustão de Biomassa em Fornalhas Ciclone

José Nunes - Eng<sup>o</sup> Mecânico  
Instituto Superior Técnico  
Grau de Mestre, 1993.

### Resumo

Neste trabalho pretendemos efectuar o estudo experimental da combustão de resíduos de baixa granulometria, nomeadamente serradura de pinho numa fornalha cuja geometria é do tipo ciclone.

Apresenta-se o equipamento da instalação experimental que foi projectada, desenhada e construída propositadamente para a realização deste trabalho.

Descrivem-se as técnicas de medida e a instrumentação utilizada na realização da medida das variáveis do sistema de queima.

Apresenta-se o programa de cálculo em FORTRAN 77, elaborado para a realização do tratamento de dados e de balanços de energia à fornalha.

Analisam-se os resultados experimentais e calculados, obtidos nos vários ensaios, salientando-se das conclusões a gama de funcionamento estável da fornalha, compreendida entre 879.8 a 2151.8 kw/m<sup>3</sup> para a serradura de pinho, a baixa perda de carga em toda a gama de funcionamento, o índice de poluentes muito reduzido e a possibilidade da fornalha ciclone poder ser utilizada como gerador de gases quentes utilizáveis em processos de secagem, produção de água quente e vapor de processo.

## Contribuição para o Estudo da Qualidade da Cortiça: o Problema da Porosidade

Ofélia Maria Serralha dos Anjos - Eng<sup>a</sup>  
Silvicultora

Universidade da Beira Interior  
Grau de Mestre, 1993

### Resumo

No presente trabalho aplica-se a análise de imagem ao estudo da qualidade da cortiça, nomeadamente na determinação da porosidade permitindo analisar e quantificar um grande número de amostras num espaço de tempo relativamente pequeno.

Comparam-se amostras de cortiça de diferentes proveniências as quais já vinham qualificadas em três classes de qualidade: superior, média e inferior. Foram medidas nas diferentes amostras a porosidade radial, tangencial (em três planos diferentes) e o número de poros. Analisou-se, posteriormente, a relação existente entre a espessura e expansão, tendo-se mostrado algumas variáveis com valores de correlação bastante aceitáveis.

Analisou-se a relação de dependência entre a tensão de corte máxima e o respectivo ângulo de torsão, tendo-se procurado estabelecer, para cada um destes factores, a relação existente com as características anteriormente quantificadas.

O estudo revelou altos valores de porosidade o que vem reforçar a ideia do declínio de qualidade das nossas cortiças.

## Propagação Vegetativa do Sobreiro (*Quercus suber* L.) por Estacaria

Margarida Ribeiro - Eng<sup>a</sup> Silvicultora  
Instituto Superior de Agronomia  
Grau de Mestre, 1993.

### Resumo

Realizaram-se ensaios de enraizamento com estacas provenientes de jovens sobreiros, durante dois anos consecutivos.

A aplicação de AIB à base da estaca melhorou a percentagem de enraizamento e a sobrevivência em relação à testemunha, na época de enraizamento de Abril. Na época de fins de Junho, já não se verificou a referida resposta positiva. Este tratamento não teve efeito no número de raízes formadas, por estaca enraizada, mas influenciou o comprimento da maior raiz, também por estaca enraizada, independentemente da época de enraizamento. A utilização de 0,1% ANA não provocou resultados diferentes da testemunha para qualquer dos parâmetros avaliados.

O descasque na base da estaca aumentou a percentagem de enraizamento e a sobrevivência. Este tratamento, juntamente com a aplicação de 0,5% de AIB conduziu a percentagens de enraizamento superiores a 60%, ao fim de três meses de ensaio, na época de enraizamento de Abril.

Quer a origem da estaca (topo ou base da planta) quer os tratamentos dos pés-mãe (colocação das plantas às escuras ou o escurecimento - uso de uma fita preta na base da futura estaca) não influenciaram a percentagem de enraizamento.

A sobrevivência das estacas é comprometida na época de enraizamento de fins de Junho, pelo facto de entrarem em dormência. A aplicação de BAP às estacas enraizadas, em dormência, estimulou o abrolhamento de gomos axilares e não se observaram efeitos fitotóxicos.

Realizaram-se cortes histológicos na base de estacas sujeitas ao tratamento de escurecimento (com ou sem aplicação de AIB na banda preta). No dia 0 observaram-se diferenças na estrutura devidas a esse tratamento especialmente ao nível da periderme e do xilema. Até ao dia 20 as diferenças estruturais das estacas submetidas ao tratamento de escurecimento foram-se acentuando com perda de coerência e aparecimento, por vezes abundante, de *callus*. Em geral, as modificações surgiam na zona do nó e só depois na zona do entrenó. A aplicação de AIB à base da estaca antes de esta ser posta a enraizar não conduziu a diferenças tão evidentes como o tratamento de escurecimento.

## Utilização de Água Residual Urbana na Cultura do Azevém (*Lolium multiflorum* Lam.)

Maria do Carmo S. M. Horta Monteiro  
Eng<sup>a</sup> Agrónoma  
Instituto Superior de Agronomia  
Grau de Mestre, 1994.

### Resumo

Com o objectivo de avaliar o possível interesse da utilização de Águas Residuais (A.R.), com e sem cloragem,