



**I CONGRESSO DE ENSINO,
PESQUISA E EXTENSÃO DA UEG**

14 a 16 de outubro de 2014
Local: Câmpus – Pirenópolis



AVALIAÇÃO DO EFEITO DE DIFERENTES DOSES DE N APLICADAS EM REPOLHO E RÚCULA E SUA RELAÇÃO COM A FORMAÇÃO DE MICRONÚCLEOS

Aparecido Alves Serafim Ferreira¹, Anne Silva Martins², Katiane Santiago Silva Benett³,
Robson José de Oliveira Júnior⁴, Alcione da Silva Arruda³

¹ Graduação em Agronomia, PIBITI/CNPq, Câmpus Ipameri, nettoalves_f@hotmail.com

² Graduação, Universidade Estadual de Goiás, Ipameri (GO)

³ Docente do curso de Graduação, Universidade Estadual de Goiás, Ipameri (GO)

⁴ Docente, Universidade Federal de Uberlândia, Patos de Minas (MG)

INTRODUÇÃO

A saúde dos indivíduos é influenciada por fatores hereditários, nutricionais, mutacionais e ambientais, com os quais eles vivem. Populações expostas a agentes físicos, químicos ou ambientais podem sofrer mutações, câncer e defeitos congênitos (ARNAIZ, 1997). A preocupação com a saúde humana, atrelado ao conhecimento de que muitas espécies são excelentes fontes de vitaminas, sais minerais e substâncias antioxidantes, entre outras contribuições, tornaram o consumo de alguns alimentos crescente em nosso meio (KADER, 2001), destacando-se o consumo de hortaliças.

O repolho (*Brassica oleracea* var. *capitata*) é uma planta da família das Brassicaceae, herbácea, com folhas arredondadas e cerosas formando uma cabeça compacta, possui grande aplicabilidade, apresenta um alto valor nutritivo, alta concentração de cálcio, proteínas e ácido ascórbico (CARVALHO et al., 2008), sendo uma planta cultivada essencialmente por pequenos agricultores.

A rúcula (*Eruca sativa* L.) é uma hortaliça herbácea anual, de porte baixo, possuindo normalmente altura de 15 a 20 cm, com folhas verdes e recortadas, também pertencente à



I CONGRESSO DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO DA UEG

14 a 16 de outubro de 2014
Local: Câmpus – Pirenópolis



família Brassicaceae. Apesar de ser produzida melhor sob temperaturas amenas, essa hortaliça tem sido cultivada ao longo do ano, em diversas regiões do país (MEDEIROS, 2005).

Com base na crescente demanda de hortaliças, buscam-se formas mais rápidas e eficazes para a produção exacerbada das mesmas, utilizando métodos comuns que na maioria das vezes são tóxicos às plantas. Dentre esses métodos destaca-se utilização de adubos nitrogenados (N) citados por Filgueira (2008) como um promotor no aumento da produtividade quando se refere a hortaliças folhosas.

A toxicidade desses nutrientes quando em contato com material genético ainda é pouco discutida, mas já se sabe que especialmente no DNA, eles podem causar alterações no seu código, ou seja, genotoxicidade ou mutagenese (ARNAIZ, 1997). Deste modo, a realização de ensaios de toxicidade tem sido incluída em programas de monitoramento, constituindo uma das análises indispensáveis (LACERDA et al., 2011).

Análise de alterações cromossômicas serve como teste de mutagenicidade e é um dos poucos métodos diretos para mensurar danos em sistemas expostos a mutagênicos ou carcinogênicos potenciais (BAGATINE et al., 2007). Para possibilitar a avaliação dos efeitos ou danos que agentes mutagênicos podem causar, é necessário que a amostra esteja em constante divisão mitótica, objetivando identificar os efeitos tóxicos e alterações ocorridas ao longo de um ciclo celular. O teste de *Allium cepa* tem sido amplamente empregado com esse propósito (SILVA et al., 2003).

O índice mitótico e índice de replicação são usados como indicadores de proliferação adequada das células (GADANO et al., 2002), o que pode ser observado também através do sistema teste vegetal de *Allium cepa*.

OBJETIVOS

Avaliar por meio do teste de *Allium cepa* o efeito de diferentes dosagens de N recomendadas para repolho e rúcula e relacionar se tais aplicações influenciam na formação de micronúcleos.

METODOLOGIA

O experimento foi implantado no laboratório do Câmpus de Ipameri da Universidade Estadual de Goiás – UEG, no município de Ipameri-GO e teve parceria com o Laboratório de



I CONGRESSO DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO DA UEG

14 a 16 de outubro de 2014
Local: Câmpus – Pirenópolis



Citogenética do Instituto de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia - UFU.

O experimento foi conduzido em sistema de blocos ao acaso, utilizando duas fontes de nitrogênio, sendo elas, ureia normal, 45% de N, e ureia revestida, 46% de N para cada cultura, com quatro tratamentos cada e cinco repetições por tratamento. As doses de N utilizadas foram às recomendadas para a cultura do repolho, 75, 150, 225 e 300 kg.ha⁻¹ de N, para cultura da rúcula, 60, 120, 180 e 240 kg.ha⁻¹ de N, utilizou-se também azida sódica como controle positivo e água destilada como controle negativo, para comparação na realização de análises citotóxicas.

Os tratamentos foram aplicados em forma de solução, a ureia foi triturada e dissolvida em água destilada. Foi feita a conversão das doses de N para serem colocadas nos recipientes. Para realização dos experimentos utilizou-se bulbos de cebolas do tipo caixa 2. Estes foram colocados nos recipientes plásticos com a parte inferior dos bulbos, anteriormente raspada com auxílio de uma lâmina, em contato com a água destilada por 24 horas para emersão das radículas. Depois de emergidas, as radículas foram submetidas ao tratamento por 48 horas, durante esse período manteve-se temperatura e luminosidade estáveis entre os tratamentos.

Após 48 horas na solução as raízes foram cortadas e medidas para posterior análise de comprimento, em seguida mergulhadas em Carnoy 3:1, onde permaneceram no próprio fixador no freezer por no mínimo 24 horas. Para preparo das lâminas, as raízes foram retiradas do fixador mergulhadas três vezes em água destilada (5 minutos cada) enxugadas rapidamente em papel de filtro, hidrolisadas em HCl 5N à temperatura ambiente por 20 minutos, e lavadas duas vezes em água destilada. Em seguida a ponta da raiz foi transferida para a lâmina, enxugada cuidadosamente com papel filtro e acrescentou-se uma gota de ácido acético a 45%. Com o auxílio de um estereomicroscópio, a coifa foi retirada procurando deixar apenas o meristema.

O meristema foi fragmentado em pedaços pequenos com auxílio de agulhas, depois os mesmos foram cobertos com uma lamínula e com uma agulha de ponta rombuda procedeu-se a separação das células. A verificação foi acompanhada em microscópio comum, com o



I CONGRESSO DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO DA UEG

14 a 16 de outubro de 2014
Local: Câmpus – Pirenópolis



diafragma do condensador parcialmente fechado ou com o condensador do microscópio deslocado para baixo.

Após a preparação da lâmina, a mesma foi colocada em nitrogênio líquido para posterior retirada da lamínula. A coloração foi feita com Giensa a 10%, o tempo de coloração variou de 5 a 20 minutos. Após coloração as lâminas foram analisadas, contando 5000 células por tratamento para determinar o Índice Mitótico (IM) e a presença de micronúcleos.

Os dados foram submetidos à análise de variância e, nos casos em que o teste F foi significativo, realizou-se o teste de Scott-Knott para comparação múltipla das médias dos tratamentos (ambos com $p < 0,05$). Adicionalmente, procedeu-se à análise de regressão linear ou polinomial, utilizando os dados obtidos com as diferentes doses de nitrogênio avaliadas. Essas análises estatísticas foram conduzidas utilizando o *software* SISVAR 5.3 (FERREIRA, 2008).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O teste com *Allium cepa* foi utilizado para avaliar o efeito de diferentes doses de N recomendadas para repolho e rúcula, como forma de estudo inicial de parâmetros macroscópicos, determinando o crescimento de raízes e parâmetros citológicos avaliando a presença de micronúcleos e possíveis aberrações celulares e inibição de células em divisão (FISKESJÖ, 1988; VESNA et al., 1996; BARBÉRIO et al., 2011).

Os biotestes utilizando o *Allium cepa* nas diferentes fontes e doses de ureia, comparando com controle negativo (água destilada), em observação macroscópica, apresentaram crescimento normal e regular de suas raízes, não havendo necrose, má formação e não verificou citotoxicidade nas diferentes doses de N.

Análise de variância indicou efeito significativo ($p < 0,01$) para a interação entre fonte de ureia e doses utilizadas somente para a cultura do repolho, para salsa a interação não foi significativa ($p > 0,05$).

Quando avaliou as fontes de ureia normal e revestida para repolho, percebeu-se que os maiores desenvolvimentos foram obtidos na fonte de ureia normal, sendo que as doses de 75 e 150 kg.ha⁻¹ N foram às melhores, visualizada de seguida que o aumento da dose provocou diminuição do comprimento das raízes. Para ureia revestida o crescimento de raízes não apresentou resultados significativos entre as diferentes doses, porém, percebe-se que as



I CONGRESSO DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO DA UEG

14 a 16 de outubro de 2014
Local: Câmpus – Pirenópolis



doses de 75 a 225 kg.ha⁻¹ N houve diminuição no comprimento de raiz em relação a dose 0 kg.ha⁻¹ N. Os resultados indicam que as doses que apresentaram menor desenvolvimento de raiz podem apresentar efeito tóxico (Tabela 1).

Tabela 1. Médias de comprimento de raízes de *Allium cepa* tratadas com diferentes doses de N recomendadas para cultura do repolho, Ipameri-GO, 2014.

Doses de Nitrogênio (Kg.ha ⁻¹)	Fontes de Nitrogênio	
Repolho	Ureia Normal	Ureia Revestida
0	0,92 bA	0,90 aA
75	1,60 aA	0,82 aB
150	1,03 bA	0,80 aB
225	0,92 bA	0,85 aA
300	0,84 bA	0,98 aA

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferiram significativamente pelo Teste Scott-Knott ao nível de significância de 5% de probabilidade.

Para rúcula ao comparar as duas fontes ureia normal e revestida, pode-se observar resultados significativos, demonstrando que utilizando ureia revestida como fonte de N obteve-se menor comprimento de raízes (Tabela 2).

Tabela 2. Fontes de N aplicadas à cultura da rúcula, Ipameri-GO, 2014.

Fontes	Cultura
	Rúcula
Ureia Normal	0,90 a
Ureia Revestida	0,83 b

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferiram significativamente pelo Teste Scott-Knott ao nível de significância de 5% de probabilidade.

As análises avaliando a variável comprimento de raízes, quando realizada utilizando as doses recomendadas para cultura da rúcula não apresentaram resultados significativos (Tabela 3).

Tabela 3. Médias das diferentes doses de N recomendadas para cultura da rúcula, Ipameri-GO, 2014.

Doses (Kg.ha ⁻¹) e Médias	
0	0,84 a
60	0,87 a
120	0,92 a
180	0,88 a
240	0,82 a

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferiram significativamente pelo Teste Scott-Knott ao nível de significância de 5% de probabilidade.



I CONGRESSO DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO DA UEG

14 a 16 de outubro de 2014
Local: Câmpus – Pirenópolis



Quanto à capacidade de resposta a doses de N, Mendonça (2003) e Morreira (2011) relatam que esse elemento contribui marcadamente para melhor desenvolvimento e produtividade da cultura da cebola.

Cecílio Filho et al. (2009) relata que a cebola apresenta respostas menores no desenvolvimento e produtividade quando se têm incrementos somente nos níveis de N, do que quando há uma disponibilidade maior de outros nutrientes, principalmente fósforo e potássio. Singh (2004) verificou que a cebola responde bem a aplicação de 80 kg.ha^{-1} de N, não havendo diferenças significativas na aplicação da dose de 120 kg.ha^{-1} de N.

Resultados semelhantes quanto a resposta da cebola a adubação nitrogenada foram observados por Farias e Perreira (1992), que identificaram a dose de 115 kg.ha^{-1} como a mais expressiva para as condições do Vale do São Francisco, Petrolina-PE; enquanto Vachchani e Patel (1996), na Índia, não verificaram diferenças entre as doses de 100 e 150 kg.ha^{-1} de N, evidenciando assim que a resposta da cebola à adubação nitrogenada pode variar de acordo com as condições, e esse comportamento vale para qualquer espécie.

De acordo Batal et al., (1994) e Vidigal (2000), não encontraram respostas positivas quando variaram as doses de N de 318 a 480 kg.ha^{-1} de N, evidenciando assim que a cultura da cebola não responde bem à altas concentrações de N.

Segundo KURTZ et al., (2012), a cultura da cebola normalmente responde à adição de fertilizantes nitrogenados, e a dose de N que proporciona o melhor desenvolvimento depende da cultivar, das condições de cultivo e normalmente situa-se entre 100 e 200 kg.ha^{-1} . Isso talvez explique a diminuição do comprimento da raiz da cebola em doses acima de 225 kg.ha^{-1} de recomendadas para a cultura do repolho.

O que se percebe na grande maioria dos estudos, como mostra as referências citadas anteriormente, é que os resultados são controversos, a quantidade ideal de N aplicada em cebola ainda é uma incógnita. Os resultados obtidos nesse trabalho com doses recomendadas para a cultura do repolho mostram que tanto fonte de N como a dose pode apresenta efeitos tóxicos em biotestes utilizando o *Allium cepa*. Da mesma forma a fonte ureia revestida para a cultura da salsa.

Análise de índice mitótico (IM) e presença de micronúcleos



I CONGRESSO DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO DA UEG

14 a 16 de outubro de 2014
Local: Câmpus – Pirenópolis



Após coloração, as lâminas foram analisadas, contando 5000 células por tratamento para determinar o índice mitótico (IM) e verificar a presença de micronúcleos. O índice mitótico foi determinado dividindo o número de células em mitose pelo número total de células observadas, multiplicando por cem para se obter o valor em porcentagem. A presença de micronúcleos foi avaliada nas lâminas em células em divisão celular.

A boa qualidade das lâminas facilitou a análise das células, sendo possível visualizar todas as fases da mitose, com isto, indicando que o material em questão estava em constante divisão, caracterizando uma região meristemática.

Em relação ao IM, observou-se que houve diferenças significativas quando os tratamentos foram comparados com o controle negativo para a cultura do repolho na fonte ureia revestida e para rúcula nas duas fontes utilizadas, havendo aumento no IM, isso significa que as doses usadas não interferiram no número de divisões mitóticas. Para repolho na fonte ureia normal não apresentou diferenças significativas.

Tabela 1. Índice Mitótico de células meristemáticas de raiz de *Allium cepa* tratadas com uréia normal e revestida nas doses recomendadas para as culturas estudadas, Ipameri-GO, 2014.

Repolho	Índice Mitótico (%) e Doses (kg.ha ⁻¹ N)	
	Controle Negativo	Tratamentos (média)
Ureia Normal	5,2 ^a	5,6 ^a
Ureia Revestida	3,8 ^b	7,5 ^a
Rúcula	Controle Negativo	Tratamentos (média)
Ureia Normal	3,1 ^b	4,9 ^a
Ureia Revestida	4,2 ^b	5,4 ^a

Mesmas letras minúsculas e números na linha não diferiram significativamente pelo Teste Tukey ao nível de significância de 5% de probabilidade.

Na análise das lâminas foi possível notar tanto a presença de micronúcleos na dose de 240 kg.ha⁻¹ de N em rúcula, quanto a presença de algumas anomalias no processo de divisão celular, como cromossomos fora do eixo equatorial e pontes anafásicas na dose de 150 kg.ha⁻¹ de N em repolho (Figura 1).

A presença de micronúcleo e anomalias revela que essas doses foram capazes de causar efeitos genotóxicos em células meristemáticas de raiz de *A. cepa*.



I CONGRESSO DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO DA UEG

14 a 16 de outubro de 2014
Local: Câmpus – Pirenópolis

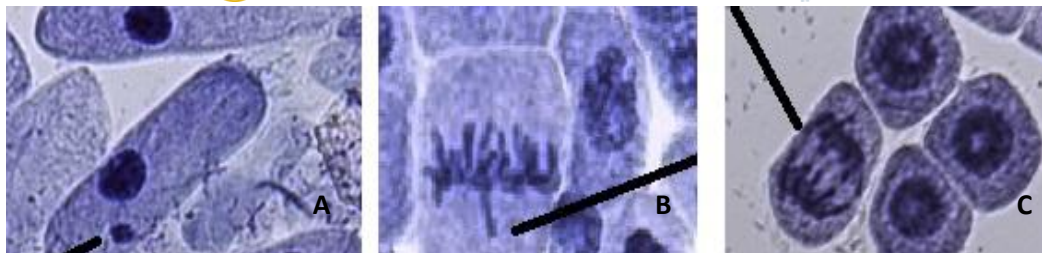


Figura 1. (A) Presença de micronúcleo em células de raiz de *A. cepa* tratada com a dose de 240 kg.ha⁻¹ de N em rúcula; (B) Metáfase com cromossomo fora da região equatorial; (C) Ponte anafásica em células meristemáticas tratadas com a dose de 150 kg.ha⁻¹ de N em repolho.

Fenech (1998) cita o teste de micronúcleo como importante técnica para identificar eventual aumento na frequência de mutação em células que são expostas a uma gama variada de agentes genotóxicos, expressando os danos no cromossomo como micronúcleos. Neste trabalho a realização do teste de micronúcleo demonstrou efeito genotóxico do N em raízes de *Allium cepa* na dose 240 kg.ha⁻¹ de N em rúcula, abrindo espaço para futuras análises na área.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir das análises citológicas realizadas pode-se observar que o teste vegetal com *Allium cepa* atua como bom bioindicador de atividades mutagênicas em tecidos vegetais, revelando o quão tóxico um nutriente pode se apresentar decorrente de suas concentrações. Não verificou efeito citotóxico nas diferentes doses de N recomendadas para as culturas. Os resultados obtidos nesse trabalho com doses recomendadas para a cultura do repolho mostram que tanto fonte de N como a dose pode apresenta efeitos tóxicos em biotestes utilizando o *Allium cepa*. Da mesma forma a fonte ureia revestida para a cultura da salsa. A realização do teste de micronúcleo e presença de anomalias demonstrou efeito genotóxico do N em raízes de *Allium cepa* na dose 240 kg.ha⁻¹ de N em rúcula e na dose de 150 kg.ha⁻¹ de N em repolho, respectivamente. Esses resultados abrem espaço para futuras análises nesta área.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Universidade Estadual de Goiás e ao CNPq pelo auxílio financeiro para execução do trabalho na forma de bolsa PBITI/CNPQ.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARNAIZ, R.R. **Las Toxinas Ambientales e Sus Efectos Genéticos**. 2ª edição. México: IEPSA, 1997, 95 p.



I CONGRESSO DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO DA UEG

14 a 16 de outubro de 2014
Local: Câmpus – Pirenópolis



BAGATINI, M.D.; SILVA, A.C.F.; TEDESCO, S.B. Uso do sistema teste de *Allium cepa* como bioindicador de genotoxicidade de infusões de plantas medicinais, **Revista Brasileira de Farmacologia**, Santa Maria: RS, 2007.

BATAL, K.M.; BONDARI, K.; GRANBERRY, D.M.; MULLINIX, B.G. Effects of source, rate, and frequency of N application on yield, marketable and rot incidence of sweet onion (*Allium cepa* L. cv. Granex-33). **Journal Horticultural Science**, Ashford, v.69, n.6, p.1043-1051, 1994.

BARBÉRIO, A.; VOLTOLINI, J.C.; MELLO, M.L.S. Standardization of bulb and root sample sizes for the *Allium cepa* test. *Ecotoxicology*, Londres, v. 20, n. 4, p. 927-935, 2011. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/content/2m8427v8042091h1/>>. Acesso em: 6 ago. 2014.

CARVALHO, C.A.; SILVA, M.B.; OLIVEIRA, T.G.; LIMA, J.M.; ROSA, M.B. Estudo espectrométrico de diferentes estágios fenológicos da *Brassica oleracea* var. capitata, **Revista Brasileira de Farmacologia**, Viçosa: MG, 2008.

CECÍLIO FILHO AB; MAY A; PÔRTO DRQ; BARBOSA JC. Crescimento da cebola em função de doses de nitrogênio, potássio e da população de plantas em semeadura direta. **Horticultura Brasileira**, 27: 049-054. 2009.

FARIAS, C.M. de; PEREIRA, J.R. Fontes e níveis de nitrogênio na produtividade da cebola no Vale do São Francisco. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.27, n.3, p.403-407, mar. 1992.

FENECH, M. Important variables that Influence baselinem micronucleus frequency in cytokines is blocked lymphocyte sabiomarker for DNA damage in human populations. **Mutat Res.**, v. 404, p. 155-165, 1998.

FERREIRA, D.F. Sisvar versão 4.2. DEX/UFLA, 2003.

FISKESJO, G. The *Allium* test an alternative in studies: the relative toxicity of metal íons. *Mutation Research*, Amsterdam, v. 197, n. 2, p. 243-260, 1988. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0027510788900966>>. Acesso em: 06 ago. 2014.

FILGUEIRA, F.A.R. **Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**. 3. ed. Viçosa: UFV, 2008. 421 p.

GADANO, A.; GURNI, A.; LÓPEZ, P.; FERRARO, G.; CARBALLO, M. In vitro genotoxic evaluation of the medicinal plant *Chenopodium ambrosioides*.L. **J Ethonopharmacol** 81: 11-16. 2002.



I CONGRESSO DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO DA UEG

14 a 16 de outubro de 2014
Local: Câmpus – Pirenópolis



KADER, A. 2001. **Importance of Fruits, Nuts and Vegetables in Human Nutrition and Health. Department of Pomology.** Disponível em: <http://www.ars.usda.gov>. Acesso em: 06 de ago. 2014.

KURTZ C., ERNANI P.R., COIMBRA, J.L.M, PETRY, E., Rendimento e conservação de cebola alterados pela dose e parcelamento de nitrogênio em cobertura. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, vol. 36, núm. 3, maio-junho, 2012, pp. 865-875

LACERDA, P.M.; SOUZA CLÁUDIA, S.;IRAZUSTA, S.P. Atividade Mutagênica em *Allium cepa* da Água de Irrigação de hortaliças na região de Itapeperica da Serra-SP. VI **Workshop de Pós-Graduação e Pesquisa do Centro Paula Souza**, São Paulo, 2011.

MENDONÇA, E.A.F., RAMOS, N.P., FESSEL, S.A. Adequação da metodologia do teste de deterioração controlada para sementes de brócolis (*Brassicaoleracea* L. – var. *Itálica*). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 25, n. 1, p.18-24, 2003.

MEDEIROS, M. C. L. **Avaliação de diferentes substratos com e sem adubação foliar na cultura da rúcula.** 2005. 25f. Monografia (Graduação em Agronomia) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, 2005.

MOREIRA MA; VIDIGAL SM; SEDIYAMA MAN; SANTOS MR. Crescimento e produção de repolho em função de doses de nitrogênio. **Horticultura Brasileira**, 29: 117-121. 2011.

SINGH, S.; YADAV, P.K.; SINGH, B. Effect of nitrogen and potassium on growth and yield of onion (*Allium cepa* L.) cv. **Pusa Red.** **Haryana Journal Horticultural Sciences**, Hisar, v.33, n.3/4, p.308-309, 2004.

SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J.A.P. **Genética toxicológica.** Porto Alegre, Alcance, 2003, 422p.

VACHCHANI, M.U.; PATEL, Z.G. Growth and yield of onion (*Allium cepa* L.) as influenced by levels of nitrogen, phosphorus and potash under South Gujarat conditions. **Progressive Horticulture**, Uttar Pradesh,v.25, n.3/4, p.166-167, 1996.

VESNA, S.; STEGNAR, P.; LOVKA, M.; TOMAN, M. J. The evaluation of waste, surfasse and ground water quality using the *Allium* test procedure. *Mutation Research*, Amsterdam, v. 368, n. 3-4, p.171-179, 1996. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165121896900592>>. Acesso em: 10 ago. 2014.

VIDIGAL, S.M. **Adubação nitrogenada de cebola irrigada cultivada no verão: projeto Jaíba, Norte e Minas Gerais.** 2000. 136f. Tese (Doutorado em Produção Vegetal)- Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2000.