

FUNDAÇÃO CARMELITANA MÁRIO PALMÉRIO – FUCAMP
FACULDADE DE CIÊNCIAS HUMANAS E SOCIAIS – FACIUS
“Educação de qualidade ao seu alcance”

JAIRLA GOMES RODRIGUES

**PROSPECÇÃO DE MICRORGANISMOS SOLUBILIZADORES DE FÓSFORO NA
RIZOSFERA DE PLANTAS NATIVAS DE CERRADO**

MONTE CARMELO
2018

FUNDAÇÃO CARMELITANA MÁRIO PALMÉRIO – FUCAMP
FACULDADE DE CIÊNCIAS HUMANAS E SOCIAIS – FACIHUS
“Educação de qualidade ao seu alcance”

JAIRLA GOMES RODRIGUES

**PROSPECÇÃO DE MICRORGANISMOS SOLUBILIZADORES DE FÓSFORO NA
RIZOSFERA DE PLANTAS NATIVAS DE CERRADO**

Trabalho apresentado como requisito para a
conclusão da disciplina de Trabalho de
Conclusão de Curso II do Curso de Ciências
Biológicas da Fundação Carmelitana Mário
Palmério – FUCAMP.

Orientadora: Prof^ª.Me. Daniele Ruela Mendes

MONTE CARMELO
2018

FUNDAÇÃO CARMELITANA MÁRIO PALMÉRIO – FUCAMP
FACULDADE DE CIÊNCIAS HUMANAS E SOCIAIS – FACIUS
“Educação de qualidade ao seu alcance”

JAIRLA GOMES RODRIGUES

**PROSPECÇÃO DE MICRORGANISMOS SOLUBILIZADORES DE FÓSFORO NA
RIZOSFERA DE PLANTAS NATIVAS DE CERRADO**

Trabalho apresentado como requisito para a
conclusão da disciplina de Trabalho de
Conclusão de Curso II do Curso de Ciências
Biológicas da Fundação Carmelitana Mário
Palmério – FUCAMP

Monte Carmelo, 2018

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me guiar nessa caminhada.

Agradeço aos meus familiares, em especial meus irmãos e meu padrasto por sempre terem me dado o apoio necessário.

Agradecimento especial à minha mãe Sônia Gomes de Sousa, por sempre me apoiar, motivar e sempre me ajudar.

Agradecimento especial à professora mestre Daniele Ruela Mendes por aceitar no Programa de Iniciação Científica – PIBIC, me oferecendo essa incrível experiência, e por me orientar no desenvolvimento do TCC, que por sua vez me orientou muito bem.

Agradecimento especial aos professores Dr. Gilberto de Oliveira Mendes (UFU) e Dra. Vanessa Terra (UFU), que ajudaram bastante sendo essenciais no desenvolvimento da pesquisa.

Agradecimentos às alunas Mikaella Vitória Silva Machado, e Elida Cristina Monteiro de Oliveira, por terem participado comigo no projeto, foram muito importantes para o resultado da pesquisa, sempre demonstrando uma alegria e dedicação com o projeto.

Agradeço a todos os professores do curso de Ciências Biológicas, que motivaram e transmitiram seus conhecimentos.

Agradecimento especial a FAPEMIG, pela confiança e amparo financeiro.

Agradecimento especial à FUCAMP por disponibilizar os laboratórios para realizar os testes e os estudos.

RESUMO

Dentre os vários nutrientes que são essenciais para as plantas, o fósforo (P) ocupa lugar de destaque, sendo elemento mineral que mais limita a produção das culturas no Brasil. As plantas obtêm este nutritivo do solo, onde a disponibilidade em geral é baixa, e para atender as necessidades há a utilização de fertilizantes na agricultura. A população microbiana exerce grande influência nas transformações no solo, na disposição e na aquisição de nutrientes pelas plantas, acreditamos que existem microrganismos capazes de disponibilizar P no solo. Nesse sentido, o objetivo deste trabalho foi avaliar a solubilização de P, por microrganismos isolados da rizosfera de plantas nativas do Cerrado. Foram utilizadas as seguintes espécies *Caryocar brasiliense* Cam (Caryocaraceae), *Miconia albicans* (Sw.) Triana (Melastomataceae), *Xylopiasericca* A.St.-Hil. (Annonaceae), *Stylosanthes guianensis* (Aubl.) Sw. (Fabaceae/Caesalpinioideae) e *Sida urens* L. (Malvaceae). Amostras das raízes foram coletadas, juntamente com o solo rizosférico aderido, foram realizadas diluições seriadas em solução salina e alíquotas de 100 µL, as diluições 10^{-3} e 10^{-4} foram dispostas em placas de Petri contendo meio NBRIP. As placas isoladas foram incubadas em BOD a 28 °C por 7 dias. Após esse período foi realizada a contagem das colônias totais e das que apresentaram halo de solubilização. Os 54 isolados que apresentavam potencial foram incubadas em BOD a 28°C por 15 dias, foi realizada a medição do diâmetro do halo de solubilização no 9º e 15º dia de incubação. Os dados após transformação $\sqrt{x} + 5$ foram submetidos à ANOVA e os tratamentos comparados pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$). Observou-se que 92,6% dos isolados capazes de mobilizar formas insolúveis de P pertenciam a plantas de porte arbóreo (*C. brasiliense*, *M. albicans* e *X. sericea*) é provável que seja por que a vegetação arbórea possui um ciclo de vida maior e maior área de solo explorada comparada as herbáceas. Seis isolados apresentaram rápido crescimento e, por isso foram avaliados no 9º dia de incubação, esses isolados foram identificados morfológicamente como *Aspergillus niger*. Oito isolados produziram halo de solubilização maior que 2 cm, chegando a 6,5, sendo seis identificados como *A. niger*. Após 15 dias foi observado que o isolado fungico SMC9 produziu halo de solubilização de 6 cm, embora levando um tempo superior a uma taxa de 0,4 cm halo dia⁻¹ contra uma taxa do *A. niger* de 0,7 cm halo dia⁻¹. Os resultados obtidos mostraram que fungos filamentosos apresentam boa disponibilidade de P $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. Em conclusão os microrganismos solubilizadores são de grande importância na disposição de P para a planta demonstrando grande potencial e visando futura produção de inoculantes.

Palavras-chave: solubilizadores de P, fosfato, microbiologia, solo.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	7
MATERIAL E MÉTODOS.....	8
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	9
CONCLUSÃO.....	13
REFERÊNCIAS.....	14

INTRODUÇÃO

O Cerrado é conhecido como a savana mais rica do mundo, possui grande biodiversidade apresentando várias espécies endêmicas e é considerado um dos “hotspots” mundiais, possuindo uma extensão de cerca de dois milhões de km²(MINISTRA,2007). A riqueza e diversidade da fauna e da flora desse bioma é tão expressiva que representa cerca de 33% da biodiversidade brasileira. (AGUIAR; CAMARGO, 2004). A região apresenta fisionomias que compreendem formações florestais,savanicase campestres. (RIBEIRO;WALTER, 1998).

A classe dos Latossolos é predominante, ocupando cerca de 46% do bioma. (LOPES; GUILHERME, 1994).Estes solos apresentam boa estrutura física, resistência à mecanização, são solosprofundos e possibilitam um bom crescimento radicular das árvores. (SCARIOT et al, 2005).Entretanto, os mesmos apresentam uma alta intemperização, exibindo uma pequena reserva de nutrientes, alta saturação por alumínio e uma baixa a média Capacidade de Troca Catiônica (CTC), apresentam teores de fósforo disponível sempre inferiores a 1 mg/ dm³. Os Latossolos são bastante utilizados na agricultura, mesmo tendo fator limitante da baixa fertilidade, isso é corrigido através de corretivos e fertilizantes associados à época adequada do plantio (SOUSA; LOBATO, 2004).

O solo do Cerrado imobiliza o fósforo (P) impedindo a aquisição do mesmo pela vegetação. Isso está relacionado à sua mineralogia e da formação de fosfatos de ferro (FePO₄), alumínio (AlPO₄) e cálcio [Ca₃(PO₄)₂] (MENDES; JUNIOR, 2003)

O fósforo é um elemento vital para a produção e crescimento das plantas ele participa de processos metabólicos e transformações no solo, se apresenta certa escassez desse nutriente a nível mundial, sua deficiência tem grandes impactos na agricultura e posteriormente na economia. Os solos em geral apresentam uma deficiência desse elemento, sendo considerado um recurso natural finito. O solo apresenta uma forte reação com P apresentando uma alta fixação nos solos tropicais (BINI; LOPEZ, 2016).

Como os solos em geral apresentam baixa disponibilidade desse elemento e a quantidade de P exigida em culturas é grande isso torna necessária a utilização de adubos fosfatados que são produzidos a partir de rochas fosfatadas. Essas adubações possuem formas solúveis e muitas vezes são aplicadas doses superiores (RIEDER, 1986).Tem-se uma estimativa que todas as reservas de P, como recurso natural não renovável a nível global se esgotarão nos próximos séculos (CORDELL; WHITE, 2011; SIQUEIRA et al 2004).

A adubação fosfatada nos solos do Cerrado acaba sendo indispensável, boa parte do que é aplicado é perdido ou fixado pelo solo com isso a adubação se torna dispendiosa. As doses de fósforo aplicado são bem maiores do que a planta realmente necessitase numa cultura precisa absorver 10 Kg será aplicada 10 vezes mais. (MALAVOLTA, 1989).

Algumas plantas possuem na sua rizosfera microrgânicos capazes de solubilizar o P, relacionando a isso é interessante utilizar esses microrganismos para o aproveitamento e melhor aquisição do fósforo pela planta (INUE, 2009). Os microrganismos têm grande influência na disposição de nutrientes para as espécies vegetais atuando nas reações bioquímicas e na disposição de nutrientes para desenvolvimento da planta. (SILVEIRA, FREITAS 2007).

Atualmente os métodos de obtenção de fósforo a partir das rochas fosfatadas no campo industrial, são realizados processos com ácidos que atacam as rochas e liberam o P deixando-o solúvel. Esses processos apresentam um alto consumo de energia além de liberarem produtos indesejáveis. O uso dos microrganismos solubilizadores se mostra como uma alternativa promissora, sendo um método para obtenção do elemento mais econômico e ambientalmente sustentável, além de serem mais seletivos. (MENDES et al, 2014). Nesse sentido objetivou-se prospectar microrganismos solubilizadores de fósforo (MSFs) na rizosfera de plantas nativas do Cerrado, isolando e caracterizando esses microrganismos.

MATERIAL E MÉTODOS

Foi realizada a coleta de raízes e solo rizosférico de plantas nativas do Cerrado, solo rizosférico é aquele que permanece aderido à raiz e radículas da planta após expressiva agitação manual. Coletaram-se três amostras de cada uma das cinco espécies de plantas nativas encontradas em uma reserva legal na região de Monte Carmelo, Minas Gerais (18° 42' 31,6" S, 47° 33' 20,9" W). As espécies escolhidas foram três plantas de porte arbóreo - *Caryocar brasiliense* Cam (Caryocaraceae), *Miconia albicans* (Sw.) Triana (Melastomataceae) e *Xylopia sericea* A. St.-Hil. (Annonaceae) e duas plantas herbáceas - *Stylosanthes guianensis* (Aubl.) Sw. (Fabaceae/Caesalpinioideae) e *Sida urens* L. (Malvaceae).

Amostras de 10 g de raízes com solo rizosférico foram misturadas a 90 mL de solução salina estéril (NaCl 0,85%), e agitadas manualmente por 5 minutos para obtenção da diluição 10^{-1} . As amostras foram diluídas serialmente em diluições 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4} . Em seguida, foram transferidas assepticamente alíquotas de 100 μ L das diluições 10^{-3} e 10^{-4} para placas de Petri que continham meio NBRIP – National Botanical Research Institute's phosphate growth medium

(10 g glicose, 5 g $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, 5 g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,25 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,2 g KCl, 0,1 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 15 g ágar, 1 L água destilada, pH 7) (NAUTIYAL, 1999). A alíquota foi espalhada na superfície do meio de cultura com a alça de Drigalsky estéril.

As placas foram incubadas em estufa Incubadora BOD (BiochemicalOxygenDemand), a 28 °C, sendo avaliadas diariamente para detecção de microrganismos solubilizadores de P, indicados pela presença de halo transparente ao redor das colônias. Estas colônias foram repicadas sucessivamente para novas placas com meio NBRIP até obtenção de culturas puras.

Ao final de 7 dias foi realizada a contagem total de colônias de microrganismos e colônias que apresentaram halo de solubilização de P.

Com os dados dos valores das contagens, realizou-se os cálculos de número de unidades formadoras de colônia por grama de raízes (UFC g^{-1}). Os dados foram submetidos à análise de variância ANOVA, sendo transformados em log UFC para tornar a escala avaliável.

Os isolados solubilizadores de P obtidos foram avaliados quanto ao potencial de solubilização em meio sólido. Cada isolado foi inoculado no centro de uma placa de Petri de 9 cm de diâmetro e incubadas no escuro em BOD a 28 °C durante 15 dias. Os diâmetros do halo de solubilização e da colônia foram medidos no 9º e 15º dia de incubação. O experimento foi instalado em delineamento inteiramente casualizado com cinco repetições. Os dados após transformação por $\sqrt{x + 5}$, foram submetidos à ANOVA e os tratamentos comparados pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

A parte experimental foi realizada no laboratório de Microbiologia da instituição de ensino FUCAMP-Fundação Carmelitana Mário Palmério - Monte Carmelo/MG.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O solo é bastante heterogêneo abriga uma grande diversidade biológica onde detém várias interações desses organismos. Dados do experimento demonstram que os valores avaliados de UFC g^{-1} variaram entre 10^5 a 10^6 da microbiota capaz de solubilizar o P e entre 10^5 a 10^7 UFC g^{-1} em relação aos microrganismos totais (Figura 1A). Nas espécies avaliadas a ocorrência de microrganismos solubilizadores no solo pode variar em algumas plantas, mas não foi detectada diferença significativa. A população microbiana capaz de disponibilizar esse nutriente mineral possui uma significativa presença nos solos do Cerrado em média 10% da microbiota na rizosfera das plantas. (Figura 1B).

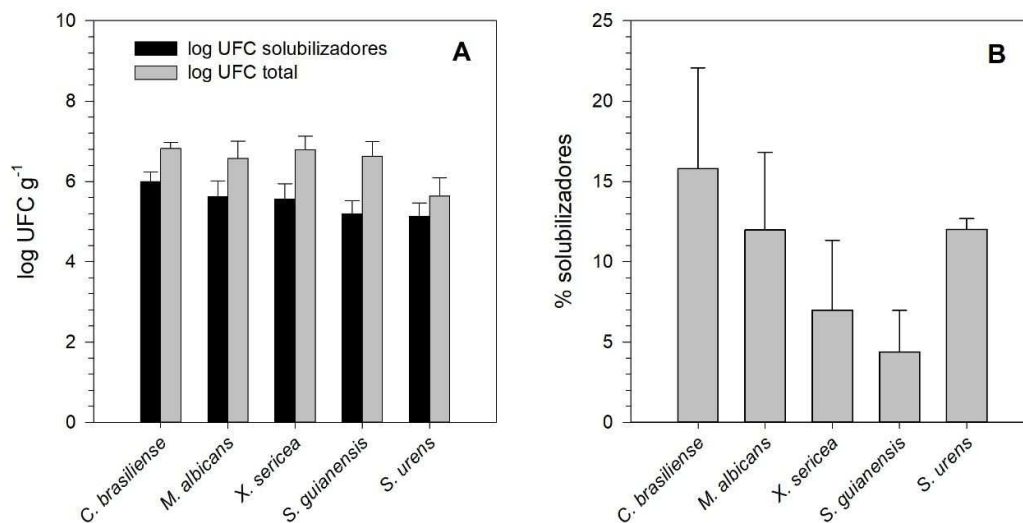


Figura 1. Caracterização da população microbiana da rizosfera de plantas nativas do Cerrado. (A) log UFC g⁻¹ e (B) % solubilizadores de fósforo. As barras de erro representam o desvio padrão média (n = 5).

O fósforo sofre várias transformações em seu ciclo como decomposição e mineralização e a presença dos microrganismos solubilizadores de fosfato é de grande importância e acaba sendo determinante para a aquisição desse mineral a planta sendo componente ativo do solo. No solo a constituição de bactérias solubilizadoras é maior comparada à quantidade de fungos capazes de disponibilizar o P, sendo que o grupo bacteriano representa 0,5% e o grupo fúngico de 0,1% da população total desses microrganismos. (KUCEY, 1983).

Nesse sentido os resultados obtidos apontam a relação das colônias de microrganismos solubilizadores de P. A avaliação visual das colônias de MSFs revelou que, do total avaliado 80% são bactérias e 20% fungos. Embora a ocorrência de fungos se apresentar expressivamente menor em quantidade eles se destacam por serem mais favoráveis a solubilização de P, pois possuem maior potencial de acidificação do meio circundante. (BANIK; DEY, 1982).

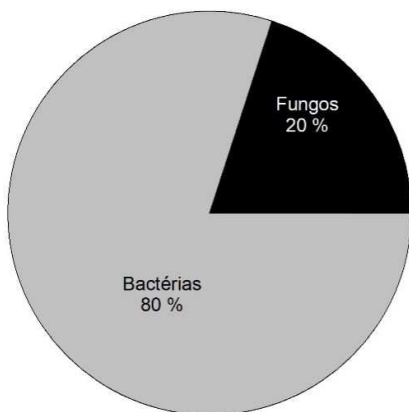


Figura 2. Percentual de bactérias e fungos solubilizadores de fósforo na rizosfera de plantas de Cerrado.

Foram obtidos 54 isolados demonstrando a capacidade de solubilizar P em meio NBRIP sólido. As espécies de plantas de porte arbóreo (*C. brasiliense*, *M.albicans* e *X. sericea*) apresentaram maior número de isolados, representando 92,6% do total de isolados (Figura 3). É provável que essa diferença resulte da maior longevidade e da maior área de solo explorada pelas raízes de plantas arbóreas quando comparada a plantas herbáceas, uma vez que mais interações com microrganismos na rizosfera poderão ser estabelecidas ao longo do seu ciclo de vida.

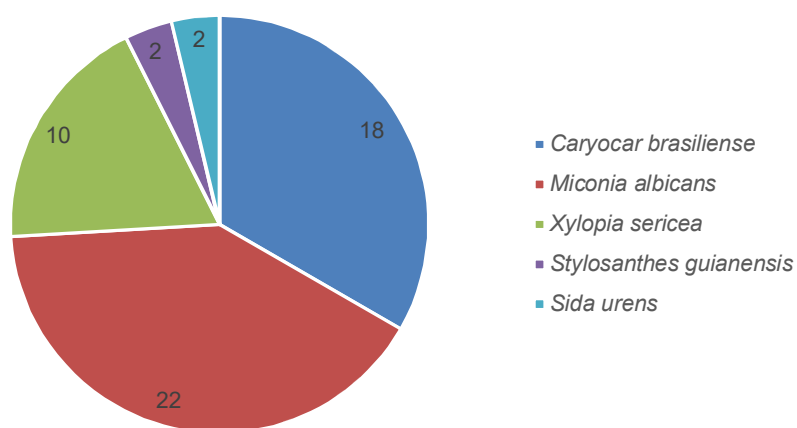


Figura 3. Número de isolados de microrganismos solubilizadores de P obtidos da rizosfera de plantas nativas do Cerrado.

Os isolados obtidos foram submetidos a avaliação do potencial de solubilização de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ em meio sólido. Baseado em caracteres morfológicos da colônia, os isolados SMC27, SMC32, SMC36, SMC37, SMC38 e SMC51 foram identificados como pertencentes à espécie *Aspergillus niger*. Esses isolados apresentaram rápido crescimento e, por isso, foram avaliados apenas aos 9 dias de incubação, tendo em vista que no 15º dia a colônia atingiu as bordas da placa.

Oito isolados produziram halo de solubilização maior que 2 cm, chegando a 6,5 cm (Figura 4). Estes isolados foram identificados como fungos filamentosos, sendo seis deles identificados como *A. niger*.

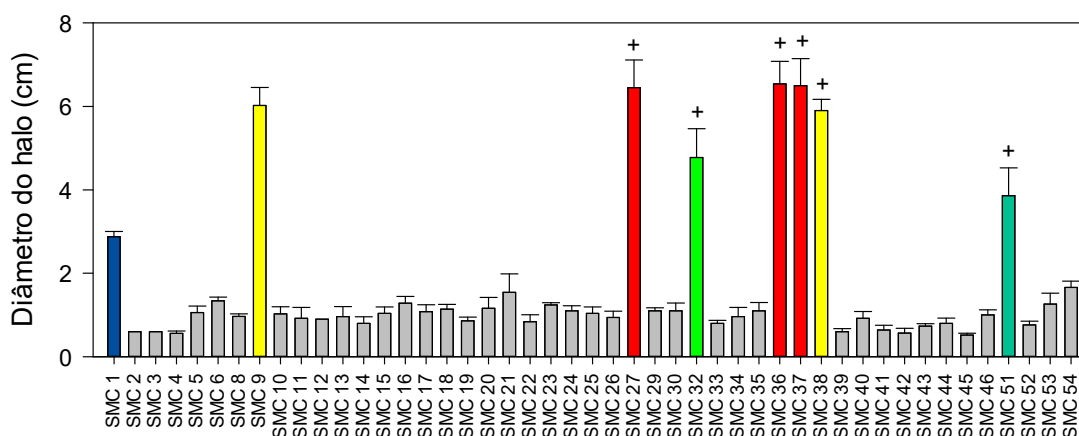


Figura 4. Diâmetro do halo de solubilização de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ por micro-organismos isolados da rizosfera de plantas nativas do Cerrado. Barras marcadas com + representam dados obtidos com 9 dias de incubação. As demais medidas foram obtidas no 15º dia de incubação. Barras de cores iguais não diferem significativamente entre si pelo teste Scott-Knott ($p < 0,05$). Barras de erros representam o desvio padrão da média ($n = 5$).

Após 15 dias observou-se que o isolado fungico SMC9 produziu halo de solubilização de uma taxa de 6 cm, igualando-se a alguns isolados de *A. niger* (Figura 4). Contudo, o tempo necessário para atingir esse nível de solubilização foi superior, obtendo-se uma taxa de 0,4 cm halo dia^{-1} contra uma taxa de 0,7 cm halo dia^{-1} .

Alguns isolados apresentaram resultados positivos sobre os parâmetros avaliados. Sendo característica utilizada na seleção destes microrganismos foi a capacidade e o potencial de solubilizar fosfatos e o diâmetro do halo de solubilização relacionada ao tempo de crescimento. Os isolados que se destacaram foram o *A. niger* e o isolado SMC9, podendo ser

selecionados pelo seu potencial visando à produção de inoculantes que contenham microrganismos capazes de disponibilizar o fósforo insolúvel de forma solúvel a planta. O uso de inoculantes de microrganismos solubilizadores constitui numa alternativa de melhorar o suprimento de P no solo (FILHO; VIDOR, 2000).

No trabalho realizado por Kucey em 1983, foram amostrados 17 locais, o total de fósforo foi extraído com NaHCO_3^- e a textura do solo foi determinada para cada solo. A população total do solo e os microrganismos solubilizadores foram determinados por diluições em série e contagem das colônias nas placas. Com os resultados obtidos foi observado que a quantidade de bactérias solubilizadoras no solo é maior que os fungos, os fungos foram superiores que as bactérias na solubilização. O grupo fungico também manteve a capacidade de solubilizar mesmo após muitas transferências de subculturas, sendo que as bactérias perderam sua capacidade quando subcultivada. Assim como observado nesse experimento o grupo fungico tem grande potencial solubilizador, com um tempo de crescimento menor, mesmo em menor quantidade em relação às bactérias.

Assim, a importância desses microrganismos na substituição parcial ou total, das formas de adubações fosfatadas oferecidas a partir de rochas fosfatada no mercado, esses microrganismos se mostram bastante promissores. Sendo necessários mais estudos relacionando as adaptações desses microrganismos às condições de campo que forem manejados.

CONCLUSÃO

1. Nas espécies avaliadas os microrganismos capazes de solubilizar o fósforo de minerais pouco solúveis representam 10% da população microbiana do solo. Sendo que desses microrganismos 80% são fungos e 20% bacterias.
2. As plantas de porte arboreo apresentaram um maior número de microrganismos solubilizadores de fósforo, em média 92,6% dos solubilizadores avaliados. Isso pode se dar pelo ciclo de vida maior da planta e por suas raízes ocuparem uma área superficial maior, tendo mais contato com o solo e com microrganismos, comparado as herbáceas.
3. Os fungos filamentosos isolados da rizosfera de plantas nativas do Cerrado apresentam maior potencial de solubilização de fósforo comparado as bactérias, apresentando um halo de solubilização maior que 2cm chegando a 6,5cm. Dos fungos filamentosos avaliados 75% foram identificados morfologicamente como *A. Niger*.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, L.M.S.; CAMARGO, A. J. A. (Ed). **Cerrado-** ecologia e caracterização. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2004. p. 23.
- BANIK S, DEY B.** Available phosphate content of an alluvial soil as influenced by inoculation of some isolated phosphate-solubilizing micro-organisms. *PlantSoil.* 1982 **69**:353-364.
- BINI, D.; LOPEZ, M. V. *Microbiologia do solo* 2º ed Piracicaba, SP: **ESALQ**, 2016. p.159.
- Biodiversidade do Cerrado e Pantanal:** áreas e ações prioritárias para conservação. Ministério do Meio Ambiente – Brasília: MMA, 2007. P.13.
- CORDELL D, WHITE S.** 2011. Peak phosphorus: clarifying the key issues of a vigorous debate about long-term phosphorus security. *Sustainability*3:2027-2049.
- FILHO, G. N. S.; VIDOR, C. **Solubilização de Fosfatos por Microrganismos na presença de fontes de carbono.** 2000. Parte da tese (Doutorado) -Faculdade de Agronomia – UFRGS, Porto Alegre (RS).
- INUE, R. N. **Isolamento e Identificação de Bactérias Solubilizadoras de Fósforo e Produtoras de Auxinas em solo de Cana- de açúcar.** 2009. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual Paulista de Ciências Agrárias e Veterinárias Campus de Jaboticabal (SP).
- KUCEY, R. M. N. Phosphate-solubilizingbacteria and fungi in various cultivated and virgin Alberta soils.*Can. J. Soil Sci.*, 1983.**63**: 671-678.
- LOPES, A. S.; GUILHERME, L. R. G. **Solos do Cerrado:** manejo da fertilidade para produção agropecuária. São Paulo: ANDA, 2º ed., 1994. p. 62.
- MALAVOLTA, E. ABC da adubação. 5º ed. São Paulo, SP: Ed. **Agronômica Ceres**,1989. p.41.
- MENDES, C.I.; JUNIOR, F. B. R. Microrganismos e Disponibilidade de Fósforo (P) nos solos: uma análise crítica. Planaltina, DF: **Embrapa Cerrados**, 2003. p. 9.
- MENDES, G. O. et al. Mechanisms of phosphate solubilization by fungal isolates when exposed to different P sources. **Annals of Microbiology**, v. 64, n. 1, p. 239–249, 2014.
- NAUTIYAL, C. S. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. **FEMS MicrobiologyLetters**, v. 170, n. 1, p. 265–270, 1999.
- RIBEIRO, J.F.; WALTER, B.M.T. Fitofisionomias do bioma Cerrado. In: SANO, S. M;ALMEIDA, S. P. de, (Ed.). **Cerrado:** ambiente e flora. Planaltina, DF: Embrapa-CPAC, 1998. p. 94.
- RIEDER, J.H. Destinação racional dos jazimentos fosfáticos nacionais. In: ENCONTRO NACIONAL DE ROCHAS FOSFATADAS, 3., Brasília, 1986. **Anais. Brasília, IBRAFOS**,1986. p.139-170.

SCARIOT, A.; SILVA, J. C. S.; FELFILI, J. M. (Organizadores). **Cerrado**: Ecologia, Biodiversidade e Conservação. Brasília, DF: Ministério do Meio Ambiente, 2005. p. 31.

SILVEIRA, A. P.D.; FREITAS, S. S. (Ed). Microbiota do solo e Qualidade Ambiental. Campinas, SP: Instituto Agrônomo, 2007. p. 22.

SIQUEIRA, J. O.; ANDRADE, A. T.; FAQUIN, V. Fósforo na Agricultura Brasileira. Piracicaba, SP: POTAFOS, 2004. p. 149.

SOUSA, D. M. G.; LOBATO, D. (Ed). **Cerrado** Correção do solo e adubação, 2. ed. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2004. p. 43-46.