

**UFRRJ**  
**INSTITUTO DE AGRONOMIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM**  
**FITOTECNIA**

**DISSERTAÇÃO**

**Emissões de N<sub>2</sub>O do solo de cana-de-açúcar plantada  
com fungicida via solo e fertilizada com ureia**

**Erika Caitano da Silva**

**2015**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE AGRONOMIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA**

# **Emissões de N<sub>2</sub>O do solo de cana-de-açúcar plantada com fungicida via solo e fertilizada com ureia**

**ERIKA CAITANO DA SILVA**

*Sob a Orientação do Pesquisador*  
**Dr. Segundo Urquiaga**

*e Co-orientação do Pesquisador*  
**Dr. Bruno José Rodrigues Alves**

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau **Mestre em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Fitotecnia, Área de Concentração em Agroecologia.

Seropédica, RJ  
Julho de 2015

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE AGRONOMIA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA**

**ERIKA CAITANO DA SILVA**

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências** no Curso de Pós-Graduação em Fitotecnia, área de concentração em Agroecologia.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM: 27/07/2015

---

Bruno José Rodrigues Alves (Ph.D.) - Embrapa Agrobiologia  
(Co-orientador)

---

Margarida Goréte Ferreira do Carmo (Ph.D.) - UFRuralRJ

---

Robert Michael Boddey (Dr.) - Embrapa Agrobiologia

631.84  
S586e  
T

Silva, Erika Caitano da, 1986-  
Emissões de N<sub>2</sub>O do solo de cana-de-  
açúcar plantada com fungicida via solo e  
fertilizada com ureia / Erika Caitano da  
Silva - 2015.  
64 f.: il.

Orientador: Segundo Urquiaga.  
Dissertação (mestrado) - Universidade  
Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de  
Pós-Graduação em Fitotecnia.  
Bibliografia: f. 52-64.

1. Solos - Teor de nitrogênio - Teses.  
2. Nitrogênio - Teses. 3. Fungos do solo -  
Teses. 4. Cana-de-açúcar - Teses. 5.  
Efeito estufa (Atmosfera) - Teses. I.  
Urquiaga, Segundo, 1950-. II. Universidade  
Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de  
Pós-Graduação em Fitotecnia. III. Título.

***Dedico e ofereço***

*Á meus pais, Maria Aparecida e Sebastião, pelo amor e dedicação, e ao meu irmão Edmilson pelo carinho e incentivo. Amo muito todos, sem vocês não conseguiria completar mais essa etapa de minha vida.*

## **AGRADECIMENTOS**

*Meus sinceros agradecimentos:*

*À Deus, em quem confio integralmente, pela orientação nas decisões, pelo conforto nas dificuldades e por atender minhas preces nos momentos de aflição e angustia.*

*Aos meus pais, Sebastião e Maria Aparecida, que venceram todas as dificuldades para que pudessem me proporcionar uma formação de qualidade. Agradeço pelo amor e carinho que tanto me dedicam, amo muito vocês.*

*Ao meu irmão Edmilson e sobrinha Inaê pelo amor, carinho e incentivo.*

*A todos os familiares, em especial a tia Lúcia Venâncio por todo amor, carinho e apoio em tudo o que faço.*

*Às amigas, Beatriz, Anelise e Silvana que percebi que mesmo depois da graduação a amizade continua e sempre se fortalece.*

*À família alojamento Embrapa Agrobiologia, pela convivência, trocas de experiências e amizades. Um espaço coletivo onde aprendemos muito com diferentes culturas e costumes, experiência muito rica para a construção profissional e principalmente pessoal de cada um, lugar onde conhecemos pessoas que servirão de exemplo e inspiração para toda a vida. O meu muito obrigada a todos os moradores!*

*Aos amigos do grupo de Ciclagem de nutrientes, bolsistas e técnicos, pela convivência e ajuda nos trabalhos, em especial ao Zuchello pelos conselhos, amizade e ajuda nos momentos de aflição.*

*Aos companheiros da empresa em SP, em especial ao Felipe, que ajudaram na execução deste trabalho.*

*Aos Pesquisadores Segundo e Bruno pelas Orientações, e pela oportunidade de desenvolver esse trabalho.*

*A todos os professores da universidade por ajudarem na minha formação e servirem de exemplos para a minha vida profissional.*

*À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, ao Instituto de Agronomia e à Embrapa Agrobiologia pela formação e capacitação.*

*À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos e financiamento do projeto.*

*“Daqui a vinte anos, você não terá arrependimento das coisas que fez, mas das que deixou de fazer. Por isso, veleje longe do seu porto seguro. Pegue os ventos. Explore. Sonhe. Descubra”.*

*(Mark Twain).*

## RESUMO

SILVA, Erika Caitano da. Emissões de N<sub>2</sub>O do solo de cana-de-açúcar plantada com fungicida via solo e fertilizada com ureia, 2015. 81 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia). Instituto de Agronomia, Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2015.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficiência de fungicida do grupo das estrobilurinas na redução da produção de N<sub>2</sub>O no solo, um potente gás de efeito estufa, além de possíveis efeitos positivos na eficiência de uso de N pela cana-de-açúcar. Foram conduzidos estudos em laboratório para avaliar o efeito do fungicida em solo fertilizado com N sobre as emissões de N<sub>2</sub>O, assim como um ensaio em casa de vegetação e outro em campo, onde se estudaram a ureia e o nitrato de amônio, tratados ou não com fungicida, sobre as emissões de N<sub>2</sub>O e indicadores de eficiência de uso de N pela cana-de-açúcar. Além do monitoramento dos fluxos de N<sub>2</sub>O com câmaras estáticas, foram também coletadas folhas da cultura para análise das frações solúveis de N e análise da enzima nitrato redutase, incluindo-se também a estimativa da produtividade e eficiência do uso de N. Os ensaios de laboratório mostraram que o fungicida aplicado ao solo reduz emissões de N<sub>2</sub>O. No ensaio em casa-de-vegetação, a análise de enzimas e frações de N na cana-de-açúcar não foram alteradas com o uso do fungicida, independente da fonte de N, mas houve tendência de redução dos fluxos de N<sub>2</sub>O no solo tratado com ureia. No ensaio de campo, os fluxos de N<sub>2</sub>O foram de 6 a 89  $\mu\text{g N m}^{-2}\text{h}^{-1}$ , 24 a 795  $\text{N m}^{-2}\text{h}^{-1}$  e 27 a 508  $\text{N m}^{-2}\text{h}^{-1}$  respectivamente para os tratamentos controle (sem adição de N), ureia e ureia +fungicida, indicando queda nas emissões de N<sub>2</sub>O de aproximadamente 30% no tratamento com fungicida. O tratamento com nitrato de amônio não induziu emissões de N<sub>2</sub>O do solo. Não houve diferença significativa entre os tratamentos em todas as análises das frações solúveis e também na análise enzimática. A produtividade de colmos (TCH), estimada a partir das dimensões dos colmos, variou significativamente de 190  $\text{Mg ha}^{-1}$ , no tratamento controle (sem adição de N), para 238  $\text{Mg ha}^{-1}$ , no tratamento com ureia, porém a aplicação do produto não influenciou na produção da cultura. O uso de fungicida reduz emissões de N<sub>2</sub>O, porém não induz maior eficiência de uso de N pela cana-de-açúcar.

**Palavras chave:** nitrogênio, emissões, N<sub>2</sub>O, fungos.

## ABSTRAT

SILVA, Erika Caitano da. Emissions of N<sub>2</sub>O from a sugarcane soil planted with soil fungicide and fertilized with urea, 2015. 82 p. Dissertation (Master of Science). Instituto de Agronomia, Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2015.

The objective of this study was to evaluate the efficiency of a fungicide of the strobilurin group in reducing soil N<sub>2</sub>O production, a potent greenhouse gas, and a possible positive effect on the N use efficiency by sugarcane. Laboratory studies were conducted to evaluate the effect of fungicide in soil fertilized with N on N<sub>2</sub>O emissions, as well as greenhouse and field experiments to study the fungicide as controller of urea and ammonium nitrate induction of N<sub>2</sub>O emissions and as an enhancer of fertilizer N use efficiency by sugarcane. In addition to the monitoring of soil N<sub>2</sub>O fluxes with static chambers sugarcane leaves were collected for analysis of soluble forms of N and nitrate reductase activity together with plant parameters to estimate yield and the efficiency of fertilizer N use. Laboratory tests revealed the fungicide was capable of reducing soil N<sub>2</sub>O emissions. Regardless of N source, the fungicide did not affect the analyses of enzymes and plant N fractions in sugarcane, but there was a downward trend of N<sub>2</sub>O fluxes in the soil treated with urea in the greenhouse experiment. In the field experiment, N<sub>2</sub>O fluxes were 6 to 89  $\mu\text{g N m}^{-2}\text{h}^{-1}$ , 24 to 795  $\mu\text{g N m}^{-2}\text{h}^{-1}$  and 27 to 508  $\mu\text{g N m}^{-2}\text{h}^{-1}$  respectively to the control (no added N), urea and urea + fungicide treatments, indicating that N<sub>2</sub>O emissions were reduced in approximately 30% by the fungicide. The treatment with ammonium nitrate did not induce N<sub>2</sub>O emissions from soil. There was no significant difference between treatments in all analyses of soluble fractions and enzyme activity. Based on the dimensions of stalks, sugarcane yield was estimated at 190 Mg ha<sup>-1</sup> for the control treatment (without added N) and at 238 Mg ha<sup>-1</sup> for urea treatment. The application of fungicide had no effect on yield. The use of fungicide reduced soil N<sub>2</sub>O emissions, but does not induce greater N use efficiency by sugarcane.

**Keywords:** nitrogen, emissions, N<sub>2</sub>O, fungus.

## SUMÁRIO

<b>1-INTRODUÇÃO .....</b>	<b>11</b>
<b>2-REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>12</b>
<b>2.1- O cultivo da cana-de-açúcar no Brasil .....</b>	<b>12</b>
<b>2.2-Adubação nitrogenada em cana-de-açúcar.....</b>	<b>13</b>
<b>2.3-Efeito Estufa .....</b>	<b>15</b>
<b>2.4 - Emissões de N<sub>2</sub>O.....</b>	<b>16</b>
<b>2.5- As estrobilurinas e seus efeitos sobre as culturas.....</b>	<b>19</b>
<b>3-MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>21</b>
<b>3.1- EXPERIMENTOS PRELIMINARES .....</b>	<b>21</b>
<b>3.1- EXPERIMENTO I: ENSAIO A CAMPO.....</b>	<b>23</b>
3.1.1. Localização e delineamento experimental .....	23
3.1.2. Amostragem de gás para análises de fluxo de N <sub>2</sub> O.....	25
3.1.3- Amostragens de solo.....	26
3.1.4- Biometria .....	27
<b>3.2- EXPERIMENTO II: ENSAIO EM CASA DE VEGETAÇÃO.....</b>	<b>27</b>
3.2.1- Amostragem de gás para análises de fluxo de N <sub>2</sub> O .....	29
<b>3.3- MÉTODOS ANALÍTICOS .....</b>	<b>29</b>
3.3.1- Amostragem e armazenamento de análises de N <sub>2</sub> O.....	29
3.3.2. Análise de Metabólitos Solúveis .....	30
3.3.3. Análise enzimática.....	31
<b>4- RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>32</b>
<b>4.1- EXPERIMENTOS PRELIMINARES .....</b>	<b>32</b>
A) Primeiro teste .....	32
<b>4.2- EXPERIMENTO I: ENSAIO A CAMPO.....</b>	<b>34</b>
4.2.1- Emissões de N <sub>2</sub> O.....	34
Tratamentos*.....	39
4.2.2- METABÓLITOS SOLÚVEIS .....	43
4.2.3- ANÁLISE ENZIMÁTICA.....	44
4.2.4- BIOMETRIA .....	45
<b>4.3- EXPERIMENTO II: ENSAIO EM CASA DE VEGETAÇÃO.....</b>	<b>47</b>
4.3.1- Emissões de N <sub>2</sub> O.....	47
4.3.2- METABÓLITOS SOLÚVEIS .....	48
4.3.3- ANÁLISE ENZIMÁTICA.....	48
4.3.4- BIOMETRIA .....	49
<b>5- CONCLUSÕES.....</b>	<b>51</b>
<b>6- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>52</b>

## 1-INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) é uma Poaceae com metabolismo fotossintético C4. Possui um ciclo chamado “cana planta” (primeiro ciclo após o plantio), que pode variar entre 12 a 18 meses. Após o primeiro corte, a planta rebrota e passa a ser chamada de “cana soca”, geralmente diminuindo sua produtividade com os cortes, sendo replantada após 4 a 6 ciclos de cana soca.

É uma das culturas mais importantes do Brasil. Atualmente o país é o maior produtor tanto da cultura como de seu principal produto, o açúcar, além de ocupar o segundo lugar na produção de etanol. Com base em dados da Companhia Nacional de Abastecimento - CONAB (2015), a produção de cana foi estimada em 634 milhões de toneladas na safra de 2014, com previsão para a safra de 2015 de 654 milhões de toneladas em uma área plantada de cerca de 9 milhões de hectares. A região Centro-Sul possui a maior produção nacional, com destaque para o estado de São Paulo com aproximadamente 53% da produção do país.

O suprimento de N para as plantas na agricultura brasileira ocorre principalmente com a adição de ureia, devido a seu alto teor de N, cujos os custos de transporte são menores, além de sua produção ser mais simples em relação às demais fontes de N, segundo as indústrias de fertilizantes (CANTARELLA E MARCELINO, 2007). Para a cana-de-açúcar são recomendadas doses de fertilizantes nitrogenados em torno de 40 kg ha<sup>-1</sup> de N na cana-planta e de 80 kg ha<sup>-1</sup> de N nas soqueiras (Nunes Junior et al., 2005), porém a cultura possui baixa eficiência no uso do nitrogênio em condições comerciais. Estima-se que a eficiência de uso de N para a cultura não ultrapasse 30 % (Balasubramanian et al., 2004). Devido à baixa eficiência de uso de N, perdas podem ocorrer através de lixiviação e volatilização de amônia, além da absorção da forma amoniacal aumentar a acidez do solo (MACLAREN e CAMERON, 1996; OLIVEIRA et al., 2002).

A literatura mostra pouca resposta na produtividade da cana-de-açúcar em função da aplicação de adubos nitrogenados. Por exemplo, Prado e Pancelli (2008) verificaram que apenas no segundo corte da soqueira de cana-de-açúcar houve alguma resposta à adição de N, porém esse aumento na produtividade foi de apenas 8%, quando comparadas as doses de 0 e 200 kg N ha<sup>-1</sup>. Franco et. al.(2008) também observaram que não houve aumento na recuperação do <sup>15</sup>N- ureia pela cana planta, com o aumento das doses de fertilizante aplicadas de 40, 80 e 120 kg N ha<sup>-1</sup>.

Por respostas pouco significativas da cana-de-açúcar com a aplicação de fertilizantes nitrogenados, alternativas para o maior aproveitamento desse elemento no solo pela cultura estão sendo estudadas. Uma das alternativas seria o uso de produtos químicos a base de princípio ativo da família das estrobilurinas, considerados responsáveis por alterações fisiológicas que aumentam o vigor das plantas.

Esses compostos inicialmente extraídos do fungo *Strobilurus tenacellus*, passaram a ser sintetizados e atualmente são utilizados como fungicidas. Com o avanço nos estudos sobre esses produtos, percebeu-se que além do combate a fungos prejudiciais às culturas, também agem proporcionando benefícios fisiológicos. Conforme descrito por Jabs (2004), essas moléculas beneficiam as plantas por meio da melhoria de seu desenvolvimento, além de promover melhor utilização de CO<sub>2</sub> e redução na produção de etileno, aumentando assim a vida útil das folhas.

Para a cultura da soja (cultivar M-SOY 8008 RR), relata-se que um tipo de estrobilurina trouxe incremento da taxa fotossintética, no estágio fenológico R1 e R5.1 em dois períodos de aplicação. Após o uso de estrobilurina, há uma redução da taxa respiratória (estádio R5.1). Foi observado aumento da atividade da enzima nitrato redutase nas folhas, quando a aplicação da estrobilurina é feita no florescimento ao invés do período de enchimento dos grãos. Além disso, também foi avaliado aumento de massa em mil grãos e de

produtividade em 1080 kg ha<sup>-1</sup> (FAGAN, 2010). Para trigo e cevada, Michael (2002) observou o aumento no rendimento em 7% de grãos, em comparação com tratamentos com fungicidas à base de azóis e azóis/morfolinas. Também foi observada, elevação em 19% da taxa fotossintética e de 15% na taxa de transporte de elétrons, além de melhorias na eficiência hídrica das culturas.

Através desses ensaios, pode-se observar que o fungicida a base de estrobilurina possui influência em vários processos fisiológicos e bioquímicos das culturas de soja, trigo e cevada, aumentando a eficiência dessas no uso do nitrogênio. Porém para a cultura da cana-de-açúcar ainda não há estudos publicados, embora fungicidas contendo estrobilurina sejam aplicados à cultura.

Se de fato ocorre um aumento da eficiência de uso de N pela planta com o uso desses fungicidas, pode-se especular sobre um conseqüente efeito na redução de perdas de N. Um dos impactos ambientais esperados com as perdas de N é a emissão de óxido nítrico (N<sub>2</sub>O) para a atmosfera. Trata-se de um gás com elevado potencial para o efeito estufa do planeta, e é produzido no solo quando existe excesso de N, alta umidade, presença de resíduos orgânicos etc pelos processos de nitrificação e desnitrificação, principalmente (ALVES et al, 2012).

Por muito tempo, os procariotos foram considerados responsáveis pela desnitrificação no solo. Porém, trabalhos realizados com o antibiótico cicloheximida, com ação fungicida, mostraram elevada redução nas emissões de N<sub>2</sub>O, sugerindo a participação relevante de fungos no processo. Laughlin e Stevens (2002) relataram reduções de 89% nas emissões de N<sub>2</sub>O com produção de azevém em solos da Irlanda. Outro estudo mostrou redução de 40% em solos agrícolas tratados com clorotalonil (KINNEY et al., 2004). Esses trabalhos permitem formular a hipótese de que o uso de fungicidas para controlar fungos fitopatogênicos do solo no plantio da cana-de-açúcar poderia contribuir para reduzir emissões de N<sub>2</sub>O, que normalmente incrementam com a fertilização nitrogenada. A segunda hipótese seria a de que a utilização de fungicidas poderia aumentar a eficiência de uso de N pelas plantas, em função de menores perdas e de possível influência fisiológica nas plantas de cana-de-açúcar.

Assim, os objetivos deste trabalho foram os de avaliar a influência de um fungicida a base de estrobilurina no desenvolvimento da cultura da cana-de-açúcar, mais especificamente sobre a eficiência de uso de N pela planta, explorando-se também o efeito do produto sobre as perdas de N<sub>2</sub>O do solo.

## **2-REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1- O cultivo da cana-de-açúcar no Brasil**

A cultura da cana de açúcar começou a ser cultivada no Brasil alguns anos após o descobrimento do país, em 1532 por incentivo do colonizador Martim Afonso de Souza. O seu cultivo foi a primeira atividade organizada do país, se tornando desde essa época importante componente de desenvolvimento (ÚNICA, 2010).

Atualmente, muitas pesquisas são voltadas para o melhoramento e aumento de produtividade da cana-de-açúcar, pelo fato de ser uma cultura de grande retorno econômico para o Brasil (DANALATOS et al., 2007; RAVINDRANATH et al., 2006; QUESADA, 2005). Sua industrialização além de fornecer açúcar e álcool, que são seus principais produtos, também disponibiliza subprodutos como torta de filtro, bagaço, vinhaça, entre outros de importância como insumo no sistema de produção. Cada tonelada de cana produz cerca de 120 quilos de açúcar e 85 litros de etanol, e mais recentemente a energia

gerada pela queima do bagaço e da palha se transformaram no terceiro produto comercial da cultura (ÚNICA, 2010).

Neves et al. (2011) afirmaram que para o país ter se tornado o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, o aumento em sua produtividade foi constante durante os 40 últimos anos, apesar do considerável crescimento em outros países como a Índia, China, Estados Unidos, Austrália e Tailândia. Essa expansão na produtividade da cultura, fez com que a produção de açúcar, que vinha sendo o “carro chefe” no setor, alcançasse aumentos de quase 600% na safra de 2009/2010 em comparação com a safra de 40 anos atrás. Hoje o Brasil responde por cerca de 20% da produção mundial de açúcar e 40% das exportações.

Apesar desses aumentos na produtividade serem expressivos e importantes para o desenvolvimento do país, com essa expansão nas áreas cultivadas levantou-se a discussão sobre a sustentabilidade do setor canavieiro, e foi revelado que a prática do cultivo de cana-de-açúcar é a maior geradora de gases de efeito estufa (GEE). Isso se deve pelo fato de que a atividade do setor energético, que utiliza a queima de combustíveis fósseis (petróleo, carvão e gás mineral) para se obter energia e transporte, ser a maior contribuinte para o aumento nas concentrações dos principais gases como CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub> e N<sub>2</sub>O, representando 57% das emissões (SCARPINELLA, 2002).

Investimentos no setor como a utilização do bagaço da cana para produção de energia (bioeletricidade) e a eliminação da queima da cana para colheita, fizeram com que as emissões fossem reduzidas, e assim a análise da pegada de carbono do etanol brasileiro, desde a produção de cana até a utilização pelo consumidor, seja 80% menor (em equivalentes de CO<sub>2</sub>), tendo como referência o uso de combustíveis fósseis veiculares (SOARES et al, 2009). Assim, o etanol é mundialmente reconhecido por sua sustentabilidade e economia (ALBINO et al., 2006), pois quando comparado com a gasolina, ele se torna uma alternativa mais barata, renovável e menos poluente (JAGGER, 2010; LEE, et al., 2006).

Segundo dados da União da Indústria de cana de açúcar (ÚNICA, 2010), além de expressiva contribuição na geração de empregos, o setor sucroenergético é um dos principais contribuintes para que a agricultura brasileira sempre esteja entre as mais importantes atividades geradoras de riquezas, e dessa forma elevando os números do Produto Interno Bruto (PIB) do país. Tendo em vista a importância da cana de açúcar no desenvolvimento do Brasil, pode-se concluir que os investimentos com pesquisas que visam alternativas para mitigar essas emissões no processo produtivo do setor, buscando a sustentabilidade do sistema, são essenciais.

## **2.2-Adubação nitrogenada em cana-de-açúcar**

A absorção de N pelos vegetais ocorre basicamente a partir das formas NO<sub>3</sub><sup>-</sup> e NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, sendo na sua maioria (99%) através de fluxo de massa e apenas 1% pela interceptação do sistema radicular (MALAVOLTA et al., 1997). Segundo Meinzer e Zhu (1998), em condições de deficiência de N a produção de esqueletos de C diminui, dessa forma ocorre uma queda na produtividade das culturas, havendo especificamente na cana-de-açúcar menores números de perfilhamento, diminuição da área foliar e menor longevidade das folhas (MALAVOLTA et al., 1997).

Para Cantarella e Raij (1986), vários experimentos mostraram que a cana na fase soca responde positivamente à aplicação de nitrogênio, porém houve casos em que a resposta foi negativa. Outros autores observaram que a cana soca possui maior resposta à adubação nitrogenada do que a cana planta (MARINHO, 1974; AZEREDO et al. 1984), porém em outros ensaios não se observou resposta positiva à aplicação desse nutriente para o ciclo de crescimento das soqueiras (GALLO et al., 1974, ANJOS et al., 1998). Dessa forma, estudos

ainda precisam ser realizados para uma conclusão definitiva sobre o assunto, especialmente sobre o destino do N não aproveitado pela cultura.

Como toda a cultura, para que haja aumentos na produtividade principalmente da cana-soca, o nitrogênio é um dos elementos essenciais. Dessa forma, a fertilização nitrogenada é uma prática que integra o sistema de produção da cultura, embora as doses, fontes e formas de aplicação variem consideravelmente entre produtores. Em alguns casos, reporta-se dispensável a aplicação de N no primeiro ciclo após o plantio (cana-planta), embora seja onde ocorre a maior acumulação de N pela cultura. Para as fases de cana-soca, as doses são maiores em função da frequente resposta da cultura à aplicação de N (ORLANDO-FILHO et al., 1980).

Alguns fatores podem explicar diferenças na resposta de N entre a cana planta e a cana soca como exemplo:

- O N acumulado nos toletes pode ser suficiente para o crescimento inicial da planta, uma vez que a demanda inicial da cultura é baixa;
- Maior vigor das raízes da cana-planta em comparação com cana-soca, permitindo maior aproveitamento do N mineralizado do solo;
- Os restos culturais da cultura anterior podem suprir parte dos requerimentos de N da cultura;
- A imobilização do N na palha da pode contribuir significativamente para reduzir a disponibilidade de N no solo na cana-soca;
- A calagem pode ajudar na disponibilização de N no solo (ARAÚJO et al., 2001);
- Possíveis diferenças na eficiência da cultura em relação à fixação biológica de nitrogênio (FBN) (URQUIAGA, 1992), além de outros benefícios promovidos através da associação com bactérias diazotróficas como na produção de hormônios que são promotores de crescimento, como exemplo o ácido indolacético (SUMAN et al., 2001);
- Maiores níveis no teor de carbono orgânico do solo e retenção de nutrientes essenciais como o N (YADAV et al., 2009);
- E por fim aumentos na solubilização de moléculas de fosfatos (SINGH et al., 2007; SHUKLA et al., 2008).

Para que ocorra uma maior resposta à fertilização com N na cana-de-açúcar, fatores como a cultivar, o número de cortes, a disponibilidade do elemento na solução do solo, o ciclo da cultura e fatores ambientais precisam ser observados (COURTAILLAC et al., 1998).

Por ser um nutriente altamente extraído do solo pela cana-de-açúcar, devido ao seu longo ciclo e por possuir um sistema radicular abundante, a cultura possui uma elevada eficiência fisiológica na utilização de nitrogênio do solo, o que deve contribuir para reduzir a resposta à fertilização nitrogenada (SILVEIRA, 1985).

Com base em estudos realizados por Korndorfer et al. (1997), aproximadamente 50% do nitrogênio acumulado na parte aérea da cana está concentrado no colmo. Esse aspecto implica em dizer que para produtividades na faixa de 80 Mg ha<sup>-1</sup>, cerca de 90 a 100 kg N ha<sup>-1</sup> são exportados do sistema, sendo que a irrigação com vinhaça devolve entre 20 a 30 kg N ha<sup>-1</sup>, deixando um saldo negativo para o sistema de 60 a 80 kg N ha<sup>-1</sup>. Como no Brasil a fertilização com N está entre 60 e 80 kg N ha<sup>-1</sup> ano<sup>-1</sup>, em média, e a eficiência não passa de 50 % (BALASUBRAMANIAN et al., 2004), pode-se deduzir que é um sistema deficitário em N ou que a fixação biológica de N<sub>2</sub> tem papel muito relevante na sustentabilidade da produção (URQUIAGA et al., 2012; BAPTISTA et al., 2014).

Normalmente culturas de grãos ou de pastagens conseguem aproveitar cerca de 60% do nitrogênio proveniente de fertilizantes. Já em cana-de-açúcar, foi encontrado um aproveitamento em torno de 20% (GAVA et al. 2003), ou ainda menores como de 7 a 16% encontrados por Trivelin et al. (2002b). O resíduo do nitrogênio no solo tende a diminuir o aproveitamento da cana em relação à adubação nitrogenada, uma vez que é pequena a quantidade de N absorvido proveniente do fertilizante em comparação ao total que é

acumulado pela planta (BITTENCOURT et al, 1986). Dessa forma as perdas de N-fertilizante tendem a serem maiores do que a quantidade que a planta consegue recuperar (VITTI, 2003; GAVA et al., 2002). Lisboa et al. (2011) concluiu que mais de 60 % do N aplicado na forma de fertilizante é perdido para o ambiente.

A combinação do N com outras fontes de nutrientes parece exercer efeitos sobre o uso de N pela cultura. Ensaios a campo conduzidos por Silva & Gurgel (1981), mostram que a acumulação de N na planta é significativa quando o solo é tratado com vinhaça como fertilizante. A presença de vinhaça no solo também possui efeito positivo na atividade da enzima nitrato redutase, nos compostos nitrogenados e na produção de proteínas em folhas, bainhas e colmos durante o ciclo de crescimento da cana-de-açúcar (SILVEIRA E CROCOMO, 1990), apresentando maiores taxas de crescimento, em relação ao tratamento controle (SILVEIRA, 1985). Além disso, estudos feitos por Schultz (2009) mostraram maior rendimento de colmos em cana de primeira soca com aplicação de vinhaça + 80kg de N-ureia ha<sup>-1</sup> em comparação a aplicação sem a mistura desses produtos.

Contudo, Silveira & Crocomo (1981), concluem que provavelmente as quantidades significativas de nitrato armazenados nos colmos ocorreram nas fases iniciais de crescimento da cana-de-açúcar. Isso indica que nas fases jovens da cultura há alta atividade no sistema de absorção, redução de nitrato e assimilação amônia (TAKASHI, 1965; TEIXEIRA, 1980).

### 2.3–Efeito Estufa

A atmosfera é uma fina camada de gases que envolvem o planeta Terra, tendo em sua constituição 78% de nitrogênio (N<sub>2</sub>) e 21% de oxigênio (O<sub>2</sub>), além da presença dos gases de efeito estufa (GEE). (IPCC, 1996). O aquecimento da atmosfera e da superfície terrestre é proporcionado através da energia solar que incide por meio de radiações ultravioleta, visível e infravermelha. Em torno de 50% dessa energia incidente no planeta é absorvida pela superfície terrestre, além de ocorrer uma absorção por gases e gotículas de água que estão presentes no ar em aproximadamente 20%. A parcela restante (30%) volta para o espaço através de corpos refletivos como a neve, o gelo, a areia e as nuvens. Os gases do efeito estufa absorvem toda essa radiação e emitem na forma de calor proporcionando esse efeito de estufa, mantendo o equilíbrio térmico da Terra (ZANATTA, 2009).

O efeito estufa é um fenômeno muito importante para a manutenção da estabilidade do ecossistema e do clima terrestre, é através dele que a temperatura da Terra se mantém constante com aproximadamente 15 °C, pois na ausência desse efeito essa temperatura seria em torno de -18 °C, assim a vida no planeta na forma que conhecemos não seria possível (IPCC, 1996; 2007). Porém, o desequilíbrio nas concentrações de gases que compõem esse fenômeno na atmosfera pode levar a aumentos dessa temperatura. Forster et. al. (2007) verificaram que em diversas regiões do planeta ocorrem aumentos na temperatura desde a era pré-industrial, sendo impulsionado pelo crescimento econômico e populacional.

Os principais gases do efeito estufa do planeta são o dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), o metano (CH<sub>4</sub>) e o óxido nitroso (N<sub>2</sub>O). Pesquisas revelam que o aumento das concentrações de CO<sub>2</sub> na atmosfera, considerando uma escala de 250 anos, foi de aproximadamente 100 ppmv (parte por milhão em volume), sendo que nos últimos 10 anos esse aumento ocorreu a uma taxa de 2 ppmv por ano. No caso do CH<sub>4</sub> houve um aumento de cerca de 150% em suas concentrações, com uma taxa anual de 3 ppmv, sendo também bastante expressivo. Nesse mesmo período, as concentrações de N<sub>2</sub>O aumentaram em 16%, passando de 270 para 320 ppbv (partes por bilhão em volume) com uma taxa de 0,8 ppbv ano<sup>-1</sup> (FORSTER et al. 2007).

Segundo estudos realizados por Hansen et. al. (2005), se as taxas anuais de emissões continuarem no mesmo ritmo, numa escala de 10 anos a temperatura terrestre poderá

umentar 0,6 °C. Além disso, é muito provável que se torne freqüente e mais durável as ocorrências de ondas de calor e eventos extremos de precipitação em diversas regiões, sem falar no aquecimento, acidificação e aumento do nível dos oceanos (IPCC, 2007).

## 2.4 - Emissões de N<sub>2</sub>O

Apesar de possuir uma concentração a níveis baixos, o óxido nitroso (N<sub>2</sub>O) é considerado um gás muito ativo no processo de efeito estufa devido a sua alta capacidade de absorver radiação infravermelha e sua alta estabilidade na atmosfera. Uma molécula desse gás, considerando-se um período de 100 anos, tem um potencial de efeito estufa 296 vezes maior do que o CO<sub>2</sub>, além de sua radiação equivaler em aproximadamente 10% em relação ao CO<sub>2</sub> e sua permanência na atmosfera ser estimada em 120 anos. (ROBERTSON & GRACE, 2004; HOFMANN, 2006; SCHINDLBACHER et al., 2004; IPCC 2007).

Existem fontes naturais de N<sub>2</sub>O como as savanas, os oceanos e os solos das florestas, além de fontes sintéticas como na produção de nylon e na queima de combustíveis fósseis (FORSTER et al, 2007). Apesar disso a prática da agricultura é considerada uma das principais causas para o aumento das emissões de gases do efeito estufa no planeta, principalmente de N<sub>2</sub>O (IPCC, 2007). As práticas agrícolas contribuem para as emissões de N<sub>2</sub>O através do uso de nitrogênio com aplicação de fertilizantes, por meio do processo de fixação biológica de nitrogênio, adubos provindos de dejetos de animais e através de mudanças de uso do solo.

Por ano aproximadamente 70% dessas emissões antropogênicas (promovidas pelo homem) de N<sub>2</sub>O no mundo está ligada a produção de animais e culturas agrícolas (MOSIER, 2001), sendo esta causada por sua grande maioria devido ao uso de fertilizantes nitrogenados (NEVISON e HOLANDA, 1997).

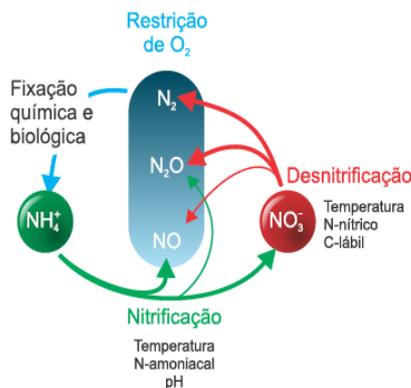
Nos próximos anos a tendência é de aumentos nessas emissões, principalmente devido a expansão econômica de países em desenvolvimento, que ocorre muitas vezes através de investimentos em áreas agrícolas, e como conseqüências há aumentos na utilização de fertilizantes (SMITH et al., 2007; ZHANG, 2007). Portanto o entendimento da dinâmica do nitrogênio no sistema solo-planta-atmosfera é essencial para o desenvolvimento de técnicas de manejo que consigam mitigar os efeitos dessas mudanças de uso da terra sobre as mudanças climáticas (EMBRAPA, 2009).

No Brasil não é diferente, apenas as emissões de N<sub>2</sub>O da agropecuária representam cerca de 90% do total do gás emitido pelo país (CERRI et al., 2009). Estatísticas apresentadas mostram que somente no ano de 2014, o país consumiu aproximadamente 32 milhões de toneladas de fertilizantes minerais, sendo que os mais utilizados são a ureia e o sulfato de amônio (ANDA, 2015), sendo um importante contribuinte para essa alta porcentagem nas emissões de N<sub>2</sub>O. Além disso, os dejetos (fezes e urina) dos animais de pastagens também possuem alta influência nesses números, sendo uma fonte com alto potencial de emissão não apenas de N<sub>2</sub>O como de metano (CH<sub>4</sub>) (CERRI et al., 2009). Um estudo realizado para observar a emissão de N<sub>2</sub>O em comparação com sistema de plantio direto e preparo reduzido do solo, com aplicação de dejetos de suínos, revelou que essas emissões obtiveram aumentos logo após a aplicação dos dejetos, nos dois sistemas de produção, revelando a importância dessa prática na elevação das concentrações desse gás na atmosfera (GIACOMINI et al., 2006).

Como se pode observar, o setor agrícola do Brasil possui uma expressiva contribuição nas emissões de N<sub>2</sub>O, com isso há a necessidade de intensificar os esforços para o desenvolvimento de tecnologias e práticas de manejo que sejam capazes de diminuir as emissões desse gás para a atmosfera (ZANATTA, 2009).

A produção de óxidos de nitrogênio no solo ocorre através dos processos de nitrificação e desnitrificação. A primeira reação sintetiza em maior proporção o óxido nítrico (NO) do que o óxido nitroso (N<sub>2</sub>O), já a segunda reação possui maior dominância na síntese de N<sub>2</sub>O (DAVIDSON et. al., 1993). A nitrificação é favorecida pela disponibilidade de NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, por concentrações adequadas de oxigênio (O<sub>2</sub>) no solo e por elevadas transformações de nitrogênio no sistema (DAVIDSON et al., 2000).

Todo esse processo pode ser observado no Modelo conceitual sobre as principais fontes de N<sub>2</sub>O e NO do sistema, demonstrado no esquema a seguir.



**Figura 1.** Modelo conceitual sobre as principais fontes de N<sub>2</sub>O e NO do sistema (EMBRAPA, 2012).

Corroborando com Paul e Clark (1996), as bactérias nitrificadoras, como as *Nitrossomonas* e as *Nitrosospira*, são os principais gêneros que oxidam NH<sub>4</sub><sup>+</sup> a NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, e *Nitrobacter*, tem como produto o NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, organismos esses favorecidos por condições de pH superiores a 5, o que é comum em áreas agrícolas, normalmente corrigidas com calcário. Os solos bem drenados favorecem a nitrificação por ser um processo aeróbico, porém a umidade e temperatura são fatores importantes para otimizar a reação.

Em solos cujo espaço poroso saturado por água (EPSA) se encontra a uma porcentagem < ou = 40%, ocorrem produções mais rápidas de NO do que N<sub>2</sub>O através do processo de nitrificação. No caso de saturação de água no solo, com altas porcentagens de EPSA a produção N<sub>2</sub>O aumenta, pois o processo dominante passa a ser a desnitrificação (DAVIDSON & VERCHOT, 2000).

Emissões elevadas de óxido nítrico (NO) significam impacto negativo por ser um gás que destrói a camada de ozônio que protege a Terra dos raios ultravioleta (DAVIDSON et al., 2001; PRATHER, 1998).

A desnitrificação é um processo que ocorre através de bactérias facultativas, que podem usar tanto o oxigênio como o nitrato para oxidar algum material orgânico. Na ausência de O<sub>2</sub>, essas bactérias reduzem o nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) a nitrito (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>), e este a óxido nitroso (N<sub>2</sub>O) e gás nitrogênio (N<sub>2</sub>). Esses processos são catalisados por enzimas microbianas que atuam de forma independente e sequencial (PHILIPPOT, 2002).

O primeiro processo é auxiliado pela enzima nitrato redutase e o segundo pela enzima nitrito redutase. Essas bactérias responsáveis por todo o processo são denominadas de desnitrificantes e formadas por grupos desses microrganismos, como exemplo as *Pseudomonas* e as *Clostridium* (MANSELL & SCHROEDER, 1998).

Esse é um dos mais importantes processos para a ciclagem de nitrogênio no sistema, sendo responsável por até 30% de redução do N adicionado no solo através de adubação, dessa forma aumentando as emissões de N<sub>2</sub>O (GRANIER et al., 2004; CANTARELLA, 2007; MARCELINO, 2009).

As principais variáveis que influenciam na produção de N<sub>2</sub>O são as que proporcionam melhores condições para a ocorrência da atividade de nitrificação e desnitrificação dos microorganismos do solo. Dessa forma podemos citar:

- A maior disponibilidade de nitrato, ocorrida devido a sua produção superar a demanda tanto das plantas quanto dos microorganismos, elevar as reações desnitrificantes (MATSON et al., 1999);
- Aumentos na disponibilidade de carbono lábil, proveniente da matéria orgânica, aceleram a atividade microbiana, e como consequência a desnitrificação também aumenta (AULAKH et al., 1992);
- O pH do solo variando entre 6 e 8, sendo muito comum em solos que possuam atividade agrícola (AULAKH et al., 1992);
- Temperatura mais elevada proporciona um ambiente mais anaeróbico, em função do aumento da respiração, e dessa forma diminuem a concentração de O<sub>2</sub> (LI et al., 2000), além da umidade também ser responsável pelas alterações nas taxas de O<sub>2</sub>, como descrito por Linn e Doran (1984);
- E por fim a disponibilidade de N mineral, que é fundamental para que ocorra todo o processo, e dessa forma se torna muito importante a forma de N que é inserida no sistema. Como exemplo, a aplicação de ureia simultaneamente com a aplicação de inibidores de nitrificação, em época favorável resultaria em diminuição das emissões de N<sub>2</sub>O (DOBBIE & SMITH, 2003).

No entanto, algumas pesquisas destacam a produção de N<sub>2</sub>O através da atividade de fungos no solo. Apesar de parecer irrelevante, pois muitas vezes é citada na literatura como pouco expressiva, a produção de N<sub>2</sub>O através de fungos tem se mostrado superior em comparação a produção bacteriana. Alguns estudos revelaram que em solos de pastagens > 80% da produção de N<sub>2</sub>O foram reduzidas com a adição de cicloheximida que é um inibidor da atividade fúngica. Mas, com a adição de inibidores bacterianos (estreptomocina) a redução da produção de N<sub>2</sub>O foi <30% (LAUGHLIN e STEVENS, 2002; YANAI et al., 2007).

Não se sabe ao certo, mas a produção de N<sub>2</sub>O por meio de fungos pode ser devida ao dominante acúmulo de biomassa fúngica no solo, e ao contrário das bactérias, os fungos desnitrificantes necessitam de pequenas quantidades de O<sub>2</sub> no solo para o desempenho de suas atividades (ZHOU et al, 2001).

McLain e Martens (2005, 2006) revelaram que os fluxos de N<sub>2</sub>O em solos aluviais no sudeste do Arizona foram produzidos a partir da mineralização de aminoácidos provenientes de fungos. Além da baixa umidade do solo não ser propícia para a desnitrificação, não houve eficiência dos autotróficos (bactérias) na competição por NH<sub>4</sub> em comparação com os organismos heterotróficos (fungos).

Para Chen et al.(2014) independentemente do tipo de ecossistema, os fungos possuem grande influência na produção de N<sub>2</sub>O no solo. Porém, nas florestas sobre solos ácidos, observou-se maior significância nesses fluxos, sugerindo que o pH do solo tenha sido um dos principais fatores responsáveis pelo predomínio da atividade de fungos no controle do processo. Outros estudos também concluem que não houve alteração na produção N<sub>2</sub>O mesmo com a adição de acetileno no solo, que inibe a atividade das enzimas bacterianas responsáveis pela produção desse gás. Isso reforça a importância dos fungos que em sua maioria não possuem esta enzima (STURSOVA et al., 2006; SHOUN et al., 1992; ZHOU et al., 2001).

As emissões dos GEE variam conforme o cultivo e o manejo que está sendo empregado. Em um sistema de cultivo de milho em solos de clima tropical, no Zimbábue na África, a máxima produção de N<sub>2</sub>O foi 0,3 kg N ha<sup>-1</sup>, sendo utilizados 40 kg ha<sup>-1</sup> de adubação verde como fonte de N (CHIKOWO et. al., 2004). No estado de Rondônia, no norte do Brasil, Passianoto et. al. (2003) encontraram uma variação nas emissões de N<sub>2</sub>O na faixa de 0,004 a

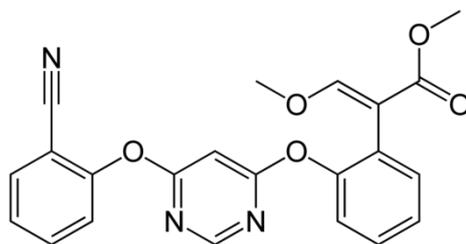
0,94 kg N ha<sup>-1</sup>, sendo essa máxima devido ao uso de 42 kg ha<sup>-1</sup> de sulfato de amônio em um plantio convencional.

No caso específico do cultivo de cana-de-açúcar é observada a emissão de gases do efeito estufa (GEE) em todas as suas fases de desenvolvimento, comprovado por Oliveira et.al. (2009). Nesse estudo, de Oliveira e equipe, foi observado que em uma produção onde ocorre o manejo de subprodutos como a vinhaça, há emissões dos principais GEE, como o CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub> e o N<sub>2</sub>O, e a prática da colheita com queima possui um fator de emissão de N<sub>2</sub>O de aproximadamente 0,20% a mais do que a colheita mecânica. As emissões de N<sub>2</sub>O na cultura foram de 3 a 5% do fertilizante aplicado no solo, com base em dados levantados por outras análises (CRUTZEN et. al., 2008).

Carmo et. al. (2012) concluíram que as maiores taxas de emissão de N<sub>2</sub>O e CO<sub>2</sub> em cana na fase de soca tratada com vinhaça, ocorreram principalmente quando houve maiores quantidades de resíduos depositados sobre a superfície do solo. Os valores encontrados foram de 6,9 kg ha<sup>-1</sup> ano<sup>-1</sup> de CO<sub>2</sub> e de 7,5 kg ha<sup>-1</sup> ano<sup>-1</sup> de N<sub>2</sub>O, com aproximadamente 2200 kg de CO<sub>2</sub> equivalente ha<sup>-1</sup> ano<sup>-1</sup>.

## 2.5- As estrobilurinas e seus efeitos sobre as culturas

Segundo a ANVISA (2014), a estrobilurina é um grupo de compostos químicos que possui função fungicida na agricultura, sendo uma de suas moléculas esquematizada na Figura 2.



Azoxystrobin

**Figura 2.** Estrutura química de uma molécula de estrobilurina.

Esse princípio ativo faz parte de uma série de produtos comerciais, principalmente para a cultura da soja. A princípio, na década de 80, era extraído através de basidiomiceto (*Strobilurus tenacellus*) de madeira podre, especificamente de cones de *Pinus*. A partir de 1992, começou a ser produzido sinteticamente por empresas multinacionais, através dos produtos azoxistrobina e o kresoxim-methyl (BARTLETT et al., 2001, 2002).

Por ser um fungicida de ação sistêmica, após ser absorvido pelo fungo ele age impedindo o transporte de elétrons na cadeia transportadora de elétrons presente nas mitocôndrias, mais especificamente no citocromo bc1. Assim a disponibilidade de oxigênio para as células dos fungos é inibida. Consequentemente, a síntese de ATP também é afetada, e essa ação bloqueia a disponibilidade de energia essencial para as transformações de substâncias que abastecem seus ciclos bioquímicos, inibindo suas funções vitais (VENANCIO et al., 1999, 2004).

Estudos realizados por Venâncio e equipe (2004) também revelam que além do efeito fungicida, esse produto possui efeitos benéficos na fisiologia dos vegetais, que proporcionam melhorias em seu desenvolvimento e rendimento.

Os efeitos benéficos da estrobilurina nas plantas são aumentos na assimilação de CO<sub>2</sub>, pelo fato de ocorrer inibição na respiração mitocondrial, e na assimilação de nitrogênio, através do aumento da atividade da enzima nitrato redutase, além de aumentos nos níveis de clorofila, redução na taxa de senescência das folhas, devido à menor taxa de produção de etileno. Dessa forma, havendo melhorias em seu desenvolvimento, qualidade e rendimento nas colheitas, pelo fato das plantas sofrerem menos estresse no campo (TOFOLI (2002); VENÂNCIO et al., 2003).

Como demonstram Grossmann e Retzlaff (1997), esse efeito benéfico tem sido correlacionado com maior produtividade e qualidade dos grãos de trigo, devido sua aplicação ocorrer na fase reprodutiva da cultura.

Outros estudos também revelam que a aplicação de estrobilurina promove aumentos na atividade da enzima nitrato redutase (KAISER e BRENDLE-BEHNISCH, 1995), além de diminuir a síntese de etileno (GROSSMANN e RETZLAFF, 1997). Bryson et al. (2000) concluíram que as estrobilurinas incrementam a taxa fotossintética, além de diminuir a respiração celular.

Segundo Kohle et al. (2003) e Venâncio et al. (2004), a aplicação de estrobilurina induz a absorção de nitrato *in vivo*, e devido à ocorrência de redução no teor de nitrato de cerca de 10% em tecidos de brotos com uma semana de observação, é possível que ocorra assimilação para metabólitos mais complexos. Dessa forma, há um aumento de 20% na biomassa da planta, com duas semanas após o uso do produto.

Como o uso das estrobilurinas, ocorre aumento da fitomassa do vegetal, e dessa forma a maior assimilação do nitrogênio é inevitada. Para que isso ocorra, a enzima NADH-nitrato redutase, responsável pela catalização da primeira etapa na assimilação de nitrato, é a principal suspeita para esse aumento de produção (CATALDO et al., 1975; KOHLE et al., 2003 e VENÂNCIO et al., 2004).

Para a cultura do feijão houve aumentos na assimilação líquida de CO<sub>2</sub>, na eficiência do uso da água e transpiração, na massa seca e na produtividade de grãos, e eficiência fotossintética, em comparação com plantas que sofreram com o estresse hídrico (JADOSKI, 2012). Na cultura da soja (cultivar M-SOY 8008 RR), Fagan et al. (2010) observaram que a adição de estrobilurina trouxe incremento da taxa fotossintética, redução da taxa respiratória, aumento da atividade da enzima nitrato redutase nas folhas, quando a aplicação da estrobilurina ocorre no florescimento.

Para ANKE (1995), a suspensão da respiração mitocondrial que ocorre através da aplicação do produto, é devido à estrobilurina inibir o transporte de elétrons entre o citocromo b e o citocromo c na cadeia transportadora de elétrons, diminuindo assim a síntese de ATP. Por esse fato, é possível esperar alguma ação também na cadeia de transporte de elétrons em outros seres eucariontes como os vegetais, não sendo necessariamente um efeito tóxico, pois isso é dependente da importância que a respiração mitocondrial exerce sobre a célula para a obtenção de energia, tendo aumentos em seu potencial em decorrência do estágio de vida do organismo, assim como de efeitos ambientais (SAUTER et al., 1995).

A diminuição da respiração da mitocôndria nas plantas, em decorrência da aplicação de estrobilurina, ativa uma via alternativa a entrada do O<sub>2</sub> na célula, além de haver menores níveis de síntese de ATP e dessa forma ocorre um aumento na [H<sup>+</sup>], causando acidez no citoplasma, assim a atividade da enzima nitrato redutase aumenta e como consequência a assimilação de nitrogênio também (GLAAB; KAISER, 1999).

A redução da taxa de etileno, por parte do produto, é devido a enzima nitrato redutase ter uma rota alternativa que produz óxido nítrico, onde inibe os precursores de etileno, o 1-aminociclopropano-1-ácido carboxílico (ACC)-sintase e (ACC)-oxidase, além de ser um importante sinalizador contra os ataques de patógenos (VENÂNCIO et al., 2004).

Em síntese, a ação de fungicida estrobilurinas sobre a inibição da germinação de esporos, nos mostra o potencial do produto no controle do desenvolvimento de fungos nos estádios iniciais de pós-germinação, obtendo uma atividade antiesporulante. Devido a chuvas elevadas ou ao aumento no uso de sistemas de irrigação, há uma maior absorção do produto, que promove maior eficiência contra os organismos fitopatogênicos, além de promover um longo intervalo entre as aplicações (VENÂNCIO et al., 1999). Porém os efeitos benéficos causados na fisiologia das plantas através do uso de estrobilurina não são todos conhecidos, como conclui Kohle et al. (2003).

Com base nesses trabalhos, é possível considerar que o uso de fungicidas a base de estrobilurina poderá ajudar não apenas na absorção de N pela cultura da cana-de-açúcar, mas também na inibição das emissões de óxido nitroso ( $N_2O$ ), pois atuarão sobre os microrganismos responsáveis por sua síntese.

### 3-MATERIAL E MÉTODOS

A avaliação do efeito das estrobilurinas no aumento da eficiência de uso de N pela planta e na redução de emissões de  $N_2O$  foi realizada em estudos de campo e em laboratório. Ensaio preliminares foram feitos para verificar se a ação fungicida poderia modificar as emissões de  $N_2O$  do solo, e assim permitir o planejamento dos demais ensaios.

Para esses experimentos, utilizou-se um fungicida comercial à base de estrobilurina, não sendo identificado para evitar conflitos de interesses. Daqui por diante, nas descrições de métodos e apresentação de resultados, foi denominado simplesmente de fungicida.

#### 3.1- EXPERIMENTOS PRELIMINARES

##### A) *Primeiro teste*

Para se avaliar a eficiência das doses do fungicida na inibição das emissões de  $N_2O$  do solo, foi realizado um teste no laboratório da Embrapa Agrobiologia, através do método de inibição da respiração induzida por substrato (IRS).

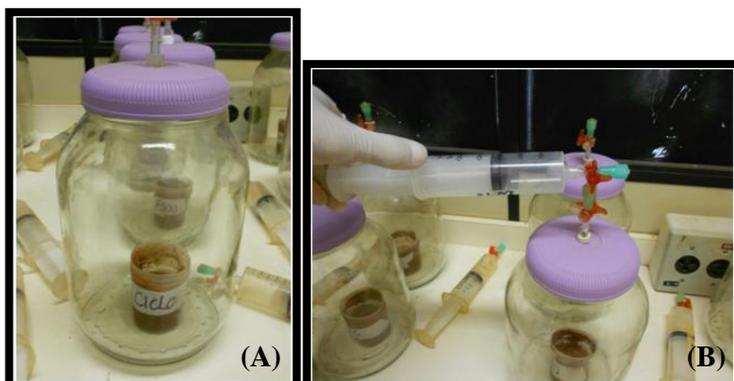
O experimento foi composto por cinco tratamentos: controle (somente adição de nitrogênio), e com as doses de fungicida de 1,9; 3,7; 7,5 e 14,9  $\mu\text{L kg}^{-1}$  substrato. O delineamento foi inteiramente casualizado, composto por cinco repetições. A dose de N utilizada foi de 13,84  $\text{g kg}^{-1}$  substrato, sendo a fonte de N o  $\text{KNO}_3$ . O substrato foi composto por uma mistura de 10g de areia lavada e 15g de solo, quantidade que foi colocada em um pote com volume de 50 mL, usado como unidade experimental.

O solo utilizado para o estudo foi proveniente da camada de 0-10 cm de um Argissolo Vermelho-Amarelo (0,1% N), existente na área experimental da Embrapa Agrobiologia. O solo foi secado ao ar e peneirado em malha de 1 mm, e, após homogeneização, 15 g foram transferidos para os potes de 50 ml, sendo aplicados 2ml de água para estimular a atividade biológica, deixando-se nesta condição por 2 dias.

Paralelamente, aplicaram-se 2 ml da solução de fungicida de cada tratamento em 10g de areia lavada (peneirada em malha de 1 mm), que foi mantida em temperatura ambiente por 2 dias, até que a areia fosse totalmente seca. O controle recebeu apenas água. Na continuação, a areia seca, contendo os respectivos tratamentos, foi transferida para os potes que continham o solo, sendo ambos misturados com auxílio de um bastão de vidro. Após a formação do substrato com a mistura da areia e solo, foi feita a fertilização adicionando-se a cada pote 2 ml de uma solução contendo  $\text{KNO}_3$  (equivalente a 13,84  $\text{g kg}^{-1}$  substrato) e glicose (equivalente a

3g kg<sup>-1</sup> de substrato). Em seguida, irrigou-se cada pote com 5 ml de água destilada para a saturação do substrato.

As amostragens de ar para análise de N<sub>2</sub>O foram realizadas as 3, 6, 12 e 24 horas após a irrigação, sendo essas amostragens especificadas em detalhes no tópico Métodos Analíticos. Brevemente, o monitoramento dos fluxos de N<sub>2</sub>O foi feito utilizando-se frascos de vidro de 2,5 L, com dimensões de 19,5 cm de altura e 12 cm de diâmetro, com tampas rosqueáveis para a confecção das câmaras estáticas para as coletas de gás (Figura 3). No horário de avaliação do gás, os potes eram colocados no interior das jarras, as quais eram fechadas e assim mantidas por 30 min., período em que amostras da atmosfera da jarra eram retiradas para quantificar o incremento de concentração do gás.



**Figura 3.** Procedimento para a coleta de gás para análise de N<sub>2</sub>O em experimentos de laboratório. (A) Colocação do pote de 50 ml com substrato dentro do frasco de vidro; (B) Coleta de gás com seringa de 50 ml.

### ***B) Segundo teste***

Neste segundo teste, o objetivo foi avaliar a influência de fungicidas e bactericidas na inibição das emissões de N<sub>2</sub>O do solo tratado com fertilizante. O experimento seguiu a mesma descrição do ensaio anterior, porém o delineamento foi inteiramente casualizado composto por 5 tratamentos com 5 repetições.

Além do controle (fertilizado com KNO<sub>3</sub>), utilizou-se cicloheximida, sulfato de estreptomicina e o fungicida (estrobilurina), e o quinto tratamento foi a mistura dos antibióticos cicloheximida e sulfato de estreptomicina. O solo foi o mesmo do experimento anterior, sendo 15 g misturados a 10 g de areia para formar 15 g de substrato por pote.

Todos os tratamentos foram aplicados em areia, que ficou dois dias em temperatura ambiente para que secasse. Neste caso, foram adicionados 2 mL da solução de cicloheximida (5 mg g<sup>-1</sup> solo), 2 mL da solução de sulfato de estreptomicina (3 mg g<sup>-1</sup> solo), 2 mL da solução de fungicida na dose equivalente a 14,9 µL kg<sup>-1</sup> de substrato, e 4 mL da mistura de antibióticos (2 mL solução de cicloheximida + 2 mL da solução de sulfato de estreptomicina), sendo que o controle recebeu 2 mL de água destilada. Depois de seca, a areia com os respectivos tratamentos foi misturada ao solo, adicionando-se aos potes uma solução de KNO<sub>3</sub> e glicose. Em seguida, fez-se a irrigação com 5 mL de água, tal como no ensaio anterior.

As amostragens de ar para análise de N<sub>2</sub>O foram realizadas as 6, 12, 24, 36 e 48 horas após a aplicação de KNO<sub>3</sub> e glicose no substrato, sendo essas amostragens especificadas em detalhes no tópico Métodos Analíticos.

Todos os demais procedimentos foram os mesmos do “primeiro teste”.

### 3.1- EXPERIMENTO I: ENSAIO A CAMPO

#### 3.1.1. Localização e delineamento experimental

O experimento foi realizado a campo em uma área experimental, localizada na região de Jaguariúna, no estado de São Paulo. O solo da área experimental é classificado como Latossolo Vermelho distroférico. Seus atributos químicos são especificados na Tabela 1.

**Tabela 1.** Atributos químicos do solo <sup>(1)</sup>.

Profundidade (cm)	pH H <sub>2</sub> O	Ca -----(cmolc dm <sup>-3</sup> )-----	Mg -----	Al V (%)	P -----(mg dm <sup>-3</sup> )-----	K
0 – 20	5,0	20	7	-	41	1,5
20 – 40	5,4	36	13	-	112	4,2

<sup>(1)</sup> Fonte: Instituto Agronômico de Campinas- IAC (2014).

O experimento teve início em março de 2014. O delineamento experimental adotado foi em blocos casualizados (DBC), sendo seis blocos com cinco tratamentos cada.

Os tratamentos foram assim definidos: controle, sem adição de N e fungicida (T1); adição da dose equivalente a 60 kg N ha<sup>-1</sup> na forma de ureia (T2); 60 kg N-ureia ha<sup>-1</sup> + a dose equivalente a 500 ml ha<sup>-1</sup> do fungicida no sulco (T3); 60 kg N-nitrato de amônio ha<sup>-1</sup> (T4) e 60 kg N-nitrato de amônio ha<sup>-1</sup> + fungicida no sulco (T5); o esquema experimental é apresentado na Figura 4. O fungicida foi aplicado conforme recomendação comercial (500 mL produto ha<sup>-1</sup>), sendo o volume de calda de 100L ha<sup>-1</sup>.



**Figura 4.** Distribuição dos blocos e tratamentos na área experimental, para o arranjo em blocos completos casualizados.

A aplicação do fungicida foi feita no sulco do plantio, por meio de um pulverizador, demonstrado na Figura 5.



**Figura 5.** Pulverização do fungicida no sulco de plantio.

Para o plantio de cana-de-açúcar utilizou a cultivar RB 855156. A brotação das primeiras plantas teve início aos 20 dias após o plantio, e uma aplicação do herbicida 2,4 D foi necessária para o controle de plantas invasoras na área, principalmente pela infestação com beldroega (*Portulaca oleraceae* L.).

A Figura 6 mostra a área experimental com as mudas no estágio inicial de brotação.



**Figura 6.** Área experimental. Estágio inicial de brotação da cultura.

Ao longo do ciclo da cultura, foram realizados monitoramentos de  $N_2O$  do solo e coletas de solo para quantificação de nitrato, amônio e carbono solúvel, amostragens de folhas para avaliação dos metabólitos solúveis nos tecidos das plantas, quantificação de atividade enzimática e avaliações biométricas (número de plantas, altura da planta, diâmetro do colmo e da folha e SPAD). As análises químicas foram conduzidas na Embrapa Agrobiologia, localizada na Rodovia BR 465, no município de Seropédica, no estado do Rio de Janeiro.

Para a avaliação das frações solúveis, as amostras de folhas foram retiradas no mesmo período da avaliação enzimática, momento em que se contava com um bom número de folhas, o que não prejudicaria o desenvolvimento da cultura. Com essas avaliações das frações solúveis, foram determinadas as quantidades de N total acumulado, N-amino, N-amônio e N-nitrato, visando o estudo da eficiência do uso de N pela cultura. A descrição detalhada desses métodos está no tópico Métodos Analíticos.

As análises dos açúcares foram realizadas no final do ciclo da cultura, através da determinação do °Brix (%), utilizando um refratômetro de campo, cuja precisão era  $\pm 0,2\%$ , método que proporciona a quantidade aproximada de açúcares presentes nas amostras, sendo possível também analisar o estágio de maturação da planta. A leitura do Brix foi realizada aleatoriamente em três colmos industrializáveis de cada parcela, sendo amostrado do quarto internódio abaixo do ponto de quebra da ponteira e do segundo internódio na base do colmo. Com os dados obtidos aplicou-se o seguinte cálculo, para saber o índice de maturação (IM) da cana, segundo Stupiello 1987:

$$IM = (\text{brix da ponta do colmo} / \text{brix base do colmo})$$

Onde,

IM < 0,60 = cana verde

IM entre 0,60 a 0,85 = em maturação

IM entre 0,85 a 1,00 = madura  
IM >1 = declínio de maturação

A produtividade da área foi estimada segundo Acunha et al. (2014) no final do ciclo da cultura, em que, através da coleta aleatória e análises biométricas como altura, peso e diâmetro de 20 colmos industrializáveis, além da contagem de perfilhos em dois metros lineares por parcela foi possível estimar a produtividade. Para isso, foi utilizada a equação proposta:  $TCH = \overline{M20} \times NC/m^2 \times 10^{-2}$ . Onde:

- $\overline{M20}$  é a massa média em gramas (g) de 20 colmos industrializáveis aleatoriamente coletados na parcela;
- $NC/m^2$  é o número de colmos por área da parcela ( $m^2$ ).

O cálculo da eficiência agrônômica (EA) de uso do fertilizante utilizado foi segundo a proposta realizada por Fageria e Baligar (2005) através da fórmula:

$EA = (PG_{cf} - PG_{sf}) / (QN_a)$ . Expressa em  $kg\ kg^{-1}$ , em que:

- $PG_{cf}$  é a produção de grãos com fertilizante nitrogenado;
- $PG_{sf}$  é a produção de grãos sem fertilizante nitrogenado;
- $QN_a$  é a quantidade de nitrogênio aplicado em kg.

### 3.1.2. Amostragem de gás para análises de fluxo de $N_2O$

Em cada parcela com seu respectivo tratamento foi posicionada uma câmara, tendo, portanto, 30 câmaras na área, conforme Figura 7.



Figura 7. Visão geral da distribuição das câmaras na área.

As câmaras foram posicionadas de forma que uma seção do sulco ficasse sob a câmara para permitir avaliar o efeito do produto que foi aplicado no sulco em cada parcela da área, como ilustrado na Figura 8.

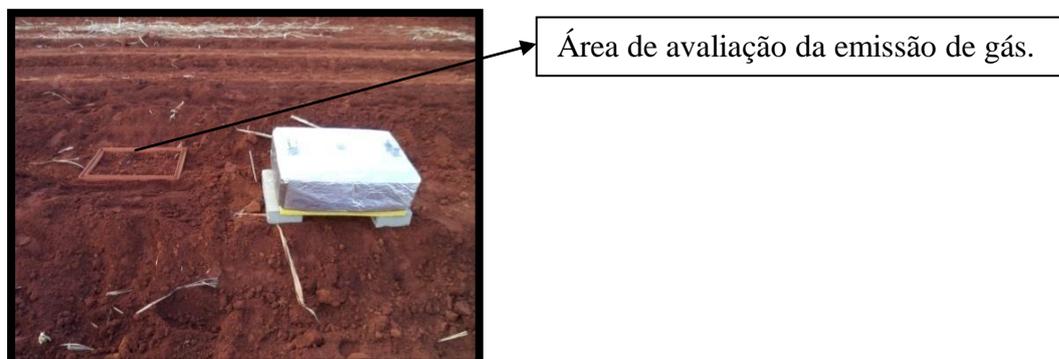
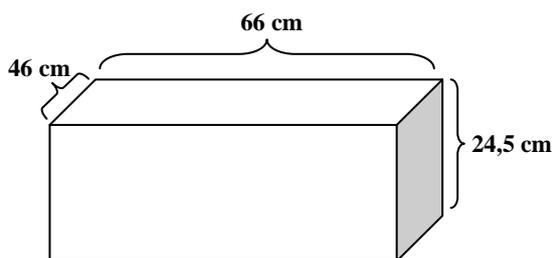


Figura 8. Base inserida no sulco de plantio para coleta de gás, local onde foram aplicados os tratamentos.

As coletas foram feitas durante 15 dias seguidos, sempre pela manhã no mesmo período, entre 8:00h e 10:00h, tendo início logo após o plantio da cana-de-açúcar. Em seguida, foram feitas coletas duas vezes por semana, durante quatro meses, e, por fim, foram feitas coletas a cada 15 dias até quando foi possível a entrada no canavial, perto do final do ciclo da cultura, em janeiro de 2015.

A metodologia de medição dos gases é baseada na descrita por ALVES et al. (2012), detalhada no tópico Métodos analíticos, porém a área da base foi 45 % maior, sendo a parte superior (câmara) feita de aço galvanizado com 25 cm de altura. As dimensões da câmara estão descritas na Figura 9.



**Figura 9.** Dimensões da câmara.

Esta parte (câmara) foi revestida com espuma e manta aluminizada para permitir isolamento térmico durante os períodos de incubação (Figura 10).



**Figura 10.** Câmara estática fechada, composta de base e tampa utilizada no experimento. Percebe-se o detalhe do revestimento da tampa com espuma e manta aluminizada para evitar o aquecimento interno pela incidência de raios solares.

### 3.1.3- Amostragens de solo

As coletas de solo foram realizadas para monitorar a disponibilidade de nitrato e amônio, além da umidade, espaço poroso saturado por água (EPSA) e carbono solúvel. Essas coletas foram realizadas a cada 3 dias a partir do plantio, durante um mês, e depois uma vez por semana durante mais 3 meses, para o cálculo do EPSA, foi realizada uma coleta ao final do experimento com o auxílio do anel de Kopeck.

A umidade da amostra é determinada por gravimetria, e o resultado obtido foi utilizado para determinação de nitrato, amônio e densidade do solo, sendo que com este último resultado foi possível a determinação dos dados de EPSA.

As demais análises foram feitas em extratos de solo, utilizando uma solução extratora de  $K_2SO_4$  0,5 M. Para análise de nitrato foi utilizada a metodologia de Olsen (2008), baseada

no espectro ultravioleta, onde uma solução estoque de  $10 \text{ mg N-NO}_3^- \text{ L}^{-1}$  foi preparada a partir de  $\text{KNO}_3$  P.A. em  $\text{KCl}$  2M. A absorvância foi medida nos comprimentos de onda do ultravioleta de 220 e 275 nm, essa absorvância provocada pelo  $\text{NO}_3^-$  no extrato é obtida pela equação:  $\text{ANO}_3^- = \text{A}_{220} - 2 \times \text{A}_{275}$ . Em seguida, foi feito o teste de regressão para a confecção da curva. O amônio foi analisado por colorimetria, utilizando-se o método do salicilato (Kempers and Zweers, 1986). As análises de C-solúvel foram feitas por titulometria após oxidação do C extraído pelo dicromato de potássio.

### 3.1.4- Biometria

As análises foram realizadas aos 100 e 180 dias após o plantio (DAP), obtendo-se o número de plantas por parcela, sendo determinada através da contagem das três linhas centrais, a altura média dos colmos em (cm) foi determinada com o auxílio de uma trena medindo-se o comprimento da base até a folha + 1, a concentração de clorofila em (%) nas folhas, realizada através do SPAD, a largura foliar em (mm) obtido no intermédio de folhas +1 e o diâmetro do colmo em (mm) medidos no terceiro internódio dos colmos, ambos obtidos com auxílio de um paquímetro, equipamentos demonstrados na Figura 11.



**Figura 11.** Equipamentos utilizados para análise do desenvolvimento da cultura. (A) SPAD, para medir a porcentagem (%) de clorofila nas folhas; (B) Paquímetro, para medir o diâmetro foliar e do colmo (mm).

## 3.2- EXPERIMENTO II: ENSAIO EM CASA DE VEGETAÇÃO

O experimento II foi conduzido em casa de vegetação localizada na Embrapa Agrobiologia, no município de Seropédica – RJ, entre janeiro a março de 2015. O solo utilizado tem a mesma classificação do solo do experimento a campo, classificado como Latossolo Vermelho. Seus atributos químicos estão especificados na Tabela 2.

**Tabela 2.** Atributos químicos do solo <sup>(1)</sup>

Profundidade (cm)	Corg (%)	pH H <sub>2</sub> O	Ca (cmolc dm <sup>-3</sup> )	Mg (cmolc dm <sup>-3</sup> )	Al	K (mg dm <sup>-3</sup> )	P
0 - 20	0,86	5,56	0,54	0,24	0,1	47	1,26

<sup>(1)</sup> Fonte: Laboratório de Química Agrícola- Embrapa Agrobiologia (2014).

Segundo o método da Embrapa, a necessidade de calagem do solo foi de 1,42 Mg/ha. Foram corrigidos 300 kg de solo, divididos em 25 vasos de 10 kg, sendo utilizados 216 g de calcário mineral agrícola. Para a adubação a recomendação foi de 112,5 g de Super simples, 45 g de  $\text{K}_2\text{SO}_4$  e 22,5 g de FTE - Br 12.

Foram utilizados vasos de 10 kg para o plantio das mudas pré-brotadas de cana-de-açúcar, que passaram por tratamento térmico em banho-maria a 60 graus por 30 minutos, para ajudar no controle de broca (*Diatrea sacchralis*).

As mudas foram preparadas em caixas com areia lavada e perlita, na proporção de 2:1, durante 40 dias. Normalmente as mudas pré-brotadas de cana, ficam na areia apenas para sua germinação, com duração de 15 dias, sendo o transplante realizado logo após esse período. O intuito de deixar as mudas por um tempo maior antes de sofrer o transplante foi devido à necessidade de se ter folhas para as análises enzimáticas e de metabólitos solúveis.

A cultivar de cana-de-açúcar utilizada foi a RB855536, que teve 80% de germinação, dessa forma foi possível utilizar 4 mudas por vaso, tendo uma quantidade considerável de massa foliar para as análises.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado (DIC), composto por 5 tratamentos com 5 repetições. Os tratamentos foram os mesmos utilizados no primeiro experimento:

- Controle, sem adição de N e fungicida (T1);
- Adição da dose equivalente a 60 kg N ha<sup>-1</sup> na forma de ureia (T2);
- 60 kg N-ureia ha<sup>-1</sup> + dose equivalente de 500 ml ha<sup>-1</sup> do fungicida no sulco (T3);
- 60 kg N-nitrato de amônio ha<sup>-1</sup> (T4);
- 60 kg N-nitrato de amônio ha<sup>-1</sup> + fungicida no sulco (T5).

Tanto a adubação, como a aplicação do fungicida foram realizadas no momento do transplante das mudas de cana-de-açúcar. A adubação equivalente a quantidade aplicada no experimento de campo foi de 0,66g de uréia e 0,88g de nitrato de amônio por vaso. A aplicação do fungicida foi realizada com o auxílio de um borrifador de jardim, sendo aplicadas 4 borrifadas por vaso, como é ilustrado na Figura 12.



**Figura 12.** (A) Adubação e (B) Aplicação do fungicida; Realizados na cova no momento de transplante das mudas.

Durante o desenvolvimento das plantas foi feito o monitoramento dos fluxos de N<sub>2</sub>O do solo. Amostras de tecido das folhas foram retiradas quando as mudas estavam com 75 dias, para análise enzimática e dos metabólitos solúveis. Houve essa espera para se proceder com essas análises devido às mudas terem sentido o transplante, não sendo possível a retirada de material foliar logo após a aplicação dos tratamentos.

Aos 103 dias as mudas foram colhidas, obtendo-se o peso da massa seca, procedendo assim com a análise de %N total da parte aérea. Todas essas análises foram realizadas seguindo os padrões descritos no tópico Métodos analíticos. A Figura 13 mostra a foto do ensaio.



Figura 13. Foto do experimento em casa de vegetação.

### 3.2.1- Amostragem de gás para análises de fluxo de N<sub>2</sub>O

Para as coletas de gás, foram seguidos os mesmos padrões do experimento I, com descrição detalhada dos procedimentos no tópico Métodos analíticos.

Porém, o material utilizado para a parte superior (câmaras) foi diferente, sendo produzidos por baldes de PVC de 8 kg com altura de 23 cm, acoplados em baldes de PVC de 10 kg (vasos) com altura de 27,5 cm, ambos com diâmetro superior de 26,5 cm. A vedação para o acúmulo de gás se deu através de calhas feitas nas bordas dos vasos, onde no momento da coleta, foram colocados água.

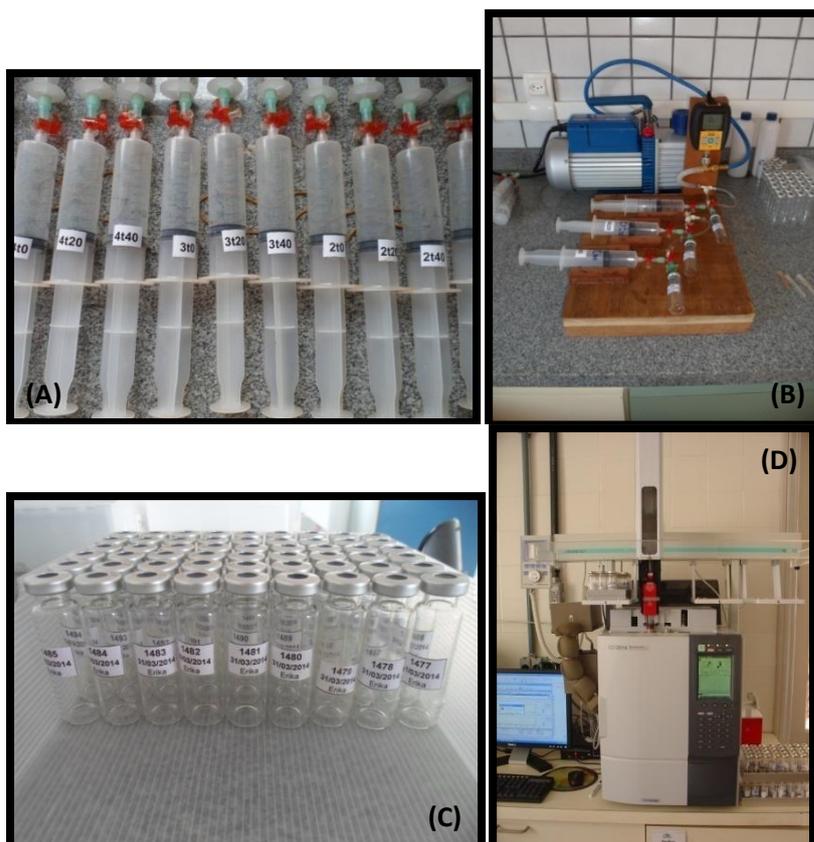
Através dos atributos físicos do solo, foi calculada a quantidade de água mantida a capacidade de campo, com isso a irrigação foi monitorada com o auxílio de uma balança. As coletas foram feitas diariamente durante 16 dias, sempre na parte da manhã entre 8h e 9h, sendo coletados os tempos 0, 15 e 30 min.

## 3.3- MÉTODOS ANALÍTICOS

### 3.3.1- Amostragem e armazenamento de análises de N<sub>2</sub>O

Uma amostra de ar, na atmosfera dentro da câmara, de 30 mL foi retirada com uso de seringas de polipropileno BD<sup>®</sup>, logo após o fechamento da câmara, correspondendo à amostragem no tempo inicial ou zero. Uma nova amostra foi retirada após 30 min. e outra após 60 min. (experimento I). No experimento II, após 15 min. e outra após 30 min.. As alíquotas de 30 mL foram posteriormente transferidas para frascos de cromatografia de 20 mL previamente submetidos a vácuo de -100 kPa com auxílio de uma bomba a vácuo elétrica, materiais apresentados na Figura 14. Como o volume de ar transferido para os frascos (30 ml) era maior do que o volume do frasco (20 ml), as amostras foram pressurizadas para armazenamento, o que poderia evitar diluição pelo ar externo até as análises cromatográficas.

As análises de N<sub>2</sub>O foram realizadas no laboratório de Ciclagem de nutrientes da Embrapa Agrobiologia, através de cromatografia gasosa, em um equipamento Shimadzu modelo GC-2014, equipado com colunas empacotadas com “Porapak Q”, conectadas a um sistema de back flush, e um detector de captura de elétrons (ECD - “*Electron Capture Detector*”).



**Figura 14.** Material utilizado na coleta e análise de gás: (A) Seringa de 60 ml, (B) Bomba de vácuo, (C) Frascos de 20 ml e (D) Cromatógrafo da marca Shimadzu modelo GC-2014.

As concentrações de  $N_2O$  foram obtidas a partir das áreas fornecidas pelo GC, de acordo com a quantidade de  $N_2O$  de cada amostra. Junto com as amostras eram colocados padrões com concentrações conhecidas de  $N_2O$  de 352, 800 e 1200 ppb, e a partir dessas concentrações dos padrões e suas áreas obteve-se uma equação de regressão linear que foi utilizada para transformação dos dados de cada amostra para no final serem calculados os fluxos de  $N_2O$  expressos em  $\mu g N-N_2O m^{-2}h^{-1}$  através da equação:

$F_{N_2O} = dc/dt * V/A * P_m/V_m$ , onde:

- $dc/dt$  é a taxa de acumulação de  $N_2O$  na câmara (em  $\mu L L^{-1}$ ), para o tempo de incubação (em horas);
- $V$  é o volume da câmara utilizada (em L);
- $A$  é a área da câmara (em  $m^2$ );
- $P_m$  é o peso molécula;
- $V_m$  é o volume molecular do  $N_2O$  à temperatura de amostragem.

No momento da coleta de gás, a temperatura no interior da câmara também foi monitorada com o auxílio de um termômetro; foram coletadas a temperatura inicial, antes do fechamento da câmara, e a temperatura ao final da incubação.

### 3.3.2. Análise de Metabólitos Solúveis

Foram coletadas amostras de um grama de material foliar, as quais foram homogeneizadas em 20 ml de etanol 80% através de um triturador Tecnal modelo TE-102 e depois a solução foi filtrada em um funil com compressas de gaze e papel de filtro. A coleta do extrato produzido foi transferida para um filtro separador, onde foi adicionado um volume de clorofórmio igual ao do extrato, e assim ocorre a separação da fase polar (etanol, densidade

0,789 g cm<sup>-3</sup>) e apolar (clorofórmio, densidade 1,49 g cm<sup>-3</sup>) (Fernandes, 1983). Após recolhimento da fase polar, ou seja, a solução superior, seu volume foi completado até 25 ml com etanol 80%. O extrato obtido foi utilizado para a determinação dos teores de N-amino livre (Yemm & Cocking, 1955), N- Amônio (Mitchel, 1972; Felker, 1977) e N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (Miranda et al., 2001) (modificado). Todas as análises foram convertidas para serem lidas em Leitor de placa de Elisa.

A análise de N total pelo método de Kjeldahl, ou seja, por digestão sulfúrica e destilação por arraste a vapor e titulação (EMBRAPA, 1999), foi feita através de coletas de amostras do material foliar e secagem em estufa a 60 graus, para posterior trituração do material em moinho de faca. A eficiência será medida tendo em conta a eficiência agrônômica, que é a razão da produtividade líquida (onde tem tratamento menos o controle sem N) dividido pela dose de N aplicada.

### 3.3.3. Análise enzimática

A análise da atividade da enzima Nitrato Redutase (NRA) obtida em  $\mu\text{mol NO}_2^- \text{ g}^{-1}$  de MF h<sup>-1</sup>, se iniciou no campo com a deposição das folhas das plantas em um recipiente com gelo, essas amostras foram levadas para o laboratório e pesadas, obtendo um peso máximo de 500 mg por amostra. Todos esses procedimentos precisam ser executados rapidamente para se conseguir verificar a atividade da enzima.

Em seguida houve a incubação das amostras, através de uma solução incubadora, seguindo a adaptação sugerida por Santos et al. (2014) para a cultura da cana-de-açúcar, segundo metodologia originalmente proposta por Jaworski (1971) para cultura da soja e modificada por Cazetta & Villela (2004) para folhas de *Brachiaria radicans*.

A conversão a nitrito foi feita através de uma curva padrão de nitrito de sódio cristalizado (Figura 15), onde a absorbância foi medida a 540 nm em um espectrofotômetro, através do qual se obteve uma equação de regressão linear e com ela a quantificação da atividade potencial da enzima nos tecidos vegetais.

Os dados obtidos dos experimentos foram submetidos aos testes estatísticos pelo programa SISVAR 5.3, sendo determinada a análise de variância e o teste de médias, comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Mais especificamente para o ensaio de campo, os dados e as variáveis obtidas na avaliação de fluxos de N<sub>2</sub>O foram analisados utilizando-se a Análise de Componentes Principais (ACP) através do programa Canoco (TER BRAAK & SMILAUER, 2002). Na interpretação dos resultados da ACP, além dos escores dos dois primeiros componentes principais (CP<sub>1</sub> e CP<sub>2</sub>), também foram utilizados os valores de coeficientes de correlação linear entre as variáveis originais e os dois componentes para verificar a relação entre fluxos e variáveis medidas.

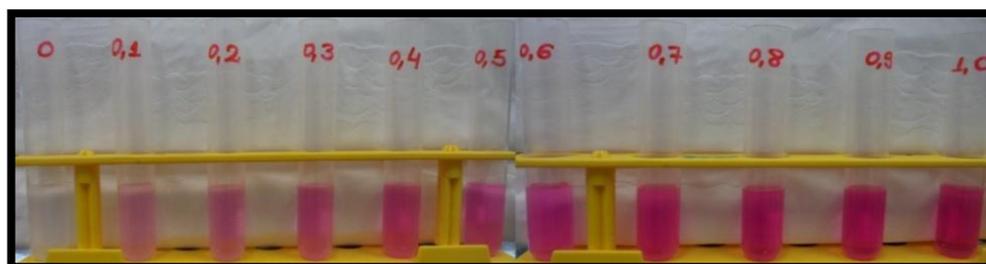


Figura 15. Curva padrão de nitrito a partir de solução padrão com concentração de  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$  N-NO<sub>2</sub>.

## 4- RESULTADOS E DISCUSSÃO

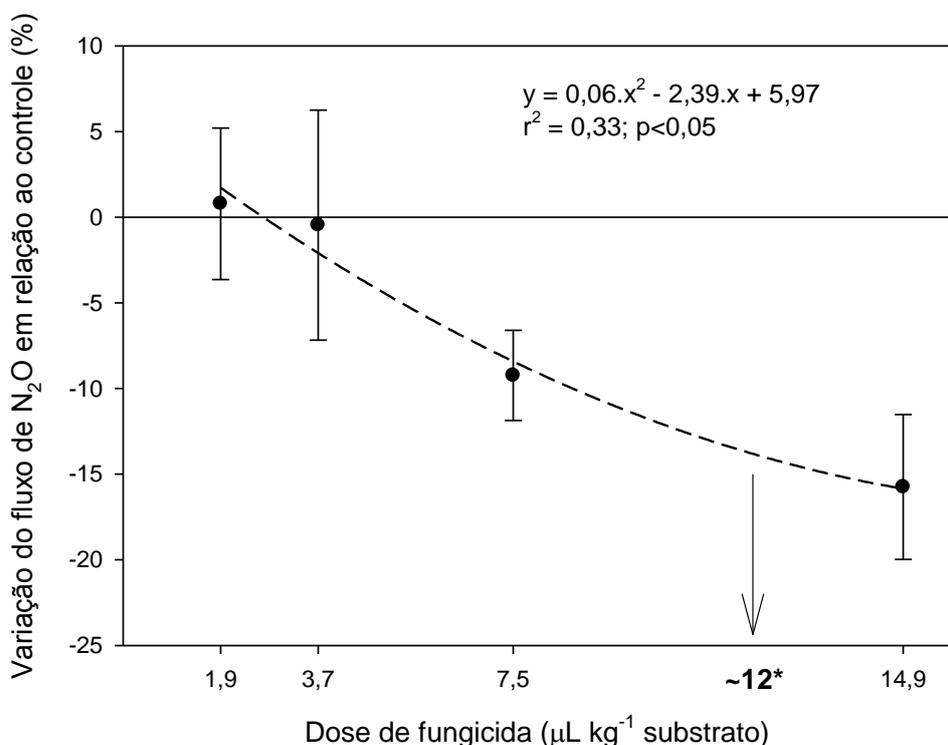
### 4.1- EXPERIMENTOS PRELIMINARES

(Para avaliação da produção de N<sub>2</sub>O no solo).

#### A) Primeiro teste

A Figura 16 mostra que a medida que se aumenta a dose do fungicida aplicado no substrato, a porcentagem da variação do fluxo de N<sub>2</sub>O em comparação ao controle onde havia apenas o nitrogênio, diminui, indicando que o fungicida teve influência na inibição dessas emissões. A maior dose do fungicida equivalente a 14,9 μL kg<sup>-1</sup> substrato resultou na maior taxa de redução das emissões de N<sub>2</sub>O, atingindo o valor de 15%.

A dose de 12 μL kg<sup>-1</sup> substrato é aproximadamente a dose que foi utilizada no experimento a campo, e o resultado encontrado nesse teste revela que nessa concentração, houve inibição das emissões de N<sub>2</sub>O do solo.



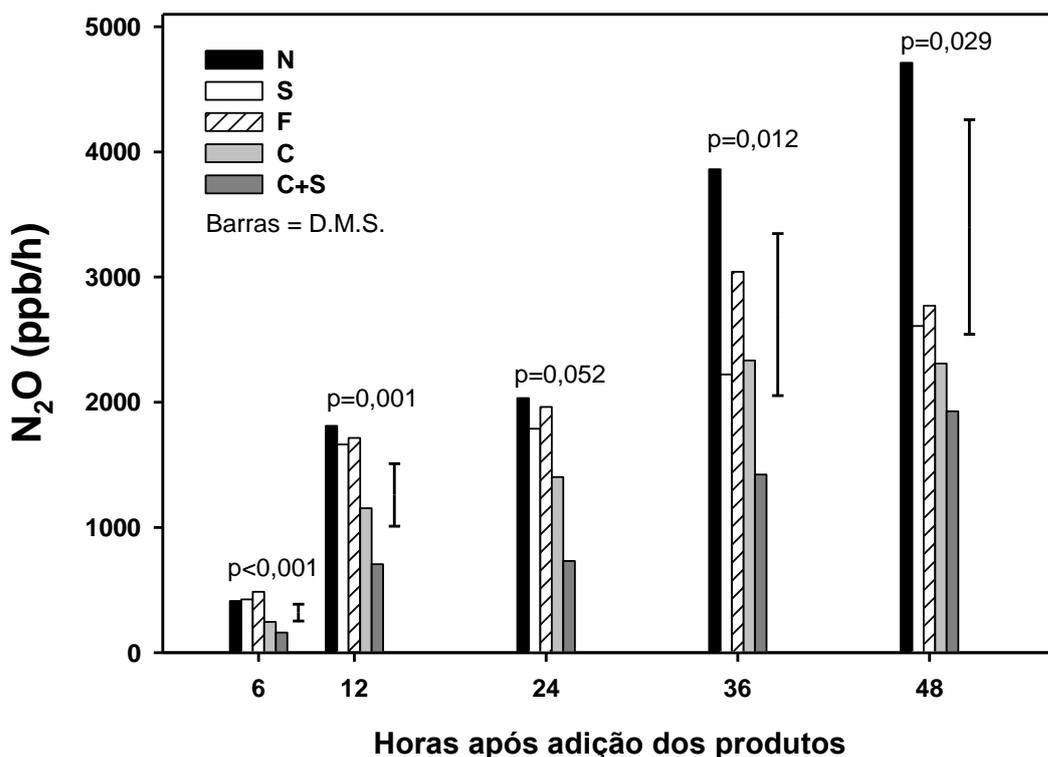
**Figura 16.** Porcentagem da variação do fluxo de N<sub>2</sub>O em relação ao controle (apenas com Nitrogênio) segundo as doses de 1,9; 3,7; 7,5 e 14,9 μL kg<sup>-1</sup> substrato do fungicida. \*Dose utilizada no experimento a campo.

#### B) Segundo teste

Nesse experimento, encontraram-se as maiores diferenças nos fluxos de N<sub>2</sub>O a partir das 36 horas do início do experimento (Figura 17). Todos os tratamentos caracterizados pela adição de antibióticos apresentaram fluxos de N<sub>2</sub>O inferiores ao controle fertilizado com N, mas sem antibiótico. O tratamento com a mistura de Cicloheximida + Estreptomicina foi o mais potente na inibição dos fluxos, com quedas de aproximadamente 60% em relação ao tratamento apenas com Nitrogênio.

O tratamento com Estrobilurina resultou em redução de aproximadamente 20% nos fluxos de N<sub>2</sub>O, porém, tanto o tratamento com Cicloheximida, como o tratamento com Estreptomicina resultaram em reduções de aproximadamente 40% nesses fluxos.

O fato da mistura entre bactericida e fungicida não trazer diferenças significativas em comparação a aplicação apenas de fungicida indica um potencial elevado de participação de fungos na produção de N<sub>2</sub>O (Laughlin & Stevens, 2002).



**FIGURA 17.** Emissões de N<sub>2</sub>O ( $\mu\text{g N m}^{-2} \text{h}^{-1}$ ) em função dos tratamentos, com Nitrogênio (KNO<sub>3</sub>), com Cicloheximida + N, com Estreptomicina + N, Estrobilurina + N e a mistura de Cicloheximida + Estreptomicina + N, após 48 horas de aplicação de Nitrogênio e Glicose. Teste de t (LSD) a 5% de probabilidade.

Com esses testes foi possível observar que o fungicida estrobilurina tem potencial elevado para redução de emissões de N<sub>2</sub>O do solo. Os dois testes realizados estão de acordo com os resultados encontrados por Laughlin e Stevens (2002) que também avaliaram a influência de fungicida a base Cicloheximida e relatam uma redução nas emissões de N<sub>2</sub>O de 89% com produção de azevém em solos da Irlanda. Já Kinney et al. (2004) trabalhando com solos agrícolas tratados com o fungicida Clorotalonil encontrou uma redução de 40% nas emissões de N<sub>2</sub>O e com o fungicida Mancozeb foi encontrado uma redução de 47% nessas emissões.

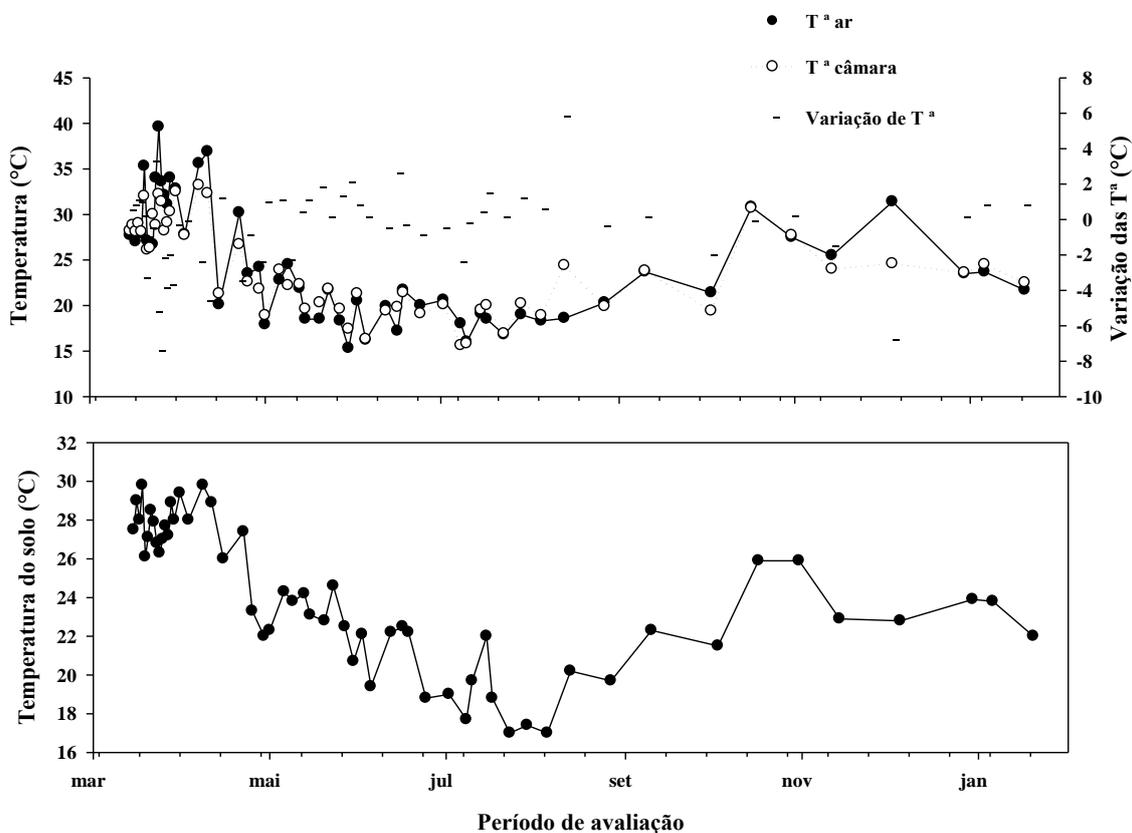
Quando o teste foi realizado em sistemas de plantio direto, as reduções das emissões com os mesmos tratamentos foram de 80% e 48% respectivamente (CRENSHAW et al., 2008). Além disso, Crenshaw et al. (2008) avaliaram a influência de cicloheximida e estreptomicina nas emissões de N<sub>2</sub>O, em solo sob pastagem no semi-árido do Novo México (EUA), e observaram resultados significativos com reduções de 85% e 53% respectivamente, nos fluxos de N<sub>2</sub>O. Destacaram diferenças nos desempenhos dependendo da cobertura do solo, do tipo de nitrogênio aplicado e da umidade do solo.

## 4.2- EXPERIMENTO I: ENSAIO A CAMPO

### 4.2.1- Emissões de N<sub>2</sub>O

Durante a condução do ensaio de campo, a temperatura do ambiente esteve em torno de 24,5 °C. A temperatura do solo durante as amostragens de gás apresentou máximas em março, com 29,8 °C na primeira semana de avaliação, temperatura ótima para a atividade dos microorganismos que participam da síntese de N<sub>2</sub>O e a mínima com 17 °C em julho (Figura 18).

A temperatura média dentro da câmara foi de 24 °C. Houve uma variação de temperatura entre o ambiente e dentro da câmara em torno de -0,5°C, com picos negativos de -7,4 °C e picos positivos de 3,3 °C. Essa maior variação negativa aconteceu devido à temperatura do ambiente nesse dia estar muito alta, em torno de 40°C, e o isolamento da câmara não permitiu que a temperatura interna aumentasse na mesma magnitude.



**Figura 18.** Distribuição das temperaturas do ambiente e dentro da câmara no momento de amostragem de gás e suas variações em °C (A); Distribuição da temperatura do solo no momento de amostragem de gás (B); No período de março de 2014 a janeiro de 2015.

As precipitações na área se concentraram nos primeiros meses do experimento, com um pico de 68 mm aos 40 dias após o início das coletas de gás (Figura 13). Foi constatado um período de seca na região, deixando as médias mensais com baixos índices pluviométricos, fato atípico que tem influência direta nas emissões de N<sub>2</sub>O, uma vez que a desnitrificação depende das condições anaeróbicas (SMITH et al., 2003).

O espaço poroso saturado por água (EPSA) teve seu pico com aproximadamente 43 % em abril, aos 46 dias após o início do experimento, coincidindo com altos índices de precipitação ocorridos alguns dias antes (Figura 13). O teor de EPSA encontrado é inferior ao ideal de 60% necessários para a produção de N<sub>2</sub>O através da nitrificação (LINN E DORAN,

1984; ZAMAN E CHANG, 2004) e de 80% necessários para o processo de desnitrificação bacteriana (BOCKMAN e OLFS, 1998), reflexo da falta de chuvas na região e também da boa drenagem do solo. Sendo propício, porém, para produções de N<sub>2</sub>O através de fungos que necessitam de pouca umidade para o desempenho da atividade de nitrificação e desnitrificação (MCLAIN E MARTENS, 2005 e 2006).

### ***1a) Concentrações de NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, NH<sub>4</sub><sup>+</sup> e Carbono solúvel do solo***

Os dados de disponibilidade de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> e NO<sub>3</sub><sup>-</sup> no solo mostram que as maiores concentrações ocorreram no mesmo período de maiores emissões de N<sub>2</sub>O (Figura 19), o que decorre da aplicação de fertilizantes nitrogenados coincidindo juntamente com o período de maiores índices pluviométricos na região.

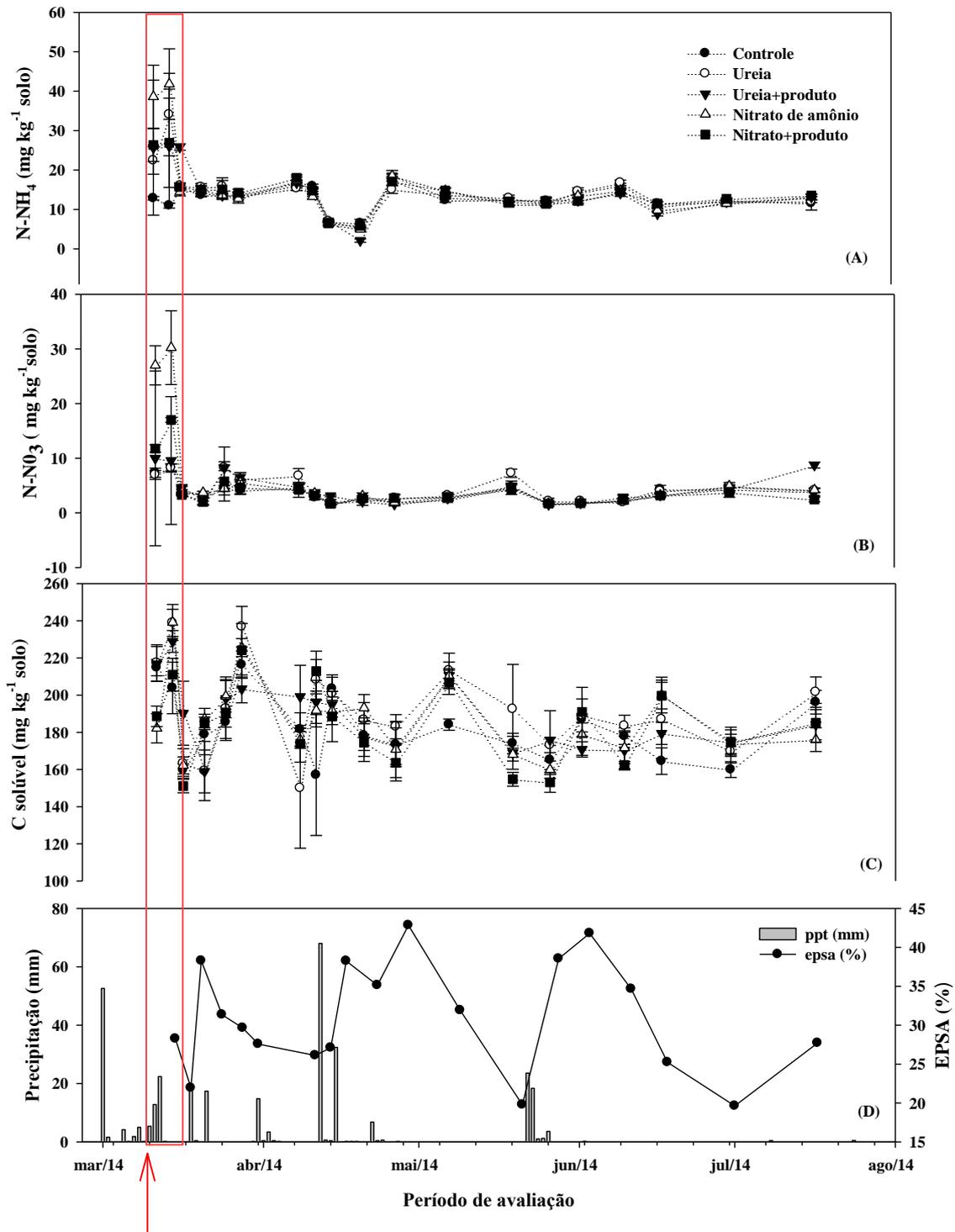
A disponibilidade de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> e NO<sub>3</sub><sup>-</sup> no solo foi maior em torno de quatro dias após a fertilização nitrogenada. Os teores de amônio alcançaram os maiores valores com os tratamentos a base de nitrato de amônio e ureia sem adição de estrobilurina, com uma concentração de 42 e 34 mg N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>.kg solo<sup>-1</sup>, respectivamente. Para os teores de nitrato houve picos de 30 mg N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>.kg solo<sup>-1</sup>, com o tratamento a base de nitrato de amônio e picos de 10 mg N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>.kg solo<sup>-1</sup> com o tratamento a base de ureia mais estrobilurina. Após os primeiros dias do início do experimento, ocorre uma queda drástica na disponibilidade de N mineral do solo, ficando com os mesmos níveis do controle, devido à absorção de N pela planta, e também as diversas transformações do nutriente no solo, aumentando assim as perdas através das emissões de N<sub>2</sub>O.

Após esse período os valores permaneceram constantes e sem diferença do controle que permaneceu todo o período de avaliação com valores médios de 13 mg N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>.kg solo<sup>-1</sup> e de 4 N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>.kg solo<sup>-1</sup>. Essas concentrações de N mineral no solo, corroboram com dados encontrados em solo sob cultivo de cana na Austrália onde os teores variam em aproximadamente 10 e 40 mg.kg solo<sup>-1</sup> de nitrato e amônio respectivamente, dias após aplicação de fertilizantes (HOLST et al., 2012).

A aplicação do fungicida reduziu a concentração de amônio no solo com as duas fontes nitrogenadas. No caso do nitrato, apenas no tratamento à base de nitrato de amônio houve redução aparente na sua disponibilidade com a aplicação do fungicida, já no tratamento com ureia, essas diferenças não foram significativas.

A concentração de carbono solúvel no solo, a partir de coletas feitas nas linhas de plantio da cana, obteve ligeiros picos logo após a fertilização nitrogenada, o que também pode estar associado ao preparo do solo, com liberação de matéria orgânica, porém com pouca variação e diferenças significativas ao longo do período avaliado. Esse fato pode ocorrer devido o acúmulo de carbono se estabelecer em camadas mais profundas do solo, como foi encontrado por Panosso et. al. (2012), que apesar do estudo ser referente a análise de estoques de C em solos com plantio de cana, pode-se observar a dinâmica do elemento no solo, onde houve resultados estatisticamente significativas apenas nas camadas de 10-20 cm.

O tratamento com nitrato de amônio, teve a maior disponibilidade de C solúvel no solo com o teor de 239 mg C.kg solo<sup>-1</sup> diferindo-se do tratamento com nitrato + produto, com máxima de 211 mg C.kg solo<sup>-1</sup>. Os tratamentos a base de ureia não se diferiram em relação à disponibilidade de carbono solúvel no solo, com picos de 238 mg C.kg solo<sup>-1</sup>. Após esse período os valores permaneceram constantes e sem diferença do tratamento controle que obteve uma média de 182 mg C.kg solo<sup>-1</sup> ao longo de todo o período de análise.



**Figura 19.** Disponibilidade de amônio (A); Nitrato (B); Carbono solúvel (C); Porcentagem de espaço poroso saturado por água (EPSA) no solo e Precipitação pluvial da área(D). Solo submetido aos tratamentos: Controle, Ureia e Ureia com fungicida, Nitrato de amônio (NA) e Nitrato de amônio com fungicida, e dados pluviométricos coletados na estação meteorológica instalada no campo experimental, no período de março a julho de 2014. As barras de erro representam o erro padrão das médias; A seta em destaque representa o momento em que foi realizada a adubação e a aplicação do fungicida e o retângulo em destaque representa os picos de disponibilidade dos elementos no solo.

Esses resultados de disponibilidade de nitrato, amônio e carbono solúvel no solo não teve significância estatística ( $P < 5\%$ ) em comparação aos diferentes tratamentos. Apesar disso, esses fatores podem explicar uma possível diferença nas emissões de  $N_2O$  entre os

tratamentos com ou sem a aplicação de fungicida com princípio ativo estrobilurina, pois a disponibilidade de N e C no solo é essencial para o metabolismo dos microrganismos responsáveis pelas transformações de N no solo e consequentemente síntese e emissão de N<sub>2</sub>O.

### ***1b) Fluxos de N<sub>2</sub>O do solo***

Pode ser observado (Figura 20 A) que os picos dos fluxos de N<sub>2</sub>O coincidem com o período chuvoso, dias após aplicação do fungicida, fato que ocorre devido ao aumento da atividade dos microrganismos desnitrificadores no solo, especialmente em condições limitantes de O<sub>2</sub>. (LINN E DORAN, 1984; ZAMAN E CHANG, 2004).

A redução da intensidade desses fluxos de N<sub>2</sub>O (Figura 14A), com o passar do tempo, podem estar associadas a redução das chuvas na área experimental, mas também ao fato de ocorrer extração de N pela planta ao longo do seu crescimento, dessa forma, diminuindo o potencial de perdas .

Através da Figura 20 B é possível observar que o tratamento com ureia possui maior emissão acumulada de N<sub>2</sub>O e a presença do produto a base de estrobilurina casou diminuição nesse acúmulo. Não houve diferença na comparação entre os tratamentos que receberam nitrato de amônio e o controle.

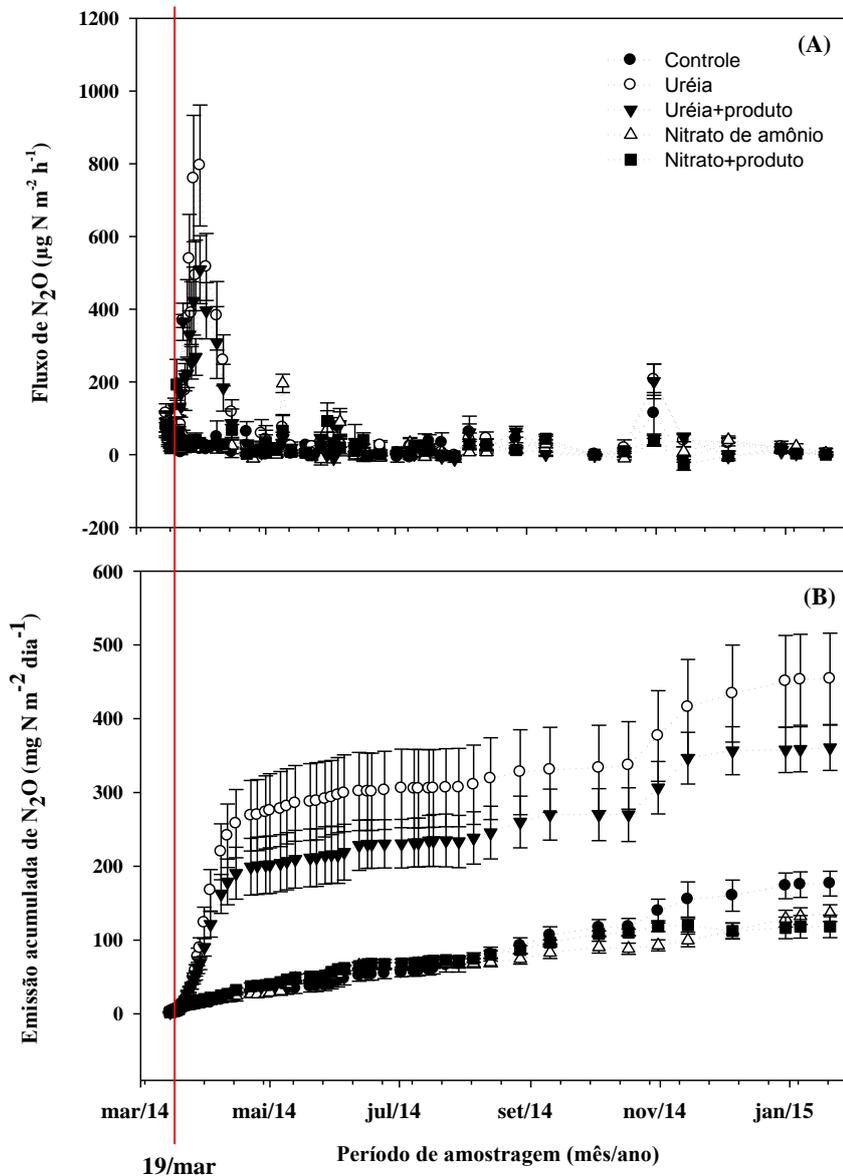
Na agricultura, a síntese de N<sub>2</sub>O ocorre principalmente devido à desnitrificação (DALAL et al., 2003; NEVISON, 2000), porém a formação desse gás também pode ocorrer através do processo de nitrificação (KOWALCHUCK E STEPHEN, 2001), o limitante é a proporção de oxigênio no solo, quando há pouca oxigenação, o processo de desnitrificação é favorecido.

Após 4 dias da aplicação do fungicida, dia 19 de março em destaque na Figura 14, as emissões de N<sub>2</sub>O começaram a se diferenciar entre os tratamentos, e perdurou por aproximadamente 30 dias. Após esse período as chuvas diminuíram e consequentemente as emissões também, se mantendo constantes até o final do experimento. Além dos efeitos dos fungicidas serem de curta duração, por serem biodegradáveis não possuem ação residual prolongada, sendo essa ação concentrada dias após a sua aplicação.

Os picos de disponibilidade de nitrato, amônio e carbono solúvel no solo coincidem com o período de máxima precipitação na região sendo, portanto, mais um fator positivo para a influência nas maiores emissões de N<sub>2</sub>O.

Os fluxos de emissões de N<sub>2</sub>O variaram de 6 a 89 µg.m<sup>-2</sup>.h<sup>-1</sup>, 24 a 795 µg.m<sup>-2</sup>.h<sup>-1</sup> e 27 a 508 µg.m<sup>-2</sup>.h<sup>-1</sup> para os tratamentos controle (sem adição de N), ureia e ureia mais o fungicida, respectivamente. Trabalhos avaliando a influência da aplicação de fertilizantes nas emissões de N<sub>2</sub>O em canaviais também encontraram variações discrepantes nos fluxos, como foi o caso de Signor (2010) que observou fluxos que vão de -10 a 2520 µg de N<sub>2</sub>O-N m<sup>-2</sup> h<sup>-1</sup>, sendo essa variação dependente do tipo de fertilizante e o método aplicado no solo, porcentagem de umidade e o tipo de solo.

A Figura 20 A mostra que o tratamento com ureia produziu mais N<sub>2</sub>O do que a fonte nítrica. O tratamento com nitrato de amônio induziu as emissões de N<sub>2</sub>O a níveis baixos, comparáveis aos do controle sem nitrogênio. Resultado incomum, uma vez que, a maior disponibilidade NO<sub>3</sub><sup>-</sup> no solo deveria induzir a desnitrificação após a irrigação e precipitação (WELL et. al., 2001; HEFTING et al., 2003). Além disso, mesmo que o processo de nitrificação fosse preponderante, emissões de N<sub>2</sub>O seriam esperadas uma vez que o fertilizante usado continha amônio em sua composição (NIELSEN e REVSBECH, 1998).



**Figura 20.** (A) Fluxo de N<sub>2</sub>O do solo em ( $\mu\text{g N m}^{-2} \text{h}^{-1}$ ); (B) Emissão acumulada de N<sub>2</sub>O em ( $\text{mg N m}^{-2} \text{dia}^{-1}$ ) em função dos tratamentos, Controle, Ureia e Ureia com fungicida, Nitrato de amônio (NA) e Nitrato de amônio com fungicida, no período de março de 2014 a janeiro de 2015, no campo experimental. Em destaque está a data em as emissões começaram a se diferenciar em função dos tratamentos. As barras de erro representam o erro padrão das médias.

Todos os resultados foram avaliados e concluídos através da Análise dos componentes principais (ACP), seu objetivo é descrever os dados obtidos em um quadro que contenha os indivíduos e as variáveis numéricas, onde as  $p$  variáveis serão mediadas com os  $n$  indivíduos. Essa análise é considerada um método fatorial, por construir, por meio de fatores, as novas variáveis sintéticas através da combinação linear das variáveis originais (BOUROCHE, 1982).

Essa análise é uma técnica matemática da Análise multivariada, que é utilizada para investigar uma hipótese quando se possui um número considerável de dados. Com isso é possível verificar qual (ais) a variável que mais influencia o resultado, originando as maiores variações, sem alterar significativamente as informações. Dessa forma é possível transformar

um grupo de variáveis em outro grupo, os chamados componentes principais (CP) de dimensões equivalentes. Ocorrendo com o mínimo de perdas possíveis de informações ou com perdas de variáveis originais que possuam pouca informação, para isso, as  $p$  variáveis iniciais precisam ser dependentes e seus coeficientes de correlação não podem ser nulos (VICINI, 2005).

Com os dados da ACP foi possível observar a real relevância entre as variáveis (espaço poroso saturado por água (EPSA), disponibilidade de nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) no solo, disponibilidade de amônio ( $\text{NH}_4^+$ ) no solo, disponibilidade de carbono solúvel no solo, fluxos de  $\text{N}_2\text{O}$  do solo e temperatura do solo), com a influência dos tratamentos (controle (sem nitrogênio), ureia, ureia com o fungicida, nitrato de amônio e nitrato de amônio com o fungicida), aplicados nas primeiras semanas do experimento, momento em que os fluxos foram mais expressivos. Para isso, os resultados foram divididos em três grupos principais, período de seca que corresponde ao início do experimento (15/03 a 18/03), período de chuva (19/03 a 28/04) e período final (29/04 a 17/07), sendo consideradas as coletas de dados realizadas até o mês de julho.

A Tabela 3 apresenta a relação dos tratamentos dados pela combinação entre os níveis dos dois fatores (fonte de N e época de avaliação) envolvidos neste estudo, os respectivos valores dos dois primeiros componentes principais ( $\text{CP}_1$  e  $\text{CP}_2$ ) e a ordenação decrescente dos tratamentos com relação aos valores de cada um dos componentes. Nessa tabela, na coluna tratamentos, a letra em maiúsculo significa a fonte de N (C= controle, U= uréia, UP= ureia com o fungicida, NA= nitrato de amônio e NAP= nitrato de amônio com o fungicida), e a palavra em minúsculo significa a época de avaliação do experimento (seca= período de seca, chuva= período de chuva e final= período final).

**TABELA 3.** Valores dos dois componentes principais ( $\text{CP}_1$  e  $\text{CP}_2$ ) para os “tratamentos” em estudo, ordenação decrescente dos “tratamentos” para  $\text{CP}_1$  e  $\text{CP}_2$  e porcentagem da informação retida pelos componentes principais (% variância e % variância acumulada)

Tratamentos*	$\text{CP}_1$	Ordem	$\text{CP}_2$	Ordem
Cseca	0,4825	5	-0,0461	5
Useca	<b>1,2002</b>	3	-0,2040	3
UPseca	<b>1,3184</b>	2	-0,4240	2
NAseca	<b>1,6584</b>	1	<b>-0,7215</b>	1
NAPseca	<b>1,1645</b>	4	-0,2446	4
Cchuva	-0,2667	10	0,3440	10
Uchuva	-0,1029	7	<b>2,0017</b>	7
UPchuva	0,1542	6	<b>1,5602</b>	6
NACHuva	-0,2045	9	0,5003	9
NAPchuva	-0,1633	8	<b>0,6995</b>	8
Cfinal	<b>-1,2143</b>	15	<b>-0,8581</b>	15
Ufinal	<b>-0,9281</b>	11	<b>-0,7592</b>	11
UPfinal	<b>-1,0787</b>	14	<b>-1,0237</b>	14
NAfinal	<b>-1,0320</b>	13	-0,0541	13
NAPfinal	<b>-0,9877</b>	12	<b>-0,7704</b>	12
Variância (%)	49,6		20,2	
Variância acumulada (%)		69,8		

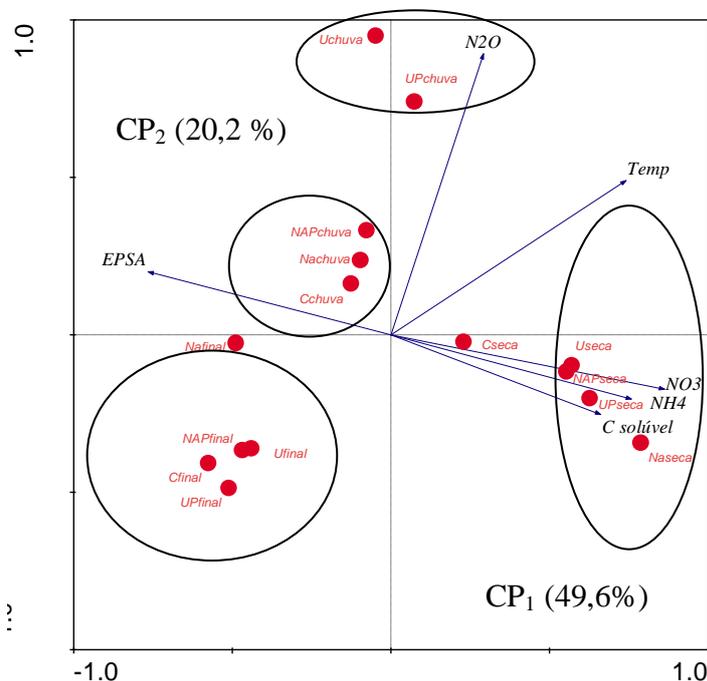
\*Tratamentos dados pela combinação entre os níveis do fator fonte de N (C: controle, U: ureia, UP: ureia+ fungicida, NA: nitrato de amônio, NAP: nitrato+ fungicida) e época de avaliação (seca, chuva, final).

Nesse estudo, os dois primeiros componentes principais foram responsáveis por 69,8% da informação contida no conjunto das seis variáveis originais com respectivas contribuições de 49,6% e 20,2% para  $\text{CP}_1$  e  $\text{CP}_2$ . Portanto, o  $\text{CP}_1$  é o arranjo que melhor representa a distribuição dos dados e o  $\text{CP}_2$  é representado perpendicularmente ao primeiro (Figura 21).

Os valores em destaque representam a correlação que houve significância entre os tratamentos e os respectivos Componentes Principais, sendo que para ser significativo o tratamento precisa alcançar um valor mínimo de  $\pm 0,7$ , onde o sinal desses valores vai indicar se a variável correlacionou positiva ou negativamente com o resultado final, apresentado na Figura 21.

Nessa mesma figura nota-se que o CP<sub>1</sub> pode ser resumido pelo fator época de avaliação, permitindo discriminar o período de Seca do período Final por estarem em lados opostos do eixo 1, portanto os resultados obtidos no início do experimento são completamente diferentes dos obtidos no final, o que já era de se esperar. Os tratamentos NA, UP, U e NAP no início do experimento (seca) relacionaram-se à maiores valores de NO<sub>3</sub>, NH<sub>4</sub> e C solúvel que podem ser explicados pela aplicação desses tratamentos e uma possível maior mineralização da matéria orgânica nesse período, além de valores elevados da temperatura do solo (°C) que é um fator ambiental independente; o tratamento Controle nesse período apresentou valores para todas estas variáveis individuais próximos a uma média geral de cada variável. Como os valores de EPSA não alcançaram altos índices, essa variável teve pouca correlação entre os tratamentos, não sendo possível identificar uma possível influência tanto entre as diferentes fontes de N como entre os períodos seco, com chuva e o final.

Interpretando o CP<sub>2</sub> é possível visualizar que os valores de N<sub>2</sub>O foram maiores nos tratamentos com ureia e ureia + fungicida no período de chuva. Nas demais combinações entre os níveis dos fatores fontes de N e época, os valores de N<sub>2</sub>O ficaram mais próximos a média geral por variável, com destaque para o tratamento com Nitrato de amônio e Nitrato de amônio + o fungicida, resultados que corroboram com as análises realizadas na interpretação da Figura 20 A.



**FIGURA 21.** Análise de componentes principais (ACP) das variáveis (N<sub>2</sub>O, NO<sub>3</sub>, NH<sub>4</sub>, C solúvel e EPSA) para os tratamentos dados pela combinação entre os dois fatores correspondentes a fontes de N (U, UP, Na, NAP e C) e épocas de avaliação (seca, chuva e final).

Com a Tabela 4 também é possível identificar quais as variáveis analisadas mais se correlacionam com os Componentes Principais 1 e 2, e pode ser observado que todas as

variáveis estão bem correlacionadas com o CP<sub>1</sub>, exceto a variável N<sub>2</sub>O que possui uma melhor correlação com o CP<sub>2</sub>.

**TABELA 4.** Coeficientes de correlação linear entre as variáveis e os dois primeiros componentes principais (CP<sub>1</sub> e CP<sub>2</sub>).

Variáveis	CP <sub>1</sub>	CP <sub>2</sub>
N <sub>2</sub> O (µg N/m <sup>2</sup> /h)	0,29	<b>0,89</b>
NO <sub>3</sub> (mg/kg solo)	<b>0,86</b>	-0,17
NH <sub>4</sub> (mg/kg solo)	<b>0,76</b>	-0,20
C solúvel (mg C kg <sup>-1</sup> solo)	<b>0,66</b>	-0,25
EPSA (%)	<b>-0,77</b>	0,20
Temperatura do solo (°C)	<b>0,74</b>	0,49

Em resumo, pode-se concluir que com base na ACP, as maiores emissões de N<sub>2</sub>O ocorreram pela influência dos tratamentos com ureia e uréia + produto no período em que houve maiores precipitações e pelas maiores concentrações de NO<sub>3</sub>, NH<sub>4</sub>, C solúvel e temperatura do solo no início do experimento.

Estudos com adubação nitrogenada a base de ureia na cultura do capim-elefante (*Pennisetum purpureum* S.), mostram que cerca de 80% das emissões de N<sub>2</sub>O são registradas nos primeiros 50 dias após sua aplicação (MORAIS et al., 2013). Já para a cultura da cana, Signor et al. (2013) demonstra que a fonte de N a base de nitrato de amônio possui um fluxo maior e mais constante, sendo observado em apenas um dia após a sua aplicação, já os efeitos com ureia são perceptivos alguns dias depois, sendo seu ponto máximo com uma aplicação de 114 kg ha<sup>-1</sup>, dessa forma Signor e sua equipe concluiu que não apenas a quantidade de N aplicado no solo influencia as emissões de N<sub>2</sub>O, mas também a fonte de N utilizada.

No tratamento com aplicação de estrobilurina junto com a fertilização nitrogenada a base de ureia, a produção de N<sub>2</sub>O do solo foi reduzida em aproximadamente 30 %. Este efeito não foi observado quando se aplicou nitrato de amônio.

Por esse ser o primeiro estudo sobre a influência de fungicidas a base de estrobilurinas perdas de N, principalmente através das emissões de N<sub>2</sub>O do solo na cultura da cana de açúcar, e tendo como fonte diferentes tipos de fertilizantes, e pelo fato do tratamento a base nítrica não mostrar diferenças nas emissões de N<sub>2</sub>O, pode-se especular sobre alguns aspectos.

O efeito de produtos a base de estrobilurina talvez seja mais pronunciado na hidrólise da ureia, atuando possivelmente sobre a enzima urease, ou até mesmo sobre os microorganismos nitrificantes e não sobre os desnitrificantes.

Se de fato o produto for mais eficiente sobre os microorganismos nitrificantes, é possível justificar as diferenças entre os tratamentos com ureia, que sofrerá essa redução nas emissões de N<sub>2</sub>O com a presença do produto, uma vez que um dos processos de ciclagem de nitrogênio no solo a partir da ureia é dependente do processo de nitrificação. Diferentemente com o tratamento com nitrato de amônio, que tem metade do conteúdo de N na forma nítrica.

Em contrapartida essa explicação não justificaria o menor fluxo de N<sub>2</sub>O dos tratamentos com nitrato de amônio em comparação com a ureia. Uma hipótese para esse fato seria a de que todo o NO<sub>3</sub><sup>-</sup> consumido por esses microorganismos desnitrificantes pode ter sido transformado rapidamente em N<sub>2</sub>, não sendo perdido através de N<sub>2</sub>O, dessa forma se explicaria o motivo do tratamento com nitrato de amônio ter um fluxo de emissão menor do que a ureia, porém como os fluxos de N<sub>2</sub> não foram medidos, não é possível confirmar essa teoria.

Alternativamente a essas hipóteses, um estudo realizado por Neto et al. (2015), também mostrou que o tratamento com nitrato de amônio resultou em menores fluxos de N<sub>2</sub>O

do que o tratamento com uréia, aplicados em canaviais na região Centro-Sul do Brasil. Os autores chegaram a conclusão de que, devido ao fato do processo de conversão do nitrato de amônio causar acidez no solo, isso dificulta a atividade da microbiota bacteriana e consequentemente diminui o processo de nitrificação e desnitrificação, o que não ocorre com a conversão da ureia. Esse resultado, porém, pode não explicar o presente experimento por não levarem em conta a atividade, por exemplo, de fungos no processo de transformação de nitrogênio no solo.

Outra possibilidade para essa inibição nas emissões de  $N_2O$  na presença do fungicida estrobilurina com o tratamento a base de ureia, é justamente essas perdas serem ocorridas através de atividade fungica, resultado que corrobora com diversos estudos que demonstram evidências de que as atividades de fungos são relevantes para as perdas de N através de fluxos de  $N_2O$  em diferentes ecossistemas (LAUGHLIN e STEVENS, 2002; CHEN et al, 2014). A predominância entre a atividade de fungos e bactérias depende de condições ambientais favoráveis para ambos, o que já se sabe é que os fungos são favorecidos em solos com pH mais ácidos e em meio com menor umidade, ao contrário das bactérias que necessitam de pH mais neutro ou alcalino e de meio anaeróbico para uma maior liberação de  $N_2O$  (CHEN et al, 2015). Além de o  $NO_3^-$  para fungos possuir uma função mais de assimilação de N do que rota alternativa para a respiração, e a princípio a produção de  $N_2O$  em fungos ocorre através da degradação de aminoácidos.

Outros estudos precisam ser realizados para uma total compreensão sobre a influência desse produto nas emissões de  $N_2O$ .

### ***1c) Fator de emissão***

O fator de emissão médio (Tabela 5) encontrado foi de 1,71% com uma variação de  $\pm 0,24\%$  para o tratamento com ureia, sendo ligeiramente maior do que o padrão do IPCC, estando de acordo com resultados encontrados por Signor, et. al., (2013), onde o fator de emissão variou de 0,8 a 12,95% dependendo da dose de ureia utilizada no canavial. No caso do nitrato de amônio foi encontrada uma estimativa de 0,01%, variando  $\pm 0,04\%$ , valor menor do que o encontrado por Neto, et. al. (2015) de 0,25% e bem abaixo do encontrado por Signor, et. al., (2013) de 1,22 a 1,53%.

**Tabela 5.** Emissões de N<sub>2</sub>O acumuladas e estimativas do fator de emissão (FE) a partir de aplicação de diferentes fontes de fertilizantes nitrogenados na cultura da cana-de-açúcar no estado de São Paulo.

Tratamento	Dose de N (g/m <sup>2</sup> )	Emissão N <sub>2</sub> O (mg N/m <sup>2</sup> )	FE (%)
Controle	0	28,4 (b)*	-
Ureia	6 (18)**	268,6 (a)	1,33 ± 0,24
Ureia + fungicida	6 (18)	199,3 (a)	0,94 ± 0,19
Nitrato de amônio	6 (18)	27,0 (b)	0,01 ± 0,04
Nitrato + fungicida	6 (18)	37,5 (b)	0,05 ± 0,02
DMS (5%)		106,77	
CV (%)		55,09	

\*Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

\*\*O número fora dos parênteses representa a dose aplicada para a cana e o número dentro dos parênteses a dose de N aplicada dentro da câmara.

#### 4.2.2- METABÓLITOS SOLÚVEIS

Foram realizadas aos 100 DAP as análises de N-total, N-nitrato, N-amino e N-amônio foliar de cana-de-açúcar, Tabela 6. Essas análises indicaram o comportamento do nitrogênio absorvido pela cultura submetida a diferentes tipos de tratamentos.

**Tabela 6.** Concentração em  $\mu\text{moles g}^{-1}$  de peso fresco de N-amino, N-nitrato e N-amônio e % de N-total da folha de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*), coletada 100 dias após o plantio (DAP) e submetida a diferentes tratamentos.

Tratamento	N-Total (%)	N-amino N-nitrato N-amônio						
		$\mu\text{moles/g}$ peso fresco						
Controle	1,75	a	6,32	a	0,32	a	0,57	a
Ureia	2,01	a	5,20	a	0,71	a	0,66	a
Ureia + fungicida	2,01	a	4,96	a	0,65	a	0,65	a
Nitrato de amônio	1,99	a	5,41	a	0,97	a	0,55	a
Nitrato de amônio + fungicida	1,97	a	5,28	a	0,62	a	0,53	a
DMS (5%)	0,56		2,96		1,07		0,35	
CV (%)	16,70		31,52		94		34,32	

\* Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Não houve diferença significativa entre os tratamentos em todas as análises realizadas. O conteúdo de N total nas folhas chegou a 2%, condizendo com os resultados encontrados por Gomes et. al. (2005), que avaliou a quantidade de N total em diferentes partes da planta de cana-de-açúcar. O momento de amostragem das folhas parecia razoável para avaliar efeitos de fertilizantes, pois segundo Reis Junior et. al. (2000), existem dois picos de acúmulo de N total nas folhas de cana-de-açúcar, um em maior valor aos 90 DAP e outro aos 360 DAP, independente do uso de fertilizantes.

De um modo geral o teor de N-amino livre nas folhas de cana-de-açúcar esteve em torno de 5  $\mu\text{moles/g}$  peso fresco, tendo pouca variação entre os tratamentos. Dados também

confirmados por Gomes et. al (2005) que obteve valores semelhantes com folhas de cana analisadas aos 90 DAP.

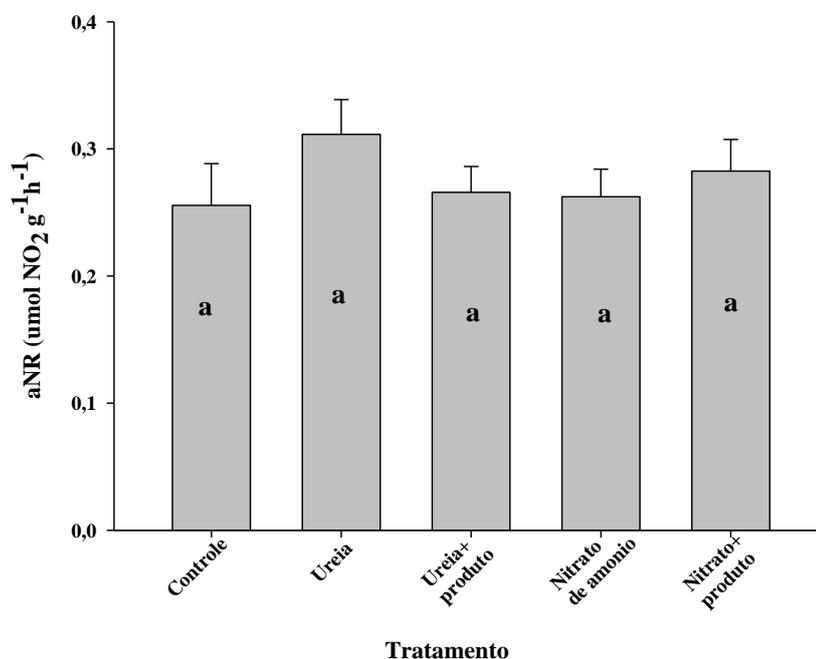
O acúmulo de N na forma de nitrato nas folhas apresentou máximo teor com 0,97  $\mu\text{mol N/g}$  peso fresco, com o tratamento adubado com nitrato de amônio, e seu mínimo teor com 0,33  $\mu\text{mol N/g}$  peso fresco com o tratamento controle (sem adição de adubação nitrogenada). O mesmo aconteceu com os níveis de N na forma de amônio, não havendo grandes alterações nos teores entre os tratamentos, tendo um teor médio de 0,6  $\mu\text{mol N/g}$  peso fresco. Para a planta de cana-de-açúcar, nessa fase inicial de crescimento (60 a 120 DAP), todo o N absorvido é rapidamente transformado e assimilado como amônio para a síntese de proteínas (SILVEIRA & CROCOMO, 1990).

Os resultados não mostraram uma possível diferença fisiológica no tratamento com a presença do produto a base de estrobilurina.

O momento de avaliação precisa ser mais bem estudado. Não existem muitas referências na literatura para orientar amostragens na cultura da cana-de-açúcar. Não obstante, essas avaliações de formas de N na planta podem servir de suporte para os indicadores fisiológicos, dessa forma é interessante repetições desse tipo de experimento para se ter uma conclusão definitiva sobre o assunto.

#### 4.2.3- ANÁLISE ENZIMÁTICA

A atividade da enzima nitrato redutase apresentou uma média de 0,27  $\mu\text{mol NO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , além de não haver diferenças significativas entre os tratamentos (Figura 22).



**Figura 22.** Atividade da enzima nitrato redutase ( $\mu\text{mol g}^{-1} \text{ h}^{-1} \text{ NO}_2$ ) aos 100 DAP, na cultura de cana-de-açúcar, submetidas a diferentes tratamentos (Controle, 60kg Ureia, 60kg Ureia + fungicida, 60kg Nitrato de amônio e 60kg Nitrato de amônio + fungicida). Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

As condições climáticas na época em que as análises foram realizadas podem ter influência nesse resultado, uma vez que, o clima ameno com temperaturas baixas podem inibir a ação da atividade da enzima, fato que corrobora com a linha de pesquisa de Campbell

(1999), Konishi & Yanagisawa (2011) e Mazid et al. (2012), que defendem a alteração da atividade da nitrato redutase devido a mudanças climáticas no ambiente.

Porém, as plantas de cana-de-açúcar também podem apresentar baixa atividade da nitrato redutase nas folhas, sendo mais concentrada nas raízes, como indicou Campbell (1999). Outro fato importante foi que essa análise ocorreu aos 100 dias após o plantio (DAP), época em que provavelmente a quantidade de N no solo (aplicado no sulco) pode não mais influenciar a atividade da enzima, mesmo com os diferentes tipos de tratamentos. Silveira e Crocomo (1990) observaram altos níveis de atividade da enzima nitrato redutase em folhas de cana-de-açúcar aos 100 DAP, com picos de aproximadamente  $4,5 \mu\text{mol NO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , aplicando doses elevadas de adubos nitrogenados sob cobertura.

Experimentos realizados com estrobilurina na cultura da soja mostraram incremento na atividade da enzima nitrato redutase, sendo concluído que há uma mudança na assimilação tanto do carbono como no nitrogênio o que melhora sua produtividade. Porém, o fungicida foi aplicado nas folhas e as avaliações foram feitas logo após a sua aplicação (FAGAN et al., 2010).

A estratégia utilizada nesse trabalho foi segundo a recomendação da empresa fabricante do produto, que sugere a aplicação de duas doses de estrobilurina para a cultura da cana-de-açúcar, a primeira aplicação no sulco de plantio e a segunda no final do seu ciclo.

#### 4.2.4- BIOMETRIA

Não foram observadas diferenças significativas entre as variáveis, altura (cm), diâmetro de colmo (mm), largura foliar (mm), número de plantas por parcela e SPAD (%), aos 200 DAP, em comparação aos tratamentos controle, ureia, ureia mais produto, nitrato de amônio e nitrato de amônio mais produto (Tabela 7).

A média da altura, diâmetro de colmo, largura foliar, número de plantas por parcela e SPAD aos 200 DAP, foram de 66 cm, 33 mm, 28 mm, 397 plantas e 46%, respectivamente. Mesmo a fertilização nitrogenada não trouxe efeito nesses índices. Estes resultados estão de acordo com os encontrados por Marques, et. al., (2012) que avaliaram o crescimento de três variedades de cana.

**Tabela 7.** Análise biométrica da cultura de cana-de-açúcar RB-855156 submetida a diferentes tipos de tratamentos aos 100, 110, 120 e 200 dias após o plantio (DAP).

Tratamento	Altura (cm)		Diâmetro do colmo (mm)		Largura foliar (mm)		*N° de perfilhos		SPAD (%)						
	120 DAP	200 DAP	120 DAP	200 DAP	110 DAP	200 DAP	100 DAP	200 DAP	100 DAP	200 DAP					
Controle	25,48	63	a	15,82	31,32	a	23,09	29,18	a	310,83	419,00	a	50,33	46,51	a
Uréia	28,23	65,66	a	16,61	32,67	a	22,39	27,71	a	274,50	385,50	a	49,02	46,01	a
Uréia + fungicida	27,18	66,93	a	16,87	34,29	a	22,71	29,41	a	267,50	407,66	a	50,17	46,32	a
Nitrato de amonio	27,95	67,20	a	16,62	33,05	a	23,01	29,12	a	332,00	388,50	a	48,15	45,32	a
Nitrato de amonio + fungicida	27,33	67,06	a	16,59	34,84	a	22,87	28,55	a	290,50	387,83	a	48,15	46,89	a
DMS (5%)	4,14	10,52		1,61	4,26		1,81	4,68		76,16	71,58		4,63	4,08	
CV	8,80	9,24		5,65	7,43		4,6	9,41		14,94	10,42		5,46	5,12	

As médias seguidas de mesma letra não diferenciam significativamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

\* Em 3 linhas centrais de 8m.

A falta de resposta da cana-planta em relação à adubação nitrogenada é um estudo bem explorado e discutido pela literatura, portanto, esses resultados estão de acordo com a maioria dos experimentos, como relatam Cantarella e Raij, (1985) em vários estudos realizados em São Paulo. Um dos fatores que podem explicar esse comportamento da cultura

é referente à mineralização da matéria orgânica do solo proveniente da despalha da cultura, que foi suficiente para atender a demanda da planta (ARAÚJO et. al., 2001) ou ainda a existência de algumas evidências de que a cana-de-açúcar possa ter benefícios através da interação com bactérias diazotróficas (Boddey et al., 2003).

As análises de açúcar realizadas no final do ciclo da cultura, nos mostra que aos 390 DAP a cultura ainda estava em processo de maturação, com uma diferença significativa a 5% de probabilidade entre o brix do tratamento controle em torno de 8 e do tratamento nitrato de amônio mais o produto em torno de 13 no ápice da planta e com variação em torno de 16 e 18 na base, além de um índice de maturação entre 0,50 a 0,71 (Tabela 8).

**Tabela 8.** Avaliação de açúcar presente na cultivar de cana-planta RB855156 e seu índice de maturação aos 390 DAP.

Tratamento	Brix		Índice de maturação
	Ápice	Base	
Controle	11,08 ab	16,91	a 0,65 a
Ureia	8,53 b	16,91	a 0,50 a
Ureia + fungicida	10,05 ab	18,33	a 0,54 a
Nitrato de amonio	10,50 ab	18,86	a 0,57 a
Nitrato de amonio + fungicida	13,25 a	18,58	a 0,71 a
DMS (5%)	3,97	3,36	0,21
CV (%)	21,54	10,86	21,07

Médias seguidas de letras iguais na mesma coluna, para cada atributo, não diferem entre si pelo teste de Tukey.

DMS – Diferença Mínima Significativa. CV – Coeficiente de Variação

Os resultados da produtividade revelam que, para as condições ambientais do local e levando em consideração o tamanho da área experimental a estimativa da produtividade em tonelada de colmo por hectare (TCH) variou entre 190 Mg ha<sup>-1</sup> para o tratamento controle (sem adição de N) e de 238 Mg ha<sup>-1</sup> para o tratamento com ureia (60 kg ha<sup>-1</sup> aplicados no sulco), apresentando estas diferenças significativas a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey, para os outros tratamentos não houve diferenças significativas (Tabela 9).

**Tabela 9.** Cálculo da estimativa da produtividade de cana-planta em tonelada de colmo por hectare (TCH) da cultivar RB855156, proposto por Acunha et al.(2014), para os diferentes tipos de tratamentos.

Tratamento	Altura (cm)	Diâmetro (cm)	Nº Perfilho m <sup>-1</sup>	Peso (kg)	TCH estimado (Mg ha <sup>-1</sup> )	*EA (%)
Controle	216	a 2,97	a 17	a 1,77	a 190,61	b -
Uréia	223	a 2,92	a 18	a 2,02	a 238,44	a 79,72
Uréia + produto	226	a 2,9	a 18	a 1,87	a 225,25	ab 57,73
Nitrato de amônio	223	a 3	a 20	a 1,80	a 230,39	ab 66,30
Nitrato de amônio + produto	222	a 3,1	a 19	a 1,72	a 221,46	ab 51,42
DMS (5%)	43,47	0,24	3,13	0,38	45,21	-
CV	8,68	3,59	7,66	9,33	9,06	-

Médias seguidas de letras iguais na mesma coluna, para cada atributo, não diferem entre si pelo teste de Tukey.

DMS – Diferença Mínima Significativa. CV – Coeficiente de Variação

\*Eficiência Agronômica (Fageria e Baligar, 2005)

Essa produtividade foi semelhante à encontrada por Dias et al., (1999) que avaliou a produção de colmos a partir de diferentes tipos de variedades em diferentes regiões do estado de São Paulo, obtendo um valor máximo com variedades RB de aproximadamente 200 Mg.ha<sup>-1</sup>.

### 4.3- EXPERIMENTO II: ENSAIO EM CASA DE VEGETAÇÃO

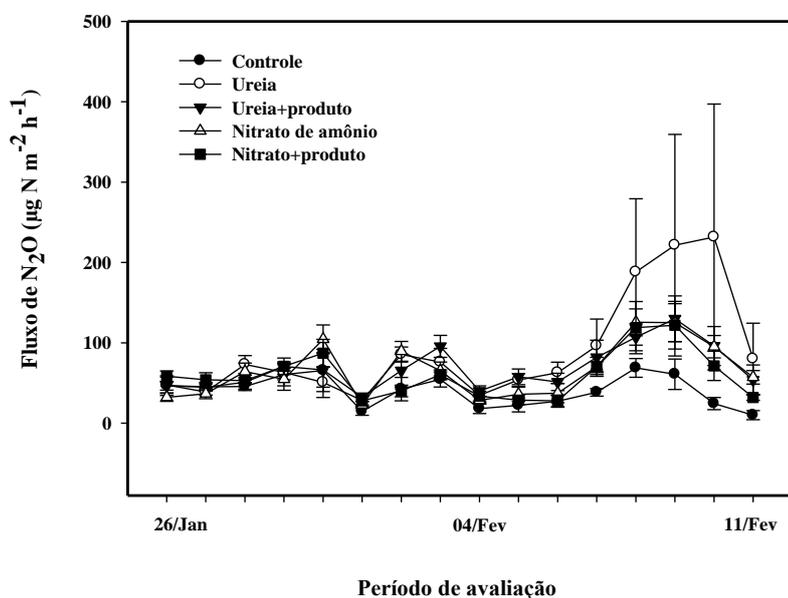
#### 4.3.1- Emissões de N<sub>2</sub>O

##### 1a) Fluxo de N<sub>2</sub>O

As diferenças entre os tratamentos nos fluxos de N<sub>2</sub>O foram observadas a partir do 6º dia (Figura 23), sendo o tratamento com ureia o que mostrou maiores fluxos. Novamente, a aplicação de ureia resultou em maiores fluxos de N<sub>2</sub>O, com tendência de ser superior a aplicação de nitrato de amônio. A aplicação de estrobilurina aparentemente reduziu a emissão de N<sub>2</sub>O tanto do tratamento a base de ureia como de nitrato, porém com as análises estatísticas não foi possível verificar diferenças significativas.

Os fluxos tiveram seus picos em torno de 200 µg N-N<sub>2</sub>O h<sup>-1</sup> aos 12 dias após a aplicação do fertilizante. Geralmente é nesse período que começam a ocorrer as perdas por N<sub>2</sub>O dos fertilizantes aplicados. Lisboa et al. (2011) encontraram fluxos equivalentes a 500 µg N-N<sub>2</sub>O h<sup>-1</sup> poucos dias após o início do experimento.

Com esse experimento em casa de vegetação não foi possível verificar a influência de fungicida a base de estrobilurina nas emissões de N<sub>2</sub>O, diferentemente dos resultados de campo, portanto novos testes precisam ser realizados.



**Figura 23.** Emissões diárias de N<sub>2</sub>O do solo, submetido aos tratamentos, Controle, Ureia, Ureia com fungicida, Nitrato de amônio e Nitrato de amônio com fungicida, no período entre 26 de janeiro a 11 de fevereiro de 2015, em casa de vegetação. As barras de erro representam o erro padrão das médias.

### 1b) Fator de emissão

O fator de emissão encontrado foi em média de  $0,16\% \pm 1,84$  para o tratamento com ureia e abaixo de  $0,10\%$  com os outros tratamentos (Tabela 10), bem abaixo do estipulado pelo IPCC de  $1\%$ . Esses valores são diferentes do encontrado no experimento a campo, porém são próximos aos encontrados por Neto et al., 2015 de  $0,44\%$  para nitrato de amônio e de  $0,52\%$  para ureia.

**Tabela 10.** Emissões de  $N_2O$  acumuladas e estimativas do fator de emissão (FE) a partir de aplicação de diferentes fontes de fertilizantes nitrogenados na cultura da cana-de-açúcar em casa de vegetação.

Tratamento	Dose de N (g vaso <sup>-1</sup> )	Emissão $N_2O$ (mg N vaso <sup>-1</sup> )	FE (%)
Controle	0	15,9 (a)*	-
Ureia	0,67	38,1 (a)	$0,16 \pm 1,84$
Ureia + fungicida	0,67	28,0 (a)	$0,09 \pm 0,40$
Nitrato de amônio	0,88	26,9 (a)	$0,08 \pm 0,22$
Nitrato +fungicida	0,88	24,2 (a)	$0,06 \pm 0,10$

\*DMS: 29,79. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

### 4.3.2- METABÓLITOS SOLÚVEIS

A adição da estrobilurina não produziu efeito sobre as frações solúveis de N na planta (N-total, N-amino livre e N-nitrato), uma vez que não houve diferenças significativas entre os tratamentos analisados (Tabela 11). As concentrações de amônio ficaram fora da faixa de detecção.

**Tabela 11.** Concentração em  $\mu\text{moles g}^{-1}$  de peso fresco de N-amino, N-nitrato e % de N-total da folha de cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*), coletada 36 dias após transplante adubação das mudas no sulco e submetida a diferentes tratamentos.

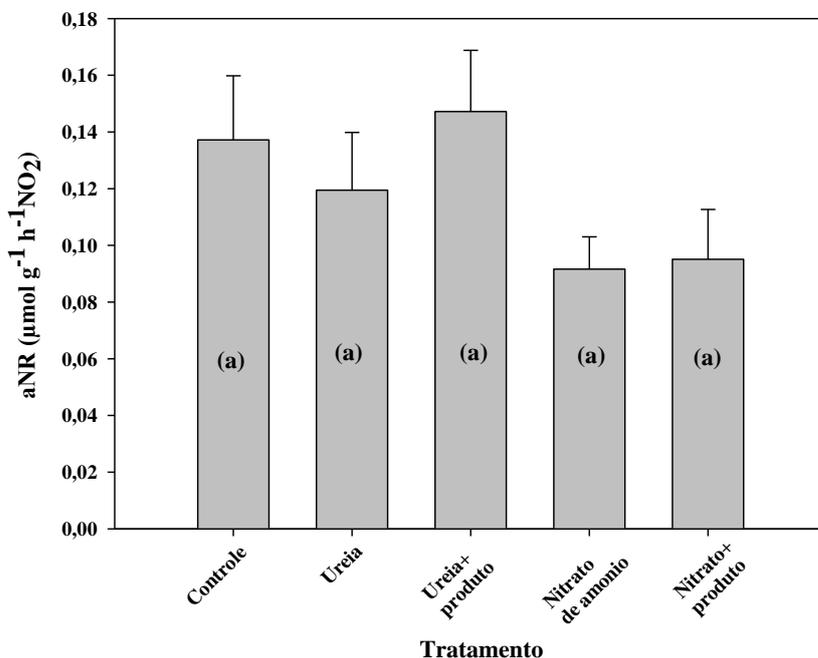
Tratamento	N-Total (%)		N-amino N-nitrato			
			$\mu\text{moles/g peso fresco}$			
Controle	1,3	a	5,82	a	0,08	a
Ureia	1,3	a	5,63	a	0,11	a
Ureia + fungicida	1,3	a	4,96	a	0,15	a
Nitrato de amônio	1,4	a	6,18	a	0,11	a
Nitrato de amônio + fungicida	1,3	a	4,92	a	0,09	a

### 4.3.3- ANÁLISE ENZIMÁTICA

Os resultados da atividade da enzima nitrato redutase apresentaram níveis baixos e sem diferença significativa entre os tratamentos com e sem aplicação do produto a base estrobilurina (Figura 24).

Esses resultados estão de acordo com os encontrados no campo, mesmo sendo realizado em casa de vegetação com controle do ambiente. Porém, como as mudas sentiram o

transplante tardio, esse fato pode ter afetado esse desempenho fisiológico inicial ou realmente o produto não possui efeito na eficiência do uso do nitrogênio pela cultura da cana-de-açúcar.



**Figura 24.** Atividade da enzima nitrato redutase ( $\mu\text{mol g}^{-1} \text{h}^{-1} \text{NO}_2$ ) aos 36 dias após transplantes e adubação das mudas da cultura de cana-de-açúcar, submetidas a diferentes tratamentos (Controle, Ureia, Ureia + fungicida, Nitrato de amônio e Nitrato de amônio + fungicida). Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

#### 4.3.4- BIOMETRIA

Foram observadas diferenças aparentes no desenvolvimento da cultura, como é demonstrado na Figura 25. As mudas tratadas com o fungicida se mostraram maiores e mais vigorosas com adubação a base de nitrato de amônio, porém o tratamento a base de uréia não mostrou diferença no desenvolvimento com a aplicação da estrobilurina. Apesar dessas diferenças entre os tratamentos, estatisticamente não houve significância entre a massa seca total de cada tratamento, sendo os valores encontrados em torno de 26g para o controle e de 32g para o Nitrato de amônio com o produto.

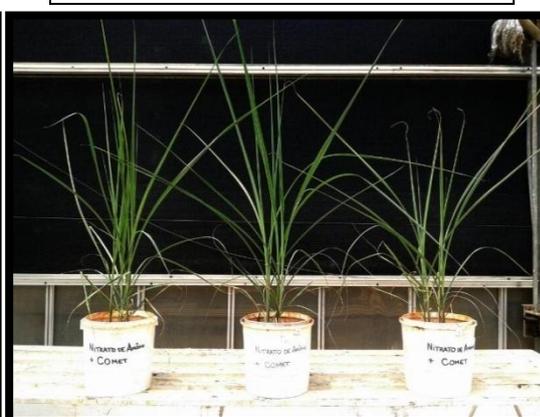
### Testemunha



### Nitrato de amônio



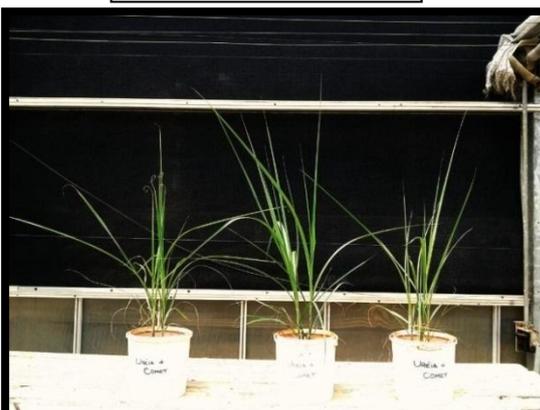
### Nitrato de amônio + produto



### Ureia



### Ureia + produto



**Figura 25.** Diferenças entre o desenvolvimento das mudas de cana-de-açúcar, entre a testemunha (sem aplicação de N) e mudas tratadas com ureia e nitrato de amônio, com e sem aplicação de fungicida com o princípio ativo estrobilurina.

## 5- CONCLUSÕES

1) Baseado nos experimentos preliminares, pode-se concluir que adições de fungicidas em solos tropicais agrícolas têm potencial para inibir significativamente as emissões de N<sub>2</sub>O do solo.

2) Nos experimentos a campo e da casa de vegetação:

- A aplicação de estrobilurina no plantio da cana-de-açúcar fertilizada com diferentes fontes de N não resultou em melhorias na eficiência do uso de nitrogênio.

- As emissões de N<sub>2</sub>O originadas da fertilização nitrogenada são reduzidas com a aplicação de estrobilurina, o que está relacionado à inibição da atividade de fungos.

## 6- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACUNHA, J. G. et al. Suficiência amostral para a estimação da produção de cana-de-açúcar. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.44, n.10, p. 1747-1754, outubro de 2014.

ALBINO, J.; CRESTE, S.; FIGUEIRA, A. Mapeamento genético da cana-de-açúcar. *Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento*, v.36, p.82-91. 2006.

ALVES, B. J. R. et al. Selection of the most suitable sampling time for static chambers for the estimation of daily mean N<sub>2</sub>O flux from soils. *Soil Biology & Biochemistry*, 46 (2012) 129e135, 2012.

ANDA. Associação Nacional para Difusão de Adubos. Estatística: principais indicadores do setor de fertilizantes. 2015. Disponível em: [www.anda.org.br/estatisticas.aspx](http://www.anda.org.br/estatisticas.aspx). Acesso em 29 jun. 2015.

ANJOS, I.A.; ANDRADE, L.A.B.; FIGUEIREDO, P.A.M. Avaliação do potencial industrial de duas variedades de cana-de-açúcar (cana-soca) sob diferentes doses de nitrogênio. In: Reunião brasileira de fertilidade do solo e nutrição de plantas, 23.Caxambu, 1998. Resumos... Caxambu: SBCS, p.87, 1998..

ANKE, T. The antifungal strobilurins and their possible ecological role. *Canadian Journal Botany*, Ottawa, v.7 (Suppl. 1), p. 940-945, 1995.

ANVISA- Agência nacional de vigilância sanitária. Disponível em < <http://portal.anvisa.gov.br/> >. Acesso em 03.jan.2014.

ARAÚJO, A. M. S.; SAMPAIO, E. V. S. B.; SALCEDO, I. H. Mineralização do C e do N em amostras armazenadas de solo e cultivadas com cana-de-açúcar, ao longo de dez anos, com e sem fertilização nitrogenada. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v. 25, n. 1, p. 43-53, 2001.

AULAK, M.S.; DORAN, J.W. e MOSIER, A.R. Soil denitrification – significance, measurement and effects of management. In: *Advances in Soil Science*, Stewart, B.A. (ed.), 1-57, Springer, New York, 1992.

AZEREDO,D.F.; ROBAINA, A.A.; ZANOTTI, N. E. Adubação mineral em cana-de-açúcar no Estado do Espírito Santo. *Saccharum-STAB* , São Paulo, v.7,n.30, p.39-43, 1984.

BALASUBRAMANIAN, V.; ALVES, B.; AULAKH, M.; BEKUNDA, M.; CAI, Z.; DRINKWATER, L.; MUGENDI, D.; KESSEL, C. van; OENEMA O. Crop, environmental, and management factors affecting nitrogen use efficiency. In: MOSIER, A.R.; SYERS, J.K.; FRENEY, J. (Ed.). *Agriculture and the nitrogen cycle*. Washington: Scientific Committee on Problems of the Environment, p.19-33. (SCOPE, 65), 2004.

BAPTISTA, R. B.;MORAIS, R. F.; LEITE, J. M.; SCHULTZ, N.; ALVES, B. J. R.; BODDEY, R. M.; URQUIAGA, S. Variations in the 15N natural abundance of plant-available N with soil depth: Their influence on estimates of contributions of biological N<sub>2</sub> fixation to sugar cane. *Applied Soil Ecology*,v.73, p.124–129, 2014.

BARLETT, D. W. et al. Understanding the strobirulin fungicides. *Pesticide Outlook*, Cambridge, v.12, n. 4, p.143-146, 2001.

BARTLETT, D.W.; CLOUGH, J.M.; GODWIN, J.R.; HALL, A.A.; HAMER, M.; PARR-DOBRZANSKI, B. Review: the strobilurin fungicides, *Pest Manage. Sci.* v.58, p.649–662, 2002.

BASF. AgCelence: marca mundial da BASF é a excelência em produtividade no campo. Disponível em <[http://www.basf.com.br/sac/web/brazil/pt\\_BR/index](http://www.basf.com.br/sac/web/brazil/pt_BR/index)> Acesso em: 23 jan.2014.

BITTENCOURT, V. C. ; FAGANELLO, B. F.; SALATA, J. C. Eficiência da adubação nitrogenada em cana-de-açúcar (planta). *STAB – Açúcar, Alcool e Subprodutos*, v. 5, n.1, p.26-33, 1986.

BOCKMAN, O.C., OLFS, H.W. Fertilizers, agronomy, and N<sub>2</sub>O. Nutrient Cycling in Agroecosystems, v.52, p.165–170, 1998.

BODDEY, R.M.; URQUIAGA, S.; ALVES, B.J.R.; REIS, V.M. Endophytic nitrogen fixation in sugarcane: present knowledge and future applications. *Plant and Soil*, v. 252, p.139-149, 2003.

BOUROCHE, J. M.; SAPORTA, G. *Análise de dados*. Rio de Janeiro: Zahar, 1982.

BRYSON, R.J.; Leandro, L.; Jones, D.R. The physiological effects of kresoxim-methyl on wheat leaf greenness and the implication for crop yield. In: *Proceedings of the righton Crop Protection Conference - Pests and Diseases, 2000*, Farnham. *Proceedings...* Farnham: British Crop Protection Council, p.739-747, 2000.

CAMPBELL, W.H. Nitrate reductase structure, function and regulation: bridging the gap between biochemistry and physiology. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, v.50, p. 277-30, 1999.

CANTARELLA, H.; RAIJ, B. van. Adubação nitrogenada no estado de São Paulo. SANTA, M. B. M. (Ed.). *Adubação nitrogenada no Brasil*. Ilhéus: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1985. p.47-79.

CANTARELLA, H. Nitrogênio. In: *Fertilidade do solo*. Novais, R.F.; Alvarez V.V.H.; Barros, N.F.; Fontes, R.L.F.; Cantarutti, R.B.; Neves, J.C.L. (eds). Viçosa, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 375-470, 2007.

CANTARELLA, H.; RAIJ, B. Van. Adubação nitrogenada no estado de São Paulo. In: *Simpósio sobre adubação nitrogenada no Brasil*. Ilhéus, Anais... Ilhéus: CEPLAC/SBCS, 1986, p.47-79, 1984.

CARMO, J.B.; FILOSO, S.; ZOTELLI, L. C.; NETO, E. R. S.; PITOMBO, L. M.; DUARTE-NETO, P. J. ; VARGAS, V. P.; ANDRADEK, C. A. ; GAVA, G. J. C.; ROSSETTO, R.; CANTARELLA, H.; NETO, A. E.; MARTINELLI, L. A. Infield greenhouse gas emissions from sugarcane soils in Brazil: effects from synthetic and organic fertilizer application and crop trash accumulation. *Blackwell Publishing Ltd, GCB Bioenergy*, v. 5, p. 267–280, 2012.

CATALDO, D.A.; HAROON, M.; SCHRADEV, L.E.; YOUNGS, V.L. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, Athens, v.6, p.71-80, 1975.

CAZETTA, J.O.; VILLELA, L.C.V. Nitrate reductase activity in leaves and stems of tanner Grass (*Brachiaria radicans* Napper). *Scientia Agrícola*, v.61, p. 640-648, 2004.

CERRI, C.C.; MAIA, S.M.F.; GALDOS, M. V.; CERRI, C. E. P.; FEIGL, B. J.; BERNOUX, M. Brazilian greenhouse gas emissions: the importance of agriculture and livestock. *Scientia Agrícola*, Piracicaba, v. 66, n. 6, p. 831-843, 2009.

CHEN, H., MOTHAPO, N.V., SHI, W. Soil moisture and pH control relative contributions of fungi and bacteria to N<sub>2</sub>O production. *Microbial Ecology*, v.69, p.180-191, 2015.

CHEN, H.; MOTHAPO, N. V.; SHI, W. The significant contribution of fungi to soil N<sub>2</sub>O production across diverse ecosystems. *Applied Soil Ecology*, v.73, p.70–77, 2014.

CHIKOWO, R.; MAPFUMO, P.; NYAMUGAFATA, P.; GILLER, K. E. Mineral N dynamics, leaching and nitrous oxide losses under maize following two-year improved fallows on a Sandy loam soil in Zimbabwe. *Plant and Soil*, v.259, p.315-330, 2004.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. Disponível em <[www.conab.gov.br/](http://www.conab.gov.br/)> Acesso em 24.abr.2015.

COURTAILLAC, N. ; BARAN, R. ; OLIVER, R. ; CASABIANCA, H. ; GANRY, F. Efficiency of nitrogen fertilizer in sugarcane-vertical system in Guadeloupe according to growth and ratoon age of the cane. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, v. 52, p. 9-17, 1998.

CRENSHAW, C. L.; LAUBER, C.; SINSABAUGH, R. L.; STAVELY, L. K. Fungal control of nitrous oxide production in semiarid Grassland. *Biogeochemistry*, v.87, p.17–27, 2008.

CRUTZEN, P.J.; MOSIER, A.R.; SMITH, K.A.; WINIWARTER, W. N<sub>2</sub>O release from agro-biofuel production negates global warming reduction by replacing fossil fuels. *Atmospheric Chemistry and Physics*, Katlenburg -Lindau, v.8, n. 2, p. 389-395, 2008.

DALAL, R.C., WANG, W., ROBERTSON, G.P., PARTON, W. Nitrous oxide emission from Australian agricultural lands and mitigation options: a review. *Australian Journal of Soil Research*, v.41, p. 165–195, 2003.

DANALATOS, N.G; ARCHONTOULIS F.G; MITSIOS, I. Potential growth and biomass productivity of *Miscanthus giganteus* as affected by plant density and N fertilization in central Greece. *Biomass and Bioenergy*, Rotterdam, v. 31, p. 145-152, 2007.

DAVIDSON, E. A.; BUSTAMANTE, M. M. C.; PINTO, A. D. S. Emissions of nitrous oxide and nitric acid from soils of native and exotic ecosystems of the Amazon and Cerrado regions of Brazil. *Scientific World*, v.1, p.322-319, 2001.

DAVIDSON, E. A.; VERCHOT, L. V. Testing the hole in the pipe model of nitric and nitrous oxide emissions from soils using the TRAGNET database. *Global Biogeochemical Cycles*, 14: 1035-1043, 2000.

DAVIDSON, E. A.; MATSON, P. A.; VITOUSEK, R.; RILEY, R.; DUNKIN, K.; GARCÍA-MÉNDEZ, G.; MAASS, J. M. Processes regulating soil emissions of NO and N<sub>2</sub>O in a seasonally dry tropical forest. *Ecology*, Tempe, v. 74, p. 130-139, 1993.

DAVIDSON, E.A. The contribution of manure and fertilizer nitrogen to atmospheric nitrous oxide since 1860. *Nature Geoscience*, v. 2, p. 659- 662, 2009.

DIAS, F. L. F.; MAZZA, J. A.; MATSUOKA, S.; PERECIN, D.; MAULE, R. F. Produtividade da cana-de-açúcar em relação a clima e solos da região noroeste do estado de São Paulo. *R. Bras. Ci. Solo*, 23:627-634, 1999.

DOBBIE, K. E.; SMITH, K. A. Impact of different forms of N fertilizers on N<sub>2</sub>O emission factors. *Journal of Geophysical Research*, v. 104, p. 26891-26899, 1999.

EMBRAPA. Documentos 249. Uso do Nitrogênio na Agricultura e suas Implicações na Emissão do Gás de Efeito Estufa Óxido Nitroso (N<sub>2</sub>O). EMBRAPA Arroz e Feijão. Santo Antônio de Goiás - GO, 2009.

EMBRAPA. Estoques de carbono e emissões de gases do efeito estufa na agropecuária brasileira. EMBRAPA Meio Ambiente. Jaguariúna – SP, 2012.

EWERS, R.M.; LAURANCE, W.F. e SOUZA JR., C.M. Temporal fluctuations in Amazonian deforestation rates. *Environmental Conservation*, 35(4), 303-310, 2008.

FAGAN, E. B.; NETO, D. D.; VIVIAN, R.; FRANCO, R. B.; YEDA, M. P.; MASSIGNAM, L. F.; OLIVEIRA, R. F.; MARTINS, K. V. Efeito da aplicação de estrobilurina na taxa fotossintética, respiração, atividade da enzima nitrato redutase e produtividade de grãos de soja. *Bragantia*, Campinas, v. 69, n. 4, p.771-777, 2010.

FAGERIA, N. K.; BALIGAR, V.C. Enhancing nitrogen use efficiency in crop plants. *Advances in Agronomy*, v.88, p.97- 185, 2005.

FELKER, P. Microdetermination of nitrogen in seed protein extracts. *Analytical Chemistry*, Washington, v.49, 1980, 1977.

FERNANDES, M. S. N carriers, light and temperature influences on the free amino acid pool composition of rice plants. *Turrialba*. 33(3):297-301, 1983.

FIGUEIREDO E B and LA SCALA N Jr. Greenhouse gas balance due to the conversion of sugarcane areas from burned to green harvest in Brazil Agric. Ecosyst. Environ. , v.141, p.77–85, 2011.

FORSTER, P., V. RAMASWAMY, P. ARTAXO, T. BERNTSEN, R. BETTS, D.W. FAHEY, J. HAYWOOD, J. LEAN, D. C. LOWE, G. MYHRE, J. NGANGA, R. PRINN, G. RAGA, M. SCHULZ AND R. VAN DORLAND. Changes in atmospheric constituents and in radioactive forcing. In: *Climate Change: The Physical Science Bases. Contribution of*

Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change [Solomon, S., D. Qin, M. Manning, Z. Chen, M. Marquis, K. B. Averyt, M. Tignor and H.L. Miller (eds)]. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA. 2007.

FRANCO, H. C. J.; TRIVELIN, P. C. O.; FARONI, C. E.; VITTI, A. C.; OTTO, R. Aproveitamento pela cana-de-açúcar da adubação nitrogenada de plantio. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 32: 2763-2770, n especial, 2008.

GALLO, J.R.; HIROCE, R.; ALVAREZ, R. Teores de nutrientes nas folhas de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) cultivar CB 41/76. *Bragantia*, Campinas, v.33, p.25-31, 1974.

GAVA, G. J. C.; TRIVELIN, P. C. O.; VITTI, A. C.; OLIVEIRA, M. W. Balanço do nitrogênio da ureia (15N) e da palhada (15N) no sistema solo-cana-de-açúcar (cana soca). In: Congresso nacional dos técnicos açucareiros alcooleiros do brasil, 8., Recife. Anais... Olinda: STAB. p. 245-251, 2002.

GAVA, G. J. C.; TRIVELIN, P. C. O.; VITTI, A. C.; OLIVEIRA, M. W. Recuperação do nitrogênio (15N) da ureia e da palhada por soqueira de cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*). *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v. 27, p. 621-630, 2003.

GLAAB, J.; KAISER, W. M. Increased nitrate reductase activity in leaf tissues after application of fungicide Kresoxim-methyl. *Planta*, Berlin, v. 207, p. 442-448, 1999.

GLORIA, N.A. & ORLANDO Fº, J. Aplicação da vinhaça como fertilizante. *Boletim técnico. PLANALSUCAR*, Piracicaba, 38p. 1983.

GOMES, A.A.; REIS, V.M.; BALDANI, V.L.D.; GOI, S.R. Relação entre distribuição de nitrogênio e colonização por bactérias diazotróficas em cana-de-açúcar. *Pesquisa agropecuária brasileira*, Brasília, v.40, n.11, p.1105-1113, novembro de 2005.

GRANIER, C.; ARTAXO, P. e REEVES, C.E. (Eds). Emissions of Atmospheric Trace Compounds. In: *Advances in Global Change Research*, 18, Kluwer Academic Publishers, 2004.

GROSSMANN, K.; RETZLAFF, G. Bioregulatory effects of the fungicidal strobilurin kresoxim methyl in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Pesticide Science*, v.50, p.11-20, 1997.

HAGEMAN, R.H. & REED, A.J. Nitrate reductase from higher plants. *Methods in Enzymology*, San Diego, 69:270-280, 1980.

HANSEN, J.; NAZARENKO, L.; RUEDY, R.; SATO, M.; WILLES, J.; GENIO, A.D.; KOCH, D.; LACIS, A. Earth's Energy Imbalance: Confirmation and Implications, *Science*, 308, 1431-1435, 2005.

HEFTING, M.M., BOBBINK, R., DE CALUWE, H. Nitrous oxide emission and denitrification in chronically nitrate-loaded riparian buffer zones. *J. Environ. Qual.* 32, p. 1194-1203, 2003.

HOFMANN, D. J.; BUTLER, J.H.; DLUGOKENCKY, E.J.; ELKINS, J.W.; MASARIE, K.; MONTZKA, S.A.; TANS, P. The role of carbon dioxide in climate forcing from 1979 to 2004: introduction of the Annual Greenhouse Gas Index, *Tellus*, 58(5), 614-619, 2006.

HOLST J.; BRACKINR.; ROBINSONN.; LAKSHMANANP., SCHMIDTS. Soluble inorganic and organic nitrogen in two Australian soils under sugarcane cultivation. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, v. 155, p.16– 26, 2012.

IBGE- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em < <http://www.ibge.gov.br/home/>> Acesso em 29.jan.2014.

IEA, Internacional Energy Agency. Biofuels for transport: Technology roadmap. Paris, France, p.52, 2011.

IPCC- (Intergovernmental Panel on Climate Change)-Climate Change: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change ed Core Writing Team, R K Pachauri and A Reisinger (Geneva: IPCC), 2007.

IPCC- Intergovernmental Panel on Climate Change, Climate change 1995: The Science of Climate Change– eds. Houghton, J.T., Meira Filho, L.G., Callander, B.A, Harris, N., Kattenberg, A.,e Maskell, K., Cambridge University Press, Cambridge, 1996.

JABS, T. Can strobilurins still deliver? *Crop Protection*, Guildford, v. 17, p. 19-20, 2004.

JADOSKI, C. J. Efeitos fisiológicos da estrobilurina em plantas de feijão (*phaseolus vulgaris* l.) condicionado sob diferentes tensões de água no solo. Dissertação de Mestrado, Unesp – Botucatu –SP, janeiro de 2012.

JAGGER, A. Brazilian ethanol: an attractive proposition. *Biofuels, Bioproduction e Biorefinery*, v.4, p, 480-483, 2010.

JAWORSKI, E.G. Nitrate reductase assay in intact plant tissues. *Biochemical Biophysical Research. Communication*, v.43, n.6, p.1274-1279, 1971.

KEMPERS, A. J.; ZWEERS, A. Ammonium determination in soil extracts by the salicylate method. *Comm Soil Sci Plant Anal*, v. 17, n. 7, p. 715-723, 1986.

KINNEY CA, MOISER AR, FERRER I, FURLONG ET, MANDERNACK KW. The effects of the fungicides mancozeb and chlorothalonil on fluxes of CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>O, and CH<sub>4</sub> in a fertilized Colorado grassland soil. *J Geophl Res-Atm* 109:D05303, 2004.

KOHLE, H.; GROSSMANN, K.; JABS, T.; GERHARD, M.; KAISER, W.; GLAAB, J.; CONRATH, U.; SEEHAUS, K.; HERMS, S. Physiological effects os the strobilurin fungicide F500 on plants, 2003.

KONISHI, M.; YANAGISAWA, S. The regulatory region controlling the nitrate-responsive expression of a nitrate reductase gene, NIA 1, in Arabidopsis. *Plant and Cell Physiology*, v.52, p.824-836, 2011.

KORNDORFER, G. H. ; VALLE, M. R. ; MARTINS, M. ; TRIVELIN, P. C. O. Aproveitamento do nitrogênio da ureia pela cana planta. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v. 21, p. 23-26, 1997.

KOWALCHUCK, G.A., STEPHEN, G.R. Ammonia-oxidising bacteria: a model for molecular microbial ecology. *Annual Reviews of Microbiology*, v.55, p. 485–529, 2001.

LAUGHLIN, R.J.; STEVENS, R.J. Evidence for fungal dominance of denitrification and codenitrification in a grassland soil. *Soil Sci Soc Am J*, v.66, p.1540–1548, 2002.

LEE, T.S.G.; BRESSAN, E. A. The potential of ethanol production from sugarcane in Brazil. *Sugar Technology*, v.8, p.195-198, 2006.

LI, C.; ABER, J.; BUTTERBACH-BAHL, K. P. H. A process-oriented model of N<sub>2</sub>O and NO emissions from forest soils: 1. Model development. *Journal of Geophysical Research*, v. 105, p. 4369-4384, 2000.

LINN, D.M., DORAN, J.W. Aerobic and anaerobic microbial populations in no till and plowed soils. *Soil Sci. Soc. Am.* v.48, p. 794–799, 1984.

LINN, D.M., DORAN, J.W. Effect of water-filled pore space on carbon dioxide and nitrous oxide production in tilled and non tilled soils. *Soil Sci. Soc. Am.* v. 48, p. 1267–1272, 1984.

LISBOA, C. C.; BUTTERBACH-BAHL, K.; MAUDER, M.; KIESE, R. Bioethanol production from sugarcane and emissions of greenhouse gases – known and unknowns. *GCB Bioenergy*. 3:277–292, 2011.

MACEDO, I.C.; LEAL, M.R.L.V.; SILVA, J.E.A.R. Balanço das emissões de gases do efeito estufa na produção e no uso do etanol no Brasil. São Paulo: Secretaria do Meio Ambiente, p.37, 2004.

MACLAREN, R.G.; CAMERON, K.C. Soil, plant and fertilizer nitrogen. In: McLAREN, R.G. (Ed.) *Soil science: Sustainable production and environmental protection*. 2.ed. New York: Oxford University Press, p.192-207, 1996.

MALAVOLTA, E. ; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S. A. Avaliação do estado nutricional das plantas. Piracicaba: Associação Brasileira para a Pesquisa da Potassa e do Fosfato, p.319, 1997.

MANSELL, B.O.; SCHROEDER, E.D. Biological denitrification in a continuous flow membrane reactor. *WaterScience Technology*, London., v.38, n.1, p.9-14, 1998.

MARCELINO, R. Inibidor de Nitrificação em Fertilizantes Nitrogenados e Rendimento de Milho. Dissertação. Instituto Agrônomo, Campinas, 2009.

MARINHO, M.L. Aspectos agronômicos e econômicos da adubação da cana-de-açúcar em Alagoas. Rio Largo: EECA, p.60, 1974.

MARQUES T. A., SILVA W. H., PALARETTI, L. F., RAMPAZO, E. M. Vegetative Growth And Maturation In Three Sugarcane Varieties. *Bioenergia em revista: diálogos*, v. 2, n. 1, p. 85-95, jan./jun. 2012.

MATSON, P. A.; MCDOWELL, W.H.; TOWNSEND, A. R.; VITOUSEK, P. M. The globalization of N deposition: ecosystem consequences on tropical environments. *Biogeochemistry*, Amsterdam, NL, v.46, p.67-83, 1999.

MAZID, M.; KHAN, T.A.; MOHAMMAD, F. Role of nitrate reductase in nitrogen fixation under photosynthetic regulation. *World Journal of Pharmaceutical Research*, v.1, p.386-414, 2012.

MCLAIN JET, MARTENS DA. Nitrous oxide flux from amino acid mineralization. *Soil Biol Biochem*, v.37, p.289–299, 2005.

MCLAIN JET, MARTENS DA. N<sub>2</sub>O production by heterotrophic N transformations in a semiarid soil. *Appl Soil Ecol*, v.32, p.253–263, 2006.

MEINZER, F.C.; ZHU, J. Nitrogen stress reduces the efficiency of the C<sub>4</sub> CO<sub>2</sub> concentrating system, and therefore quantum yield, in *Saccharum* (sugarcane) species. *Journal of Experimental Botany*, 1998.

MICHAEL, G. The influence os strobirlurin containing fungicides on physiological processes of yield formation in winter wheat varieties. 2002. 288 f. (Thesis) Technical University of Munich, Berlin, 2002.

MIRANDA, KM.; ESPEY, M.G.; WINK, D.A. A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric Oxide*, v 5, p. 67-71, 2001.

MITCHELL, .L. Microdetermination of nitrogen ia plan& tissues J. *AOAC* 55 (1): 1-3, 1972.

MIYAZAWA, M., PAVAN, M.A., MURAOKA, T., CARMO, C.A.F.S., MELO, W.J. Análises químicas de tecido vegetal. In: *Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes*. SILVA, F. C (ed.). Brasília, EMBRAPA, p. 171-223, 1999.

MORAIS, R. F.; BODDEY, R. M.; URQUIAGA, S.; JANTALIA C. P.; ALVES B. J. R. Ammonia volatilization and nitrous oxide emissions during soil preparation and N fertilization of elephant grass (*Pennisetum purpureum Schum.*) *Soil Biology & Biochemistry*, v. 64, p. 80-88, 2013.

MOSIER A R. Exchange of gaseous nitrogen compounds between agricultural systems and the atmosphere *Plant Soil*, v.228, p.17–27, 2001.

NEVES, M. F.; PINTO, M. J. A.; CONEJERO, M. A. TROMBIN, V. G. The example of Brazil, *Food and fuel*. p.105, 2011.

NEVISON, C. D. & HOLLAND, E. A. A re-examination of the impact of anthropogenically fixed nitrogen on the atmospheric N<sub>2</sub>O and the stratospheric O<sub>3</sub> layer. *Journal of Geophysical Research*, v.102, p.25519-25536. 1997.

NEVISON, C. Review of the IPCC methodology for estimating nitrous oxide emissions associated with agricultural leaching and runoff. *Chemosphere*, p.493–500, 2000.

NIELSEN, T.H., REVSBECH, N.P. Nitrification, denitrification, and N liberation associated with two types of organic hot-spots in soil. *Soil Biol. Biochem.*, v.30, p. 611–619, 1998.

NUNES JUNIOR, D.; PINTO, R.S.A.; TRENTO, F.E.; ELIAS, A.I. Indicadores agrícolas do setor canavieiro: safra 2003/2004. Ribeirão Preto: Idea, p.111, 2005.

OLIVEIRA, B.G.; FEIGL, B.J.; NETO, M.S.; CERRI, C.C. Emissões de gases de efeito estufa nos canais de distribuição da vinhaça, subproduto da agroindústria sucroalcooleira. In: XXXII Congresso Brasileiro de Ciência do Solo. 2009. Fortaleza- CE. Anais... Fortaleza: SBCS; UFC, CD-ROOM, 2009.

OLIVEIRA, M.W.; TRIVELIN, P.C.O.; BOARETTO, A.E.; MURAOKA, T.; MORTATTI, J. Lixiviação de nitrogênio, potássio, cálcio e magnésio em solo arenoso cultivado com cana-de-açúcar. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v.37, n.6, p.861-868, 2002.

OLSEN, K.K. (2008). Multiple Wavelength Ultraviolet Determinations of Nitrate Concentration, Method Comparisons from the Preakness Brook Monitoring Project, October 2005 to October 2006. Springer Science + Business Media B.V. 2007.

ORLANDO FILHO, J.; HAAG, H.P. & ZAMBELLO Jr. E. Crescimento e absorção de macronutrientes pela cana-de-açúcar, variedade CB 41-76 em função de idade em solos do Estado de São Paulo. *Boletim Técnico Planalsucar*, n.2, 128p. Piracicaba, 1980.

PANOSSO, A. R.; PERILLO, L. I.; FERRAUDO A. S.; PEREIRA, G. T.; MIRANDA, J. G. V.; LA SCALA, N. Fractal dimension and anisotropy of soil CO<sub>2</sub> emission in a mechanically harvested sugarcane production area. *Soil and Tillage Research*, Volume 124, Pages 8–16, August 2012.

PASSIANOTO, C.C.; AHRENS, T.; FEIGL, B.J.; STEUDLER, P.A.; DO CARMO, J.B.; MELILO, J.M. Emissions of CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>O, and NO in conventional and no-till management practices in Rondônia, Brazil. *Biol. Fertil Soils*, v.38, p.200-208, 2003.

PAUL, E. A.; CLARK, F. E. Soil microbiology and biochemistry. San Diego: Academic, p.340, 1996.

PHILIPPOT, L.; Denitrifying genes in bacterial and Archeal genomes. *Biochimica et Biophysica Acta*, Amsterdam, v. 1577, p. 355-376, 2002.

PRADO, R. M.; PANCELLI, M. A. Resposta de soqueira de cana-de-açúcar à aplicação de nitrogênio em sistema de colheita sem queima. *Bragantia*, Campinas, v.67, n. 4, p. 951-959, 2008.

PRATHER, J. M. Times scales in atmospheric chemistry: coupled perturbations to N<sub>2</sub>O, NO, and O<sub>3</sub>. *Science*, New York, v. 279, p. 1339-1341, 1998.

QUESADA D.M. Parâmetros quantitativos e qualitativos da biomassa de genótipos de capim elefante (*Pennisetum purpureum* Schum.) com potencial para uso energético, na forma de

carvão vegetal. 2005. Tese (Doutorado em Agronomia Ciência do Solo) Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Seropédica, 2005. 65f.

RAVINDRANATH, N.H; BALACHANDRA, P; DASAPPA, S; RAO, K.U. Bioenergy technologies for carbon abatement. *Biomass and Bioenergy*, Rotterdam, v.30, p.826-837, 2006.

ROBERTSON, G.P. Abatement of nitrous oxide, methane and the other non-CO<sub>2</sub> greenhouse gases: The need for a system approach. In: *The Global Carbon Cycle: integrating humans, climate and natural world*. Field, C. B. & Raupach, M.R (Ed). SCOPE series 62. Island Press, Washington, p. 112-124, 2004.

ROBERTSON, G.P.; GRACE, P.R. Greenhouse gas fluxes in tropical and temperate agriculture: the need for a full-cost accounting of global warming potentials. *Environment, Development and Sustainability*, vol.6, p.51–63, 2004.

SANTOS, C. L. R. et al. Otimização da análise da atividade da redutase do nitrato e sua caracterização em folhas de cana-de-açúcar. *Pesquisa agropecuária brasileira*. Brasília, v.49, n.5, p. 384-394, maio de 2014.

SCARPINELLA, G. A. Reflorestamento no Brasil e o protocolo de Quioto. 2002. Dissertação (Mestrado) Programa Interunidades de Pós-Graduação em Energia, Universidade de São Paulo, São Paulo-SP, 2002. 162f.

SCHINDLBACHER, A.; ZECHMEISTER-BOLTENSTERN, S.; BUTTERBACH BAHL, K. Effects of soil moisture and temperature on NO, NO<sub>2</sub> and N<sub>2</sub>O emissions from European forest soils. *Journal of Geophysical Research*, 109, D17302, 2004.

SHOUN H, KIM D, UCHIYAMA H, SUGIYAMA J. Denitrification by fungi. *FEMS Microbiol Lett*, v. 94, p.277–282, 1992.

SHUKLA, S. K.; YADAV, R. L.; SUMAN, A.; SINGH, P. N. Improving rhizospheric environment and sugarcane ratoon yield through bio-agent amended farm yard manure in Udic ustochrept soil. *Soil Tillage Residual*, v.99, p.158-168, 2008.

SIGNOR, D. Estoques de carbono e nitrogênio e emissões de gases de efeito estufa em áreas de cana-de-açúcar na região de Piracicaba. Dissertação (Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, p.119, 2010.

SIGNOR, D.; CERRI, C. E. P.; CONANT, R. N<sub>2</sub>O emissions due to nitrogen fertilizer applications in two regions of sugarcane cultivation in Brazil. *Environmental research letters*,8, 015013 (9pp), UK, 2013.

SILVA, G.M.A. & GURGEL, M.N.A. Aplicação de vinhaça como fertilizante em cana-de-açúcar em solo L.E., fase arenosa. In: Congresso nacional da sociedade de técnicos açucareiros do Brasil, 2., Rio de Janeiro, 1981. *Anais*. STAB-Rio de Janeiro, 1981.

SILVEIRA, J.A.G. da & CROCOMO, O.J. Biochemical and physiological aspects of sugarcane (*Saccharum* spp.) I. Effect of NO<sub>3</sub> nitrogen concentration on the metabolism of sugars and nitrogen. *Energia Nuclear na Agricultura*, Piracicaba, 3:19-33, 1981.

SILVEIRA, J.A.G. da. Interações entre assimilação de nitrogênio e o crescimento de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp) cultivada em condições de campo. Piracicaba. (Doutorado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP), p.152, 1985.

SILVEIRA, J.A.G.; CROCOMO, O.J. Assimilação de nitrogênio em cana-de-açúcar cultivada em presença de elevado nível de N e de vinhaça no solo. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, v. 2(2):p 7-15, 1990.

SINGH, K. P.; SUMAN, A.; SINGH, P. N.; LAL, M. Yield and soil nutrient balance of sugarcane plant ratoon system with conventional and organic nutrient management in subtropical India. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, v.79, p.209-219, 2007.

SMITH, K. A.; BALL, T.; CONEN, F.; DOBBIE, K. E.; MASSHEDER, J.; REY, A. Exchange of greenhouse gases between soil and atmosphere: interactions of soil physical factors and biological processes. *European Journal of Soil Science*, Oxford, v. 54, n. 4, p. 779-791, 2003.

SMITH, P.; MARTINO, D.; CAI, Z.; GWARY, D.; JANZEN, H.; KUMAR, P.; MCCARL, B.; OGLE, S.; O'MARA, F.; RICE, C.; SCHOLE, B.; SIROTENKO, O. Agriculture. In: METZ, B.; DAVIDSON, O. R.; BOSCH, P. R.; DAVE, R.; MUYER, L. A. (Ed). *Climate change: mitigation of climate change*. Cambridge: Cambridge University Press, p. 497-540, 2007.

SOARES, L. H. DE B.; ALVES, B. J. R.; URQUIAGA, S.; BODDEY, R. M. Mitigação das emissões de gases do efeito estufa pelo uso de etanol da cana de açúcar produzido no Brasil. *Seropédica, Embrapa Agrobiologia*, 2009. 14p. (Circular Técnica 27).

STUPIELLO, J. P. A cana-de-açúcar como matéria-prima. In: PARANHOS, S. B., *Cana-de-açúcar: Cultivo e Utilização*. Campinas: Fundação Cargill, v. 2, cap. 7, p. 759-804, 1987.

STURSOVA M, CRENSHAW CL, SINSABAUGH RL. Microbial responses to long term N deposition in a semi-arid grassland. *Microbial Ecol* 51:90-98, 2006.

TAKASHI, D. Nitrate in sugarcane. In: Hawaii an sugar planter's association. *Annul Report*. 1965. Hawaii, 1965. 34p.

TEIXEIRA, M.A.; MURRAY, M.L.; CARVALHO, M.G. Assessment of land use and land use change and forestry (LULUCF) as CDM projects in Brazil. *Ecological Economics*, New York, v.60, p. 260-270, 2006.

TEIXEIRA, N.T. Comportamento do nitrogênio "solúvel" em cana-de-soca em condições de campo e em variedade de cana- de-açúcar cultivadas em solução nutritiva. Piracicaba, 1980. 83p. (Doutorado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).

TER BRAAK, C.J.F.; SMILAUER, P. *Canoco for Windows* v. 4.5. CPRO-DLO, Wageningen, Netherlands, 2002.

TOFOLI, J. G. Ação de fungicidas e acibenzolar-s-methyl no controle da pinta preta do tomateiro. 2002. 127 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia)- Faculdade de Ciências Agrônomicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2002.

TRIVELIN, P. C.; VITTI, A. C.; OLIVEIRA, M. W. ; GAVA, G. J. C.; SARRIÉS, G. A. Utilização de nitrogênio e produtividade de cana-de-açúcar (cana-planta) em solo arenoso com incorporação de resíduos da cultura. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v. 26, n. 3, p. 636-646, 2002b.

ÚNICA. União da Indústria de Cana de açúcar. <http://www.unica.com.br/>, acessado em 01 jul. 2015.

URQUIAGA, S.; CRUZ, K.H.S.; BODDEY, R.M. Contribution of nitrogen fixation to sugarcane: nitrogen-15 and nitrogen balance estimates. *Soil Science Society of America Journal*, v.56, p.105-114, 1992.

URQUIAGA, S.; XAVIER, R. P.; MORAIS, R. F.; BAPTISTA, R. B.; SCHULTZ, N.; LEITE, J. M.; SÁ, J. M.; BARBOSA, K. P.; RESENDE, A. S.; ALVES, B. J. R.; BODDEY, R. M. Evidence from field nitrogen balance and 15N natural abundance data for the contribution of biological N<sub>2</sub> fixation to Brazilian sugarcane varieties. *Plant Soil*, v.356, p.5–21, 2012.

VENANCIO, W.S. et al. Physiological Effects of Strobirulin Fungicides on Plants. *Ci. Exatas Terra, Ci. Agr. Eng.*, Ponta Grossa, v.9 (3), p.59-68, dez, 2003.

VENANCIO, W.S.; RODRIGUES, M.A.T.; BEGLIOMINI, E.; SOUZA, N.L. Physiological effects of Strobirulin Fungicides on Plants. *Publication UEPG*, Ponta Grossa, v.9, n.3, p.59-68, 2004.

VENANCIO, W.S.; ZAGONEL, J.; FURTADO, E.L.; SOUZA, N.L. Novos fungicidas. I produtos naturais e derivados sintéticos: estrobilurinas e fenilpirroles. In: LUZ, W.C.; FERNANDES, J.M.; PRESTES, A.M.; PICININI, E.C. *Revisão anual de patologia de plantas*, Passo Fundo, v.7 p.103-155, 1999.

VICINI, L. *Análise multivariada da Teoria à prática*. UFSM- Santa Maria- RS, 2005.

VITTI, A. C. Adubação nitrogenada da cana-de-açúcar (soqueira) colhida mecanicamente sem a queima prévia: manejo e efeito na produtividade. Piracicaba, 2003. 114 f. Tese (Doutorado)- Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

WELL, R., AUGUSTIN, J., DAVIS, J., GRIFFITH, S.M., MEYER, K., MYROLD, D.D. Production and transport of denitrification gases in shallow ground water. *Nutr. Cycl. Agroecosyst*, v.60, p. 65–75, 2001.

YADAV, R. L.; SUMAN, A.; PRASAD, S. R.; PRAKASH, O. Effect of *Gluconacetobacter diazotrophicus* and *Trichoderma viride* on soil health, yield and N economy of sugarcane cultivation under subtropical climatic conditions of India. *European Journal of Agronomy*, v.30, p.296-30, 2009.

YANAI, Y., TOYOTA, K., MORISHITA, T., TAKAKAI, F., HATANO, R., LIMIN, S.H., DARUNG, U., DOHONG, S. Fungal N<sub>2</sub>O production in an arable peat soil in Central Kalimantan, Indonesia. *Soil Sci. Plant Nutr.* v.53, p. 806–811, 2007.

YEMM, E.W. e COCKING, E.C. The determination of Aminoacid with ninhydrin. *Analyst*, v. 80, p.209-213, 1955.

YOU, X.; LIU, C.; LIU, F.; LIU, Y.; DONG, J. Dissipation of pyraclostrobin and its metabolite BF-500-3 in maize under field conditions. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 80 p. 252–257, 2012.

ZAMAN, M., CHANG, S.X.. Substrate type, temperature, and moisture content affect gross and net soil N mineralization and nitrification rates in Agroforestry systems. *Biol. Fertil. Soils* 39, 269–279, 2004.

ZANATTA, J. A. Emissão de óxido nitroso afetada por sistemas de manejo do solo e sistemas de manejo. 2009. 79 f. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) - Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

ZHANG, W.; ZHANG, X. A forecast analysis on fertilizers consumption worldwide. *Environment Monitoring and Assessment*, Dordrecht, v. 133, p. 427-434, 2007.

ZHOU A, TAKAYA N, SAKAIRI MAC, SHOUN H. Oxygen requirement for denitrification by the fungus *Fusarium oxysporum*. *Arch Microbiol*, v.175, p.19–25, 2001.