

*Agosto 2018*

## VIII SEMINÁRIO

### *Iniciação Científica e Pós-Graduação*

*da Embrapa Tabuleiros Costeiros*

**29 de agosto de 2018**

*Embrapa Tabuleiros Costeiros  
Aracaju, SE*

**31 de agosto de 2018**

*Unidade de Execução de Pesquisa (UEP)  
Rio Largo, AL*

# Anais



*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
Embrapa Tabuleiros Costeiros  
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

# **VIII Seminário de Iniciação Científica e Pós-Graduação da Embrapa Tabuleiros Costeiros**

**Anais**

*Ronaldo Souza Resende*  
Editor Técnico

**Embrapa**  
*Brasília, DF*  
2018

**Embrapa Tabuleiros Costeiros**

Av. Beira Mar, 3250  
49001-970 Aracaju, SE  
Fone: (79) 4009-1344  
www.embrapa.com.br  
https://www.embrapa.br/fale-conosco/sac

**Unidade responsável pelo conteúdo e edição**

Embrapa Tabuleiros Costeiros

Comitê Local de Publicações

Presidente: *Ronaldo Souza Resende*

Secretário-Executivo: *Marcus Aurélio Soares Cruz*

Membros: *Amaury da Silva dos Santos, Ana da Silva Lédo, Anderson Carlos Marafon, Joézio Luiz dos Anjos, Julio Roberto Araújo de Amorim, Lizz Kezzy de Moraes, Luciana Marques de Carvalho, Tânia Valeska Medeiros Dantas e Viviane Talamini*

Supervisão editorial: *Flaviana Barbosa Sales*

Normalização bibliográfica: *Josete Cunha Melo*

Projeto gráfico: *Beatriz Ferreira da Cruz*

Capa: *Danilo Santos Nascimento*

Editoração eletrônica: *Beatriz Ferreira da Cruz*

**1ª edição**

Publicação digitalizada (2018)

As opiniões emitidas nesta publicação são de exclusiva e de inteira responsabilidade dos autores, não exprimindo, necessariamente, o ponto de vista da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), vinculada ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

**Todos os direitos reservados.**

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

Embrapa Tabuleiros Costeiros

---

Seminário de Iniciação Científica e Pós-Graduação da Embrapa Tabuleiros Costeiros (8. : 2018 : Aracaju, SE).

Anais / VIII Seminário de Iniciação Científica e Pós-Graduação da Embrapa Tabuleiros Costeiros; Ronaldo Souza Resende, editor técnico – Brasília, DF : Embrapa, 2018.  
PDF (155 p.).

ISBN 978-85-7035-826-4

1. Seminário. 2. Pesquisa. 3. Iniciação científica. I. Embrapa Tabuleiros Costeiros. II. Título.

CDD 630

---

©Embrapa, 2018

## **Editor Técnico**

**Ronaldo Souza Resende**

Engenheiro-agrônomo, doutor em Irrigação e Drenagem,  
pesquisador da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE

# Comissão Organizadora

**André Felipe Câmara Amaral**

Bacharel e licenciado em Química, mestre em Química Orgânica, analista da Unidade de Execução de Pesquisa de Rio Largo (UEP-Rio Largo) da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Rio Largo, AL

**Beatriz Ferreira da Cruz**

Publicitária, especialista em Marketing Promocional, analista da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE

**Elio Cesar Guzzo**

Biólogo, doutor em Entomologia, pesquisador da Unidade de Execução de Pesquisa de Rio Largo (UEP-Rio Largo) da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Rio Largo, AL

**Elizabeth Garlich Possenti**

Graduada em Administração e Ciências Contábeis, analista da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE

**Flávia Karine Nunes Pithan**

Administradora, mestre em Gestão da Qualidade, analista da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE

**Flaviana Barbosa Sales**

Secretária-executiva, especialista em Comportamento Organizacional e Gestão de Pessoas, analista da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE

**Lílian Dias Dantas da Silva**

Bacharel em Ciência da Computação, analista da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE

**Liliane Dias Dantas**

Bacharel em Administração, técnica da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE

**Lizz Kezzy de Moraes**

Engenheira-agrônoma, doutora em Genética e Melhoramento de Plantas, pesquisadora da Unidade de Execução de Pesquisa de Rio Largo (UEP-Rio Largo) da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Rio Largo, AL

**Luciano Alves de Jesus Junior**

Estatístico, mestre em Ciência da Propriedade Intelectual, analista da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE

**Marcus Aurélio Soares Cruz**

Engenheiro civil, doutor em Recursos Hídricos, pesquisador da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE

**Saulo Coelho Nunes**

Jornalista, especialista em Gestão Estratégica, analista da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE

**Sayonara Marinho Soares Borges**

Jornalista, mestre em Ciência da Propriedade Intelectual, analista da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE

**Sergio de Oliveira Procópio**

Engenheiro-agrônomo, doutor em Fitotecnia, pesquisador da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE

**Walane Maria Pereira de Mello Ivo**

Engenheira-agrônoma, doutora em Aplicação de Radioisótopos na Agricultura e Meio Ambiente, pesquisadora da Unidade de Execução de Pesquisa de Rio Largo (UEP-Rio Largo) da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Rio Largo, AL

## **Comissão Técnico-Científica**

### **Marcus Aurélio Soares Cruz**

Engenheiro civil, doutor em Recursos Hídricos, pesquisador da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE

### **Ronaldo Souza Resende**

Engenheiro-agrônomo, doutor em Irrigação e Drenagem, pesquisador da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE

### **Sergio de Oliveira Procópio**

Engenheiro-agrônomo, doutor em Fitotecnia, pesquisador da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE

### **Viviane Talamini**

Engenheira-agrônoma, doutora em Fitopatologia, pesquisadora da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE

### **Walane Maria Pereira de Mello Ivo**

Engenheira-agrônoma, doutora em Aplicação de Radioisótopos na Agricultura e Meio Ambiente, pesquisadora da Unidade de Execução de Pesquisa de Rio Largo (UEP-Rio Largo) da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Rio Largo, AL

## **Comitê Ad Hoc**

### **Ana Claudia Mendes Malhado**

Ecóloga, doutora em Ecologia, professora da Universidade Federal de Alagoas (UFAL), bolsista de produtividade do CNPq, Maceió, AL

### **Carlos Alexandre Borges Garcia**

Químico industrial, doutor em química, professor da Universidade Federal de Sergipe (UFS), bolsista de produtividade do CNPq, Aracaju, SE

### **Cláudio Dariva**

Engenheiro químico, doutor em Engenharia Química, professor da Universidade Tiradentes (Unit), bolsista de produtividade do CNPq, Aracaju, SE

### **Iraildes Pereira Assunção**

Engenheira-agrônoma, doutora em Fitopatologia, professora da Universidade Federal de Alagoas (UFAL), bolsista de produtividade do CNPq, Maceió, AL

### **Leandro Bacci**

Engenheiro-agrônomo, doutor em Fitotecnia, professor da Universidade Federal de Sergipe (UFS), bolsista de produtividade do CNPq, São Cristóvão, SE



## **Apresentação**

O VIII Seminário de Iniciação Científica e Pós-Graduação da Embrapa Tabuleiros Costeiros tem por objetivo tornar públicos os resultados das atividades de pesquisa desenvolvidas por nossos bolsistas no período 2017-2018.

Esses resultados são frutos da interação dinâmica entre pesquisadores, analistas, assistentes e bolsistas, que resultam no aprimoramento recíproco e constante da formação técnico-científica das partes envolvidas.

Para a Embrapa Tabuleiros Costeiros, a realização deste evento, bem como o registro dos Resumos das pesquisas desenvolvidas por estudantes bolsistas e pesquisadores, é motivo de grande satisfação, e ilustra a relevância dos programas de iniciação científica na formação de profissionais qualificados para atuação nas áreas de pesquisa e desenvolvimento agropecuários.

Agradecemos à Fundação de Apoio à Pesquisa e Inovação Tecnológica do Estado de Sergipe (Fapitec-SE), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Alagoas (Fapeal-AL) e ao CNPq pelo financiamento dos bolsistas por meio de Programas de Iniciação Científica e de Pós-Graduação.

Desejamos aos leitores que aproveitem toda riqueza de conhecimentos apresentados para o fortalecimento da habilidade do diálogo científico na sua essência.

*Marcelo Ferreira Fernandes*  
Chefe-Geral da Embrapa Tabuleiros Costeiros

# Sumário

<b>Produção de biomassa em genótipos de capim-elefante e sorgo forrageiro sob restrição hídrica</b>	11
<b>Avaliação de acessos de <i>Saccharum</i> quanto à tolerância in vitro ao alumínio</b>	18
<b>Avaliação in vitro de cepas de bactérias com potencial probiótico isoladas do trato intestinal de tambaquis</b>	22
<b>Avaliação não invasiva indireta para determinação da colonização probiótica intestinal em peixes</b>	27
<b>Avaliação da contaminação por deltametrina e cipermetrina na água de pisciculturas do Baixo São Francisco</b>	32
<b>Resistência de tambaquis suplementados com probiótico ao desafio com <i>Aeromonas hydrophila</i></b>	38
<b>Identificação dos Metabólitos Orgânicos Voláteis (MOVs) em diferentes acessos do BAGcana e o seu papel na resistência a <i>Diatraea saccharalis</i></b>	43
<b>Teores de prolina em cultivares de girassol</b>	48
<b>Avaliação da precocidade sexual e determinação do melhor momento para separação pelo sexo no manejo reprodutivo de cordeiros portadores da genética <i>FecG<sup>E</sup></i></b>	52
<b>Ocorrência e caracterização de folículos multioócitos em ovelhas portadoras da genética prolífica <i>FecG<sup>E</sup></i></b>	57
<b>Enriquecimento e caracterização de germoplasma de nim em Sergipe</b>	62
<b>Eficiência de fungicidas e acaricidas sobre as doenças foliares do coqueiro e o ácaro-vermelho-das-palmeiras</b>	66
<b>Coleta e caracterização morfológica de acessos de inhame provenientes dos municípios produtores de Alagoas e Sergipe</b>	70
<b>Líquido da casca de coco verde: caracterização química e possíveis alternativas de uso na agricultura</b>	73
<b>Levantamento de cigarrinhas potencialmente vetoras de fitoplasmas causadores de LYTS em coqueiro e suas plantas hospedeiras em Alagoas</b>	77
<b>Avaliação de isolados de nematoides entomopatogênicos para controle de <i>Rhynchophorus palmarum</i></b>	80

<b>Avaliação da vulnerabilidade de aquíferos presentes na região de atuação da Embrapa Tabuleiros Costeiros, SE</b> .....	85
<b>Caracterização dos regimes hidrológicos de bacias hidrográficas presentes na área de atuação da Embrapa Tabuleiros Costeiros, SE</b> .....	89
<b>Avaliação da contaminação de pesticidas no músculo de tambaquis (<i>Colossoma macropomum</i>) cultivados e de sedimento na região do Baixo São Francisco</b> .....	94
<b>Análise da diversidade e estrutura genética de acessos de coqueiro-anão</b> .....	100
<b>Estimativa da transferência de pressões aplicadas na superfície a camadas subsuperficiais de um argissolo de Tabuleiros Costeiros</b> .....	104
<b>Impacto da gliricídia (<i>Gliricidia sepium</i>) sob indicadores de qualidade química do solo para uso em sistemas de ILPF (Integração Lavoura-Pecuária-Floresta)</b> .....	110
<b>Avaliação da indução de resistência em coqueiro à mosca-branca <i>Aleurodicus pseudugesii</i> Martin (Hemiptera: Aleyrodidae)</b> .....	115
<b>Desenvolvimento de protocolo para avaliação morfológica dos espermatozoides de peixes de água doce</b> .....	120
<b>Avaliação de extratos vegetais no manejo da queima-das-folhas-do-inhame</b> .....	124
<b>A hidrólise alcalina como acelerador da degradação da casca de coco seco</b> .....	128
<b>Avaliação de clones de capim-elefante para fins energéticos nas condições dos Tabuleiros Costeiros de Sergipe</b> .....	132
<b>Avaliação da <i>Cratylia</i> (<i>Cratylia argentea</i>) em cultivos adensados</b> .....	136
<b>Avaliação da produtividade em plantio adensado e da qualidade da forragem de moringa oleifera</b> .....	140
<b>Emissões de gases de efeito estufa em áreas de cana-de-açúcar colhida crua e queimada</b> .....	144
<b>Estudo prospectivo de mercado e identificação de tendências da agroindústria na comercialização de produtos e subprodutos do coqueiro</b> .....	149

# Produção de biomassa em genótipos de capim-elefante e sorgo forrageiro sob restrição hídrica

Victor dos Santos Guimarães<sup>1</sup>, Jonas Paulino dos Santos<sup>2</sup>, Adriana Neutzling Bierhals<sup>3</sup>, Anderson Carlos Marafon<sup>4</sup>

**Resumo** - Tendo em vista que a deficiência hídrica é o principal fator condicionante do desempenho produtivo das culturas, há necessidade de definição de genótipos mais adaptados à carência de água no solo. Neste sentido, o presente trabalho teve como objetivo determinar a produção de biomassa seca em genótipos de capim-elefante e sorgo forrageiro submetidos à supressão de água durante a fase de crescimento vegetativo. O experimento foi conduzido em casa de vegetação, sob condições controladas de umidade e temperatura, sendo avaliados três genótipos de capim-elefante (BRS Capiacu, BRS Kurumi e clone Madeira) e dois de sorgo forrageiro (SF 15 e BRS 716). As plantas foram cultivadas durante 75 dias e submetidas à supressão de água durante 20 dias. Após este período, foram determinadas as produções de biomassa seca de folhas (BSF), biomassa seca de colmos (BSC), biomassa seca de raízes (BSR), a relação folha:colmo e a relação parte aérea: raízes de cada um dos genótipos. O delineamento experimental foi em blocos casualizados, com cinco repetições. Os resultados obtidos foram comparados separadamente para cada genótipo. Também foram comparados entre si os valores obtidos para os cinco genótipos mantidos em condições ideais de umidade do solo (testemunhas). Na avaliação individual dos genótipos, observou-se que as produções de folhas (BSF) do capim-elefante BRS Kurumi e do sorgo forrageiro SF15 mantidos sob restrição de água foram valores inferiores às testemunhas. Os genótipos de capim-elefante BRS Capiacu e Clone Madeira mantidos sob restrição hídrica apresentaram menores produções de colmos (BSC) e de raízes (BSR) em relação às suas respectivas testemunhas. Na comparação entre genótipos, mantidos sob condições ideais de umidade do solo, constatou-se que a BRS Capiacu apresentou produção de colmos (BSC) superior, que as produções de folhas (BSF) dos genótipos de capim-elefante BRS Capiacu e BRS Kurumi foram superiores e que os dois genótipos de sorgo (SF15 e BRS716) e o capim-elefante BRS Capiacu apresentaram produções de raízes (BSR) superiores aos demais genótipos. A relação folha:colmo do capim-elefante BRS Kurumi foi superiores aos demais genótipos, devido ao seu porte baixo e grande quantidade de folhas. A relação parte aérea:raízes dos genótipos BRS Capiacu e clone Madeira foram superiores aos demais genótipos, demonstrando o elevado potencial de conversão de matéria seca da parte aérea (colmos e folhas).

**Termos para indexação:** *Pennisetum purpureum*, *Sorghum bicolor*, crescimento, parte aérea, raízes, supressão de água.

## Introdução

Na maior parte das áreas tropicais do planeta, o déficit hídrico é o fator mais importante na determinação do crescimento e da produtividade das forrageiras, provocando uma estacionalidade de produção principalmente entre as estações de inverno e verão. Os efeitos dos fatores climáticos no crescimento e desenvolvimento, assim como a partição de carbono entre os órgãos, são importantes nas taxas de crescimento da cultura (Norman et al., 1995).

A deficiência hídrica é o principal fator condicionante do desempenho produtivo das culturas, por isso, os programas de melhoramento genético buscam características como: maior eficiência no uso da água, sistema radicular mais robusto, maior atividade do sistema antioxidativo e alta capacidade de ajustamento osmótico. Os três mecanismos fisiológicos relacionados à seca são: resistência, tolerância e escape. O escape acontece por meio de um sistema radicular profundo e ramificado, o qual é eficiente na extração de água do solo. Já a tolerância está relacionada ao nível bioquímico, quando a planta diminui o seu metabolismo e tem a capacidade de recuperação quando o estresse é interrompido (Magalhães et al., 2014). Com a deficiência hídrica no solo ocorre o fechamento dos estômatos e as trocas gasosas (água e CO<sub>2</sub>) são limitadas, mesmo assim alguns genótipos tolerantes à seca podem desenvolver mecanismos de controle estomático que permitem o uso eficiente da água com os estômatos semiabertos, sem paralisar a fotossíntese e sem grandes perdas de água (Mutava et al., 2011). De acordo com Cavatte et al. (2011), os programas de melhoramento genético para condições de estresse hídrico devem focar, principalmente, as seguintes características: maior eficiência no uso da água, sistema radicular mais robusto, maior atividade do sistema antioxidativo e de ajustamento osmótico.

Gramíneas forrageiras como o capim-elefante e o sorgo são tradicionalmente utilizadas para fins de alimentação animal, mas também podem ser consideradas alternativas sustentáveis para a produção de biomassa energética, visto que, por tratar-se de fontes renováveis, podem prevenir a extração de madeira em florestas nativas sendo capazes de atender propósitos energéticos, tais como a

<sup>1</sup> Graduando em Agronomia, estagiário da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Unidade de Execução de Pesquisa de Rio Largo (UEP-Rio Largo), Rio Largo, AL.

<sup>2</sup> Graduando em Agronomia, estagiário da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Unidade de Execução de Pesquisa de Rio Largo (UEP-Rio Largo), Rio Largo, AL.

<sup>3</sup> Bióloga, doutoranda em Proteção de Plantas, bolsista da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Unidade de Execução de Pesquisa de Rio Largo (UEP-Rio Largo), Rio Largo, AL.

<sup>4</sup> Engenheiro-agrônomo, pesquisador da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Unidade de Execução de Pesquisa de Rio Largo (UEP-Rio Largo), Rio Largo, AL.

produção de energia térmica, elétrica e/ou mecânica. Esta alternativa torna-se mais sustentável quando as culturas dedicadas à produção de energia ocupam áreas agrícolas onde a produção de alimentos seria pouco viável, as chamadas áreas marginais, e quando se escolhe fontes de biomassa que possam oferecer algum ganho energético sem competir com a produção de alimentos. Dentre estas gramíneas o capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schum.) e o sorgo [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] são duas espécies altamente promissoras, tendo em vista o seu elevado potencial de produção de biomassa (Samson et al., 2005).

O capim-elefante é uma das gramíneas mais importantes e difundidas em todas as regiões tropicais e subtropicais do mundo. É originária da África, com ocorrência natural em vários países, desde a Guiné, no oeste, até Angola e Zimbábue, no sul, e Moçambique e Kenia, no leste africano, todos eles com regimes de pluviosidade superiores a 1000 mm ano<sup>-1</sup> (Brunken, 1977). A espécie pertence à família *Poaceae*, subfamília *Panicoideae*, que compreende mais de 200 variedades e/ou ecotipos. Entre as principais cultivares introduzidas podem ser citadas: Napier, Cameroon, Roxo, Mercker, Anão, Vrukwna, Taiwan A-146, Taiwan A-144, Merkeron, Porto Rico, Cubano e alguns híbridos triploides e hexaploides (Pereira; Léo, 2008). Trata-se de uma gramínea perene de ciclo curto propagada vegetativamente, que apresenta alto índice de perfilhamento, rápido crescimento, elevada eficiência fotossintética (metabolismo C4) e acúmulo de matéria seca (40 t ha<sup>-1</sup> ano<sup>-1</sup>-45 t ha<sup>-1</sup> ano<sup>-1</sup>). Além disso, possui alta capacidade de rebrota e retranslocação de nutrientes das raízes no final do ciclo vegetativo anual, sendo capaz de otimizar o uso da água do solo e da energia solar para garantir a rebrota (Samson et al., 2005).

O sorgo (*S. bicolor*) é uma planta C4 originária do continente africano, que apresenta propagação por sementes, ciclo longo (180 dias) e elevada capacidade de produção de biomassa. Existem diversos tipos agronômicos de sorgo como: granífero, sacarino, forrageiro e biomassa ou lignocelulósico. O sorgo biomassa tem potencial para queima em caldeiras de usinas de grande porte (termelétricas) ou para a produção de bioetanol (Borém et al., 2014).

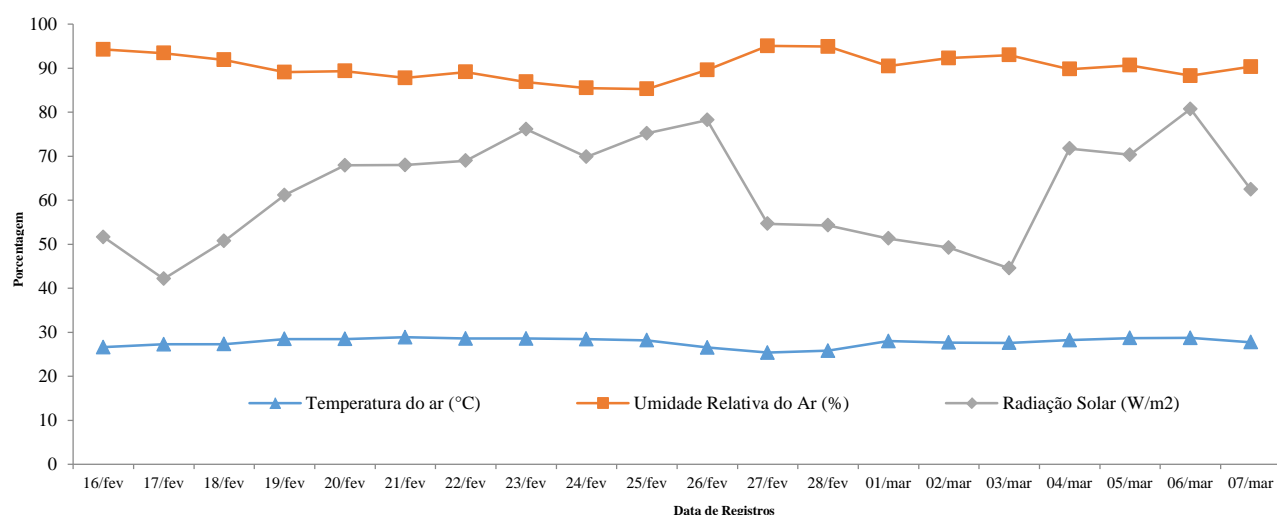
Na maior parte das áreas tropicais do planeta, o déficit hídrico é o fator mais importante na determinação do crescimento e da produtividade das forrageiras, provocando uma estacionalidade de produção principalmente entre as estações de inverno e verão. Os efeitos dos fatores climáticos no crescimento e desenvolvimento, assim como a partição de carbono entre os órgãos, são importantes nas taxas de crescimento da cultura (Norman et al., 1995).

Levando-se em conta a necessidade de definição de genótipos mais adaptados à carência de água no solo em regiões com épocas de baixos índices pluviométricos, este trabalho teve por objetivo determinar a produção de biomassa em genótipos de capim-elefante e sorgo forrageiro mantidos em condições de deficiência hídrica durante a fase de crescimento vegetativo.

## Metodologia

O experimento foi conduzido em casa de vegetação, com condições controladas de temperatura e umidade relativa do ar, na Unidade de Execução de Pesquisa e Desenvolvimento de Rio Largo da Embrapa Tabuleiros Costeiros, situada no município de Rio Largo, estado de Alagoas, cujas coordenadas geográficas são: Latitude 09°28'02'', Longitude 35°49'38'' e altitude de 130 m.

Foram avaliados cinco genótipos de gramíneas forrageiras, sendo três de capim-elefante (BRS Capiacu, BRS Kurumi e clone Madeira) e dois de sorgo forrageiro (SF 15 e BRS 716). As plantas foram cultivadas durante 75 dias, sendo então submetidas aos tratamentos: (1) Testemunha (condições ideais de umidade) e (2) Supressão de água durante 20 dias. As médias diárias observadas no período de avaliação, dos 75 aos 95 dias após o plantio (DAP) foram de 27,8° para temperatura, 90,4% para umidade relativa do ar e de 62,5 W/m<sup>2</sup> (watts por metro quadrado) para a radiação solar incidente (Figura 1).



**Figura 1.** Médias de radiação solar, temperatura e umidade relativa do ar durante o período experimental.

As plantas foram cultivadas em bombonas plásticas com capacidade para 100 litros contendo substrato composto por areia, terra e torta e filtro (proporção de 1:1:1). As características físico-químicas do substrato são apresentadas na Tabela 1.

**Tabela 1.** Análise físico-química do substrato utilizado no experimento em casa de vegetação.

Rio Largo, AL, 2018.

Granulometria			mg dm <sup>-3</sup>		cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup>		%			
Areia	Silte	Argila	K	P	Ca	Mg	T <sup>(1)</sup>	M <sup>(2)</sup>	V <sup>(3)</sup>	MO <sup>(4)</sup>
75	5	20	261	1234	5,24	1,47	8,8%	0,82	81,9	3,58

T<sup>(1)</sup> = capacidade de troca de cátions, M<sup>(2)</sup> = índice de saturação de alumínio, V<sup>(3)</sup> = saturação por bases e MO<sup>(4)</sup> = matéria orgânica.

Após o período de restrição hídrica (75 aos 95 DAC) foram determinadas cinco variáveis-resposta: biomassa seca de folhas (BSF), biomassa seca de colmos (BSC), biomassa seca de raízes (BSR), relação folha: colmo e relação parte aérea: raízes. Foi efetuado o corte e a separação da parte aérea (folhas e colmos) de cada genótipo para secagem do material em estufa por 48h a 105 °C, sendo determinadas a BSF e a BSC. Para determinação da BSR, o substrato foi removido, efetuando-se a separação e a lavagem do sistema radicular de cada planta, mediante secagem do material em estufa (48h a 105 °C). A partir dos valores de BSC, BSF e BSR obtidos foram calculadas as relações folha: colmo e parte aérea: raízes.

O delineamento experimental foi em blocos casualizados, com cinco repetições. As variáveis-resposta foram comparadas para cada genótipo, separadamente. Também foram comparados os valores obtidos para os cinco genótipos mantidos em condições ideais de umidade do solo (testemunhas).

Os resultados obtidos foram submetidos à análise da variância e as médias comparadas pelo Teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade ( $p \leq 0,05$ ), através do programa estatístico Sisvar (Ferreira, 2011).

## Resultados e Discussão

Foram observadas diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ) para os valores de biomassa seca de colmos (BSC), de folhas (BSF) e de raízes (BSR) em resposta das plantas à supressão de água, na avaliação de cada um dos genótipos separadamente. Para a BSF, os genótipos BRS Kurumi e Sorgo SF15 mantidos sob restrição apresentaram valores inferiores à testemunha. Para os valores de BSC e BSR, os genótipos de capim-elefante BRS Capiagu e Clone Madeira apresentaram valores inferiores nas plantas mantidas com supressão hídrica quando comparados às suas respectivas testemunhas, mantidas sob condições ideais de umidade do solo (Tabela 2).

**Tabela 2.** Produção de biomassa seca de colmos (BSC), folhas (BSF) e raízes (BSR) e relações folha: colmo e parte aérea:raízes em genótipos de capim-elefante e sorgo forrageiro submetidos à supressão de água durante 20 dias. Rio Largo, AL, 2018.

Genótipo	Tratamento	BSC	BSF	BSR	Relação Folha:Colmo	Relação PA:Raízes
		g planta <sup>-1</sup>				
Capim-elefante BRS Capiacu	Testemunha	408,5 a	219,8 a	54,0 a	0,54 a	11,65 a
	Supressão	307,7 b	193,0 a	43,1 b	0,63 a	11,61 a
Capim-elefante BRS Kurumi	Testemunha	278,4 a	227,7 a	60,1 a	0,82 a	8,42 a
	Supressão	245,8 a	188,5 b	58,5 a	0,77 a	7,42 a
Capim-elefante Clone Madeira	Testemunha	363,0 a	180,0 a	42,1 a	0,50 a	12,90 a
	Supressão	289,9 b	156,9 a	31,1 b	0,54 a	14,37 a
Sorgo Forrageiro BRS 716	Testemunha	285,3 a	131,4 a	56,7 a	0,46 a	7,35 a
	Supressão	270,0 a	116,5 a	56,8 a	0,43 a	6,81 a
Sorgo Forrageiro SF 15	Testemunha	231,6 a	147,4 a	68,3 a	0,64 a	5,55 a
	Supressão	229,7 a	120,6 b	62,4 a	0,53 a	5,61 a

Médias seguidas por letras diferentes na mesma coluna, para cada genótipo, diferem entre si pelo Teste de Skott Knott a 5% de probabilidade.

As reduções significativas nas produções de BSC e de BSR no capim-elefante BRS Capiacu e do Clone Madeira em função da restrição hídrica demonstram que os dois genótipos são afetados pela falta de água durante esta fase de crescimento. De acordo com Santos et al. (2011), o capim-elefante tolera curtos períodos de seca, embora sua produção seja reduzida ou nula quando prevalece o déficit hídrico, mas apresenta capacidade de recuperação logo após o início das chuvas. Quando submetidas às condições de deficiência hídrica, as plantas de capim-elefante apresentam alterações para prevenir e tolerar a perda de água. De maneira geral, todos os aspectos ligados ao crescimento da planta são afetados pelo estresse hídrico, dentre eles: diminuição da expansão foliar, redução na altura, aceleração na taxa de senescência foliar, inibição do perfilhamento e aceleração da morte dos perfilhos estabelecidos, bem como o atraso no crescimento das plantas (Barreto et al., 2001).

A produção de BSF sofre redução significativa na BRS Kurumi e no Sorgo SF15 Madeira em função da restrição hídrica. Para se adaptarem às condições de déficit hídrico, algumas plantas adotam a estratégia de redução da parte aérea em favor das raízes, limitando sua capacidade de competir por luz, pela diminuição da área foliar, com consequente redução na produtividade (Nabinger, 1997), aceleração na taxa de senescência foliar, inibição do perfilhamento e ramificações e a aceleração da morte dos perfilhos estabelecidos, bem como atraso no seu crescimento e desenvolvimento (Buxton; Fales, 1994).

A adaptação das plantas ao déficit hídrico é um mecanismo muito complexo envolvendo interação entre genótipo e respostas de tolerância da planta a seca. Geralmente, no início do déficit, a planta passa por um período de aclimação em que são observadas alterações metabólicas e morfológicas para prevenir danos aos tecidos. A avaliação das alterações morfológicas e fisiológicas em função do déficit hídrico podem indicar mecanismos de tolerância à seca. A assimilação do carbono, a alocação de carbono a órgãos não fotossintetizantes, a produção de osmorreguladores, além de outros mecanismos morfo-fisiológicos, são alterados pelo em plantas sob déficit hídrico (Chaves et al., 2002).

Na comparação entre os cinco genótipos mantidos sob condições ideais de umidade do solo, foram verificadas diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ) para todas as variáveis avaliadas. O capim-elefante BRS Capiçu apresentou BSC superior aos demais genótipos. Os genótipos de capim-elefante BRS Capiçu e BRS Kurumi apresentaram valores de BSF superiores aos demais e os genótipos de sorgo (SF15 e BRS 716) e o capim-elefante BRS Capiçu apresentaram valores de BSR superiores aos demais. A relação folha:colmo do capim-elefante BRS Kurumi foi superior aos demais. Quanto à relação parte aérea: raízes os genótipos BRS Capiçu e clone Madeira foram os que apresentaram valores significativamente superiores aos demais (Tabela 3).

**Tabela 3.** Produção de biomassa seca de colmos (BSC), folhas (BSF) e raízes (BSR) e relações folha: colmo e parte aérea: raízes em genótipos de capim-elefante e sorgo forrageiro aos 95 dias após o plantio (DAP). Rio Largo, AL, 2018.

Genótipo	BSC	BSF	BSR	Relação Folha:Col mo	Relação PA:Raízes
	g planta <sup>-1</sup>				
Capim-elefante BRS Capiçu	408,5 a	219,8 a	54,0 a	0,54 b	11,6 a
Capim-elefante BRS Kurumi	278,4 c	227,7 a	60,1 a	0,82 a	8,4 b
Capim-elefante Clone Madeira	363,0 b	180,0 b	42,1 b	0,50 b	12,9 a
Sorgo Forrageiro BRS 716	285,3 c	131,4 c	56,7 a	0,46 b	7,3 b
Sorgo Forrageiro SF 15	231,6 c	147,4 c	68,3 a	0,64 b	5,6 b

Médias seguidas por letras diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo Teste de Skott Knott a 5% de probabilidade.

A maior relação folha:colmo do capim-elefante BRS Kurumi se deve ao porte baixo deste genótipo, que apresenta entrenós curtos e grande quantidade de folhas. Já a maior relação parte aérea:raízes dos genótipos BRS Capiçu e clone Madeira deve-se ao seu porte elevado (altura), com entrenós longos e maior quantidade de colmos em relação às folhas.

Quando cultivado com disponibilidade hídrica satisfatória e manejado intensivamente, o capim-elefante pode apresentar produções diárias superiores a 125 kg ha<sup>-1</sup> de matéria seca e atingir até 6 metros de altura após 6 meses de cultivo, mantendo rebrotas viáveis e produtividade elevada (Paciullo et al., 2003).

O capim-elefante tolera curtos períodos de seca e tem sua produção reduzida ou nula quando prevalece o déficit hídrico, mas apresenta capacidade de recuperação logo após o início das chuvas. Cabe ressaltar que, mesmo sendo menos produtivo em termos de acúmulo de biomassa na parte aérea, os genótipos de sorgo apresentam considerável tolerância contra a supressão hídrica. Magalhães et al. (2014) afirmaram que a tolerância diferenciada ao estresse hídrico apresentada pelo sorgo é conferida pelo seu sistema radicular e extenso e por características foliares de plantas xerófitas, que atrasam a perda de água permitindo o uso mais eficiente deste recurso. No semiárido brasileiro, o sorgo é utilizado como cultura principal, em razão da irregularidade no regime de chuvas, com período curto e distribuição irregular no espaço e no tempo, caracterizado, ainda no período chuvoso, por ocorrência de veranicos, com 15 a 20 dias de duração (Barros et al., 2004).

Os mecanismos que conduzem a tolerância à seca podem ser divididos em dois grupos principais: 1) mecanismo de fuga: quando a planta evita a falta de água nos tecidos durante a seca por meio da manutenção do turgor e do volume celular, tanto pela absorção de água por um sistema radicular abundante ou pela redução da sua perda por transpiração ou por vias não estomáticas como as cutículas das folhas; e 2) mecanismo de tolerância, na qual a planta mantém o metabolismo, mesmo sob baixos potenciais de água no



solo, devido principalmente ao ajuste osmótico (AO) e à capacidade antioxidante. O ajuste osmótico resulta no acúmulo de solutos compatíveis ou osmólitos dentro da célula, reduzindo o potencial osmótico e auxiliando na manutenção do turgor na medida em que a planta experimenta o déficit hídrico. O AO é considerado uma característica importante que contribui para reduzir os efeitos da seca sobre a produtividade em diversas culturas. A capacidade antioxidante, por sua vez, resulta da habilidade das plantas em desintoxicar espécies reativas de oxigênio (ROS), as quais causam injúrias celulares como a peroxidação de lipídeos e proteínas e/ou modificações em ácidos nucleicos (Verslues et al., 2006).

## Conclusões

Na comparação entre genótipos, na avaliação individual dos genótipos mantidos sob condições ideais de umidade do solo:

- (1) As produções de folhas (BSF) do capim-elefante BRS Kurumi e do sorgo forrageiro SF15 após o período de restrição de água são inferiores às suas respectivas testemunhas.
- (2) Os genótipos de capim-elefante BRS Capiáu e Clone Madeira mantidos sob restrição hídrica durante 20 dias apresentam produções de colmos (BSC) e de raízes (BSR) inferiores em relação às suas respectivas testemunhas.

Na comparação entre genótipos mantidos sob condições ideais de umidade do solo:

- (1) O capim-elefante BRS Capiáu apresenta maior produção de colmos (BSC) e os genótipos BRS Kurumi e BRS Capiáu apresentam maiores produções de folhas (BSF) em relação aos demais materiais.
- (2) Os dois genótipos de sorgo (SF15 e BRS716) e o capim-elefante BRS Capiáu apresentam maiores produções de raízes (BSR) superiores aos demais materiais avaliados.
- (3) A relação folha: colmo do capim-elefante BRS Kurumi e a relação parte aérea: raízes dos genótipos BRS Capiáu e do clone Madeira são superiores aos demais genótipos.

## Referências

- BARRETO, G. P.; LIRA, M. A.; SANTOS, M. V. F.; DUBEUX JÚNIOR, J. C. B. Avaliação de clones de capim-Elefante (*Pennisetum purpureum* Schum.) e de um híbrido com o milheto (*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.) submetidos ao estresse hídrico. 1. Parâmetros Morfológicos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 30, n. 1, p. 1-6, 2001.
- BARROS, A. H. C. Zoneamento de Risco Climático para o Sorgo no Estado de Pernambuco. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE METEOROLOGIA, 13., 2004, Fortaleza. **Anais...** Fortaleza: SBMET, 2004. 1 CD-ROM.
- BORÉM, A.; PIMENTEL, L.; PARRELLA, R. **Sorgo do plantio à colheita**. Viçosa: UFV, 2014. 275 p.
- BRUNKEN, J. N. A systematic study of *Pennisetum* Sect. *Pennisetum* (Gramineae). **American Journal of Botany**, v. 64, n. 2, p. 161- 176, 1977.
- BUXTON, D. R.; FALES, S. L. Plant environment and quality. In: FAHEY JUNIOR, G. C. (Ed.). **Forage quality, evaluation and utilization**. Madison: American Society of Agronomy, 1994. p. 155-199.
- CAVATTE, P. C.; MARTINS, S. C. V.; MORAIS, L. E.; SILVA, P. E. M.; SOUZA, L. T.; MATTA, F. M. da. A fisiologia dos estresses abióticos. In: FRITSCHÉ-NETO, R.; BORÉM, A. (Ed.). **Melhoramento de plantas para condições de estresses abióticos**. Visconde do Rio Branco: Suprema, 2011, 250 p.
- CHAVES, M. M.; PEREIRA, J. S.; MAROCO, J.; RODRIGUES, M. L.; RICARDO, C. P. P.; OSÓRIO, M. L.; CARVALHO, I.; FARIA, T.; PINHEIRO, C. How plants cope with water stress in the field? Photosynthesis and growth. **Annals of Botany**, v. 89, p. 907-916, 2002.
- FERREIRA, D. F.; SISVAR: A Computer Statistical Analysis System. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, 2011.
- MAGALHÃES, P. C.; SOUXA, T. C.; MAY, A.; LIMA FILHO, O. F.; SANTOS, F. C.; MOREIRA, J. A. A.; LEITE, C. E. P.; ALBUQUERQUE, C. J. B.; FREITAS, R. S. Exigências edafoclimáticas e fisiologia da produção. In: BORÉM, A.; PIMENTEL, L.; PARRELLA, R. **Sorgo do plantio à colheita**. Viçosa: UFV, 2014. p. 59-88.

MARAFON, A. C.; SANTIAGO, A. D.; CAMARA, T. M. M.; RANGEL, J. H. A.; AMARAL, A. F. C.; LÉDO, F. J. S.; BIERHALS, A. N.; PAIVA, H. L. **Potencial produtivo e qualidade da biomassa de capim-elefante para fins energéticos**. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2014. (Embrapa Tabuleiros Costeiros. Circular Técnica, 68).

MUTAVA, R. N.; PRASAD, P. V. V.; TUINSTRA, M. R.; KOFOID, K. D.; YU, J. Characterization of sorghum genotypes for traits related to drought tolerance. **Field Crops Research**, v. 123, p. 10-18, 2011.

NORMAN, M. J. T.; PEARSON, C. J.; SEARLE, P. G. E. **The ecology of tropical food crops**. Cambridge: Cambridge University Press, 1995. 430 p.

PACIULLO, D. S. C.; DERESZ, F.; AROEIRA, L. J. M.; MORENZ, M. J. F.; VERNEQUE, R. S. Morfogênese e acúmulo de biomassa foliar em pastagem de capim-elefante avaliada em diferentes épocas do ano. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, n. 7, p. 881-887, jul. 2003.

PEREIRA, A. V.; LÉDO, F. J. S. Melhoramento genético de *Pennisetum purpureum*. In: RESENDE, R. M. S.; VALLE, C. B. do; JANK, L. **Melhoramento de Forrageiras Tropicais**. Campo Grande,: Embrapa Gado de Corte, 2008. p. 89-116.

SAMSON, R.; MANI, S.; BODDEY, R.; SOKHANSANJ, S.; QUESADA, D.; URQUIAGA, S.; REIS, V.; HOLEM, C. The potential of C4 perennial grasses for developing a global BIOHEAT industry. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 24, p. 461-495, 2005.

SANTOS, M. C. S.; LIRA, M. A.; TABOSA, J. N.; MELLO, A. C. L.; SANTOS, M. V. F. Comportamento de clones de *Pennisetum* submetidos a períodos de restrição hídrica controlada. **Archivos de Zootecnia**, v. 60, p. 31-39, 2011.

VERSLUES, P. E.; AGARWAI, M.; KATIYAR-AGARWAI, S. Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status. **Plant Journal**, v. 46, p. 523-539, 2006.

# Avaliação de acessos de *Saccharum* quanto à tolerância in vitro ao alumínio

Lucas Henrique Andrade Nascimento<sup>1</sup>, Leila Albuquerque Resende de Oliveira<sup>2</sup>, Annie Carolina Araújo de Oliveira<sup>3</sup>,  
Adriane Leite do Amaral<sup>4</sup>, Lizz Kizzy de Moraes<sup>5</sup> e Ana da Silva Léo<sup>6</sup>

**Resumo** - O Brasil vem se destacando no cenário internacional quanto à produção de energia renovável. As fontes renováveis de energia como biomassa têm despertado grande interesse da pesquisa, que tem buscado incessantemente por cultivares mais produtivas sob condições desfavoráveis de cultivo. Dentre as biomassas mais utilizadas e com maior potencial para produção de energia, a cana-de-açúcar destaca-se no cenário nacional. Diante disso, o objetivo deste estudo foi avaliar um acesso da espécie *Saccharum spontaneum* do Complexo *Saccharum* do BAGCana da Embrapa quanto à tolerância ao estresse abiótico de toxidez por alumínio em condições de cultivo in vitro. Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas da Embrapa Tabuleiros Costeiros em Aracaju. Para tanto foram utilizadas brotações adventícias, cultivadas em meio Murashige e Skoog líquido, suplementado com 2% de sacarose, na presença de cinco concentrações (0 µM, 200 µM, 350 µM, 500 µM, 650 µM) de AlCl<sub>3</sub>. Número de brotações, comprimento da parte aérea e da raiz, massa seca da raiz e parte aérea foram analisados. Com base nos resultados o *S. spontaneum* mostrou-se tolerante aos níveis de Al testados.

**Termos para indexação:** biomassa, cana-de-açúcar, tolerância.

## Introdução

O Brasil vem se destacando no cenário internacional quanto à produção de energia renovável. Embora apenas 10% da energia primária do mundo seja derivada de fontes renováveis, cenários globais apontam para um aumento de 40% da demanda de energia entre 2013 e 2035. As fontes renováveis de energia como biomassa, Pequena Central Hidrelétrica (PCH), eólica, termelétrica e solar representaram 41% da matriz energética brasileira em 2013 (Plano Decenal de Expansão de Energia 2023, Ministério de Minas e Energia). O país é modelo em geração sustentável de energia e considerado protagonista na substituição dos combustíveis fósseis.

Dentre as biomassas mais utilizadas e com maior potencial para produção de energia, a cana-de-açúcar destaca-se no cenário nacional por apresentar uma área plantada de 8,7 milhões de hectares e uma produção de 684,77 milhões de toneladas, sendo 47,88% destinados à produção de açúcar e 52,12% ao etanol (CONAB, 2016). Além dos produtos açúcar e álcool, o bagaço produzido nas usinas é utilizado na geração de eletricidade, contribuindo para a diversificação do setor sucroenergético e aumento de sua receita.

Na cana com o ideótipo para energia, chamada de “cana energia”, busca-se a variabilidade existente do material selvagem, alta produção de biomassa, alto teor de fibra e maior adaptação às condições adversas de cultivo, favorecendo a exploração em ambientes restritivos ao cultivo da cana convencional. Para promover e incrementar a fibra na cana energia é necessário acessar germoplasma silvestre, contido em bancos de germoplasma, que apresentam aptidão para alta produção de biomassa, elevado teor de fibra, além da grande capacidade de perfilhamento (Carvalho Neto et al., 2014; Matsuoka et al., 2014).

*Saccharum spontaneum* é descrita como uma espécie altamente polimórfica, com grande variabilidade entre plantas, e por apresentar alta adaptabilidade, podendo ser encontradas em diversos ambientes (desertos, baixadas encharcadas, rochas, regiões litorâneas etc), altitudes (do nível do mar às montanhas do Himalaia) e condições climáticas (de regiões de clima tropical a locais de inverno nevado) (Pange, 1933; Pange; Srinivasan, 1957). Pela grande variabilidade, *S. spontaneum* é a espécie que mais contribuiu com características de interesse agrônomo, além de ser uma das principais fontes de fibra aos programas de melhoramento genético que visam o desenvolvimento de variedades com grande potencial para a produção de biomassa. A alta produtividade e resistência a estresses bióticos e abióticos encontrados nas variedades híbridas são em grande parte atribuíveis a *S. spontaneum* (Naidu; Sreenivasan, 1987; Roach, 1977).

O atendimento à demanda por biomassa para produção de bioenergia deverá estar aliado à proteção dos ecossistemas e a garantia da segurança alimentar. Desta forma, a produção de biomassa para produção de energia deverá se expandir preferencialmente para áreas degradadas ou de baixa aptidão agrícola, o que irá requerer o desenvolvimento de genótipos adaptados aos ambientes de produção marginais, tanto em termos climáticos quanto edáficos.

<sup>1</sup>Graduando em Agronomia, bolsista da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

<sup>2</sup>Engenheira Florestal, bolsista da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju-SE.

<sup>3</sup>Engenheira Florestal, bolsista da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju-SE.

<sup>4</sup>Engenheira-agrônoma, doutora em Agronomia, pesquisadora da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

<sup>5</sup>Engenheira-agrônoma, doutora em Agronomia, pesquisadora da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

<sup>6</sup>Engenheira-agrônoma, doutora em Agronomia, pesquisadora da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

Regiões restritivas com acidez de solo apresentam alumínio em sua composição. Nessas regiões as raízes da cana-de-açúcar não se desenvolvem adequadamente inibindo a absorção de nutrientes e favorecendo a susceptibilidade à seca (Llugany et al., 1994; Foy et al., 1978; Kochian, 1995). Devido à grande variabilidade genética, intra e interespecífica de acessos *Saccharum*, o *screening* é uma abordagem apropriada para identificar o desempenho de genótipos quanto à resistência ao Al (Cançado et al., 2009). Diante disso, o objetivo deste estudo foi avaliar um acesso da espécie *Saccharum spontaneum* do Complexo *Saccharum* do BAGCana da Embrapa quanto à tolerância ao estresse abiótico de toxidez por alumínio em condições de cultivo in vitro.

## Material e Métodos

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, Sergipe.

### Material vegetal

Como material vegetal, foram utilizadas brotações do acesso NSL291970 - *Saccharum spontaneum*, previamente estabelecido in vitro. Esse acesso foi proveniente da National Center for Genetic Resources Preservation/ARS/USDA, Fort Collins, CO, USA, e faz parte do Banco ativo de Germoplasma de Cana-de-açúcar da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

### Multiplicação dos acessos

A cada 30 dias, as brotações foram multiplicadas em ambiente asséptico, em tubos de ensaio contendo 20 mL do meio de multiplicação (MM) consistindo em sais do meio MS (Murashige; Skoog, 1962), suplementados com 2% de sacarose, 0,2 mg L<sup>-1</sup> de BAP (6-benzilaminopurina - Sigma-Aldrich) + 0,1 mg L<sup>-1</sup> de cinetina (Sigma-Aldrich), gelificado com 3,5 g L<sup>-1</sup> de Phytigel® (Sigma-Aldrich) e pH ajustado para 5,8. O meio foi autoclavado a 121°C durante 20 minutos, em todas as fases. As culturas foram mantidas sob condições de temperatura ambiente (25 °C ± 2 °C), fotoperíodo de 12 horas de luz e intensidade luminosa de 60 µmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>.

### Instalação dos ensaios in vitro

Para o *screening* in vitro quanto à tolerância ao alumínio foi utilizada a metodologia adaptada de Cançado et al. (2009). Brotações adventícias de 3 cm, enraizadas dos acessos oriundas do segundo subcultivo foram transferidas para meio de cultura MS (Murashige; Skoog, 1962) líquido, com base de suporte de isopor esterilizado, suplementado com 20 g L<sup>-1</sup> de sacarose, em cinco diferentes concentrações de Cloreto de Alumínio (AlCl<sub>3</sub>) (0 µM; 200 µM, 350 µM, 500 µM e 650 µM), com pH ajustado para 4.2. As culturas foram mantidas em câmara de crescimento sob condições de dia longo (16/8 h ciclo de luz/escuro) a uma temperatura de 25 °C ± 2 °C e umidade relativa de 60% a 70%, com luz sendo fornecida por câmaras de ar brancas fluorescentes (60 W, photon densidade de fluxo de 50 mmol m<sup>-2</sup> S<sup>-1</sup>).

Para o enraizamento, brotações foram inoculadas em meio de cultura MS, suplementado com 20 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 0,7 mg L<sup>-1</sup> de ANA (ácido naftalenoacético), gelificado com 1,5 g L<sup>-1</sup> de phytigel®, e pH ajustado para 5,8. As culturas foram mantidas em câmara de crescimento sob condições de dia longo (16/8 h ciclo de luz/escuro) a uma temperatura de 25 °C ± 2 °C e umidade relativa de 60% a 70%, com luz sendo fornecida por câmaras de ar brancas fluorescentes (60 W, photon densidade de fluxo de 50 mmol m<sup>-2</sup> S<sup>-1</sup>), até atingirem 1 cm de raiz.

### Avaliações de crescimento

Aos 30 dias, foram realizadas avaliações biométricas (número de brotações, crescimento da parte aérea e crescimento de raiz), massa seca da parte aérea (MSPA) e raiz (MSR). Para obtenção do resultado do crescimento de parte aérea e raiz foi realizada a subtração entre o comprimento aos 30 dias e 0 dias (no início do experimento). Para obtenção da MSPA e MSR os acessos cultivados in vitro que receberam as diferentes concentrações foram coletados e a parte vegetativa secadas em estufa de aeração forçada a 60 °C até atingir peso constante.

### Análise estatística

O delineamento experimental será inteiramente casualizado, em cinco repetições para cada avaliação. Para os níveis de AlCl<sub>3</sub>, as médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância e, realizada a análise de regressão e ajustadas equações. Para as análises foi utilizado o software estatístico SISVAR (Ferreira, 2011).

## Resultados e Discussão

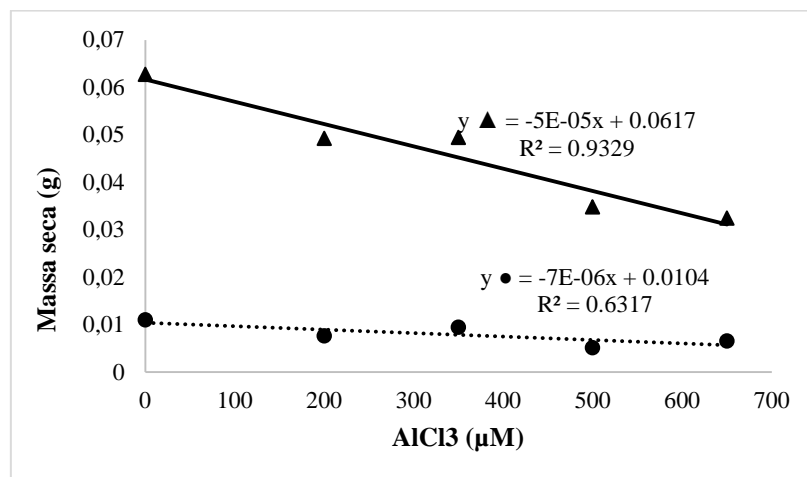
O comportamento do acesso quanto à toxicidade por Al foi avaliado com a aplicação de modelos de regressão, os quais demonstraram que não houve significância. Comparando-se as médias, quanto ao número de brotações, crescimento de parte aérea e da raiz, não houve diferença estatística entre os tratamentos utilizados, como pode ser observado pela comparação das médias com a da testemunha, demonstrando que o acesso é tolerante aos níveis de alumínio testados (Tabela 1).

**Tabela 1.** Número de brotações, crescimento da parte aérea e da raiz de brotações de *S. spontaneum* submetidos ao estresse por toxidez de alumínio in vitro.

Tratamento	Número brotações	Crescimento parte aérea (cm)	Crescimento raízes (cm)
0	2,5000 a	20,8750 a	0,5562 a
200	2,1429 a	22,4642 a	0,5428 a
350	2,2000 a	22,0333 a	0,5733 a
500	1,7857 a	20,0714 a	0,4571 a
650	2,0714 a	19,7857 a	0,3000 a
CV %	20,65	8,83	28,68

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Para a massa seca de parte aérea e da raiz houve redução linear significativa à medida que se aumentou o cloreto de alumínio (Figura 1).

**Figura 1.** Efeito do estresse por toxidez de alumínio in vitro na massa seca de parte aérea (▲) e raízes (●) de *S. spontaneum* (acesso NSL291970).

O primeiro sintoma da toxicidade do Al detectável é extremamente rápido, em questão de minutos inibe o crescimento da raiz, resultando em redução e danos no sistema radicular (Barceló; Poschenrieder, 2002). A rápida resposta da raiz indica que num primeiro momento o Al inibe a expansão e alongação das células das raízes, e depois a divisão celular também passa a ser inibida (Kochian, 1995; Matsumoto, 2000). Porém, em alguns trabalhos, a tendência de inibição do alongamento radicular não acompanhou necessariamente o incremento da concentração de Al em solução, como já foi relatado em cana-de-açúcar por Hetherington et al, 1988.

Em outro trabalho realizado por Oliveira (2012) em cana-de-açúcar em solução nutritiva utilizando dez concentrações crescentes de Al permitiu-se visualizar o comportamento das variedades, mas a queda no crescimento radicular foi muito sensível, mesmo utilizando ampla faixa de concentrações de Al, diferentemente da maioria dos trabalhos com outras gramíneas que trabalham com poucas doses. Nesse trabalho o autor observou que o crescimento radicular não apresentou queda no crescimento nas primeiras doses, a maioria das variedades apresentou decréscimo no crescimento somente a partir de 500 µmol.L<sup>-1</sup>.

Embora, vários trabalhos mostrarem os efeitos negativos do Al, existem trabalhos que mostram efeitos benéficos em algumas espécies. Uma possível explicação é o aumento da disponibilidade de Fe no meio de crescimento, resultando na hidrólise de Al e pH mais baixo. Thawornwong e Diest (1974) mostraram que o desenvolvimento do arroz foi estimulado na presença de baixas concentrações de Al em solução nutritiva. Isto sugere que em arroz, uma pequena quantidade de Al seja necessária para o desenvolvimento normal da planta.

O valor econômico e ambiental de uma planta tolerante à qualquer situação de estresse é indiscutível, já que pode significar a redução de custos e dos impactos do uso exagerado dos fatores de produção. Estas espécies tolerantes se comportam de forma eficiente e a identificação destas variedades pode contribuir para sistemas sustentáveis de produção por oferecer garantias do sucesso da expansão das fronteiras agrícolas da cultura, assim como maximizar a eficiência dos insumos, sobretudo irrigação e fertilização.

No presente estudo, os níveis de Al testados não foram suficientes para provocar o estresse em *S. spontaneum*, sendo necessários novos estudos com doses mais elevadas.

## Conclusões

*Saccharum spontaneum* é tolerante a 650 µM de AlCl<sub>3</sub> in vitro.

Novos estudos devem ser realizados para identificar o ponto crítico de Al para a espécie em questão.

## Agradecimentos

CNPq/Fapitec/Fapeal/Pibic/Embrapa/CPATC

## Referências

- BARCELÓ, J.; POSCHENRIEDER, C. Fast root growth responses, root exudates, and internal detoxification as clues to the mechanisms of aluminium toxicity and resistance: a review. **Environmental and Experimental Botany**, v. 48, n. 1, p. 75-92, 2002.
- CARVALHO-NETTO, O. V.; BRESSIANI, J. A.; SORIANO, H. L.; FIORI, C. S.; SANTOS, J. M.; BARBOSA, G. V. S.; XAVIER, M. A.; LANDELL, M. G. A.; PEREIRA, G. A. G. The potential of the energy cane as the main biomass crop for the cellulosic industry. **Chemical and Biological Technologies In Agriculture**, v. 1, 2014.
- CANÇADO, G. M. C.; RIBEIRO, A. P.; PIÑEROS, M. A.; MIYATA, L. Y.; ALVARENGA, Â. A.; VILLA, F.; PASQUAL, M.; PURGATTO, E. Evaluation of aluminium tolerance in grapevine rootstocks. **Vitis**, v. 48, n. 4, p. 167-173, 2009.
- CONAB. Conjuntura Mensal. **Cana-de-açúcar**. Brasília, DF: Ministério da Agricultura e do Abastecimento, 2016. 6 p.
- FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, p. 1039-1042, 2011.
- FOY, C. D.; CHANEY, R. C.; WHITE, M. C. The physiology of metal toxicity in plants. **Annual Review Of Plant Physiology**, v. 29, p. 511-566, 1978.
- HETHERINGTON, S. J.; ASHER, C. J.; BLAMEY, F. P. C. Comparative tolerance of sugarcane, navybean, soybean and maize to aluminium toxicity. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 39, p.171-176, 1988.
- KOCHIAN, L.V. Cellular mechanisms of aluminum resistance in plants. **Annual Review Plant Physiology**, 46, p. 237-260, 1995.
- LLUGANY, M.; MASSOT, N.; WISSEMEIER, A. H.; POSCHENRIEDER, C.; HORST, W. J.; BARCELÓ, J. Aluminum tolerance of maize cultivars as assessed by callose production and root elongation. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, v. 157, n. 6, p. 447-451, 1994.
- MATSUMOTO, H. Cell biology of aluminum toxicity and tolerance in higher plants. **International Review Cytology**, v. 200, p. 1-46, 2000.
- MATSUOKA, S.; KENNEDY, A. J.; SANTOS, E. G. D.; TOMAZELA, A. L.; RUBIO, C. S. Energy Cane: its concept, development, characteristics, and prospects. **Advances in Botany**, v. 2014, p. 1-13, 2014.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-497, 1962.
- NAIDU, K. M.; SREENIVASAN, T. V. Conservation of sugarcane germplasm. In: COPERSUCAR INTERNATIONAL SUGARCANE BREEDING WORKSHOP, 1987, Piracicaba. **Resumos...** São Paulo: Copersucar, 1987.
- OLIVEIRA, M. Z. **Tolerância de variedades de cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) à toxidez por alumínio em solução**. 2012. 109 f. Dissertação (Mestrado)-Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2012.
- PANGE, R. R. *Saccharum spontaneum* L. A comparative study of the forms grown at the imperial Sugarcane Breeding Station, Coimbatore. **Indian Journal of Agriculture Science**, v. 3, p. 1- 10, 1933.
- PANGE, R. R.; SRINIVASAN, K. Studies in *Saccharum spontaneum*. The geographical distribution of spikelet length. **Indian Journal Sugarcane Research & Development**, v. 1, p. 1-8, 1957.
- ROACH, B. T. *Saccharum spontaneum*: Utilization of wild germplasm in breeding. **Proceedings of the International Society of Sugar Cane Technologists**, v. 16, p. 233-238, 1977.
- THAWORNWONG, N.; DIEST, A. V. Influence of high acidity and aluminum on the growth of lowland rice. **Plant and Soil**, v. 41, n. 1, p. 141-159, 1974.

# Avaliação in vitro de cepas de bactérias com potencial probiótico isoladas do trato intestinal de tambaquis

João Carlos Nunes de Souza<sup>1</sup>, Natalino da Costa Sousa<sup>2</sup>, Márcia Valéria Silva do Couto<sup>3</sup>, Higo Andrade Abe<sup>4</sup>, Joel Artur Rodrigues Dias<sup>5</sup>, Peterson Emmanuel Guimarães Paixão<sup>6</sup>, Juliana Oliveira Meneses<sup>7</sup>, Fernanda dos Santos Cunha<sup>8</sup>, Jéssica Queiroz Pardo<sup>9</sup>, Estela dos Santos Medeiros<sup>10</sup>, Ricardo Coelho de Sousa<sup>11</sup>, Alexandre Nizio Maria<sup>12</sup>, Paulo Cesar Falanghe Carneiro<sup>13</sup>, Rodrigo Yudi Fujimoto<sup>14</sup>

**Resumo** - A intensificação na produção de peixe exige dos produtores novas alternativas para alimentação visando melhorar o desempenho e imunidade desses animais, reduzindo surtos de doenças e consequentes mortalidades, principal causa de prejuízos na produção. Assim, com o presente estudo objetivou-se isolar, selecionar e identificar bactérias do trato intestinal de tambaqui *Colossoma macropomum* com o potencial probiótico por meio de ensaios in vitro. Foram isoladas 31 cepas do intestino de 15 juvenis de *C. macropomum*, sendo realizada análise bioquímica, teste de tolerância à pH (4, 5, 6, 8 e 9), sais biliares (5% p/v), halo de inibição contra *Escherichia coli* (EC), *Aeromonas hydrophila* (AH), *Pseudomonas aeruginosa* (PA), *Enterococcus durans* (ED), *Staphylococcus aureus* (StA) e *Micrococcus luteus* (ML), e o teste de viabilidade e inclusão na ração. Das cepas isoladas, quatro obtiveram melhores resultados nos testes in vitro e de viabilidade: *Bacillus cereus* (T12A), *Bacillus thuringiensis* (T3A), *Enterococcus faecalis* (T3AR) e *Enterococcus faecalis*. A cepa T12A foi a de melhor resposta aos testes, tendo apresentado tolerância a pH levemente ácido (pH 6, 8 e 9), maior resistência à sais biliares (91%) e maiores halos de inibição na atividade antibacteriana frente aos patógenos testados. Assim, conclui-se que o *B. cereus* é uma cepa com potencial probiótico ao tambaqui, sendo necessários testes in vivo para avaliar a melhor concentração a ser aplicada nas diferentes fases de produção.

**Termos para indexação:** aquicultura, probiótico, isolamento, autóctone, tambaqui.

## Introdução

A intensificação da produção de pescado proporciona um ambiente estressor para os animais cultivados acarretando no aparecimento de doenças (Marcusso, Salvador; Marinho Neto, 2017). Dentre as principais doenças que representam problemas para a piscicultura, as de origem bacteriana são as que podem causar grandes perdas econômicas na cadeia produtiva em um curto tempo (Leira et al., 2017). Para o controle dessas enfermidades uso de antibióticos vem sendo utilizado de forma indiscriminada, representando um risco ambiental e de saúde coletiva, uma vez que o mau uso de bactericidas pode promover o aparecimento de bactérias resistentes (Amarante et al., 2018). Nesse âmbito, medidas alternativas ao uso de antibióticos são de grande interesse para a piscicultura. Dentre as principais medidas utilizadas atualmente com esse propósito está o uso de probióticos na dieta animal.

Diversos microrganismos podem ser utilizados como probióticos, mas uso de microrganismos da própria espécie aumenta as chances de colonização do probiótico no trato gastrointestinal e por isso deve ser priorizado (Mouriño, et al., 2016). Para selecionar as bactérias probióticas diversas avaliações químicas e físicas devem ser realizadas, simulando as alterações características ao longo do trato digestório, determinando assim as limitações à sobrevivência e a colonização intestinal da bactéria no hospedeiro (Jatobá, et al., 2017).

Apesar da importância que a suplementação com probiótico na dieta de peixe vem representando para a piscicultura a aplicação dessa tecnologia em espécies nativas é escassa, bem como, literatura existente sobre bactérias probióticas autóctones de *C. macropomum*. Desta forma, o presente trabalho objetivou isolar, selecionar e identificar cepas de bactérias com potencial probiótico do trato intestinal de *C. macropomum* através de testes in vitro.

<sup>1</sup>Graduando em medicina Veterinária, bolsista da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

<sup>2</sup>Engenheiro de pesca, bolsista Embrapa Tabuleiros Costeiros Aracaju, SE.

<sup>3</sup>Engenheira de pesca, bolsista Embrapa Tabuleiros Costeiros Aracaju, SE.

<sup>4</sup>Engenheiro de pesca, bolsista Embrapa Tabuleiros Costeiros Aracaju, SE.

<sup>5</sup>Engenheiro de pesca, bolsista Embrapa Tabuleiros Costeiros Aracaju, SE.

<sup>6</sup>Engenheiro de pesca, bolsista Embrapa Tabuleiros Costeiros Aracaju, SE.

<sup>7</sup>Engenheira de pesca, bolsista Embrapa Tabuleiros Costeiros Aracaju, SE.

<sup>8</sup>Engenheira de pesca, bolsista Embrapa Tabuleiros Costeiros Aracaju, SE.

<sup>9</sup>Graduanda em medicina Veterinária, bolsista da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

<sup>10</sup>Graduanda em medicina Veterinária, bolsista da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

<sup>11</sup>Engenheiro Mecânico, mestre em Engenharia mecânica, analista da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

<sup>12</sup>Zootecnista, doutor em Zootecnia, pesquisador da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

<sup>13</sup>Engenheiro-agrônomo, doutor em Agronomia, pesquisador da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

<sup>14</sup>Zootecnista, doutor em Zootecnia, pesquisador da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

## Material e Métodos

O presente estudo foi conduzido no Laboratório de Aquicultura da Embrapa Tabuleiros Costeiros em Aracaju, SE. As cepas foram isoladas do trato digestório de quinze juvenis de *C. macropomum* saudáveis ( $0,986 \pm 0,20$  g e  $28,32 \pm 2,34$  cm), obtidas do lago da Embrapa, e da Estação de Piscicultura da Universidade Federal Rural do Pará (UFRA). Todos os procedimentos com animais foram autorizados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) protocolo nº 29022016.003.

Para a remoção do intestino, os animais foram anestesiados com eugenol (60 mg/L), eutanasiados por secção medular e desinfetados com álcool 70%. Posteriormente, foi realizada a coleta de fragmentos do intestino com peso de 0,1 g e homogeneizado em gral de porcelana com um ml solução salina estéril (0,65%) (1:10) e semeado em placa de petri com meio de cultura Man Rogosa Sharpe (MRS) ágar contendo 0,1% de azul de anilina, sendo incubadas por 48 horas a 35 °C. As cepas de interesse foram isoladas por esgotamento em placa de MRS até atingir a pureza do morfotipo isolado (Ramirez et al., 2006; Jatobá et al., 2008).

Para as avaliações in vitro, as cepas com potencial probiótico foram inoculadas em tubos contendo MRS caldo com distintas concentrações de pH (4, 5, 6, 8 e 9) e sais biliares a 5% (p/v), sendo então conduzidos para estufa bacteriológica a 35 °C durante 24 horas. Em seguida, foi realizada a leitura por espectrofotometria a 630 nm de absorbância. Sendo a resposta de cada cepa isolada, definida pelo percentual de redução da absorbância em comparação ao meio de cultura controle com pH (7) e sem adição dos sais biliares (Vieira et al., 2013).

Para o teste de antagonismo foi utilizada a técnica de halo de difusão, sendo retirados quatro discos ( $\varnothing$  0,8 cm) das placas contendo as bactérias probióticas e alocadas em meio de cultura Agar Triptona de Soja (TSA), semeadas com *Aeromonas hydrophyla* (ATCC 7966), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Enterococcus durans* (ATCC 19432), *Escherichia coli* (D363), *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213) e *Micrococcus luteus* (A270), cedidas pelo Laboratório de Camarões Marinhos da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). As placas foram então incubadas a 35 °C por 48 horas.

Para identificação do material genético, as cepas foram ativadas em caldo MRS durante 24 horas a 35°C. O DNA foi extraído seguindo metodologia de Sambrook, Fritsch e Maniatis (1989), adaptado por Jin (2006). Em seguida realizada quantificação de quatro µL da amostra com eletroforese em gel de agarose 1% (Sambrook; Russel, 2001).

Após quantificação do material genético foi realizado a amplificação dos genes selecionados para sequenciamento e identificação. Através da Reação de Polimerização em Cadeia (PCR), o isolado foi amplificado utilizando os primers de *phenylalanyl-tRNA synthase* (pheS), com os iniciadores: pheS-21-F (5' CAYCCNGCHCGYGAYATGC 3') e pheS-23-R (5' GGRTGRACCATVCCNGCHCC 3') para análise de taxonomia de procariotos (Naser et al., 2007). Para amplificação do fragmento de DNA, as reações foram conduzidas com 2,4 µL de DNTPs (1,25 mM), 1,5 µL de tampão (200 Mm Tris-HCl- PH 8, 500 mM KCl), 0,6 µL de MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 0,6 µL de cada um dos iniciadores (50 ng/µL), aproximadamente 25 ng de DNA molde, 0,1 µL de Taq Polimerase (5 U/µL) e adicionado água ultrapura para completar volume final de 15 µL da reação. O ciclo de temperatura utilizada foi de desnaturação a 95 °C durante cinco minutos, seguidos de 30 ciclos de desnaturação a 95°C por um minuto, anelamento a 58 °C/1,5 minutos, extensão a 72 °C/1,5 minutos, seguido por uma extensão final a 75 °C por 5 minutos. O sequenciamento das cepas foi realizado por eletroforese capilar, com aparelho ABI3730, utilizando-se o polímero POP7 e BigDye v.3.1, e enviados para arquivo individual para cada cepa, em formato FASTA, para leitura no sistema *Basic Local Alignment Search Tool*-BLAST, e identificadas pela comparação de suas sequências depositadas no acervo mundial GenBank<sup>1</sup>.

Os dados obtidos foram transformados em raiz quadrada e submetidos ao teste de premissas de normalidade de Shapiro-Wilk e então à análise de variância (ANOVA), sendo o valor de F significativo, as médias foram confrontadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, utilizando o programa estatístico Assistat.

<sup>1</sup> <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.



## Resultados e Discussão

Foram isoladas 31 cepas bacterianas dos juvenis de *C. macropomum*. Destas, 22 foram identificadas morfológicamente como Gram-positivas, das quais 8 apontaram afinidade com corante indicador de bactérias ácido lácticas (Tabela 1).

**Tabela 1.** Cepas isoladas de juvenis de *Colossoma macropomum* para eventual potencialidade de uso probiótico.

CEPAS	GRAM	MORFOLOGIA	CA	CEPAS	GRAM	MORFOLOGIA	CA
T1AR	+	B	*	T1A	-	C	
T12AR	+	C		T14A	+	C	*
T2AR	+	C	*	T2A	+	B	
T22AR	+	C		T22A	+	B	
T3AR	+	C	*	T23A	+	C	
T31AR	+	B		T3A	+	B	*
T32AR	-	C		T31A	+	B	
T4AR	+	C	*	T32A	+	B	
T41AR	+	C		T4A	+	C	*
T42AR	-	C		T41A	-	C	
T43AR	-	C		T42A	-	C	
T5AR	-	B		T5A	-	C	
T4AR	+	C		T6A	-	C	
T6AR	+	B		T62A	+	B	
T1A	+	B		T64A	+	B	
T12A	+	B	*				

B- Morfologia de *Bacillus*; C- *Coccus*; (+): CA: Colônia Azul; (\*): Presença.

Os testes de resistência a diferentes concentrações de pH e a ação de sais biliares (SB) são de fundamental importância (Mouriño et al., 2016) pois demonstram a capacidade da cepa isolada em resistir às alterações sofridas pelo alimento durante sua passagem pelo sistema digestório, e para isso, devem ter como resposta a sobrevivência em valores fisiológicos encontrados no animal de interesse (Jatobá et al., 2017). O pH do intestino de *C. macropomum* varia entre 7 e 8, mas o pH do estômago é muito ácido (Almeida, 2010), sendo uma barreira que pode reduzir em até 90% a densidade de células bacterianas e diminuindo a disponibilidade destas bactérias no intestino (Ramesh et al., 2017). Nas faixas de pH estudadas as cepas T3A, T4A e T12A foram as que apresentaram a menor redução de densidade em meios mais ácidos (Tabela 2). Já em relação ao teste de exposição a sais biliares (SB) a 5%, no período de 24 horas mostrou que a cepa T12A apresentou melhor resultado (Tabela 2). Testes de resistência de cepas de *Bacillus licheniformis* e *B. pumilus* isoladas de *Labeo rohita*, realizados por Ramesh et al. (2017) mostraram que a viabilidade celular destas bactérias quando expostas a sais biliares (5%) foi de aproximadamente 75 e 55%, respectivamente, valores menores que os encontrados por Zhou et al. (2018) onde cepas de *Bacillus* sp. mostraram taxa de sobrevivência superiores a 85,3% em bile a 2% durante 12 horas, apresentando resultados inferiores ao do presente estudo.

**Tabela 2.** Redução em porcentagem de absorbância das cepas de *Colossoma macropomum*, submetidas aos desafios frente a escalas de pH e concentração de sais biliares (SB).

CEPA	pH4 (%)	pH5 (%)	pH6 (%)	pH8 (%)	pH9 (%)	SB* (%)
T3AR	83,5±2,2A	84,5±2,7C	34,3±3,0B	37,6±4,2B	15,8±4,7B	57,8±0,9C
T4AR	86,4±1,2C	86,4±1,5D	37,9±1,4B	39,3±2,1B	29,4±2,3C	58,9±0,0C
T2AR	94,7±0,6D	92,7±0,8F	73,1±0,6E	68,2±1,0D	50,0±1,0E	58,4±1,9C
T1AR	93,8±0,3D	90,8±0,4E	53,8±0,1D	38,8±0,2B	45,0±0,2D	61,8±1,2D
T14A	85,0±1,1B	85,4±0,1C	44,1±0,2C	61,2±0,0C	42,2±0,1D	69,5±0,1E
T3A	85,1±0,0B	69,8±0,0A	8,2±0,3A	39,1±0,3B	56,9±0,1E	52,1±1,2B
T4A	86,6±0,0C	83,6±0,0C	5,7±0,3A	13,2±0,3 <sup>a</sup>	4,5±0,4A	60,8±0,5D
T12A	86,5±0,0C	82,8±0,0B	2,7±0,3A	14,2±0,3 <sup>a</sup>	7,0±0,2A	9,0±0,8A

Letras distintas indicam diferença significativa entre os tratamentos na coluna pelo teste de Tukey (p < 0.05).

A atividade antibacteriana das cepas frente ao agente patogênico obteve resultados positivos frente a todos os patógenos desafiados, apresentando halos de inibição de tamanhos superiores a 12 mm (Tabela 3). As cepas T3AR, T4AR, T12A e T2AR se destacaram por apontarem maior ação antagonista frente a bactérias Gram positivas e Gram negativas, sendo a cepa T3AR a cepa com maiores halos de inibição (> 18 mm) para todos os patógenos avaliados. A cepa T12A só apresentou diferença estatística para *Enterococcus durans*, quando comparado a cepa T3AR, já as cepas T4AR e T2AR apresentaram semelhança estatística com a cepa T3AR para as bactérias *Aeromonas hydrophila*, *Enterococcus durans* e *Micrococcus luteus*. Resultados semelhantes foram encontrados em estudos com cepas de *Lactobacillus* sp. (Kato et al., 2016), *Bacillus* sp. (Zhou et al., 2018) e *Enterococcus faecium* (Gopalakannan; Arul, 2011).

**Tabela 3.** Avaliação antagonística in vitro das cepas com potencial probiótico isoladas de juvenis de *Colossoma macropomum*. Halo de inibição (mm) frente à *Escherichia coli* (EC), *Aeromonas hydrophila* (AH), *Pseudomonas aeruginosa* (PA), *Enterococcus durans* (ED), *Staphylococcus aureus* (StA) e *Micrococcus luteus* (ML).

CEPA	EC(-)	AH(-)	PA(-)	ED(+)	StA(+)	MC(+)
T3AR	19,9±1,2A	19,5±1,1A	21,1±1,4A	18,1±0,4 <sup>a</sup>	18,3±0,1A	22,1±1,5A
T14A	16,9±0,7B	13,6±0,4D	12,5±0,5C	12,3±0,8C	17,6±2,0AB	19,9±2,0AB
T4A	17,6±0,7B	16,3±0,5B	16,8±0,3B	12,7±1,0C	16,8±0,4B	20,6±1,9A
T4AR	16,3±0,4B	19,5±0,4A	15,0±0,3B	18,7±0,7 <sup>a</sup>	16,5±1,4B	19,5±0,4A
T12A	19,0±0,4A	18,7±0,4AB	21,0±1,8A	14,8±0,9B	18,8±1,6A	21,7±0,4A
T2AR	17,4±0,4B	20,4±2,1A	14,2±0,2BC	18,8±1,8 <sup>a</sup>	17,5±0,7AB	21,5±0,5A
T3A	16,8±0,7B	17,1±0,4B	16,4±0,0B	15,4±0,2B	16,7±0,3B	17,9±0,6B
T1AR	15,5±0,3B	15,5±0,5C	15,9±0,2B	13,9±0,4BC	14,6±0,4C	18,0±0,6B

Letras distintas indicam diferença significativa entre os tratamentos na coluna pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ), (-): Bactéria Gram negativa, (+): Bactéria Gram positiva.

As cepas que apresentaram melhores resultados in vitro seguiram para identificação molecular, possibilitando identificar as espécies trabalhadas com nítida leitura no banco de sequências *GenBank* com 98% de similaridade de identidade, sendo identificadas como: *Bacillus cereus* (T12A), *Bacillus thuringiensis* (T3A), *Enterococcus faecalis* (T3AR) e *Enterococcus faecalis* (T4A). Estudos mostram a utilização de *Bacillus* sp. e *Enterococcus* sp. como potenciais probióticos, obtendo resultados benéficos tanto no controle de patógenos, como no desempenho produtivos (Zhou et al., 2018; Garcia-Marengon et al., 2015; Gopalakannan; Arul, 2011).

## Conclusões

Com base nos resultados obtidos nos testes in vitro, é possível concluir que a espécie *Bacillus cereus* isolada de *Colossoma macropomum* apresentou melhor capacidade de suportar as condições gastrointestinais do peixe. No entanto, estudos in vivo devem ser realizados para comprovar seu potencial como probiótico, bem como a melhor concentração a ser aplicada nas diferentes fases de produção.

## Agradecimentos

Os autores agradecem ao CNPq pelo apoio financeiro (432622/2016-0 e 305195/2016-6) e bolsa.

## Referências

- ALMEIDA, L. C. D. **Desempenho produtivo, eficiência digestiva e perfil metabólico de juvenis de tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818), alimentados com diferentes taxas carboidrato/lipídio.** 2011. 103 f. Tese (Doutorado)-Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2011.
- AMARANTE, J. F.; KOLLING, L.; FERRONATO, A. I.; VARGAS, A. C.; COSTA, M. M.; AMARANTE, T. A. B. Resistência aos antimicrobianos de bactérias obtidas de carpas (*Cyprinus carpio*) cultivadas em sistema semi-intensivo, **Ciência Animal Brasileira**, v. 19, n. 1, p. 1-7, 2018.
- GARCIA-MARENGON, N.; MOURA, M. C. de; OLIVEIRA, N. T. E. de; BOMBARDELLI, R. A.; MENEZES-ALBUQUERQUE, D. Use of probiotics *Bacillus cereus* var, toyoi and *Bacillus subtilis* C-3102 in the diet of juvenile Nile tilapia cultured in cages. **Latin American Journal of Aquatic Research**, v. 43, n. 3, 2015.
- GOPALAKANNAN, A.; ARUL, V. Inhibitory activity of probiotic *Enterococcus faecium* MC13 against *Aeromonas hydrophila* confers protection against hemorrhagic septicemia in common carp *Cyprinus carpio*. **Aquaculture international**, v. 19, n. 5, p. 973- 985, 2011.
- HUANG, J. B.; WU, Y. C.; CHI, S. C. Dietary supplementation of *Pediococcus pentosaceus* enhances innate immunity, physiological health and resistance to *Vibrio anguillarum* in orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*), **Fish & shellfish immunology**, v. 39, n. 2, p. 196-205, 2014.

- JATOBÁ, A.; MORAES, A. V.; STECKERT, L. D.; JESUS, G. F. A. Selection of autochtone probiotic for *Astyanax bimaculatus*, **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 69, n. 6, p. 1645-1652, 2017.
- JATOBÁ, A.; VIEIRA, F. D. N.; BUGLIONE NETO, C.; SILVA, B. C.; MOURIÑO, J. L. P.; JERÔNIMO, G. T.; DOTTA, G.; MARTINS, M. L. Lactic-acid bacteria isolated from the intestinal tract of Nile tilapia utilized as probiotic, **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, n. 9, p. 1201-1207, 2008.
- JIN, J. D.; LEE, D. S.; SHIN, E. K.; KIM, S. J.; JUNG, R.; HAHN, T. W. Molecular typing by random amplification of polymorphic DNA (RAPD) and detection of virulence genes of *Salmonella enterica* subspecies enterica serovar *Gallinarum biovar gallinarum*. **Journal of veterinary medical science**, v. 68, n. 12, p. 1321-1326, 2006.
- KATO, C. D.; KAHUMA, C. E.; NAMULAWA, V. T.; KASOZI, N. Antibacterial activity of *Lactobacillus* spp and *Lactococcus* spp Isolated from various Parts of pebbly fish, *Alestes baremoze*. **British Microbiology Research Journal**, v. 17, p. 1-7, 2016.
- LEIRA, M. H.; REGHIM, L. S.; CIACCI, L. S.; DA CUNHA, L. T.; BOTELHO, H. A.; BRAZ, M. S.; DIAS, N. P.; MELO, C. C. I. Problemas sanitários das pisciculturas brasileiras. **PUBVET**, v. 11, p. 538-645, 2017.
- MARCUSSO, P. F.; SALVADOR, R.; MARINHO-NETO, F. de A. *Streptococcus agalactiae* infection in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v. 16, n. 2, p. 165-169, 2017.
- MOURIÑO, J. L. P.; PEREIRA, G. V.; VIEIRA, F. N.; JATOBÁ, A. B.; USHIZIMA, T. T.; DA SILVA, B. C.; SEIFFERT, W. Q.; JESUS, G. F. A.; MARTINS, M. L. Isolation of probiotic bacteria from the hybrid South American catfish *Pseudoplatystoma reticulatum* × *Pseudoplatystoma corruscans* (Siluriformes: Pimelodidae): A haematological approach, **Aquaculture Reports**, v. 3, p. 166-171, 2016.
- NASER S. M.; DAWYNDT, P.; HOSTE, B.; GEVERS, D.; VANDEMEULEBROECKE, K.; CLEENWERCK, I.; VANCANNEYT, M.; & SWINGS, J. Identification of lactobacilli by pheS and rpoA gene sequence analyses. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, n. 12, p. 2777-2789, 2007.
- RAMESH, D.; SOUISSI, S.; AHAMED, T. S. Effects of the potential probiotics *Bacillus aerophilus* KADR3 in inducing immunity and disease resistance in *Labeo rohita*, **Fish & shellfish immunology**, v. 70, p. 408-415, 2017.
- RAMÍREZ, C.; BOLÍVAR, G.; CIFFONI, E.; PANCHENIAK, E. F. R.; SOCCOL, C. R. Microorganismos lácticos probióticos para ser aplicados en la alimentación de larvas de camarón y peces como sustituto de antibiótico. **La Alimentación Latinoamericana**, v. 264, p. 70-78, 2006.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning**: a laboratory manual. 2. ed. New York: Cold spring harbor laboratory press, 1989.
- SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular cloning**. A laboratory manual, 3. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- SINGH, S. T.; KAMILYA, D.; KHETI, B.; BORDOLOI, B.; PARHI, J. Paraprobiotic preparation from *Bacillus amyloliquefaciens* FPTB16 modulates immune response and immune relevant gene expression in *Catla catla* (Hamilton, 1822). **Fish & shellfish immunology**, v. 66, p. 35-42, 2017.
- SUBHARANJANI, S.; PREMA, P.; IMMANUEL, G. Supplementation of *B. cereus* as Probiotic in Fish Feed of *Trichogaster Trichopterus* (Blue Gourami) and Calculating its Growth and Survival. **International Journal of Current Microbiology And Applied Science**, v. 4, n. 12, p. 744-751, 2015.
- VIEIRA, F. D. N.; JATOBÁ, A.; MOURIÑO, J. L. P.; VIEIRA, E. A.; SOARES, M.; SILVA, B. C. D.; SEIFFERT, W. Q.; MARTINS, M. L.; VINATEA, L. A. In vitro selection of bacteria with potential for use as probiotics in marine shrimp culture, **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 48, n. 8, p. 998-1004, 2013.
- ZHOU, S.; XIA, Y.; ZHU, C.; CHU, W. Isolation of Marine *Bacillus* sp. with Antagonistic and Organic-Substances-Degrading Activities and Its Potential Application as a Fish Probiotic. **Marine drugs**, v. 16, n. 6, 2018.

# Avaliação não invasiva indireta para determinação da colonização probiótica intestinal em peixes

Peterson Emmanuel Guimarães Paixão<sup>1</sup>, Natalino da Costa Sousa<sup>2</sup>, Márcia Valéria Silva do Couto<sup>3</sup>, Higo Andrade Abe<sup>4</sup>, Joel Artur Rodrigues Dias<sup>5</sup>, Juliana Oliveira Meneses<sup>6</sup>, Fernanda dos Santos Cunha<sup>7</sup>, Alexandre Nizio Maria<sup>8</sup>, Paulo Cesar Falange Carneiro<sup>9</sup>, Ricardo Coelho de Sousa<sup>10</sup>, Jéssica Queiroz Pardo<sup>11</sup>, João Carlos Nunes de Souza<sup>12</sup>, Rodrigo Yudi Fujimoto<sup>13</sup>

**Resumo** - A eutanásia é um método que precisa ser realizado para a quantificação probiótica intestinal. Novas metodologias precisam ser desenvolvidas para reduzir essa prática. Assim, um método indireto como coleta de fezes para essa avaliação de colonização probiótica pode ser uma alternativa. Pensando nisso, o presente estudo teve como objetivo avaliar indiretamente a colonização probiótica intestinal pela quantificação das bactérias probióticas nas fezes, assim como avaliar o desempenho zootécnico dos peixes submetidos à suplementação. Para tanto, 120 juvenis de acará bandeiras foram submetidos a um delineamento inteiramente casualizado com quatro tratamentos e três repetições (controle, dietas suplementadas com  $10^4$  UFC,  $10^6$  UFC e  $10^8$  UFC de *Enterococcus faecium*/g de ração). Os animais foram alimentados durante 90 dias e a cada 30 dias foram realizadas as biometrias e a coleta de fezes, assim como eutanásia de uma amostra de peixes, para a quantificação probiótica intestinal para as correlações estatísticas. A bactéria probiótica proporcionou melhora no desempenho produtivo nas concentrações de  $10^6$  UFC e  $10^8$  UFC de *E. faecium*/g de ração, que representaram uma concentração intestinal, ao final de 90 dias, de  $5 \times 10^5$  UFC e  $6 \times 10^6$  UFC de *E. faecium*/g de intestino, porém não foi possível determinar um fator de correção entre a quantificação das bactérias nas fezes e a quantidade de bactérias no intestino, impossibilitando um método indireto de determinação de colonização. Assim apesar do melhor desempenho zootécnico, a eutanásia ainda se mostra a metodologia de maior acurácia para determinar a quantidade de bactérias probióticas. Porém novas metodologias devem ser incentivadas para reduzir a prática da eutanásia para essa quantificação probiótica.

**Termos para indexação:** probiótico, método indireto, fezes, colonização.

## Introdução

Os probióticos são microrganismos que colonizam o trato intestinal dos animais proporcionando uma modulação da microbiota com consequente melhora na absorção de nutrientes, competição com bactérias patogênicas e melhora imunológica do seu hospedeiro (Mouriño et al., 2017).

O uso de probióticos na aquicultura está em franco desenvolvimento, encontrando-se probióticos para algumas espécies de peixes (Farias et al., 2016; Mehdinejad et al., 2018). Porém, uma das dificuldades para averiguar a presença do probiótico nos animais, é devido à necessidade da eutanásia do peixe para coleta do trato gastrointestinal, que possibilita o isolamento e a quantificação dessa bactéria probiótica. Esse tipo de procedimento não poderia ser utilizado, por exemplo, em animais reprodutores já que esses são os responsáveis pela produção de formas jovens que subsidiam a produção. Assim, metodologias que possibilitem a avaliação da quantidade de probiótico nos peixes após suplementação na dieta sem a eutanásia dos animais é uma questão importante tanto do ponto de vista produtivo quanto de ética animal.

Dentre as espécies de peixes de importância econômica estão os ornamentais que embora não produzam alimento per se, produzem recursos financeiros que possibilitam as famílias usufruírem de uma melhora na qualidade de vida (Assis et al., 2014). Entre as espécies ornamentais destaca-se o acará bandeira (*Pterophyllum scalare*), muito apreciada pelos consumidores devido ao seu formato, docilidade, cores e facilidade de manutenção em cativeiro (Ribeiro et al., 2012). Neste cenário, não há estudos sobre a avaliação de uma metodologia indireta de avaliação de colonização de bactérias probiótica em acará bandeira. Assim o presente estudo teve como objetivo avaliar a quantificação bacteriana indireta nas fezes a fim de impedir a eutanásia dos animais para tal propósito, assim como o efeito da suplementação de uma bactéria probiótica autóctone no desempenho produtivo de acará bandeira.

<sup>1</sup>Engenheiro de pesca, bolsista Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

<sup>2</sup>Engenheiro de pesca, bolsista Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

<sup>3</sup>Engenheira de pesca, bolsista Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

<sup>4</sup>Engenheiro de pesca, bolsista Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

<sup>5</sup>Engenheiro de pesca, bolsista Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

<sup>6</sup>Engenheira de pesca, bolsista Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

<sup>7</sup>Engenheira de pesca, bolsista Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

<sup>8</sup>Zootecnista, doutor em Zootecnia, pesquisador da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

<sup>9</sup>Engenheiro-agrônomo, doutor em Agronomia, pesquisador da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

<sup>10</sup>Engenheiro Mecânico, mestre em Engenharia mecânica, analista da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

<sup>11</sup>Gruaduada em medicina Veterinária, bolsista da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

<sup>12</sup>Gruaduada em medicina Veterinária, bolsista da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

<sup>13</sup>Zootecnista, doutor em Aquicultura, pesquisador da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

## Material e métodos

A bactéria probiótica foi isolada do trato digestório de dez juvenis saudáveis de *P. scalare* ( $2,2 \pm 0,17$  cm e  $0,77 \pm 0,15$  g) submetidos a jejum de 24 horas para esvaziamento intestinal. Os peixes foram eutanasiados (CEUA Nº 03.13.09.015.00.00) e o intestino anterior coletado, sendo então macerado em solução salina (2% de NaCl) e transferido para tubos *Falcon* contendo meio de cultura em caldo (1:10), Man Rogosa Sharpe (MRS), homogeneizado com agitador de tubos vórtex e incubados por 24 horas a 35 °C. Após crescimento bacteriano, foi realizada a cultura em placa de Petri de acordo com Ramirez et al. (2006) e então identificada geneticamente como *Enterococcus faecium*.

Para o preparo da ração, a cepa da bactéria ácido-láctica de *E. faecium* foi crescida em meio de cultura caldo MRS, sendo homogeneizada e incubada, como descrito acima, em recipientes vedados de acordo com a concentração desejada para cada tratamento. Foi feita aspersão na ração na proporção de 100 mL/Kg, seguindo a metodologia de Jatobá et al. (2015). A ração comercial utilizada apresentava a seguinte composição bromatológica: Umidade 15%; Proteína bruta 39,5%; Extrato etéreo 6,5%; Fibra bruta 2,5%; Material mineral 8,5%, Cálcio 2,8% e Fósforo 5,3%.

Foram utilizados 120 espécimes de juvenis saudáveis de *P. scalare* (comprimento padrão de  $3,4 \pm 0,5$  cm e peso de  $1,68 \pm 0,4$  g). Os peixes foram alocados em 12 aquários (10 indivíduos por recipiente) em delineamento inteiramente casualizado constituído por quatro tratamentos: ração comercial aspergida com  $10^4$  UFC,  $10^6$  UFC e  $10^8$  UFC de *E. faecium*/g de ração comercial (T1, T2 e T3, respectivamente) e ração comercial sem a adição da bactéria probiótica (controle). Foram realizadas três repetições de cada tratamento durante período experimental de 90 dias. As dietas experimentais foram fornecidas *ad libitum* duas vezes ao dia (8h e 17 h). O experimento foi realizado em aquários com 90 L de água em sistema de recirculação e aeração constante individualizada. Durante o período experimental, os valores físicos e químicos da água mantiveram-se em temperatura de  $28,6 \pm 0,28$  °C, oxigênio dissolvido de  $5,78 \pm 0,34$  mg/L, pH de  $7,62 \pm 0,30$  e condutividade elétrica de  $368 \pm 32,12$  µS/cm.

A cada 30 dias, após alimentação, o aquário era limpo e então se aguardava o momento de trânsito das fezes para a sua coleta, esta era destinada para quantificação das bactérias probióticas. Posteriormente, os animais eram retirados dos aquários, anestesiados com eugenol (60 mg/L) e então pesados e medidos para determinação dos parâmetros de desempenho zootécnico (ganho em peso - GP = peso final – peso inicial; taxa de crescimento específico - TCE =  $100 \times [(\ln \text{ peso final} - \ln \text{ peso inicial}) / \text{número de dias}]$ ; uniformidade do lote-Up (Furuya et al., 1998); fator de condição relativo-Kr (Le Cren, 1951), sobrevivência -S= [número final de animais/número inicial de animais\*100] e conversão alimentar aparente – CAA = consumo de ração/ganho de peso.

Para a análise microbiológica, no mesmo momento da biometria nove peixes de cada tratamento foram eutanasiados, por aprofundamento anestésico seguido de seção medular, para avaliar as possíveis alterações nas concentrações de microrganismo probiótico no trato gastrointestinal dos peixes submetidos aos tratamentos e o grupo controle. As porções de fezes e o intestino médio foram pesadas e maceradas em gral e pistilo na proporção peso/volume com solução salina estéril a 0,65%, para posterior diluição seriada  $10^{-2}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  e  $10^{-6}$  com fator 1:10 em tubos de ensaio.

Posteriormente, uma alíquota de 100 µl de cada diluição foi semeada em placas de petri contendo o meio de cultura seletivo MRS, para avaliação do crescimento das bactérias ácido-láticas. Estas placas foram então incubadas a 35 °C por 48 horas (Mouriño et al., 2017).

Os valores de desempenho foram submetidos a Análise de Variância (ANOVA) em cada período experimental e o teste de Tukey para a comparação das médias. As contagens microbiológicas foram transformadas em  $\log(x+1)$ , antes de serem submetidas aos testes estatísticos. Os dados de quantificação microbiológica das fezes e do intestino foram submetidas a correlação de Pearson e posteriormente a estimação da regressão não linear.

## Resultado e Discussão

Os peixes suplementados com dietas contendo concentrações de  $10^6$  UFC e  $10^8$  UFC de *E. faecium*/g de ração, tiveram aumento no ganho de peso ( $1,41 \pm 0,08$  g e  $1,54 \pm 0,10$  g), taxa de crescimento específico para peso ( $2,07 \pm 0,10\%$  e  $2,15 \pm 0,14\%$ ), uniformidade do lote ( $93,33 \pm 1,54\%$  e  $93,33 \pm 1,54\%$ ) e menor conversão alimentar aparente ( $1,82 \pm 0,02$  e  $1,76 \pm 0,04$ ) durante os primeiros 30 dias. Nos 60 e 90 dias estes dois tratamentos apresentaram apenas melhora no ganho de peso e conversão alimentar (Tabela 1), não sendo observada diferença para a sobrevivência ao longo do experimento.

Em *Labeo rohita* e *Astyanax bimaculatus* também houve melhora nos parâmetros de desempenho zootécnico quando alimentados com bactéria probiótica autóctone (Giri et al., 2013; Moraes et al., 2018). O uso de probiótico autóctone favorece a colonização no trato intestinal, possibilitando o aumento das vilosidades e promovendo a melhoria na absorção de nutrientes contidos na ração, podendo contribuir para o incremento de peso final (Verschuere et al., 2000; Merrifield et al., 2010; Ringo et al., 2010; Jatobá et al., 2017). Essa colonização intestinal foi verificada durante o experimento com aumento da quantidade de bactérias probiótica no

decorrer do período experimental sendo que a partir dos 60 dias a concentração probiótica alcançou valores de  $10^4$  UFC/g,  $10^5$  UFC/g e  $10^6$  UFC/g de intestino e permaneceram nesse patamar até o final do experimento (Tabela 2). Essa interação entre o hospedeiro e a bactéria probiótica são importantes para determinar a comunidade microbiana intestinal (Zoetendeal et al., 2002), sendo assim microrganismos espécie-específicos melhores para esse fim probiótico.

**Tabela 1.** Desempenho produtivo e sobrevivência (média±desvio padrão) dos juvenis de *P. scalare* alimentados com rações de diferentes concentrações do probiótico *Enterococcus faecium*, durante 90 dias experimentais.

	GP (g)	TCEp (%)	U (%)	Kr	S (%)	CAA
<b>30 dias</b>						
<b>C</b>	1,14±0,05 b	1,70±0,06 b	53,3±12,64 b	0,99±0,05 a	100 a	2,11±0,02 c
<b>T1</b>	1,35±0,09 ab	1,96±0,12 ab	73,3±11,54 ab	1,01±0,02 a	100 a	1,98±0,04 b
<b>T2</b>	1,41±0,08 a	2,07±0,10 a	93,33±11,54 a	0,99±0,06 a	100 a	1,82±0,02 a
<b>T3</b>	1,54±0,10 a	2,15±0,14 a	93,33±11,54 a	1,04±0,04 a	100 a	1,76±0,04 a
<b>60 dias</b>						
<b>C</b>	2,31±0,21 b	1,98±0,15 a	100 a	1,03±0,05 a	100 a	1,87±0,01b
<b>T1</b>	2,45±0,33 b	1,96±0,22 a	100 a	0,98±0,02 a	100 a	1,91±0,07b
<b>T2</b>	3,05±0,19 a	2,30±0,13 a	100 a	1,02±0,02 a	100 a	1,47±0,14 a
<b>T3</b>	3,14±0,11 a	2,20±0,14 a	100 a	1,00±0,06 a	100 a	1,52±0,10 a
<b>90 dias</b>						
<b>C</b>	2,70±0,34 b	1,40±0,17 a	100 a	0,99±0,01 a	100 a	1,79±0,04 b
<b>T1</b>	2,90±0,35 b	1,41±0,18 a	100 a	1,01±0,02 a	100 a	1,81±0,08 b
<b>T2</b>	3,96±0,39 a	1,66±0,16 a	100 a	1,02±0,01 a	100 a	1,50±0,04 a
<b>T3</b>	3,92±0,43 a	1,61±0,14 a	100 a	1,04±0,03 a	100 a	1,52±0,05 a

Os valores nas colunas com letras diferentes diferenciam estatisticamente pelo teste Tukey ( $p < 0,05$ ). GP (ganho de peso), TCEp (taxa de crescimento específico para peso), U (Uniformidade), Kr (Fator de condição relativo), S (sobrevivência) e CAA (conversão alimentar aparente). Grupo controle (C), Peixes alimentados com dietas contendo concentrações de  $10^4$  (T1),  $10^6$  (T2) e  $10^8$  (T3) UFC de *E. faecium*/g de ração.

Estudos utilizando a bactéria probiótica autóctone *E. faecium* em peixes ornamentais são escassos. Já em espécies para corte como tilápia nilótica (*Oreochromis niloticus* Linnaeus, 1758), truta (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) e linguado (*Paralichthys olivaceus* Temminck e Schlegel, 1846) suplementados com *E. faecium* foi possível observar que além de melhor desempenho zootécnico (ganho de peso e conversão alimentar) a suplementação promoveu melhora no sistema imunológico (Merrifield et al., 2010; Kim et al., 2012; Moraes et al., 2018). Para o acará bandeira também se observou melhora na reprodução quando foram alimentados com ração suplementada com *E. faecium* (Hollatz, 2015).

Com relação ao probiótico nas fezes, observou-se que houve um aumento gradativo em relação ao tempo de suplementação (Tabela 2), mostrando que a partir dos 60 dias a concentração de probióticos nas fezes no T1 e T2 foi semelhante à encontrada no intestino. Já no tratamento T3 observou-se que a semelhança somente foi alcançada aos 90 dias de experimento. Essa semelhança entre a quantidade encontrada nas fezes e no intestino pode ser decorrente tanto pelo fato do excesso de bactéria da dieta, que por não colonizar o intestino, é liberada nas fezes, quanto pela modificação do microambiente intestinal no decorrer da passagem do bolo fecal pelo intestino, pois esse microambiente varia do intestino anterior ao reto (Marteau et al., 2001). Pelos resultados apresentados existe uma correlação entre a concentração probiótica nas fezes e a concentração probiótica no intestino (Pearson  $r^2=0,81$   $p=0,0013$ ). Após transformação logarítmica dos dados para linearização e consequente obtenção de regressão linear, observou-se que apesar de significativa ( $p=0,0005$ ), apresenta um baixo coeficiente de determinação ( $R^2=0,71$ ) que impossibilitou uma determinação com acurácia da concentração probiótica do intestino a partir das fezes.

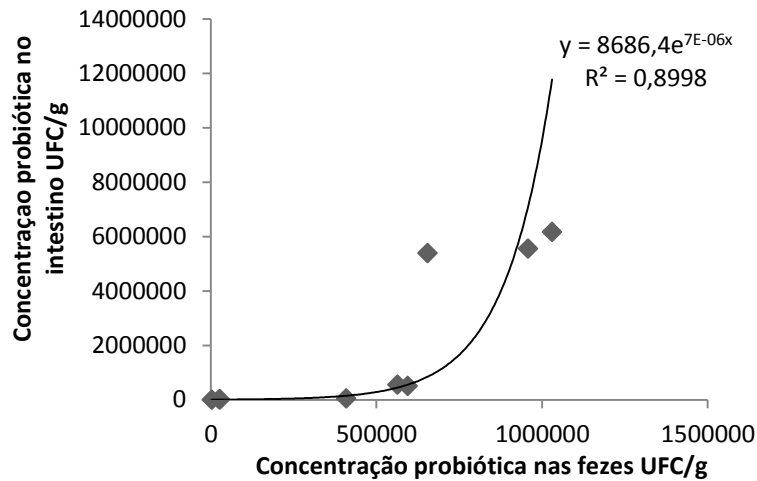
**Tabela 2.** Concentração probiótica no intestino e fezes dos peixes no decorrer do período experimental suplementados com *E. faecium*

	Controle		T1		T2		T3	
	fezes	peixe	Fezes	peixe	fezes	peixe	fezes	peixe
<b>30 dias</b>	0	0	$2 \times 10^3$	$3 \times 10^3$	$4 \times 10^5$	$5 \times 10^4$	$6 \times 10^5$	$5 \times 10^6$
<b>60 dias</b>	0	0	$2 \times 10^4$	$2 \times 10^4$	$5 \times 10^5$	$5 \times 10^5$	$9.5 \times 10^5$	$5 \times 10^6$
<b>90 dias</b>	0	0	$2 \times 10^4$	$1 \times 10^4$	$5 \times 10^5$	$5 \times 10^5$	$1. \times 10^6$	$6 \times 10^6$

\*Concentração probiótica em UFC/g (de fezes ou intestino)

Considerando-se um ajustamento da curva de regressão para uma equação não linear, observou-se que para os dados do presente trabalho, a regressão exponencial apresentou maior coeficiente de determinação ( $R^2 = 0,89$  Figura 1), porém devido aos altos valores em escala exponencial, um maior coeficiente de determinação, acima de  $R^2 = 0,95$  seria mais adequado para confirmar a estimativa da concentração probiótica intestinal.

Assim, ainda não há como determinar com acurácia a concentração probiótica intestinal pela análise das fezes o que inviabilizou a determinação de um fator de correção. Porém, havendo a suplementação durante 90 dias, pode-se conseguir estimar a quantidade de bactérias no intestino pelas fezes, mas novos estudos devem ser realizados para comprovar a estabilidade da quantidade probiótica além desses 90 dias para garantir essa estimativa.



**Figura 1.** Relação concentração probiótica nas fezes e no intestino, equação e coeficiente de determinação da regressão exponencial para o ajustamento da curva entre a concentração probiótica nas fezes e no intestino.

## Conclusão

A metodologia indireta proposta não permitiu a estimativa da quantidade de probiótico intestinal a partir de amostras de fezes, durante todo o tempo de suplementação experimental, que implica em novas pesquisas para impedir a eutanásia de animais de criação para tal fim e ao mesmo tempo facilitar o acompanhamento da colonização intestinal. Apesar disso, o probiótico se mostrou eficiente em promover melhora do desempenho zootécnico dos peixes suplementados, e aos 90 dias uma estimativa da concentração poderia ser realizada.

## Agradecimentos

Os autores agradecem ao CNPq pelo apoio financeiro (432622/2016-0 e 305195/2016-6)

## Referências

- ASSIS, D. A. S. D.; CAVALCANTE, S. S.; BRITO, M. F. G. D. Avaliação do comércio de peixes ornamentais de água doce em Aracaju, Sergipe. **Magistra**, v. 26, n. 2, p. 213-220, 2014.
- FARIAS, T. H. V.; LEVY-PEREIRA, N.; ALVES, L. de O.; DIAS, C. D.; TACHIBANA, L.; PILARSKI, F.; RANZANI-PAIVA, M. J. T. Probiotic feeding improves the immunity of pacus, *Piaractus mesopotamicus*, during *Aeromonas hydrophila* infection. **Animal Feed Science and Technology**, v. 211, n. 1, p. 137-144, 2016.
- FURUYA, W. M.; SOUZA S. R.; FURUYA, V. R. B.; HAYASHI C.; RIBEIRO R. P. Dietas peletizada e extrusada para machos revertidos de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) na fase de terminação. **Ciência Rural**, v. 28, n. 3, p. 483-487, 1998.
- GIRI, S. S.; SUKUMARAN, V.; OVIYA, M. Potential probiotic *Lactobacillus plantarum* VSG3 improves the growth, immunity, and disease resistance of tropical freshwater fish, *Labeo rohita*. **Fish & shellfish immunology**, v. 34, n. 2, p. 660-666, 2013.
- HOLLATZ, T. **Ração suplementada com probiótico na reprodução do peixe Acará-bandeira**. 2015. 49 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia)-Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, Sergipe, 2015.
- JATOBÁ, A.; MORAES, A.V.; STECKERT, L. D.; JESUS, G. F. A. Selection of autochtone probiotic for *Astyanax bimaculatus*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 69, n. 6, p. 1645-1652, 2017.

JATOBÁ, A.; MOURIÑO, J. L. P. Efeito do *Lactobacillus plantarum* no trato intestinal de alevinos de *Oreochromis niloticus*. **Ciência Animal Brasileira**, v. 6, p. 45-53, 2015.

KIM, Y. R.; KIM, E. Y.; CHOI, S. Y.; HOSSAIN, M. T.; OH, R.; HEO, W. S.; KONG, I. S. Effect of a probiotic strain, *Enterococcus faecium*, on the immune responses of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). **Journal of microbiology and biotechnology**, v. 22, n. 4, p. 526-529, 2012.

LE CREN, E. D. The length-weight relationship and seasonal cycle in gonad weight and condition in the perch (*Perca fluviatilis*). **Journal of Animal Ecology**, v. 20, n. 2, p. 201-219, 1951.

MARTEAU, P.; POCHART, P.; DORE, J. L.; BE'RA-MAILLET, C.; BERNALIER, A.; CORTIER, G. Comparative study of bacterial groups within the human cecal and fecal microbiota. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 10, p. 4939–4942, 2001.

MEHDINEJAD, N.; IMANPOUR, M. R.; JAFARI, V. Combined or Individual Effects of Dietary Probiotic, *Pediococcus acidilactici* and Nucleotide on Reproductive Performance in Goldfish (*Carassius auratus*). **Probiotics and antimicrobial proteins**, v. único, p. 1-6, 2018.

MERRIFIELD, D. L.; DIMITROGLOU, A.; FOEY, A.; DAVIES, S. J.; BAKER, R. T.; BØGWALD, J.; CASTEX, M.; RINGØ, E. The current status and future focus of probiotic and prebiotic applications for salmonids. **Aquaculture**, v. 302, n. 1-2, p. 1-8, 2010.

MORAES, A. V. D.; PEREIRA, M. D. O.; MORAES, K. N.; RODRIGUES SOARES, J. P.; JESUS, G. F. A. JATOBÁ, A. Autochthonous probiotic as growth promoter and immunomodulator for *Astyanax bimaculatus* cultured in water recirculation system. **Aquaculture Research**, v. único, p. 1-7, 2018.

MOURIÑO, J. L. P.; VIEIRA, F. N.; JATOBÁ, A.; SILVA, B. C.; PEREIRA, G. V.; JESUS, G. F. A.; MARTINS, M. L. Symbiotic supplementation on the hemato immunological parameters and survival of the hybrid surubim after challenge with *Aeromonas hydrophila*. **Aquaculture Nutrition**, v. 23, n. 2, p. 276-284, 2017.

RAMÍREZ, C.; BOLÍVAR, A.; CIFFONI, G. A.; PANCHENIAK, E. M. G.; SOCCOL, E. F. R. C. Microorganismos lácticos probióticos para ser aplicados en la alimentación de larvas de camarón y peces como substituto de antibiótico. **La Alimentación Latino Americana**, v. 264, p. 70-78, 2006.

RIBEIRO, F. D. A. S.; VASQUEZ, L. A.; FERNANDES, J. B. K.; SAKOMURA, N. K. Feeding level and frequency for freshwater angelfish. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 41, n. 6, p. 1550-1554, 2012.

RINGØ, E.; LØVMO, L.; KRISTIANSEN, M.; BAKKEN, Y.; SALINAS, I.; MYKLEBUST, R.; MAYHEW, T. M. Lactic acid bacteria vs. pathogens in the gastrointestinal tract of fish: a review. **Aquaculture Research**, v. 41, n. 4, p. 451-467, 2010.

VERSCHUERE, L.; ROMBAUT, G.; SORGELOOS, P.; VERSTRAETE, W. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 64, n. 4, p. 655-71, 2000.

ZOETENDAL, E. G.; WRIGHT, A. V.; VILPPONEN-SALMELA, T.; BEN-AMOR, K.; AKKERMANS, A. D. L.; DE VOS, W. M. Mucosa-associated bacteria in the human gastrointestinal tract are uniformly distributed along the colon and differ from the community recovered from feces. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 7, p. 3401–3407, 2002.



# Avaliação da contaminação por deltametrina e cipermetrina na água de pisciculturas do Baixo São Francisco

Tereza Vitória Brito D'Ávila<sup>1</sup>, Cindy Caroline Moura Santos<sup>2</sup>, Fernanda dos Santos Cunha<sup>3</sup>, Bruno Santos Lima<sup>4</sup>, Yasmim Maria Barbosa Gomes de Carvalho<sup>5</sup>, Adriano Antunes de Souza Araújo<sup>6</sup>, José Guedes de Sena Filho<sup>7</sup>, Alexandre Nizio Maria<sup>8</sup>, Paulo Cesar Falange Carneiro<sup>9</sup>, Ricardo Coelho de Sousa<sup>10</sup>, Rodrigo Yudi Fujimoto<sup>11</sup>

**Resumo** - Os piretroides são defensivos agrícolas que se destacam por serem efetivos no controle de pragas e baixa toxicidade aos mamíferos, porém seus resíduos podem gerar impactos ambientais, afetando corpos hídricos e os organismos aquáticos. A cipermetrina e deltametrina são piretroides utilizados na região do Baixo São Francisco sergipano nas atividades agrícolas, o que gera uma preocupação ambiental e social, visto que esta região também é responsável pela produção de peixes no estado de Sergipe. Diante disto, o objetivo do presente estudo foi identificar a presença dos piretroides cipermetrina e deltametrina na água do rio São Francisco, córregos de abastecimento e pisciculturas, para auxiliar futuras políticas públicas que colaborem com a redução do uso indiscriminado e inadequado desses compostos. Para isto, foram mensurados os parâmetros físico-químicos de água de 10 pisciculturas, 9 córregos e 3 afluentes do rio São Francisco no município de Propriá, SE durante o período chuvoso (agosto a outubro de 2017) e seco (novembro de 2016 e janeiro de 2017) assim como a coleta de 1 litro de água para determinação dos piretroides. Este material foi armazenado em frascos de polietileno, protegidos da luz, conservado em gelo, transportado para o laboratório de aquicultura e armazenados a -20 °C. Posteriormente realizou-se, em cada amostra, a microextração líquido-líquido dispersiva para então análise em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A partir das análises dos parâmetros de qualidade da água observou-se que esta não foi restritiva para o crescimento dos peixes. Mas pela CLAE foi possível identificar a presença de cipermetrina e deltametrina em amostras de água da região. A cipermetrina foi identificada em 8 pontos no período chuvoso e em 18 pontos no período seco dentre os 22 pontos amostrados com variação de 0,0155 µg/L a 1,0492 µg/L, e a deltametrina foi encontrada em 5 pontos no período chuvoso e em 10 pontos no período de seca com variação entre 0,02775 µg/L a 0,3024 µg/L. Através deste estudo foi possível observar que a presença dos piretroides nas águas do Baixo São Francisco excedeu os limites propostos pelas legislações internacionais, com maiores concentrações na época de seca, representando assim um fator de impacto ambiental para a qualidade de água das pisciculturas e córregos de drenagem, o que ocasiona uma maior preocupação para a formulação de políticas públicas que tenham como objetivo a conservação dos recursos hídricos.

**Termos para indexação:** recursos hídricos, cromatografia, contaminação, piretroides.

## Introdução

Os defensivos agrícolas são definidos como agentes químicos ou biológicos que têm a finalidade de reduzir as perdas em plantações causadas por pragas e ervas daninhas a fim de garantir o potencial produtivo (Environment Agency, 1997). Nos últimos anos, houve um aumento no uso desses defensivos, provenientes da expansão de áreas agrícolas, o que ocasionou uma maior preocupação com o impacto que seus resíduos poderiam causar no meio ambiente (Sindag, 2011; Ramos, 2013; Saraiva et al., 2013).

Devido a esses possíveis impactos, defensivos antes utilizados como organofosforados, carbamatos e organoclorados, estão sendo substituídos pelos piretroides, que são inseticidas que proporcionam maior eficiência em baixas dosagens, menor impacto ambiental e são praticamente atóxicos para mamíferos. No entanto esses piretroides apresentam alta toxicidade para abelhas e organismos aquáticos (Waring, 2000; Koçak et al., 2002; Balint et al., 1995; Pimpão, 2007).

Dentre os piretroides mais utilizados estão a cipermetrina e a deltametrina que a depender da sua estrutura molecular, podem apresentar toxicidade moderada (II) e alta (III), respectivamente, para os ratos, causando letargia, leve tremor, salivação, diarreia e paralisia de acordo com Organização Mundial da Saúde (Who, 2006), já para os peixes, esses inseticidas são classificados como altamente tóxicos, causando efeitos comportamentais como letargia, batimento acelerado do opérculo e presença na superfície da água.

<sup>1</sup>Graduando em Farmácia, bolsista da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

<sup>2</sup>Graduando em Farmácia, bolsista da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

<sup>3</sup>Engenheira de pesca, Aracaju, SE.

<sup>4</sup>Farmacêutico, mestre em Ciências Farmacêuticas, Aracaju, SE.

<sup>5</sup>Farmacêutico, mestre em Ciências Farmacêuticas, Aracaju, SE.

<sup>6</sup>Farmacêutico, doutor em Ciências Farmacêuticas, professor da Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, SE.

<sup>7</sup>Farmacêutico, doutor em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, analista da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

<sup>8</sup>Zootecnista, doutor em Zootecnia, pesquisador da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

<sup>9</sup>Engenheiro-agrônomo, doutor em Agronomia, pesquisador da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

<sup>10</sup>Engenheiro Mecânico, mestre em Engenharia mecânica, analista da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

<sup>11</sup>Zootecnista, doutor em Aquicultura, pesquisador da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

Os peixes apesar de não serem os organismos alvo dos piretroides acabam sendo atingidos de forma indireta, pois esses compostos alcançam os corpos hídricos, superficiais ou subterrâneos, por meio da lixiviação, percolação, e/ou escoamento superficial (Barrionuevo; Lanças, 2001; Tomita; Beyruth, 2002; Senger et al., 2005; Pimpão, 2006; Jaensson et al., 2007). Alguns estudos já comprovaram a contaminação de recursos hídricos por piretroides em várias partes do mundo, como em águas do mar, subterrânea e para consumo humano nos Estados Unidos e na Espanha (Ritter, 1990; Gutiérrez et al., 1998; Coly; Aaron, 1998). Valores de referência já foram estabelecidos em legislações internacionais, como pelo Conselho Canadense de Ministros do Meio Ambiente que estabeleceu 0,0004 µg/L de deltametrina para a proteção aquática (CCME, 1997) e de 0,0001 µg/L de cipermetrina estabelecida pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA, 1997).

No Brasil foi possível identificar que 19 princípios ativos são utilizados na região do Baixo São Francisco, sendo dois destes princípios a cipermetrina e a deltametrina (Britto et al., 2015). Esta região é caracterizada por áreas de várzeas inundáveis próximas as margens do rio, propícias tanto para o cultivo agrícola, quanto para a construção de viveiros de piscicultura (Galindo, 2000). Assim, uma possível contaminação por piretroides deve ser investigada na região a fim de garantir a sustentabilidade das atividades agrícolas e pecuárias assim como a saúde pública.

Com isso, o objetivo deste trabalho foi avaliar as águas do rio, córregos de drenagem e pisciculturas situados na região do Baixo São Francisco sergipano quanto à contaminação por piretroides, de forma a auxiliar em futuras políticas públicas que colaborem com a redução do uso indiscriminado e inadequado desses compostos.

## Material e Métodos

### Localização dos pontos de amostragem

Foram marcados vinte e dois pontos de coletas de água, no município de Propriá, SE (Tabela 1) com o auxílio do equipamento GPS (Garmin®). Dez desses pontos estão localizados em pisciculturas, três em afluentes do rio São Francisco e nove em canais de abastecimentos de riziculturas e pisciculturas. As coletas de água foram realizadas no período chuvoso (agosto a outubro de 2017) e seco (novembro 2016 a janeiro de 2017).

**Tabela 2.** Descrição dos pontos de coleta no Baixo São Francisco sergipano.

Local	Ponto de coleta	Coordenadas geográficas		Local	Ponto de coleta	Coordenadas geográfica	
		Latitude	Longitude			Latitude	Longitude
Piscicultura	P2	-10,256	-36,749	Piscicultura	P17	-10,212091	-36,851612
Córrego	P4	-10,254155	-36,751195	Córrego	P18	-10,212086	-36,851615
Piscicultura	P6	-10,2512	-36,754476	Piscicultura	P19	-10,202958	-36,854378
Córrego	P7	-10,251723	-36,754269	Córrego	P20	-10,202646	-36,853989
Piscicultura	P8	-10,267135	-36,740495	Córrego	P22	-10,208080	-36,861473
Córrego	P10	-10,264843	-36,741253	Piscicultura	P23	-10,206057	-36,860798
Piscicultura	P11	-10,235869	-36,797442	Piscicultura	P24	-10,206026	-36,860747
Piscicultura	P12	-10,227493	-36,866151	Córrego	P25	-10,221048	-36,856793
Piscicultura	P13	-10,212848	-36,852758	Rio Cot	P26	-10,254446	-36,752314
Córrego	P15	-10,228593	-36,861807	Rio SF1	P27	-10,19975	-36,844264
Córrego	P16	-10,212913	-36,852713	Rio SF2	P28	-10,20512	-36,840346

\*SF1: Afluente do São Francisco amostra 1; SF2: Afluente do São Francisco amostra 2; COT: Rio Cotinguiba (afluente do São Francisco).

### Coleta de amostragem de água e análises de parâmetros de qualidade de água

Foram coletados 1000 mL de água de cada ponto de amostragem. Estas amostras foram armazenadas em frascos de polietileno, protegidas de luz, identificadas e condicionadas em gelo, em seguida levadas a laboratório para a realização das análises cromatográficas. Realizou-se ainda in loco análises de parâmetros de qualidade de água como o pH, mensurado com a utilização de pHmetro Akrom; Oxigênio Dissolvido (OD) e temperatura da água mensurados com a utilização de uma sonda multiparâmetros HANNA e Condutividade Elétrica (CE) através de uma sonda YSI.

### Preparação de soluções padrões dos piretroides

Foram obtidos padrões dos piretroides cipermetrina, deltametrina e esfenvalerato (*Sigma Aldrich*®). Para o preparo das soluções padrões, em concentração de 100 µg.L<sup>-1</sup>, utilizou-se o metanol (*J.T. Baker*® para HPLC) como solvente. As soluções foram submetidas a banho ultrassom por um tempo de 30 minutos para melhor diluição e posteriormente filtradas em membrana de 0,45 µm (*Chromafil*® Xtra PTFE).

### Micro Extração Líquido-Líquido Dispersivo (MELLD) dos piretroides

Para a extração dos análogos de interesse (piretroides), as amostras de água foram submetidas a MELLD. Cada amostra coletada foi descongelada a temperatura de 4 °C e posteriormente retirada uma alíquota de 30 mL, filtrada em papel filtro de 205 µm (Qualy). Adicionou à amostra 7,5 mL de metanol (*NEON®*) e 1,8 mL de clorofórmio (*Sigma Aldrich®*) onde foram misturados com a utilização de uma pipeta de Pasteur (3 mL) até a formação de uma solução turva. Desta solução retirou uma alíquota de 10 mL e inseriu em um tubo de vidro de 15 mL, sendo agitada manualmente por 30 segundos e centrifugada a 4000 RPM por um tempo de 5 minutos.

Após o processo de centrifugação ocorreu à decantação do clorofórmio (solvente extrator) e os piretroides (análitos) no fundo do tubo, separados então do metanol (solvente disperso) e a água contida na amostra bruta. Da solução depositada no fundo do tubo retirou-se 500 µL, que foram transferidos para um vial de 1,5 mL, e posteriormente secos com a N<sub>2</sub> gasoso para a retirada do clorofórmio. Após a secagem, o resíduo restante no vial foi restituído com 1 mL de acetonitrila (*Exodo Científica®* para UV/HPLC) e posterior injeção no CLAE (Fernández Ramos et al., 2014).

### Análises por cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Para essa análise utilizou um cromatógrafo líquido *Shimadzu®* com a seguinte configuração: Gaseificador DGU- 20\*3, duas bombas LC-2AD, um injetor automático SIL-20\*HT, um forno CTO-20 A um detector de arranjo de diodos SPD20Avp, acoplados a um sistema controlador CBM-20 A. A determinação dos piretroides ocorre em uma coluna analítica Him-Pack® C18-250 x 4,6 mm (5µm tamanho da partícula), conectada à uma pré-coluna *Phenomenex®* C18-30 x 4 mm (4 µm tamanho da partícula). Como fase móvel, a água ultrapura (A) (*milliq System, Millipore®*) e acetonitrila (B) foram utilizadas.

As análises dos padrões de piretroides foram realizadas utilizando um sistema de gradiente de eluição, no qual iniciou com 70% de B por um período de 1 minuto, 70%-95% de B durante 1 minuto-2 minutos, 95%-100% de B durante 2 minutos-10 minutos, 100%-70% de B durante 10 minutos-15 minutos, com retorno as condições iniciais e finalizando as análises. O fluxo de fase móvel foi de 0,8 mL/min. e o volume de injeção das amostras de 20 µL. A temperatura das análises foi de 25 °C com um comprimento de onda (λ) para a detecção dos compostos em 210nm.

### Análises dos piretroides por CLAE

As soluções padrões e diluições foram analisadas por CLAE no comprimento de onda de 210 nm. De acordo com os resultados obtidos, o emprego de um sistema gradiente de eluição com fase móvel acetonitrila/ água ultrapura foi adequado.

### Identificação e quantificação dos piretroides nas matrizes

Para a quantificação dos compostos, foram feitas curvas de calibração utilizando cada padrão de piretroide. As curvas foram obtidas através da diluição e análises de concentrações no intervalo linear de 0,01 µg/L a 10µg/L para a cipermetrina e deltametrina, com análises realizadas em triplicatas (n=3). As identificações dos piretroides foram determinadas pela co-injeção dos padrões de cipermetrina e deltametrina comparando com o tempo de retenção extraído das amostras analisadas por CLAE.

## Resultados e Discussão

### Parâmetros de qualidade de água

Notou-se que os resultados obtidos foram satisfatórios quando comparados com a resolução CONAMA 357 de 2005 do Ministério do Meio Ambiente, que dispõe sobre as condições e padrões de parâmetros de qualidade dos corpos hídricos. Os valores estão dentro dos padrões desejados pela legislação. Foram registrados médias de temperatura de 27.59±1.62 °C, de oxigênio dissolvido de 6.29±2.6 mg/L, e de pH de 8.0±0.31, sendo que esses valores podem influenciar na hidrólise destes defensivos quando em solução aquosa com pH acima do neutro e alta concentração de oxigênio que possibilitaria uma menor persistência no meio ambiente, contudo, foi possível identificar a presença de cipermetrina e deltametrina em amostras de água na região, possivelmente devido a sua grande utilização nas culturas encontradas na região (Usepa, 1989; Santos, 2007). O esfenvalerato não foi encontrado nas águas de região.

### Curva padrão

A partir da análise dos padrões foram definidas duas equações de regressão sendo  $y = 93072x + 60698$  para cipermetrina e  $y = 87019x + 42032$  para deltametrina. As curvas obtidas para cada padrão estão de acordo com o requerido pela Resolução 899 da ANVISA, determinando que o valor de r seja  $\geq 0,99$  (ANVISA, 2003), podendo assim serem utilizadas para a determinação da concentração dos piretroides nas amostras de água. Dessa maneira, a cipermetrina apresentou tempo de retenção de 5,2 minutos e a deltametrina de 5,8 minutos utilizando acetonitrila/água ultrapura como solventes móveis, sendo os mesmos considerados adequados devido a eluição de um pico cromatográfico com excelente resolução do cromatograma.

### Identificação dos piretroides

As concentrações de cipermetrina e deltametrina identificadas por meio da CLAE nos pontos de coletas estão apresentadas na Tabela 3.

**Tabela 3.** Concentração de Cipermetrina e Deltametrina em µg/L nos pontos de coleta de água na região do Baixo São Francisco sergipano.

Ponto de coleta	Local	Cipermetrina	Deltametrina	Cipermetrina	Deltametrina
		Chuva	Chuva	Seca	Seca
P 2	Piscicultura	0,4067	0,07488	0,6690	0,1794
P 4	Córrego	0,4811	0,03960	0,0159	0,0335
P 6	Piscicultura	<LQ	<LQ	0,0000	0,0000
P 7	Córrego	0,0984	0,06565	0,1569	0,0242
P 8	Piscicultura	0,2083	0,08810	0,7263	0,1889
P 10	Córrego	<LQ	<LQ	0,0205	0,0000
P 11	Piscicultura	<LQ	<LQ	0,4143	0,0715
P 12	Piscicultura	0,2691	0,02775	0,6081	0,0381
P 13	Piscicultura	0,0296	<LQ	0,7384	0,3024
P 15	Córrego	<LQ	<LQ	0,0576	0,0137
P 16	Córrego	<LQ	<LQ	0,1490	0,0000
P 17	Piscicultura	0,0489	<LQ	1,0492	0,0000
P 18	Córrego	<LQ	<LQ	0,0314	0,0000
P 19	Piscicultura	0,0155	<LQ	0,6015	0,1178
P 20	Córrego	<LQ	<LQ	0,1471	0,0000
P 22	Córrego	<LQ	<LQ	0,1288	0,0000
P 23	Piscicultura	<LQ	<LQ	0,6191	0,0000
P 24	Piscicultura	<LQ	<LQ	0,5495	0,1919
P 25	Córrego	<LQ	<LQ	0,0823	0,0000
P 26	Rio COT.	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
P 27	Rio S. F1.	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
P 28	Rio S. F2.	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ

\*LQ- Limite de Quantificação. \*\*SF1: Afluente do São Francisco amostra 1; SF2: Afluente do São Francisco amostra 2; COT: Rio Cotínguiba (afluente do São Francisco).

A cipermetrina foi identificada em 8 pontos no período chuvoso e em 18 pontos no período seco dentre os 22 pontos amostrados com variação de 0,0155 µg/L a 1,0492 µg/L, sendo que esses valores estão acima do permitido pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (1997) que propõe um valor máximo de 0,0001 µg/L em corpos hídricos de água doce (EPA, 1997). Já a deltametrina foi encontrada em 5 pontos no período chuvoso e em 10 pontos no período de seca com variação entre 0,02775 µg/L a 0,3024 µg/L, concentrações estas acima do recomendado por legislação internacional, como o Conselho Canadense de Ministros do Meio Ambiente (1994). Apesar de não haver legislação nacional para os piretroides, a deltametrina e cipermetrina estão acima do que é permitido por legislações internacionais.

Os resultados da identificação e quantificação da cipermetrina e deltametrina nos pontos de piscicultura e córregos de drenagem foram maiores que as concentrações encontradas em outras partes do mundo como no delta do rio Ebro na península Ibérica que apresentou valores variando de 0,00073 µg/L a 0,000572 µg/L para deltametrina e 0,002 µg/L a 0,000588 µg/L para a cipermetrina. Na China, no reservatório de Guanting, em áreas agrícolas também são relatadas concentrações menores de piretroides como 0,00125 µg/L de cipermetrina e 0,004301 µg/L para a deltametrina (Feo et al., 2010; Xue et al., 2005; Weston, 2010).

Os piretroides são altamente tóxicos aos organismos aquáticos e que por serem lipofílicos, acabam sendo facilmente absorvidos pelas brânquias podendo causar diversos danos como a dificuldade na troca gasosa, lesões nas estruturas de órgãos como fígado, rins, cérebro e músculos, e a indução em alterações genotóxicas, e dependendo da concentração pode ocasionar a morte (Bols et al., 2001; Borges, 2007; Singh, 2008). Além disso, os piretroides podem interferir na reprodução de peixes de clima temperado, como o salmão (Moore; Waring, 2000), e eles podem bioconcentrar como já observado por Aznar-Alemany et al. (2017) em salmões cultivados nos Estados Unidos, Chile, Dinamarca, França, Noruega, Escócia e Espanha.

Apesar de serem altamente sensíveis à deltametrina e cipermetrina, não são observadas mortalidades de peixes na região do Baixo São Francisco. O que pode justificar essa não mortalidade dos peixes na região é o fato que peixes adultos possuem uma maior resistência aos compostos químicos. A tilápia, por exemplo, segunda espécie mais cultivada na região do Baixo São Francisco sergipano, apresenta uma CL50 de 5,99 µg/L e 14,6 µg/L para a cipermetrina e deltametrina, respectivamente. Porém, isso não minimiza o impacto do presente estudo, visto que os peixes cultivados na região podem estar sofrendo alterações hematológicas e histopatológicas, bem como bioconcentrando esses compostos químicos, o que traz uma preocupação para a saúde pública, visto que esses peixes serão destinados ao consumo humano (Sarıkaya; Ansari et al., 2009; Cengiz; Unlu, 2006).

Devido a esses possíveis problemas causados à qualidade da água e aos organismos aquáticos pelo uso de defensivos agrícolas como piretroides, as implementações de políticas públicas devem ser realizadas para que possa definir limites máximos para estes defensivos e garantir a proteção aquática e a saúde pública. Como também sendo necessária a criação de medidas mitigadoras para a redução da contaminação dos corpos hídricos que fazem parte da bacia hidrográfica do rio São Francisco.

## Conclusão

O uso de piretroides no Baixo São Francisco excedeu os limites propostos pelas legislações internacionais representando um fator de impacto ambiental para a qualidade de água das pisciculturas e córregos de drenagem, como também para as espécies de peixes cultivadas. O que ocasiona uma maior preocupação para a formulação de políticas públicas que tenham como objetivo a conservação desses.

## Referências

- ANSARI, R. A.; KAUR, M.; AHMAD, F.; RAHMAN, S.; RASHID, H.; ISLAM, F.; RAISUDDIN, S. Genotoxic and Oxidative Stress-inducing Effects of Deltamethrin in the Erythrocytes of a Freshwater Biomarker Fish Species, *Channa punctata* Bloch. **Jornal in Environmental Toxicology**, v. 24, n. 5, pg. 429-436, oct. 2009.
- ANVISA. **Resolução - RE nº 899, de 29 de maio de 2003**. Brasília, DF, 2003. Disponível em: <[http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/RE\\_899\\_2003\\_COMP.pdf/ff6fdc6b-3ad1-4d0f-9af2-3625422e6f4b](http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/RE_899_2003_COMP.pdf/ff6fdc6b-3ad1-4d0f-9af2-3625422e6f4b)>. Acesso em: 17 de jul. 2018.
- AZNAR-ALEMANY, O., ELJARRAT, E., BARCELÓ, D. Effect of pyrethroid treatment against sea lice in salmon farming regarding consumers health. **Food Chemical Toxicology**, v.105, p. 347-354, abr. 2017.
- BÁLINT, T.; SZEGLETES, T.; SZEGLETES, Z. S.; HALASY, K.; NEMCSÓK, J. Biochemical and subcellular changes in carp exposed to the organophosphorus methidation and the pyrethroid deltametrin. **Aquatic Toxicology**, v. 33, n. 3-4, p. 279-295, oct. 1995.
- BARRIONUEVO, R. W.; LANÇAS, F. M. Extração em fase sólida (SPE) e micro extração em fase sólida (SPME) de piretroides em água. **Química Nova**, v. 24, n. 2, p. 172-175, out. 2001.
- BOLS, N. C.; BRUBACHER, J. L.; GANASSIN, R. C.; LEE, L. E. J. Ecotoxicology and innate immunity in fish. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 25, n. 8-9, p. 853-873, out. 2001.
- BORGES, A. Changes in hematological and serum biochemical values in Jundiá *Rhamdia quelen* due to sub-lethal toxicity of cipermethrin. **Chemosphere**, v. 69, n. 6, p. 920-926, out. 2007.
- CANADIAN COUNCIL OF MINISTERS OF THE ENVIRONMENT. Canadian Water Quality Guidelines for the Protection of Aquatic Life. **Deltamethrin**. Hull, 1999. 3 p. Disponível em: <<http://ceqg-rcqe.ccme.ca/download/en/170>>.
- CENGİZ, E. I.; UNLU, E. Sublethal effects of commercial deltamethrin on the structure of the gill, liver and gut tissues of mosquitofish, *Gambusia affinis*: A microscopic study. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 21, n. 3, p. 246- 253, may. 2006.
- CODEVASF. **Produção de pescado**: renda alternativa para os produtores do Baixo São Francisco. Aracaju, 2016. Disponível em: <<http://www.codevasf.gov.br/principal/publicacoes/boletim-informativo-dos-projetosda-codevasf/BIP14/producao-de-pescados/?searchterm=propri%C3%A1>>. Acesso em: 13 de nov. 2017.
- COLY, A. AARON, J. J. Cyclodextrin-enhanced fluorescence and photochemically-induced fluorescence determination of five aromatic pesticides in water. **Analytica Chimica Acta**, v. 360, n. 1-3, p.129-141, mar. 1998.
- ENVIRONMENT AGENCY PESTICIDES IN THE AQUATIC ENVIRONMENT. National Centre for Toxic and Persistent Substances, 1997.
- FEO, M. I. L.; GINEBRED, A.; ELJARRAT, E.; BARCELÓ, D. Presence of pyrethroid pesticides in water and sediments of Ebro River Delta. **Journal of Hydrology**, v. 393, p. 156-162, nov. 2010.
- FERNÁNDEZ-RAMOS, C.; ŠATÍNSKÝ, D.; SOLICH, P. New method for the determination of carbamate and pyrethroid insecticides in water samples 76 using online SPE fused core column chromatography. **Talanta**, v. 129, p. 579– 585, jun. 2014.
- FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A.; MARTÍNEZ-VIDAL, C. L.; ARREBOLA-LIÉBANAS, F. J.; GONZALES-CASADO, A.; VILCHEZ, J. L. Determination of endosulfan and some pyrethroids in waters by micro liquid-liquid extraction and GC-MS. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 360, n. 5, p. 568-572, mar. 1998.

GALINDO, L. C.; CASTRO, A. L. **Recomendações técnicas para a criação de peixes no Baixo São Francisco**. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2000. 36 p.

IBGE. **Estimativa populacional dos municípios do Baixo São Francisco**, Brasília, DF, 2013. Disponível em: <<http://cidades.ibge.gov.br/xtras/uf.php?lang=&coduf=28&search=sergipe>>. Acesso em: 13 de nov. 2017.

JAENSSON, A.; SCOTT, A. P.; MOORE, A.; KYLIN, H.; OLSÉN, K. H. Effects of a pyrethroid pesticide on endocrine responses to female odours and reproductive behavior in male parr of brown trout (*Salmo trutta* L.). **Aquatic Toxicology**, v. 81, n. 81, p. 1-9, fev. 2007.

KOÇAK, O.; POLAT, H.; ERKOÇ, F. U.; VIRAN, R. Investigation of acute toxicity of beta-cypermethrin on guppies *Poecilia reticulata*. **Chemosphere**, v. 49, n. 1, p. 39-44, out. 2002.

MOORE, A.; WARING, C. P. The effects of a synthetic pyrethroid pesticide on some aspects of reproduction in Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.). **Aquatic Toxicology**, v. 52, n. 1, p. 1-12, mar. 2001.

PIMPÃO, C. T. **Avaliação aguda dos efeitos toxicológicos da deltametrina em uma espécie de peixe fluvial nativo: estudo bioquímico e imunotóxico**. 2006. Tese (Doutorado)- Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

PIMPÃO, C. T.; ZAMPRONIO, A. R.; SILVA DE ASSIS, H. C. Effects of deltamethrin on hematological parameters and enzymatic activity in *Ancistrus multispinis* (Pisces, Teleostei). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 88, p. 122-127, jun. 2007.

RITTER, W. F. Pesticide contamination of ground water in United States: a review. **Journal of Environmental Science and Health**, v. 25, n. 1, p. 1-29, mar. 1990.

SANTOS, M. A. T.; AREAS, M. A.; REYES, F. G. R. **Piretroides: uma visão geral**. **Alimentos e Nutrição**, v. 18, n. 3, p. 339-349, jul. 2007.

SARIKAYA, R. Investigation of Acute Toxicity of Alpha-Cypermethrin on Adult Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus* L.). **Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 9, p. 85-89, jan. 2009.

SENGER, M. R.; RICO, E. P.; BEM, A. M. de; ROSEMBERG, D. B.; DIAS, R. D.; BOGO, M. R.; BONAN, C. D. Carbofuran and malathion inhibit nucleotide hydrolysis in zebrafish (*Danio rerio*) brain membranes. **Toxicology**, v. 212, n. 2-3, p. 107-115, sep. 2005.

SINGH, P. B.; SINGH, V. Cypermethrin induced histological changes in gonadotrophic cells, liver, gonads, plasma levels of estradiol-17 $\beta$  and 11-ketotestosterone, and sperm motility in *Heteropneustes fossilis* (Bloch). **Chemosphere**, v. 72, n. 3, p. 422-431, abr. 2008.

SILVA, D. R. O. da; AVILA, L. A. de; AGOSTINETTO, D.; MAGRO, T. D.; OLIVEIRA, E. de; ZANELLA, R.; NOLDIN, J. A. Monitoramento de agrotóxicos em águas superficiais de regiões orizícolas no sul do Brasil. **Ciência Rural**, v. 39, n. 9, p. 2383-2389, dez. 2009.

TOMITA, R. Y.; BEYRUTH, Z. Toxicologia de Agrotóxicos em Ambiente Aquático. **O Biológico**, v. 64, n. 2, p. 135-142, dez. 2002.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Pesticide Fact Sheet Number 199: cypermethrin**. Office of Pesticides and Toxic Substances, Washington, DC, 1989. 9 p.

XUE, N.; XU, X.; JIN, Z. Screening 31 endocrine-disrupting pesticides in water and surface sediment samples from Beijing Guanting reservoir. **Chemosphere**, v. 61, n. 11, p. 1594-1606, dez. 2005.

WESTON, D. P.; LYDY, M. Urban and Agricultural Sources of Pyrethroid Insecticides to the Sacramento-San Joaquin Delta of California. **Environmental Science and Technology**, v. 44, n. 5, p. 1833-1840, fev. 2010.

WHO. **Who specifications and evaluations for public health pesticides: Deltamethrin**. Washington, DC, 2006. p. 58.

# Resistência de tambaquis suplementados com probiótico ao desafio com *Aeromonas hydrophila*

Any Eduarda Nanes de Oliveira Farias<sup>1</sup>, Joel Artur Rodrigues Dias<sup>2</sup>, Natalino da Costa Sousa<sup>3</sup>, Márcia Valéria Silva do Couto<sup>4</sup>, Higo Andrade Abe<sup>5</sup>, Estevam Santos Neto<sup>6</sup>, Raiza Tamajura Varjão Silva Santos<sup>7</sup>, Juliana Oliveira Meneses<sup>8</sup>, Fernanda dos Santos Cunha<sup>9</sup>, Alexandre Nizio Maria<sup>10</sup>, Paulo Cesar Falange Carneiro<sup>11</sup>, Ricardo Coelho de Sousa<sup>12</sup>, Rodrigo Yudi Fujimoto<sup>13</sup>

**Resumo** - A piscicultura brasileira vem aumentando a produção nos últimos anos, entretanto com o aumento da densidade de estocagem e manejos inapropriados, doenças bacterianas podem ocorrer no sistema de produção, causando lesões, anemia e morte dos peixes, gerando impactos econômicos e ambientais a essa cadeia produtiva. Nesse cenário, o objetivo deste trabalho foi avaliar a resistência de tambaquis à *Aeromonas hydrophila* após suplementação probiótica. Diante disto o objetivo do trabalho foi avaliar os efeitos do probiótico *Bacillus cereus* na resistência de juvenis de *Colossoma macropomum*, desafiados com *Aeromonas hydrophila*. Para tanto, inicialmente determinou-se a concentração letal do patógeno ( $10^4$  UFC.g<sup>-1</sup>,  $10^5$  UFC.g<sup>-1</sup>,  $10^6$  UFC.g<sup>-1</sup>,  $10^7$  UFC.g<sup>-1</sup> e  $10^8$  UFC.g<sup>-1</sup> de *A. hydrophila*). Neste experimento foi possível observar 100% de mortalidade nas concentrações  $10^7$  UFC.g<sup>-1</sup> e  $10^8$  UFC.g<sup>-1</sup>, seguidos por 46,6% na concentração  $10^6$  UFC.g<sup>-1</sup> e 100% de sobrevivência nas unidades com  $10^5$  UFC.g<sup>-1</sup> e  $10^4$  UFC.g<sup>-1</sup> do patógeno durante 96 horas de teste. A concentração letal obtida (CL<sub>50</sub>) foi de  $2,7 \times 10^6$  UFC.g<sup>-1</sup>. Essa concentração foi então utilizada no teste de desafio sanitário, em animais que foram alimentados durante 120 dias com ração incorporada com *B. cereus* nas concentrações  $10^4$  UFC.g<sup>-1</sup>,  $10^6$  UFC.g<sup>-1</sup> e  $10^8$  UFC.g<sup>-1</sup>, com mais dois tratamentos controles (com e sem a injeção do patógeno). Os animais do controle com a injeção do patógeno apresentaram menores taxas de sobrevivência de 33,4%. Já nos tratamentos que os animais foram submetidos às dietas com probiótico apresentaram 93,3%; 86,6% e 86,6% de sobrevivência, para  $10^4$  UFC.g<sup>-1</sup>,  $10^6$  UFC.g<sup>-1</sup> e  $10^8$  UFC.g<sup>-1</sup> de *B. cereus* na ração, respectivamente. Na avaliação dos parâmetros hematológicos houve aumento nas concentrações de leucócitos, linfócitos e monócitos, dos animais alimentados com probiótico. O uso probiótico espécie-específico de *B. cereus* favoreceu a resistência de juvenis de tambaqui a uma exposição infecciosa com *A. hydrophila*.

**Termos para indexação:** hematologia, imunostimulante, sanidade, tambaqui.

## Introdução

A produção nacional de pescado no ano de 2010 foi de 1.264 mil toneladas, no qual 38% foram provenientes da aquicultura, com previsão de aumento produtivo de 8,3%/ano até 2020 (Brasil, 2010). Dentre as espécies mais produzidas no território nacional, destaca-se o tambaqui (*Colossoma macropomum*), espécie nativa de ampla distribuição geográfica que se estende nas bacias dos rios Orinoco e Amazonas. Sua potencialidade na aquicultura se refere ao seu desempenho em tamanho e peso e produção aproximada de 135,86 mil toneladas (IBGE, 2016).

Entretanto, um dos principais gargalos produtivos são as mortalidades ocasionadas por agentes infecciosos, principalmente as bactérias, que são responsáveis por grandes prejuízos reduzindo a lucratividade do setor. Para o tambaqui, já foram relatadas infecções bacterianas ocasionadas por *Flavobacterium columnare*, *Streptococcus agalactiae*, *Pseudomonas* sp. e *Aeromonas hydrophila* (Marques et al., 2016; Paixão et al., 2017).

As bactérias do gênero *Aeromonas* têm aparecido, nos últimos anos, como agente primário causador de lesões ulcerativas e septicemia hemorrágica em peixes de água doce (Ghenghesh, 2001). Para controlar essa proliferação das doenças bacterianas nas

<sup>1</sup>Graduanda em biomedicina, bolsista da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

<sup>2</sup>Engenheiro de pesca, bolsista Embrapa Tabuleiros Costeiros Aracaju, SE.

<sup>3</sup>Engenheiro de pesca, bolsista Embrapa Tabuleiros Costeiros Aracaju, SE.

<sup>4</sup>Engenheira de pesca, bolsista Embrapa Tabuleiros Costeiros Aracaju, SE.

<sup>5</sup>Engenheiro de pesca, bolsista Embrapa Tabuleiros Costeiros Aracaju, SE.

<sup>6</sup>Graduando em Engenharia de pesca, Aracaju, SE.

<sup>7</sup>Graduanda em Engenharia de pesca, Aracaju, SE.

<sup>8</sup>Engenheira de pesca, bolsista Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

<sup>9</sup>Engenheira de pesca, bolsista Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

<sup>10</sup>Zootecnista, doutor em Zootecnia, pesquisador da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

<sup>11</sup>Engenheiro-agrônomo, doutor em Agronomia, pesquisador da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

<sup>12</sup>Engenheiro Mecânico, mestre em Engenharia mecânica, analista da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

<sup>13</sup>Zootecnista, doutor em Aquicultura, pesquisador da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

pisciculturas comumente são utilizados antibióticos e quimioterápicos. No entanto, o uso destes produtos de forma errônea, se torna prejudicial para o meio ambiente e ao manipulador, possibilitando a seleção de bactérias com genes de resistentes a estes fármacos (Andrade-Porto et al., 2017; Julinta et al., 2017).

Como alternativa ao uso de antibióticos, nos últimos anos destacam-se as rações funcionais, com o uso de probióticos – que são microrganismos vivos, fornecidos na dieta do hospedeiro, que tem como intuito melhorar a sua saúde (Gatesoupe, 1999) a partir da melhoria do sistema imunológico (Mouriño et al., 2017), além de benefícios no desempenho produtivo (Giri et al., 2014). Diante desse contexto, o objetivo do trabalho foi avaliar a resistência de tambaquis suplementados com probiótico *Bacillus cereus* ao desafio sanitário com a bactéria patogênica *Aeromonas hydrophila*.

## Material e Métodos

O trabalho foi avaliado e aprovado pelo comitê de ética da Embrapa (numero 29022016.0003), e foi realizado no Laboratório de aquicultura da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE. Primeiramente, foi determinada a concentração letal média (CL<sub>50</sub>) de *A. hydrophila* inoculadas intraperitonealmente em juvenis de *C. macropomum*. A bactéria foi ativada em meio de cultura BHI por 24 horas a uma temperatura de 35° C, e em seguida foi mantida na concentração de 10<sup>8</sup> UFC.mL<sup>-1</sup>. Para o teste de concentração letal 50% (CL<sub>50</sub>) foi usado um delineamento inteiramente casualizado com cinco tratamentos: 1,2 x 10<sup>4</sup> UFC.g<sup>-1</sup>; 1,2 x 10<sup>5</sup> UFC.g<sup>-1</sup>; 1,2 x 10<sup>6</sup> UFC.g<sup>-1</sup>; 1,2 x 10<sup>7</sup> UFC.g<sup>-1</sup> e 1,2 x 10<sup>8</sup> UFC.g<sup>-1</sup> de peixe, mais um tratamento controle (sem infecção do patógeno), todos com três repetições, contendo cinco peixes por repetição. O experimento teve duração de 96 horas, sendo a mortalidade observada a cada 4 horas, para então o CL<sub>50</sub> ser estimado pelo método Trimmed Spearman Karber (Hamilton et al., 1977). Essa concentração foi então utilizada no teste de desafio sanitário dos tambaquis suplementados com probiótico

### Teste in vivo de desafio após suplementação probiótica

Juvenis de tambaqui foram suplementados com dietas contendo *Bacillus cereus* à 4,2 x 10<sup>4</sup> UFC.g<sup>-1</sup>, 3,9 x 10<sup>6</sup> e 3,3 x 10<sup>8</sup> UFC.g<sup>-1</sup> de ração, mais ração controle sem a inclusão da bactéria, arraçoados durante 120 dias. Após suplementação realizou-se o desafio sanitário com injeção de *A. hydrophila* na concentração letal estipulada anteriormente. No decorrer do desafio sanitário foi observada a sintomatologia (ulceração, escurecimento da pele, exoftalmia e mortalidade) durante 96 horas. Ao final, as amostras sanguíneas dos peixes sobreviventes e moribundos foram coletadas por punção do vaso caudal, com seringas umedecidas com EDTA (3%). A partir desta uma alíquota foi utilizada para determinar o nível de glicose (mg.dL<sup>-1</sup>) utilizando o medidor automático Accu-Chek Active®, 10µL de sangue foi diluído em 1mL de solução salina (0,65%) para a contagem de eritrócitos em câmara de Neubauer, o hematócrito (%) foi determinado pelo método de microhematócrito, a hemoglobina pelo modelo de cianometahemoglobina mensurado no analisador bioquímico Thermoplate® e para se determinar os níveis de proteína plasmática totais (g.dL<sup>-1</sup>) utilizou-se o refratômetro (Quimis®). De posse dos dados de eritrócito, hematócrito e hemoglobina foram calculados os índices hematimétricos: VCM (volume corpuscular médio =  $Ht \times 100/n^{\circ} \text{eritrócitos} = \text{fL}$ ), HCM (hemoglobina corpuscular média =  $\text{taxa Hb} \times 10/n^{\circ} \text{eritrócitos} = \text{pg}$ ) e CHCM (concentração de hemoglobina corpuscular média =  $\text{taxa HCM} \times 100/Ht = \text{g.dL}^{-1}$ ). E para a contagem de células diferencial e total de leucócitos e trombócitos, foram confeccionadas lâminas de extensões sanguíneas e coradas com Panótico NewProv.

De posse dos dados, estes foram submetidos às premissas de normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk e homocedasticidade de Bartlett e então submetidas à análise de variância (ANOVA), sendo o valor de F significativo, realizou-se o teste de Tukey ( $p < 0,05$ ) para comparação das médias.

## Resultados e discussão

Os valores médios de qualidade de água para temperatura (27,6±0,7 °C), oxigênio dissolvido (6,3±0,4 mg.L<sup>-1</sup>), condutividade elétrica (225,0±5,0 µS.cm<sup>-1</sup>), pH (6,8±0,2) e amônia total (0,7±0,1 a 1,4±0,1 mg.L<sup>-1</sup>), apresentaram-se ideais para a criação da espécie como relatado por Silva e Fujimoto (2015). No teste de CL<sub>50</sub> foi constada 100% de mortalidade nas concentrações de 1,2 x 10<sup>7</sup> UFC.g<sup>-1</sup> e 1,2 x 10<sup>8</sup> UFC.g<sup>-1</sup> de *A. hydrophila*, seguida pela concentração 1,2 x 10<sup>6</sup> UFC.g<sup>-1</sup> com 46,6 % de mortalidade, e nenhuma mortalidade nas concentrações de 1,2 x 10<sup>5</sup> UFC.g<sup>-1</sup> e 1,2 x 10<sup>4</sup> UFC.g<sup>-1</sup> durante as 96 horas experimentais. A partir desses resultados, obteve-se como concentração letal (CL<sub>50</sub>) 2,7 x 10<sup>6</sup> UFC.g<sup>-1</sup> para *A. hydrophila*, sendo então utilizada no desafio sanitário.



No desafio sanitário com a injeção do patógeno a sobrevivência dos animais foi influenciada pelas dietas contendo probiótico, no qual os peixes suplementados com  $4,4 \times 10^4$  UFC,  $3,9 \times 10^6$  e  $3,3 \times 10^8$  UFC de *B. cereus* por g.ração<sup>-1</sup>, apresentaram sobrevivência de 93,3%; 86,6% e 86,6%, respectivamente, sendo observada a sintomatologia infecciosa de escurecimento do corpo após 8 horas da injeção ao patógeno, caracterizado pelo nível dois de infecção pela escala de Ray (1954), todavia, retomando a coloração normal após 56 horas de infecção. Já para o grupo controle com a injeção do patógeno e sem o uso da ração com probiótico apresentou sobrevivência de 33,4%, sendo observadas lesões ulcerativas no local de injeção do patógeno, distensão abdominal e dilatação do ânus, que os classificou na intensidade infecciosa como grau 3 segundo protocolo de Ray (1954).

No presente trabalho a avaliação hematológica dos tambaquis sem suplementação probiótica e desafiados com o patógeno mostrou redução no número de eritrócitos, hematócrito e hemoglobina quando comparados aos tratamentos com uso probiótico na dieta (Tabela 1), devido a uma provável hemorragia ou hemólise característica da ação infecciosa do gênero *Aeromona*. Entretanto, nos tambaquis suplementados com probiótico o eritrograma se assemelhou ao grupo controle que não foi suplementado com a bactéria e não recebeu injeção do patógeno, demonstrando uma provável manutenção homeostática e aumento do suprimento de oxigênio (Ribeiro, 2016) mesmo com a injeção da bactéria patogênica.

Em peixe o sistema imunológico inato é o primeiro mecanismo ativado na defesa contra patógenos invasores, sendo considerado importante por desempenhar um papel significativo para a sobrevivência do hospedeiro (Biller-Takahashi, 2013). Assim sendo, observou-se uma melhora do sistema imune nos peixes suplementados com probiótico onde apresentaram maiores valores de leucócitos totais (Tabela 1) e dentre esses leucócitos, houve aumento dos linfócitos, mononócitos e neutrófilos, aumentando assim a resistência dos tambaquis à infecção bacteriana (Dias et al, 2011). Estes resultados se assemelham aos encontrados por Jatobá (2008), em tilápias do Nilo utilizando dietas contendo *L. plantarum* e desafiadas com *E. durans*, no qual apresentaram a contagem de monócitos superiores nos peixes dos tratamentos que receberam dieta suplementada com probiótico.

Um maior número de trombócitos também foi encontrado nos animais suplementados com  $10^4$  UFC.g<sup>-1</sup> e  $10^8$  UFC.g<sup>-1</sup> de *B. cereus* na ração (Tabela 1), este incremento da resposta imunológica do hospedeiro, pode ter auxiliado na maior resistência dos espécimes quando submetidos a uma exposição infecciosa com *A. hydrophyla* (Martins et al., 2008) pois esta célula também apresenta capacidade fagocítica em peixes.

**Tabela 1.** Média e desvio padrão dos valores de sobrevivência, hemograma, contagem total de leucócitos, trombócitos e diferencial de leucócitos de *Colossoma macropomum* submetidos à infecção experimental com *Aeromonas hydrophyla* (UFC.g<sup>-1</sup>).

Tratamento	CC	CD	$10^4$ (UFC.g <sup>-1</sup> )	$10^6$ (UFC.g <sup>-1</sup> )	$10^8$ (UFC.g <sup>-1</sup> )
Sobrevivência	100±0,00A	33,33±1,15 B	93,33±1,15A	86,66±1,15A	86,66±1,15A
Glicose (mg.dL <sup>-1</sup> )	22,6±4,7B	ND	29,6A±3,1B	31,8±6,8AB	35,7±6,4A
Eritrócitos (x10 <sup>6</sup> µL <sup>-1</sup> )	2,10±7,5A	0,625±1,9B	1,228±4,8A	1,440±6,6A	1,593±9,0A
Hematócrito (%)	24,83±2,3A	10,73±4,3B	22,20±4,5A	23,35±3,4A	24,97±3,0A
Proteína Total (g.dL <sup>-1</sup> )	4,00±0,1A	2,32±0,2B	3,79±0,5A	4,17±0,2A	4,18±0,5A
Hemoglobina (g.dL <sup>-1</sup> )	4,23±2,3AB	2,34±0,7B	5,211±0,8A	5,515±1,4A	4,610±0,7A
VCM (fL)	128,5±23,5A	161,21±24,5A	151,96±24,3A	169,842±27,1A	162,271±29,1A
HCM (g.dL <sup>-1</sup> )	31,1±2,2A	28,84±3,2A	43,83±4,2A	45,943±4,1A	39,145±4,2A
CHCM (g.dL <sup>-1</sup> )	24,19±5,1A	22,405±5,5A	25,1336,2A	25,765±5,5A	23,851±4,5A
Trombócitos (x10 <sup>3</sup> µL <sup>-1</sup> )	65,244±1,3A	1,733±0,3C	5,530±1,8B	2,366±1,4BC	11,607±1,7B
Leucócitos (x10 <sup>3</sup> µL <sup>-1</sup> )	23,568±9,3BC	16,433±8,1C	87,489±10,5A	74,282±9,4A	63,307±9,3AB
Linfócitos (x10 <sup>3</sup> µL <sup>-1</sup> )	21,920±9,5BC	14,743±8,1C	79,466±9,7A	59,926±7,6B	53,604±6,1AB
Monócitos (x10 <sup>3</sup> µL <sup>-1</sup> )	0,311±0,2C	0,709±0,2C	3,653±1,2AB	5,736±0,7A	2,945±1,9BC
Neutrófilo (x10 <sup>3</sup> µL <sup>-1</sup> )	0,975±0,5AB	0,802±0,4B	2,343±0,7AB	3,250±1,8A	3,536±1,3A
Basófilo (x10 <sup>3</sup> µL <sup>-1</sup> )	0,262±0,05A	0,099±0,09A	1,178±0,01A	1,041±0,6A	0,954±0,6A
LG Pas (x10 <sup>3</sup> µL <sup>-1</sup> )	-	0,091±0,03C	1,179±0,54B	2,173±0,81A	0,885±0,34B

Letras diferentes na mesma linha apresentam diferença significativa  $p < 0,05$  entre os mesmos índices pelo teste de Tukey. CC- Controle sem infecção, CD- Controle desafiado.

## Conclusão

Os juvenis de *Colossoma macropomum* apresentaram sensibilidade a infecção com *A. hydrophila* apresentando  $CL_{50}$  de  $2,7 \times 10^6$  UFC.g<sup>-1</sup>.

O uso probiótico espécie-específico de *B. cereus* favoreceu a resistência de juvenis de tambaqui, que proporcionou melhorias fisiológicas com base nas análises hematológicas quando submetidos a uma exposição infecciosa com *A. hydrophila*.

## Agradecimentos

Os autores agradecem ao CNPq pelo apoio financeiro (432622/2016-0 e 305195/2016-6)

## Referências

- ANDRADE-PORTO, S. M.; AFFONSO, E. G.; KOCHHANN, D.; MALTA, J. C. O.; ROQUE, R.; ONO, E. A.; TAVARES-DIAS, M. Antiparasitic efficacy and blood effects of formalin on *Arapaima gigas* (Pisces: Arapaimidae). **Aquaculture**, v. 479, p. 38-44, 2017.
- BILLER-TAKAHASHI, J. D.; TAKAHASHI, L. S.; MARZOCCHI-MACHADO, C. M.; ZANUZZO, F. S.; URBINATI, E. C. Disease resistance of pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) fed with b-glucan. **Brazilian Journal of Biology**, v. 74, n. 3, p. 698-703, 2014.
- BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura. Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura. 2010. Disponível em: <[http://www.mpa.gov.br/index.php?opti on=com\\_content&view=article&id=300 :bolet m-estatistico-da-pesca-e-aquicultura2010&catid=7&Itemid=303](http://www.mpa.gov.br/index.php?opti on=com_content&view=article&id=300 :bolet m-estatistico-da-pesca-e-aquicultura2010&catid=7&Itemid=303)>. Acesso em: 05 de junho 2018.
- DIAS, D.; TACHIBANA, L.; SERIANI, R.; SANTOS, A. A.; RANZANI-PAIVA, M. J. T.; ROMAGOSA, E. Tempo de migração dos macrófagos em matrinxãs, *Brycon amazonicus* por meio da técnica de inoculação de leveduras *Saccharomyces cerevisiae*. **Acta Amazonica**, v. 41, n. 3, 2011.
- GATESOUBE, F. J. The use of probiotics in aquaculture. **Aquaculture**, v. 180, p. 1-2, p. 147-165, 1999.
- GHENGHESH, K. S.; EL-GHODBAN, A.; DKAKNI, R.; ABEID, S.; ALTOMI, A.; TAHRUNI, A.; MARIALIGETI, K. Prevalence, species differentiation, haemolytic activity, and antibiotic susceptibility of aeromonads in untreated well water. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 2, p. 169-173, fev. 2001.
- GIRI, S. S.; SUKUMARAN, V.; SEN, S. S.; JENA, P. K. Effects of dietary supplementation of potential probiotic *Bacillus subtilis* VSG1 singularly or in combination with *Lactobacillus plantarum* VSG3 or/and *Pseudomonas aeruginosa* VSG2 on the growth, immunity and disease resistance of *Labeo rohita*. **Aquaculture Nutrition**, v. 20, n. 2, p. 163-171, 2014.
- HAMILTON, M. A.; RUSSO, R. C.; THURSTON, V. Trimmed sperman-karber method for estimating medial lethal concentrations in toxicology bioassays. **Environmental Science and Technology**, v. 11, n. 7, p. 714-719, 1977.
- IBGE. Produção da pecuária municipal. 2016. Disponível em: <[https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm\\_2015\\_v43\\_br.pdf](https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm_2015_v43_br.pdf)>. Acesso em: 08 jan. 2018.
- JATOBA, A.; VIEIRA, F. D.; BUGLIONE NETO, C. ; SILVA, B. C.; MOURINO, J. L. P.; JERONIMO, G. T.; DOTTA, G.; MARTINS, M. L. Lactic-acid bacteria isolated from the intestinal tract of Nile tilapia utilized as probiotic. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 43, p. 1201-1207, 2008.
- JULINTA, R. B.; ABRAHAM, T. J.; ROY, A.; SINGHA, J.; DASH, G. Histopathology and Wound Healing in Oxytetracycline Treated *Oreochromis niloticus* (L.) Against *Aeromonas hydrophila* Intramuscular Challenge. **Journal of Aquaculture Research & Development**, v. 8, n. 488, p. 1-6, 2016.
- MARQUES, D. S.; FERREIRA, D. A.; PAIVA, P. M.; NAPOLEÃO, T. H.; ARAÚJO, J. M.; MACIEL CARVALHO, E. V.; COELHO, L. C. Impact of stress on *Aeromonas* diversity in tambaqui (*Colossoma macropomum*) and lectin level change towards a bacterial challenge. **Environmental technology**, v. 37, n. 23, p. 3030-3035, 2016.

MARTINS, M. L.; MOURIÑO, J. L. P.; AMARAL, G. V.; VIEIRA, F. N.; DOTTA, G.; JATOBÁ, A. M. B.; PEDROTTI, F. S.; JERÔNIMO, G. T.; BUGLIONE-NETO, C. C.; PEREIRA JUNIOR, G. Alterações hematológicas em tilápia-do-nilo infectada experimentalmente com *Enterococcus* sp. **Brazilian Journal of Biology**, v. 68, n. 3, p. 657- 661, 2008.

MOURIÑO, J. L. P.; VIEIRA, F. N.; JATOBÁ, A.; SILVA, B. C.; PEREIRA, G. V.; JESUS, G. F. A.; MARTINS, M. L. Symbiotic supplementation on the hemato-immunological parameters and survival of the hybrid surubim after challenge with *Aeromonas hydrophila*. **Aquaculture Nutrition**, v. 23, n. 2, p. 276-284, 2017.

PAIXÃO, A. E. M.; SANTOS, J. C. dos; PINTO, M. S.; PEREIRA, D. S. P.; RAMOS, C. E. C. de O.; CERQUEIRA, R. B.; SILVA, R. F. da. Effect of commercial probiotics (*Bacillus subtilis* and *Saccharomyces cerevisiae*) on growth performance, body composition, hematology parameters, and disease resistance against *Streptococcus agalactiae* in tambaqui (*Colossoma macropomum*). **Aquaculture International**, v. 25, n. 6, p. 2035- 2045, 2017.

RIBEIRO, S. C.; CASTELO, A. S.; SILVA, B. M. P. D.; CUNHA, A. D. S.; PROIETTI JUNIOR, A. A.; OBA-YOSHIOKA, E. T. Hematological responses of tambaqui *Colossoma macropomum* (Serrassalmidae) fed with diets supplemented with essential oil from *Mentha piperita* (Lamiaceae) and challenged with *Aeromonas hydrophila*. **Acta Amazonica**, v. 46, n. 1, p. 99-106, 2016.

SILVA, C. A.; FUJIMOTO, R. Y. Crescimento de tambaqui em resposta a densidade de estocagem em tanques-rede. **Acta Amazonica**, v. 45, n. 3, p. 323-332, 2015.

# Identificação dos Metabólitos Orgânicos Voláteis (MOV's) em diferentes acessos do BAGcana e o seu papel na resistência a *Diatraea saccharalis*

Natalia Tavares Santos Ferreira<sup>1</sup>, Demetrios José de Albuquerque Oliveira<sup>2</sup>, Antonio Euzébio Goulart Santana<sup>3</sup>, Alessandro Riffel<sup>4</sup>

**Resumo** - O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar com uma produção aproximada de 634 milhões de toneladas para a safra 2017/2018. Um importante fator restritivo para a expressão do potencial dessa cultura no Brasil é o ataque de pragas e doenças, e estima-se que cerca de 10% das perdas anuais para sejam ocasionadas por insetos, sendo a praga mais importante a broca da cana (*Diatraea saccharalis*). As plantas, durante seu processo evolutivo, para reduzir os danos causados pelo ataque dos insetos herbívoros, têm desenvolvido uma série de mecanismos de defesa, dentre eles: barreiras físicas, metabólitos secundários tóxicos e a emissão de metabólitos orgânicos voláteis (MOV's) sinalizadores. Quando a planta é atacada por insetos herbívoros, ela emite MOV's que podem atrair inimigos naturais dos insetos, repelir a praga ou sinalizar a outras partes da planta e plantas vizinhas para o preparo da defesa. A manipulação da produção de metabólitos secundários tóxicos também tem sido utilizada na busca de alternativas para o controle de pragas e promoção de resistência. Os mecanismos de defesa apresentam-se tão distintos, que há variação dentro da espécie, fruto das diferenças de pressão de seleção durante o curso evolutivo. No entanto, pouco dessa variabilidade natural tem sido explorada para aplicação na agricultura. A prospecção da variabilidade natural entre parentais selvagens, rústicos ou até mesmo entre diferentes cultivares, pode ser uma ferramenta bastante útil no desenvolvimento de cultivares resistentes. Estudos envolvendo mecanismos de defesa e o conhecimento da variabilidade natural para a resistência a insetos ainda são bastante escassos. Nosso grupo de pesquisa vem desvendando os mecanismos de defesa da cana-de-açúcar e o presente trabalho teve como objetivo realizar análise do metaboloma da cana-de-açúcar no sítio de entrada da broca-da-cana e a caracterização da resistência em diferentes genótipos do complexo Saccharum, em busca de novas fontes de resistência.

## Introdução

As plantas, durante seu processo evolutivo, na tentativa de reduzir os danos causados pelo ataque dos insetos herbívoros, têm desenvolvido uma série de mecanismos de defesa, dentre eles: barreiras físicas, metabólitos secundários tóxicos e a emissão de metabólitos orgânicos voláteis (MOV's). Os MOV's podem atrair inimigos naturais, repelir a praga ou sinalizar diferentes partes da planta, desde a parte aérea até as raízes, como também plantas vizinhas para o preparo da defesa (Voelckel; Baldwin 2004; Agrawal, 1999; Dudareva et al., 2006; Dicke e Loreto, 2010; Dudareva et al., 2006; Baetz; Martinoia, 2014; Nalam; Nachappa, 2014). Os MOV's podem afetar diretamente a fisiologia e o comportamento dos herbívoros apresentando-se como tóxicos (antibiose) ou repelentes/deterrentes (antixenose) (Kessler; Baldwin, 2002).

A resistência de plantas é uma das formas mais efetivas para o controle de pragas e uma interessante alternativa ao uso de inseticidas. Para o desenvolvimento de variedades resistentes, é essencial identificar, caracterizar e categorizar as possíveis fontes dessa resistência. Na natureza, pragas com efeitos altamente devastadores raramente ocorrem, apesar da presença constante e abundante de insetos herbívoros. Isto ocorre devido à grande variedade de mecanismos de defesa que as plantas apresentam (Shoornhoven, 2005).

No entanto, estudos envolvendo mecanismos de defesa e o conhecimento da variabilidade natural para a resistência a insetos em cana-de-açúcar ainda são bastante escassos. Portanto, é importante desvendar os fundamentos e mecanismos dessa variação existente. Tais análises podem facilitar o desenvolvimento de marcadores moleculares para introduzir características de resistência em programas de melhoramento genético de culturas de importância econômica (Bergelson; Roux, 2010).

<sup>1</sup>Graduanda em Engenharia Agrônoma, Maceió, AL.

<sup>2</sup>Químico da Universidade Federal de Alagoas (UFAL), Maceió, AL.

<sup>3</sup>Farmacêutico, professor e pesquisador da Universidade Federal de Alagoas (UFAL), Maceió, AL.

<sup>4</sup>Farmacêutico, pesquisador da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Unidade de Execução de Pesquisa de Rio Largo (UEP-Rio-Largo), Rio Largo, AL.

Nos últimos anos, a Embrapa iniciou a implantação de seu Banco de Germoplasma do Complexo Saccharum (*S. officinarum*, *S. spontaneum*, *S. robustum*, *Erianthus* sp. e *Miscanthus* sp.) necessitando de uma caracterização para resistência a pragas. O ataque de pragas continua com o um dos fatores restritivos para aumentos de produtividade, e a variabilidade genética presente pode ser uma valiosa fonte para o desenvolvimento de materiais resistentes. Portanto, o presente projeto, dentro da variabilidade existente e ainda pouco caracterizada buscou identificar novas fontes de resistência, direta e indireta, para a cana-de-açúcar.

## Material e Métodos

Primeiramente foi realizada a análise do metaboloma do material vegetal restrito ao sítio de injúria pela lagarta para identificar possíveis metabólitos de defesa rápida na variedade SP 791011. Em seguida foram realizados os ensaios para verificar a atividade de antibiose entre os diferentes acessos do banco, como um *screening* inicial para selecionar e reduzir o número de acessos a serem caracterizados quimicamente. Na próxima etapa, com os materiais selecionados, serão realizados os ensaios de metabolômica e análise dos MOVs para identificar possíveis marcadores e novas fontes de resistência.

### Material Vegetal

O material vegetal utilizado em todos os experimentos com cana de açúcar é oriundo do Banco de Germoplasma da Embrapa, sendo utilizados cinco diferentes genótipos. Os toletes foram plantados através de propagação de entrenós, cultivadas em copos plásticos de 0,5 L utilizando como substrato composto orgânico. As plantas de canas-de-açúcar desenvolveram-se em casa de vegetação sob condições de temperatura e umidade controladas, onde receberam os devidos tratos culturais. Na base dos copos plásticos foram abertos orifícios para o escoamento de possível excesso de água. Para o ensaio de metabolômica foi utilizada a cultivar SP791011. Para os ensaios de antibiose utilizaram-se os acessos: *Miscanthus* sp.Fiji 10, *Saccharum* híbrido US 67-22-2, *S. spontaneum* US72\_1319, *Erianthus arundinaceus* Ij76-358, *Erianthus arundinaceus* IJ76-381

### Obtenção e Manutenção da *Diatraea saccharalis*

Os insetos foram adquiridos junto a Usina Santo Antônio, s/n, zona rural, São Luís do Quitunde, AL. Para os experimentos sem chance de escolha foram utilizadas lagartas de terceiro instar. As lagartas foram mantidas em tubos de vidro com dieta artificial até quatro horas antes do início do experimento. A partir de então as lagartas foram privadas da alimentação tendo contato somente com algodão umedecido em água destilada. A privação de alimentação foi utilizada para garantir que as lagartas brocassem a cana durante os experimentos.

### Bioensaios

A fim de avaliar a resistência do tipo antibiose, a performance larval das lagartas foi avaliada pela realização de um bioensaio sem chance de escolha de alimentação. O bioensaio foi realizado adicionando-se as lagartas na base da planta e deixando-a brocar por um período de 14 dias. Para o estudo do metaboloma utilizou-se o tempo de 120 horas. Após esse período, as lagartas foram cuidadosamente removidas do interior do colmo com auxílio de uma pinça. A performance larval foi calculada como a percentagem de ganho de peso antes e após sua alimentação nas plantas. Para manter a lagarta na base do colmo da planta, utilizou-se uma adaptação de gaiola telada. Cada tratamento foi composto por dez plantas (repetições) e uma lagarta por planta. A análise estatística dos valores para o ganho de peso foi realizada pelos testes ANOVA e Kruskal-Wallis.

### Extração de compostos para a análise metabolômica

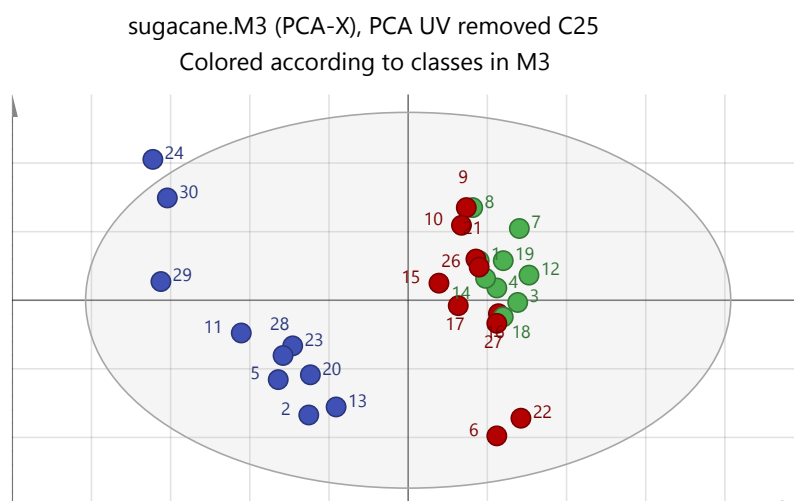
Para a análise dos metabólitos coletou-se 10 amostras de folhas de plantas de cana-de-açúcar aos de cada acesso com 60 dias de idade. O procedimento para RMN 2D será o mesmo, porém foi analisada uma amostra de cada tratamento. As folhas foram seccionadas junto ao caule das plantas e imediatamente congeladas em N<sub>2</sub> líquido, armazenadas em temperatura de -80 °C. As amostras foram trituradas em N<sub>2</sub> líquido, secadas e então submetidas a extração. Para a extração pesou-se 50 mg de cada amostra em tubos de 1,5mL (tipo eppendorf) devidamente identificados, onde foi adicionado 500 µL de tampão fosfato (90 mmol/L, pH 6,0), o qual foi preparado adicionando 1,232 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e 10 mg de TSP (0,01%) para 100 mL de D<sub>2</sub>O e posteriormente 500 µL metanol deuterado. Procedeu-se com a extração por microondas durante 30 minutos e centrifugação a 14000 RPM durante 15 minutos para a remoção dos resíduos sólidos. Posteriormente coletou-se o sobrenadante e procedeu-se com a análise por RMN em tubo adequado para este procedimento.

### Análise por RMN e estatística multivariada

A identificação dos metabólitos não voláteis será feita com uso da técnica de RMN (Ressonância Magnética Nuclear) RMN- $^1\text{H}$ , os espectros foram obtidos a 25 °C em espectrômetro Bruker AVANCE operando a 400 MHz na frequência do hidrogênio. Cada espectro de RMN- $^1\text{H}$  consistiu de 128 pulsos (10min e 26s) com tempo de aquisição de 5 s, largura do pulso de  $90^\circ = 9,75 \mu\text{s}$ , atraso (delay) de relaxamento (RD) de 2 segundos. Será utilizada a técnica de supressão do sinal da água para reduzir a razão sinal ruído. Os decaimentos livre de indução (FID) passaram por transformadas de Fourier com um line broadening (LB) = 0,3 Hz. O espectro de J-resolvido foi adquirido com 32 pulsos por 128 incrementos em 8K pontos de dados, com comprimento espectral de 5,208 KHz e 60 Hz em acoplamento spin-spin com RD = 1,5s. O espectro COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  foi obtido com 32 pulsos por 512 incrementos em 2K pontos de dados, com comprimento espectral de 5,208 KHz em ambas as dimensões com RD = 1,5s. Os espectros HMBC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  e HSQC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  foram adquiridos com 64 pulsos por 512 incrementos em 4K pontos de dados, com comprimento espectral de 5,208 KHz para o  $^1\text{H}$  e 22,149 KHz para o  $^{13}\text{C}$  com RD = 1,5s. Os espectros resultantes serão calibrados com o TSP como padrão interno em 0,0 ppm, usando o programa TopSpin RMN (versão 2.1, Bruker). Os espectros de RMN- $^1\text{H}$  otimizados serão reduzidos ( $\delta$  0,3-10,0 ppm) e divididos em regiões de largura (bucket = 0,0004 ppm), normalizados e alinhados através do programa MATLAB versão 2014a. As regiões de  $\delta$  4,7-5,0 e 3,24-3,33  $\delta$  foram excluídas da análise por causa dos sinais residuais de água e de metanol. A análises estatística que serão efetuadas são: PCA e OPLS-DA usando o software SIMCA-P (versão 14.0, Umetrics, Umeå, Suécia) com escalonamento baseado no método de única variância (UV).

## Resultados e Discussão

Quando analisadas as modificações no metaboloma da planta, no sítio restrito ao de entrada da lagarta de *Diatraea saccharalis*, verificaram-se alterações no perfil dos metabólitos entre os três grupos estudados: plantas saudas (controle), plantas submetidas a dano mecânico (controle positivo) e as plantas submetidas a herbivoria (Figura 1). Esses resultados indicam que há uma resposta específica a herbivoria, possivelmente à presença dos eliciadores presentes na secreção oral das lagartas. Além disso, o dano causado pela lagarta é capaz de induzir localmente a biossíntese de compostos específicos. A continuação do estudo e a identificação destes compostos podem auxiliar na descrição do mecanismo de defesa local, bem como fornecer um possível marcador ou composto de defesa na espécie vegetal.



**Figura 1.** PCA escores dos perfis de metabólitos de tecido de cana-de-açúcar amostradas após 120h de bioensaio de herbivoria (PCA). Score plot das amostras. As plantas foram submetidas a herbivoria por *D. saccharalis* (azul), controle positivo aplicando dano mecânico (vermelho) e plantas saudas (verde).

Foram realizados os bioensaios com cinco genótipos do BAG do complexo Saccharum. As lagartas foram submetidas à herbivoria e retiradas do confinamento às plantas e pesadas após 14 dias. Quando analisadas as médias de ganho de peso, observa-se diferença entre os genótipos, demonstrando que as lagartas ganharam menos peso quando se alimentaram de plantas do gênero *Miscanthus* e *Erianthus* (Tabela 1). No entanto os testes aplicados não demonstraram diferença estatística significativa. Estudos adicionais como a quantificação do ganho de peso em diferentes tempos de herbivoria, a utilização um número maior de repetições e de genótipos testados são necessários para melhorar a qualidade dos resultados deste bioensaio.

**Tabela 1.** Ganho de peso de lagartas de *D. Saccharalis* em diferentes genótipos do Complexo Saccharum.

Genótipo	Ganho de Peso* (%)
<i>Miscanthus</i> sp. Fiji 10	7,54
<i>Saccharum</i> híbrido US 67-22-2	92,72
<i>Saccharum spontaneum</i> US72_1319	48,07
<i>Erianthus arundinaceus</i> Ij76-358	40,05
<i>Erianthus arundinaceus</i> Ij76-358	32,48

\*Média da massa de 4 lagartas alimentando-se por 14 dias em 4 plantas diferentes

## Conclusões

A diferença de perfil metabólico durante a herbivoria mostra que há uma resposta específica da planta no local em que a lagarta utiliza como porta de entrada na planta.

Embora sem significância estatística, as médias de ganho de peso de lagartas de *D. Saccharalis* alimentando-se em diferentes genótipos do Complexo Saccharum foram diferentes.

## Referências

- AGRAWAL A. A.; STRAUSS, S.Y.; STOUT, M. J. Costs of induced responses and tolerance to herbivory in male and female fitness components of wild radish. **Evolution**, v. 53, p. 1093-1104, 1999.
- BAETZ, U.; MARTINOIA, E. Root exudates: the hidden part of plant defense. **Trends in Plant Science**, v. 19, n. 2, p. 90-98, 2014.
- BERGELSON, J.; ROUX, F. Towards identifying genes underlying ecologically relevant traits in *Arabidopsis thaliana*. **Nature Review Genetics**, v.1 1, p. 867-879, 2010.
- CRUZ, C. D. Genes: a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 35, n. 3, p. 271-276, 2013.
- DICKE, M.; LORETO, F. Induced plant volatiles: from genes to climate change. **Trends in plant science**, v. 15, n. 3, p. 115, 2010.
- DUDAREVA, N.; NEGRE, F.; NAGEGOWDA, D. A.; ORLOVA, I. . Plant volatiles: recent advances and future perspectives. **Critical reviews in plant sciences**, v. 25, n. 5, p. 417-440, 2006.
- KESSLER, A.; BALDWIN, I. T. Plant responses to insect herbivory: the emerging molecular analysis. **Annual review of plant biology**, v. 53, n. 1, p. 299-328, 2002.
- NALAM, V. J.; NACHAPPA, P. The role of roots in plant defense responses to aboveground herbivores. In: **ROOT Engineering**. Berlin, Heidelberg: Springer, 2014. p. 369-384.
- PALMGREN, M. G.; EDENBRANDT, A. K.; VEDEL, S.E.; ANDERSEN, M. M.; LANDES, X.; ØSTERBERG, J. T.; FALHOF, J.; OLSEN, L. I.; CHRISTENEN, S. B.; SANDØE, P.; GAMBORG, C.; KAPPEL, K.; THORSEN, B. J.; PAGH, P. Are we ready for back-to-nature crop breeding? **Trends Plant Science**, v. 20, n. 3, p. 155-164, mar. 2015.

RIFFEL, A.; BENISIO FILHO; OLIVEIRA, J.; BIRKETT, M.; ZHOU, J. J.; PICKETT, J.; SANTANA, A. A GENE CODING FOR a putative terpene synthase from sugarcane is induced during diatraea saccharalis infestation. INTERNATIONAL CHEMICAL ECOLOGY CONFERENCE, 2013, Victoria. Abstracts... Victoria, AT: International society of Chemical Ecology, 2013.

SCHOONHOVEN, L. M.; VAN LOON, J. J. A.; DICKE, M. **Insect-Plant Biology**. New York: Oxford University Press, 2005.

STEWART-JONES A.; POPPY, G. M. Comparison of glass vessels and plastic bags for enclosing living plant parts for headspace analysis. **Journal of Chemical Ecology**, v. 32, p. 845-864, 2006.

TURLINGS, T. C.; WÄCKERS, F. Recruitment of predators and parasitoids by herbivore-injured plants. **Advances in insect chemical ecology**, v. 2, p. 21-75, 2004.

VOELCKEL, C.; BALDWIN, I. T. Herbivore-induced plant vaccination. Part II. Array-studies reveal the transience of herbivore-specific transcriptional imprints and a distinct imprint from stress combinations. **Plant Journal**, v. 38, p. 650-663, 2004.



# Teores de prolina em cultivares de girassol

Stela Braga de Araújo<sup>1</sup>, Lizza Adrielle Nascimento Santos<sup>2</sup>, Luciana Marques de Carvalho<sup>3</sup>, Hélio Wilsom Lemos de Carvalho<sup>4</sup>

**Resumo** - Com o objetivo de avaliar o acúmulo de prolina em cultivares de girassol altamente produtivas no Centro-Sul do Brasil, nas condições edafoclimáticas de Sergipe. Para isso, determinou-se o teor de prolina em plantas de onze cultivares de girassol presentes nos ensaios experimentais conduzidos em Frei Paulo, Umbaúba e Nossa Senhora das Dores, no estado de Sergipe, de 2015 a 2017. Em todos os ambientes e anos, as plantas receberam mesmos tratamentos culturais e manejo. Em todos os casos, as folhas foram coletadas no mesmo período, início do florescimento e a prolina foi extraída segundo mesmo protocolo. Maior teor médio de prolina foi encontrado nas condições de Umbaúba, onde o solo oferece impedimento para o aprofundamento radicular. Nessa condição, a cultivar Olisun 3 foi aquela com maior acúmulo de prolina. Em Nossa Senhora das Dores, verificaram-se os menores teores de prolina, sugerindo que as cultivares não investiram muito no acúmulo de prolina nesse ambiente. Em Frei Paulo as cultivares com maior acúmulo de prolina foram Helio 251, BRS 287, as quais se destacaram em dois anos. Conclui-se que as cultivares diferiram entre si significativamente quanto aos teores de prolina, com maior acúmulo nos ambientes com menor disponibilidade de umidade e ou impedimento do solo para o aprofundamento radicular. As cultivares Olisun 3, BRS324 e Helio 250 acumulam mais prolina nas condições edafoclimáticas de Umbaúba, enquanto as cultivares Helio 251 e BRS287 acumulam mais prolina nas condições edafoclimáticas de Frei Paulo e muito pouca prolina é acumulada nas condições de Nossa Senhora das Dores.

**Termos para indexação:** ajuste osmótico, *Helianthus annuus*, tolerância à seca.

## Introdução

O girassol (*Helianthus annuus* L.) é uma oleaginosa anual, que contribui com cerca de 12% da produção mundial de óleo comestível. Proporciona alto rendimento de óleo e também de torta para alimentação animal. É classificado como uma cultura de baixa a média tolerância à seca, embora as necessidades de água desta oleaginosa ainda não estejam claramente definidas (Iqbal et al., 2005). Atualmente, as principais regiões produtoras no país são o Centro-Oeste e o Sul (IBGE, 2018). Entretanto, essa cultura é considerada alternativa promissora para o Nordeste, devido ao ciclo curto (90 a 120 dias) e moderada tolerância à seca.

A escolha da cultivar ou cultivares de girassol mais apropriadas ao cultivo na região é um dos fatores determinantes do sucesso da lavoura e constitui insumo de baixo custo. Estudos disponíveis na literatura indicaram que aquelas mais produtivas em uma dada região, nem sempre são as mais produtivas em ambientes diferentes, o que indica necessidade de avaliações de cultivares no Nordeste antes de se recomendar o cultivo nessa região. Assim, desde 2007 o rendimento em grãos de cultivares de girassol tem sido avaliado em Sergipe em diferentes condições edafoclimáticas.

A disponibilidade hídrica é um dos fatores ambientais que mais afeta o crescimento e produção das plantas. Seus efeitos têm sido ainda mais limitantes no Nordeste do país, onde a distribuição irregular das chuvas e menor volume impõe restrição ao crescimento e desenvolvimento de muitas culturas. Trabalhos recentes tem verificado o acúmulo do aminoácido prolina em plantas de girassol submetidas a déficit hídrico (Cechin et al., 2010; Manivannan et al., 2007; Anjum et al., 2011; Ghaffari et al., 2012). O acúmulo desse aminoácido nas folhas constitui um mecanismo de adaptação que as plantas possuem para tolerarem períodos curtos de seca, possibilitando que a planta mantenha o metabolismo fotossintético em ambientes com deficiência hídrica. Tal fato ocorre devido à parte hidrofóbica do aminoácido ligar-se à parte hidrofóbica das proteínas, aumentando, assim, sua solubilidade e evitando a desnaturação das mesmas, possibilitando assim ajuste osmótico. Por essas razões, a quantificação de prolina é utilizada para avaliar vegetais mais tolerantes à seca. O objetivo deste trabalho foi avaliar o acúmulo de prolina em cultivares de girassol altamente produtivas no Centro-Sul do Brasil, nas condições edafoclimáticas de Sergipe.

## Material e Métodos

Em cultivos de girassol (*Helianthus annuus* L.) conduzidos em três áreas experimentais da Embrapa no estado de Sergipe foram obtidas folhas para a extração e determinação de prolina. As áreas situavam-se nos municípios de Frei Paulo (10°51'S, 37°53'O, 272 m), Nossa Senhora das Dores (10°30'S, 37°13'O, 200 m) e Umbaúba (12° 22'S, 37° 40'O, 109 m) (Tabela 1). Dados de precipitação pluvial de cada ambiente foram obtidos por meio de pluviômetro instalado na área experimental.

<sup>1</sup>Química Industrial, bolsista CNPq da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

<sup>2</sup>Graduanda em Química Ambiental, bolsista CNPq da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE

<sup>3</sup>Bióloga, doutora em Fitotecnia (Produção vegetal), pesquisadora da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

<sup>4</sup>Engenheiro-agrônomo, mestre em Genética e Melhoramento de Plantas, pesquisador da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

**Tabela 1.** Características dos ambientes onde as cultivares de girassol foram avaliadas entre 2015 e 2017.

Características	Frei Paulo	N. S. das Dores	Umbaúba
Latitude	10°51'S	10°30'S	12°22'S
Longitude	37°53'O	37°13'O	37°40'O
Altitude (m)	272	200	109
Clima	BSh	TAs	TAs
Tipo do solo	Cambissolo eutrófico	Latossolo distrófico	Argissolo distrófico

<sup>ab</sup> BSh (Semiárido quente), TAs (Tropical com verão seco), de acordo com classificação Köppen- Geiger

Em todas as áreas de cultivo, as cultivares de girassol em estudo foram semeadas (em junho, no período úmido) e tiveram suas folhas coletadas (em setembro, início da floração) no mesmo período. As cultivares avaliadas foram Aguará 4, Aguará 6, BRS 321, BRS322, BRS323, BRS324, BRS387, CF101, Embrapa 122, Helio250, Helio251e Olisun 3.

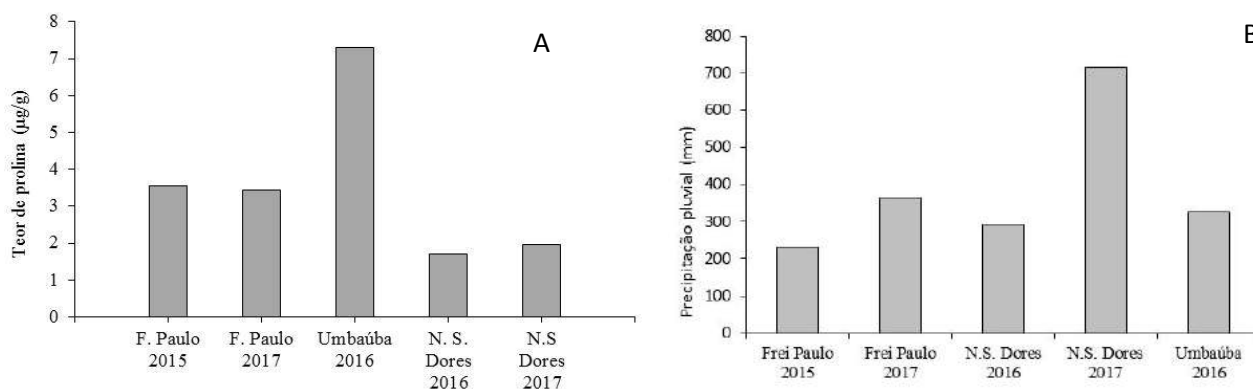
Os ensaios de campo, a partir dos quais foram obtidas as folhas de girassol foram conduzidos em 2015 (em Frei Paulo), em 2016 (em Nossa Senhora das Dores e em Umbaúba) e em 2017 (em Frei Paulo e em Nossa Senhora das Dores) no mês de setembro.

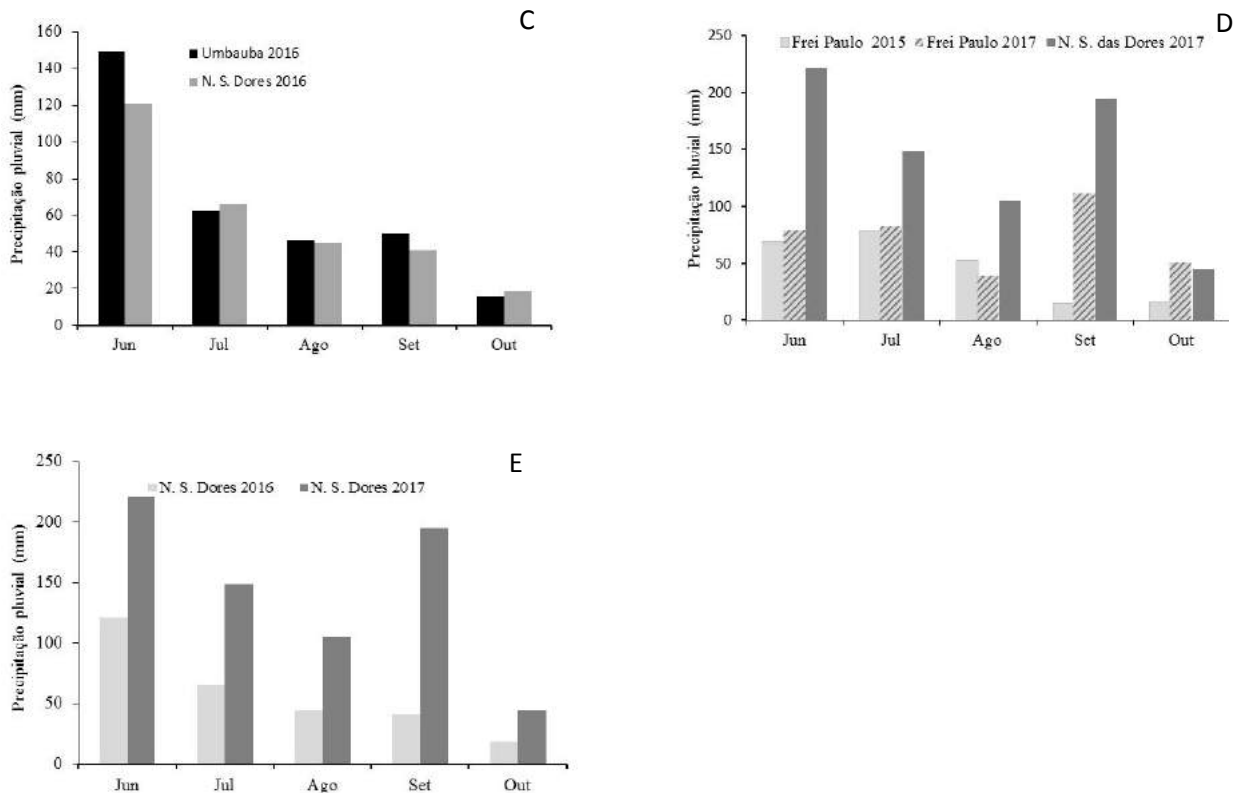
As folhas foram obtidas de três plantas (repetições) de cada uma das onze cultivares de girassol estabelecidas nessas áreas, quando as plantas estavam no estágio R4-R5 (início da floração). De cada planta, duas folhas completamente expandidas foram removidas a partir do 3°-4° nós, contado a partir do ápice, acondicionadas em saco de polipropileno, e armazenadas a -20 °C até realização das análises em laboratório.

O processo de extração foi conduzido em baixa temperatura, com o fim de evitar a degradação enzimática da prolina. Cerca de 1,25 g (definida em testes preliminares) de tecido foliar foi removido a partir da região mediana da folha e utilizada em maceração, na presença de ácido sulfosalicílico a 3%, como solução extrativa. O macerado foi submetido a filtração à vácuo. A extração e determinação do teor de prolina foram feitas de acordo com metodologia proposta por Bates et al. (1973). Cada repetição foi avaliada em duplicata. A concentração de prolina em µg/mL, em cada amostra, foi calculada por meio de equação de regressão, estimada a partir de curva padrão de prolina. Os dados foram tabelados no Excel e submetidos à análise de variância e posteriormente as médias foram comparadas pelo teste Scott Knott a 5%, por meio do programa estatístico Sisvar.

## Resultados e Discussão

Dentre os ambientes avaliados, o teor de prolina foi, em média, maior em Umbaúba e menor em Nossa Senhora das Dores em 2016 (Figura 1). Em Umbaúba, verificou-se também a maior amplitude de variação (1,68 µg/g a 24,03 µg/g). O maior teor de prolina foi encontrado nas plantas da cultivar Olisun (24,03 µg/g), seguida pelas plantas das cultivares Helio 250 e BRS324 (Tabela 2). Considerando que a prolina contribui com o maior ajuste osmótico, um dos mecanismos de tolerância à seca das plantas de girassol, essas cultivares foram aquelas que mais investiram no acúmulo de prolina como estratégia de tolerância a seca nas condições de Umbaúba. Cecchin et al. (2010) e Ghaffari et al. (2012) também determinaram o teor de prolina em folhas de girassol e verificaram diferenças significativas entre as cultivares de girassol. Eles encontraram teores médios de prolina acima de 9 µg/g, entretanto, as plantas foram cultivadas em vaso e foram submetidas a estresses severos.





**Figura 1.** Teor médio de prolina (a) e precipitação pluvial total (b) no período experimental (de junho a outubro) em cada um dos ambientes experimentais (Frei Paulo, 2015 e 2017; Umbaúba, 2016; Nossa Senhora das Dores, 2016 e 2017) e precipitação pluvial mensal em Nossa Senhora das Dores e Umbaúba em 2016 (c), em Nossa Senhora das Dores e Frei Paulo, em 2017, e em Frei Paulo, em 2015 (d), em Nossa Senhora das Dores, em 2016 e 2017 (e).

**Tabela 2.** Média do teor de prolina foliar de onze cultivares de girassol (*Helianthus annuus* L.) crescidas nos municípios de Frei Paulo, Umbaúba e Nossa Senhora das Dores, SE. 2105, 2016 e 2017.

Cultivares	Frei Paulo		N. S. das Dores		Umbaúba
	2015	2017	2016	2017	2016
AGUARA4	2,00d	3,47b	1,29c	3,86a	1,68d
AGUARA6	3,67c	5,00a	3,25a	2,31b	2,53
BRS321	2,67c	2,00b	1,28c	1,59c	2,89
BRS322	2,00d	3,00b	1,1c	1,78c	2,96
BRS323	2,00d	3,33b	1,46c	1,04d	2,04
BRS324	3,00c	3,00b	1,72b	1,69c	15,81
BRS287	5,00b	4,00a	1,71b	1,9c	3,54
CF101	3,33c	4,00a	1,78b	2,28b	3,76
HELIO250	7,33a	3,00b	1,869b	1,97c	11,21
HELIO251	4,33b	4,00a	2,16b	1,24d	1,97
OLISUN3	2,67c	3,00b	1,36c	1,76c	24,03
Média	3,54	3,45	1,71B	1,95A	7,30
C.V. (%)	13,2%	11,1%	15,5%	10,8%	14,22

<sup>ab, c e ns</sup> Significativos a 1% e 5% de probabilidade pelo teste F. As médias seguidas pelas mesmas letras minúscula, nas colunas, não diferem entre si pelo teste Scott-Knott.

Nas condições de Frei Paulo, o teor médio de prolina acumulado pelas plantas em 2015 e 2017 foi inferior a Umbaúba, mas muito similar entre os anos (Figura 1). As cultivares de girassol com maior acúmulo foram Helio 250 (em 2015), BRS 287 (em 2015 e 2017), Helio 251 (em 2015 e 2017), Aguará 6 e CF 101 (2017). Em Nossa Senhora das Dores, onde se encontraram as plantas com menos prolina nas folhas, maior teor foi determinado nas cultivares Aguará 6 (2016 e 2017), CF101 (2016 e 2017), Aguará 4 (em 2017), BRS 287, Helio 250 e Helio 251 (em 2016).

Considerando que as cultivares avaliadas em todos os ambientes e anos foram as mesmas e os plantios foram conduzidos da mesma forma, a diferença no acúmulo de prolina entre as áreas de cultivo pode ser atribuída às condições ambientais. Em 2016, o volume total de precipitação pluvial foi similar em Umbaúba e em Nossa Senhora das Dores (Figura 1 b). A distribuição das chuvas de junho a outubro também foi similar nesses dois ambientes (Figura 1 c), com menos de 60 de chuva nos meses de julho a outubro. Entretanto, as duas áreas diferem quanto ao tipo de solo (Tabela 1). Em Umbaúba, há um Argissolo distrofico com horizonte coeso a cerca de 20 cm, o qual pode restringir o crescimento radicular, especialmente quando seco (Gomes et al. 2017). Sugere-se que em Umbaúba, as plantas de girassol encontraram restrição para o crescimento radicular e, portanto, não puderam aprofundar raízes para buscar água nas camadas mais profundas do solo, e então investiram mais no acúmulo de prolina, como estratégia de tolerância à seca. Em Nossa Senhora das Dores, em contraste, as cultivares de girassol investiram menos no acúmulo de prolina. Sugere-se que isso se relaciona com a falta de restrição ao crescimento radicular e, portanto menor necessidade de investir no acúmulo de prolina e ajuste osmótico.

O volume total de precipitação pluvial em Frei Paulo nos anos de 2015 e 2017 foi similar (Figura 1 b). Isto explica porque também não foi verificada diferença significativa entre os acúmulos de prolina nos anos de 2015 e 2017 em Frei Paulo (Tabela 2). Entretanto, as cultivares com maiores acúmulos de prolina em 2015 não foram as mesmas em 2017. Sugere-se que essa diferença está relacionada com as diferenças na distribuição de chuvas em setembro- outubro (Figura 1d). Por outro lado, a distribuição e volume total de precipitação pluvial em Nossa Senhora das Dores nos anos 2016 e 2017 foram bem diferentes. Entretanto, isso não se refletiu no acúmulo de prolina nas folhas de girassol. Sugere-se que especialmente no ano mais seco, 2016, outras estratégias, como o aprofundamento radicular, tenham sido utilizadas pelas plantas, que dessa forma não necessitaram investir no acúmulo de prolina.

## Conclusão

As cultivares de girassol diferem quanto ao acúmulo de prolina, o qual também varia em função do ambiente de cultivo. Maior acúmulo nas folhas é encontrado nos ambientes com menor disponibilidade de umidade para as plantas, podendo ser decorrente de impedimento para o aprofundamento de raízes associado a baixa pluviosidade.

As cultivares Olisun 3, BRS324 e Helio 250 acumulam mais prolina nas condições edafoclimáticas de Umbaúba, enquanto as cultivares Helio 250, Helio 251 e BRS287 acumulam mais prolina nas condições edafoclimáticas de Frei Paulo.

## Referências

- ANJUM, S. A.; XIE, X. Y.; WANG, L. C.; SALEEM, M. F.; MAN, C.; LEI, W. Morphological, physiological and biochemical responses of plants to drought stress. **African Journal of Agricultural Research**, v. 4, p. 2026-32, 2011.
- BATES, L. S.; WALDRAN, R. P.; TEARE, I. D. Rapid determination of free proline for water stress studies. **Plant Soil**, v. 39, p. 205-208, 1973.
- CECHIN, I.; CORNIANI, N.; FUMIS T. D.; CATANEO, A. C. Differential responses between mature and young leaves of sunflower plants to oxidative stress caused by water deficit. **Revista Ciência Rural**, v. 40, p. 1290-1294, 2010.
- GHAFFARI, M.; TOORCHI, M.; VALIZADEH, M.; SHAKIBA, M. Morpho-physiological screening of sunflower inbred lines under drought stress condition. **Turkish Journal of Field Crops**, v. 17, p. 185-190, 2012.
- GOMES, J. B. V.; ARAÚJO FILHO, J. C.; VIDAL-TORRADO, P.; COOPER, M.; SILVA, E. A.; CURI, N. Cemented Horizons and Hardpans in the Coastal Tablelands of Northeastern Brazil. **Revista Brasileira de Ciência de Solo**, v. 41, p. e0150453, 2017.
- IBGE. **Produção Agrícola Municipal**. 2018. Disponível em: <www.sidra.ibge.gov.br/bda/pesquisa>. Acesso em: mar. 2018.
- IQBAL, N.; ASHRAF, M. Y.; ASHRAF, M. Influence of water stress and exogenous glycinebetaine on sunflower achene weight and oil percentage. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 1, p. 155, 2005.
- MANIVANNAN, P.; JALEEL, C. A.; SANKAR, B.; KISHOREKUMAR, A.; SOMASUNDARAM, R.; LAKSHMANAN, G. A.;
- PANNEERSELVAM, R. Growth, biochemical modifications and proline metabolism in *Helianthus annuus* L. as induced by drought stress. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 1, p. 41-9, 2007.

# Avaliação da precocidade sexual e determinação do melhor momento para separação pelo sexo no manejo reprodutivo de cordeiros portadores da genética *FecG<sup>E</sup>*

Islan Dantas Menezes Dias<sup>1</sup>, Clêrton Magno Rocha Santana Pereira<sup>2</sup>, Maiana Silva Chaves<sup>3</sup>, Davi Andrade Oliveira<sup>4</sup>, Samuel Rezende Paiva<sup>5</sup>, Alexandre Rodrigues Caetano<sup>6</sup>, Alexandre Nizio Maria<sup>7</sup>, Valdir Ribeiro Junior<sup>8</sup>, Hymerson Costa Azevedo<sup>9</sup>

**Resumo** - Estudos sobre a puberdade e maturidade sexual são essenciais para a determinação da idade de separação de cordeiros pelo sexo, entretanto, têm sido escassos, especialmente naqueles portadores de mutações prolíficas a exemplo da *FecG<sup>E</sup>*. Objetivou-se avaliar o efeito da mutação *FecG<sup>E</sup>* sobre a puberdade e maturidade sexual de cordeiros Santa Inês criados no Agreste de Sergipe e determinar a idade para separação dos animais pelo sexo no manejo reprodutivo. Foram utilizados 36 cordeiros, pesados e avaliados andrológicamente (motilidade espermática – MOT; concentração espermática – CON; Defeitos Maiores e Totais – DMA e DT) a cada 15 dias para determinação da puberdade (MOT  $\geq$  10%, CON  $\geq$  50 x 10<sup>6</sup> spz/mL e DT  $\leq$  50%) e maturidade sexual (MOT  $\geq$  50%, DMA  $\leq$  15%, DT  $\leq$  30% e CON  $\geq$  1000 x 10<sup>6</sup> spz/mL). A idade máxima para separação pelo sexo foi estabelecida como sendo a média de idade menos o desvio padrão em que os animais apresentaram espermatozoides no ejaculado. Os dados foram avaliados através da análise de covariância com medidas repetidas no tempo, considerando o peso ao nascimento como covariável e, foi aplicado o pós-teste de Duncan a 95% de significância. Não foram observadas diferenças significativas entre os genótipos, a mutação *FecG<sup>E</sup>* não influenciou nos parâmetros utilizados para determinar a puberdade e maturidade, observando-se que os cordeiros atingiram a puberdade em média aos 187 dias de idade com valores médios de: MOT – 62,45%; CON – 714,82 x 10<sup>6</sup> spz/mL; DT – 42,57 %. A maturidade foi alcançada em média aos 230 dias de idade com os cordeiros apresentando valores médios de: MOT – 69,48%; CON – 1.225,77 x 10<sup>6</sup> spz/mL; DMA – 0,20%; DT – 10,97%. Conclui-se que a mutação *FecG<sup>E</sup>* não afeta a puberdade e maturidade sexual dos cordeiros Santa Inês criados na região Agreste do estado de Sergipe. Não há necessidade de recomendação específica de idade para a separação dos cordeiros pelo sexo no manejo reprodutivo dos rebanhos mutantes que, em geral, deve ser de no máximo 112 dias de idade.

**Termos para indexação:** GDF-9, maturidade, mutação, polimorfismo, puberdade, Santa Inês.

## Introdução

A ovinocultura tem se destacado cada vez mais como importante fonte de renda para produtores. Neste sistema de produção, a eficiência reprodutiva é um dos principais fatores limitantes da lucratividade e, o conhecimento da influência dos fatores ambientais e genéticos é um passo importante para melhorar a produtividade dessa espécie (Rekwot et al., 2001). A separação de cordeiros pelo sexo é uma prática de manejo reprodutivo importante para os rebanhos, pois permite ao produtor, direcionar os cruzamentos entre os animais decidindo que genes serão propagados, controlar a consanguinidade e a disseminação de doenças e, evitar que as fêmeas prejudiquem seu desenvolvimento ponderal em detrimento de uma gestação precoce.

Machos sexualmente precoces iniciam antecipadamente sua atividade reprodutiva e, conseqüentemente, têm um maior tempo de vida útil como reprodutor. A utilização desses animais diminui o intervalo entre gerações dos rebanhos com redução dos custos de produção e alcance mais rápido de benefícios do melhoramento genético, sendo fundamental o conhecimento da idade em que estes animais atingem a puberdade (Souza et al., 2003) e a maturidade sexual.

Os machos são os principais difusores da genética no rebanho e a seleção de cordeiros mais produtivos e adaptados às condições ambientais locais é essencial no manejo reprodutivo, potencializando os programas de melhoramento genético a fim de atender as demandas dos produtores e mercado consumidor (Mcmanus et al., 2010). A utilização de bioferramentas nos programas de melhoramento genético, a exemplo das técnicas moleculares, como os marcadores e sequenciamento gênico, permite identificar e caracterizar genes e suas mutações com fenótipos relevantes na produção e reprodução animal (Milazzotto et al., 2008).

<sup>1</sup>Graduando em Medicina Veterinária, bolsista Fapitec/SE/PIBIC, Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

<sup>2</sup>Médico Veterinário, Técnico Administrativo da Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, SE.

<sup>3</sup>Médica Veterinária, mestre em Sanidade e Reprodução de Ruminantes, bolsista CAPES, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE.

<sup>4</sup>Médico Veterinário, bolsista Capes/Fapitec/SE, Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, SE.

<sup>5</sup>Biólogo, doutor em Genética e Melhoramento, pesquisador da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF.

<sup>6</sup>Zootecnista, doutor em Genética, pesquisador da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF.

<sup>7</sup>Zootecnista, Doutor em Zootecnia, pesquisador da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

<sup>8</sup>Zootecnista, doutor em Zootecnia, Professor Adjunto da Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, SE.

<sup>9</sup>Médico Veterinário, doutor em Reprodução Animal, pesquisador da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

Em ovelhas Santa Inês, um polimorfismo de nucleotídeo simples (SNP) no éxon 2 do gene do Fator de Diferenciação e Crescimento-9 (GDF-9), foi descoberto e nomeado como *FecG<sup>E</sup>*, apresentando um efeito aditivo na taxa de ovulação (82%) e prolificidade (50%) em homozigotas (Silva et al., 2011). Contudo, ainda não se sabe os efeitos desta mutação sobre a reprodução dos machos ovinos principalmente em relação à sua puberdade e maturidade sexual.

A caracterização da puberdade e maturidade sexual de cordeiros Santa Inês portadores da *FecG<sup>E</sup>* permite avaliar os efeitos desta mutação sobre a fisiologia dos machos e determinar o melhor momento para separação pelo sexo no manejo reprodutivo dos rebanhos mutantes, a fim de auxiliar as atividades de conservação e melhoramento genético da espécie ovina.

Este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da mutação *FecG<sup>E</sup>* sobre a puberdade e maturidade sexual de machos ovinos da raça Santa Inês e determinar a idade para separação de cordeiros pelo sexo em rebanhos de animais portadores desta genética criados em sistema semi-intensivo de produção de carne na sub-região do Agreste de Sergipe.

## Material e Métodos

Os procedimentos experimentais envolvendo os animais foram aprovados na Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Embrapa Tabuleiros Costeiros (protocolo: 06122016.0014) e executados entre dezembro de 2016 e novembro de 2017. O manejo e as atividades diretamente relacionadas aos animais foram realizados no Campo Experimental Pedro Arle (CEPA) da Embrapa Tabuleiros Costeiros, localizado no município de Frei Paulo, Agreste do estado de Sergipe, Brasil (Latitude: 10°36'08" Sul e Longitude: 37°38'29" Oeste).

Foram utilizados 36 cordeiros contemporâneos confinados até  $239 \pm 11,2$  ( $\bar{X} \pm S$   $\sigma$ ) dias de idade com dieta à base de silagem de milho (15% de peso corporal) e concentrado de milho e soja com 18% de proteína bruta (PB) livre (0,6% de peso corporal), com mistura mineral comercial própria para ovinos e água *ad libitum*. Entre  $239 \pm 11,2$  e  $427 \pm 11,2$  dias de idade, os cordeiros foram submetidos a manejo semi-intensivo quando passaram a ter acesso a pastagens compostas por *Panicum maximum* cultivar Green Panic e Aruana e a serem confinados à noite para receber a mesma dieta à base de silagem e concentrado, além de mineralização.

Os cordeiros foram genotipados para *FecG<sup>E</sup>* no laboratório de genética animal da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília/ DF, Brasil, a partir de amostras de sangue (5 mL) colhidas através da punção da veia jugular dos cordeiros em tubos contendo EDTA, as quais foram refrigeradas a -20°C até a extração do DNA (Araujo et al., 2009) com posterior sequenciamento de Sanger (Lacerda et al., 2016). Baseando-se no resultado da genotipagem, os cordeiros foram divididos em grupos genótipos: *FecG<sup>+/+</sup>* (Homozigoto não mutante, n=7); *FecG<sup>+/E</sup>* (Heterozigoto mutante, n=11) e; *FecG<sup>E/E</sup>* (Homozigoto mutante, n=18).

A cada quinze dias durante os 11 meses do experimento foram realizados pesagens por meio de balança digital (Toledo MGR-CAMPO®, São Bernardo do Campo, Brasil) e exames andrológicos por meio de biometrias testiculares e análises seminais e espermáticas. Com auxílio de paquímetro, a altura (AT) e largura (LT) de cada testículo foram mensuradas nas posições dorsoventral e lateromedial, respectivamente e, utilizando-se de fita métrica, a circunferência escrotal (CE) foi medida na altura da curvatura maior dos testículos (Pacheco et al., 2009). Do testículo direito e esquerdo foram obtidos seus respectivos volumes (VT) a partir da fórmula:  $VT = 2 \left[ \frac{4}{3} \pi \left( \frac{LT}{2} \right)^2 \left( \frac{AT}{2} \right) \right]$  sendo  $\pi = 3,1416$  (Bailey et al., 1998).

A coleta do sêmen foi feita com auxílio de eletroejaculador (TK 800®, Uberaba, Brasil), primeiramente esvaziando-se a ampola retal dos animais, que foram contidos em decúbito lateral e, submetidos à sonda lubrificada com gel à base de carboximetilcelulose, a qual foi introduzida no reto posicionando-se os eletrodos ventralmente e aplicando-se 6 estímulos elétricos de baixa voltagem (8V) com duração de 6 segundos e intervalo de 6 a 10 segundos (Damián et al., 2011).

As amostras de sêmen foram avaliadas e tiveram o volume seminal (VS) determinado através de pipeta de precisão. A cinética espermática foi avaliada subjetivamente colocando-se uma gota de sêmen puro ou diluído em solução de X-Cell® (IMV, L'Aigle, França), a depender da concentração aparente de espermatozoides na amostra colhida. Utilizando-se microscópio ótico (100 a 400x) foram mensurados, a motilidade espermática (MOT – 0 a 100%) e, o vigor espermático (VigE – 1 a 5) (Henry et al., 2013).

A análise de concentração espermática (CON) foi realizada adicionando-se uma alíquota de sêmen à água ultrapura (Milli-Q®, Merck, Darmstadt, Alemanha) na proporção de 1:400 e mensuração em câmara de Neubauer sob microscópio ótico (400x). O número total de espermatozoides (NTE) da amostra seminal foi determinado a partir da multiplicação do VS pela CON.

A morfologia dos espermatozoides foi avaliada transferindo-se 10  $\mu$ L da amostra seminal para 500  $\mu$ L de tampão fosfato-salino com glutaraldeído a 0,2% aquecidos a 37 °C. A partir de uma alíquota desta mistura, 200 espermatozoides foram analisados por meio de microscópio de contraste de fase, sob óleo de imersão (1000x) e, classificados com defeitos maiores (DMA) e menores (DME). Através da soma dos DMA e DME obteve-se o número de espermatozoides com defeitos totais – DT (Henry et al., 2013).

A viabilidade dos espermatozoides (VE) foi avaliada misturando-se alíquotas de sêmen em corante eosina-nigrosina (1:1 à 1:3), que permaneceram sob incubação à 37 °C por um minuto antes da confecção do esfregaço. A lâmina foi seca com soprador para posterior contagem de 200 espermatozoides por amostra em microscópio ótico (400x) sendo considerados espermatozoides com membrana plasmática intacta aqueles que apresentavam cabeça não corada de rosa pela eosina.

A funcionalidade da membrana plasmática (FMP) foi avaliada por meio do teste hiposmótico (HOST) diluindo-se 10 µL de sêmen em 100 µL de água ultrapura (0 mM) e incubando-se (37 °C/5') e fixando-se a mistura em 10 µL de solução de formol salino tamponado (Menezes et al., 2013). Sob microscópio de contraste de fase (1000x), contou-se 200 espermatozoides sendo considerados reativos ao HOST aqueles com cauda dobrada. Calculou-se o percentual de espermatozoides com membrana plasmática funcional subtraindo-se, do total daqueles reativos ao HOST, os que apresentaram cauda dobrada na análise da morfologia espermática.

Os animais foram considerados púberes quando o ejaculado apresentava espermatozoides com  $MOT \geq 10\%$ ,  $CON \geq 50 \times 10^6$  spz/mL (Pacheco et al., 2009) e  $DT \leq 50\%$  (Avellaneda et al., 2006). A maturidade sexual por sua vez foi determinada a partir do momento em que os cordeiros apresentaram ejaculado com  $MOT \geq 50\%$  (Garcia et al., 1987),  $DMA \leq 15\%$  e  $DT \leq 30\%$  (Lopes et al., 2013) e,  $CON \geq 1000 \times 10^6$  spz/mL de sêmen (Henry et al., 2013). A recomendação da idade máxima para separação pelo sexo dos cordeiros no manejo reprodutivo foi estabelecida como sendo a média de idade menos o desvio padrão em que os animais apresentaram espermatozoides no ejaculado independente da sua quantidade e qualidade.

Os genótipos *FecG<sup>E</sup>* foram considerados como efeitos principais (variáveis independentes) na análise dos dados. As variáveis dependentes (pesagens e avaliações andrológicas) foram submetidas ao teste de *Saphiro-Wilk* para verificação do pré-requisito de normalidade da distribuição. As variáveis que não apresentaram distribuição normal tiveram seus dados transformados, utilizando-se a metodologia de Box e Cox (1964). Após verificação dos pré-requisitos, o peso ao nascimento foi adotado como covariável na análise de covariância (ANCOVA) aplicada com arranjo de medidas repetidas no tempo, ao nível de 5% de probabilidade, utilizando-se o PROC GLM, onde cada coleta foi considerada como medida repetida, utilizando o comando REPEATED. Médias entre tratamentos foram comparadas pelo teste de *Duncan* ao nível de 5% de probabilidade. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o pacote estatístico SAS (SAS Institute, Inc., 2010), sendo os resultados expressos em média e erro padrão.

## Resultados e Discussão

O manejo de separação dos cordeiros pelo sexo no rebanho é uma prática utilizada para evitar prenhez indesejada. Assim, deve-se realizar a separação dos cordeiros em grupos de machos e fêmeas antes do aparecimento de espermatozoides no ejaculado dos cordeiros independente de sua quantidade e qualidade e, consequentemente, seu potencial fertilizante. No presente trabalho, foram identificados espermatozoides no ejaculado dos cordeiros em média aos 133 dias de idade com desvio padrão de 21,17 dias.

Os genótipos não influenciaram nenhum parâmetro durante todo o período experimental e não tiveram influência sobre a idade à puberdade dos cordeiros que ocorreu em média aos 187 dias, apresentando os seguintes valores para os parâmetros avaliados: Peso corporal – 37,26 kg; VTd – 68,98 mm; VTe – 68,68 mm; CE – 241,59 mm; VS – 718,37 µL; MOT – 62,45%; VigE – 2,62;  $CON - 714,82 \times 10^6$  spz/mL; NTE –  $54,14 \times 10^6$  spz; DMA – 13,45%; DMe – 29,11%; DT – 42,57%; VE – 79,33%, FMP – 18,50%. Utilizando alguns parâmetros semelhantes ao deste trabalho para determinar a puberdade, Pacheco et al. (2009) relataram que cordeiros Santa Inês, manejados no Sul do Espírito Santo, tornaram-se púberes com uma idade média mais tardia (210 dias) e apresentaram qualidade seminal inferior: MOT – 37,71% e DT – 47,20%. Já Souza et al. (2003) identificaram idade semelhante (181 dias) à puberdade de ovinos Santa Inês criados no estado do Ceará, utilizando apenas os critérios de concentração ( $\geq 50 \times 10^6$  spz/mL) e motilidade espermática ( $\geq 10\%$ ) para sua determinação, cujos valores foram de  $70,00 \times 10^6$  spz/mL e 43,57%, respectivamente.

Embora a puberdade tenha sido atingida aos 187 dias, o cordeiro só deverá ser utilizado na sua plenitude como reprodutor após atingir a maturidade sexual (González, 2002) quando atinge um nível satisfatório de sua capacidade reprodutiva. Nesse estágio reprodutivo, os carneiros servirão um maior número de ovelhas em um curto período de tempo, aumentando a pressão de seleção e a disseminação do material genético desejável (Pacheco; Quirino, 2010). Nos cordeiros Santa Inês deste trabalho, a maturidade sexual ocorreu em média aos 230 dias de idade sem influência do genótipo, apresentando os seguintes valores para os parâmetros avaliados: Peso corporal – 47,79 kg; VTd – 130,46 mm; VTe – 123,63 mm; CE – 278,09 mm; VS – 1370,29 µL; MOT – 69,48%; VigE – 3,39;  $CON - 1.225,77 \times 10^6$  spz/mL; NTE –  $1.654,60 \times 10^6$  spz; DMA – 0,20%; DMe – 10,77%; DT – 10,97%; VE – 84,19%; FMP – 29,97%.

A idade à maturidade sexual obtida neste trabalho diferiu do que Souza et al. (2010) definiram como idade em que cordeiros Santa Inês se apresentavam aptos à reprodução. Os referidos autores relataram que os animais atingiram esta condição em média aos 308 dias de idade quando apresentavam ejaculados com concentração espermática mínima de  $1000 \times 10^6$  spz/mL. Considerando-se as recomendações do CBRA, os cordeiros utilizados neste trabalho seriam considerados como aptos à reprodução aos 427 dias de idade, especialmente em consequência da CE mínima de 30 cm.

## Conclusões

Conclui-se que a mutação *FecG<sup>E</sup>* não afeta a puberdade e maturidade sexual dos cordeiros Santa Inês criados na região Agreste do estado de Sergipe. Não há necessidade de recomendação específica de idade para a separação dos cordeiros pelo sexo no manejo reprodutivo dos rebanhos mutantes que, em geral, deve ser de no máximo 112 dias de idade.

## Agradecimentos

Este estudo foi financiado em parte pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Brasil (CNPq), Fundação de Apoio à Pesquisa e a Inovação Tecnológica do Estado de Sergipe (Fapitec/SE) - Brasil, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (Capes - Código 001), e Financiadora de Estudos e Projetos - Brasil (Finep).

## Referências

ARAUJO, F. R.; RAMOS, C. A. do N.; LUÍZ, H. L.; PÉRES, I. A. H. F. S.; OLIVEIRA, R. H. M. de; SOUZA, I. I. F. de; RUSSI, L. dos S. **Avaliação de um protocolo de extração de DNA genômico a partir de sangue total**. Comunicado Técnico (INFOTEC-E). Disponível em: < <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/handle/doc/85336> >. Acesso em: 27 jun. 2016.

AVELLANEDA, Y.; RODRÍGUEZ, F.; GRAJALES, H.; MARTÍNEZ, R.; VASQUEZ, R. Determinación de la pubertad en corderos en el trópico alto colombiano por características corporales, calidad del eyaculado y valoración de testosterona. **Livestock Research for Rural Development**, v. 18, p. 138, 2006.

BAILEY, T. L.; HUDSON, L.R.S; POWE, T.A; RIDDELL Z.M.G; WOLFE D.F; CARSON R.L. Caliper and ultrasonographic measurements of bovine testicles and a mathematical formula for determining testicular volume and weight *in vivo*. **Theriogenology**, v. 49, p. 581-594, 1998.

DAMIÁN, J. P.; UNGERFELD, R. The stress response of frequently electroejaculated rams to electroejaculation: hormonal, physiological, biochemical, haematological and behavioural parameters. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 46, n. 4, p.646–50, 2011.

GARCIA, J. M.; PINHEIRO, L. E. L.; OKUDA, H. T. Body development and semen physical and morphological characteristics of young Guzera bulls. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 3, n. 1, p. 47–53, 1987.

GONZÁLEZ, F. H. D. **Introdução a Endocrinologia Reprodutiva Veterinária**. Copyright. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. (Faculdade de Veterinária) 2002, p. 87

HENRY, M.; NEVES, J. P.; JOBIM, M. I. M. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. Ed.3. Belo Horizonte: CBRA, p. 104, 2013.

LACERDA, T. S. A.; CAETANO, A.R.; FACÓ, O.; FARIA, D.A.; McMANUS, C. M.; LÔBO, R. N.; SILVA, K. M.; PAIVA, S. R. Single marker assisted selection in Brazilian Morada Nova hair sheep community-based breeding program. **Small Ruminant Research**, v. 139, p. 15–19, 2016.

LOPES, F.G.; KOETZ JUNIOR, C.; BARCA JÚNIOR, F. A; OKANO, W.; da SILVA, L. C.; da SILVA JÚNIOR, M. A. G. Maturidade sexual e classificação andrológica por pontos (CAP) em touros jovens da raça nelore puros de origem (PO). **Bioscience Journal**, v. 29, n. 1, 2013.

McMANUS C.; PAIVA, S. R.; ARAÚJO, R. O. Genetics and breeding of sheep in Brazil. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, p. 236-246, 2010.

MENEZES, G.F.O.; BITTENCOURT, R. F.; RIBEIRO FILHO, A. L.; CHALHOUB, M. F. B.; OBA, E.; BICUDO, D. S. Utilização do choque osmótico na avaliação da viabilidade de sêmen criopreservado de ovinos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.50, p. 396-405, 2013.

MILAZZOTTO, M. P.; VISINTIN, J. A. Biotecnologias da reprodução animal-biologia molecular aplicada à biotecnologia. **Ciência Veterinária nos Trópicos**, v. 11, p. 145-148, 2008.

PACHECO, A.; OLIVEIRA, A. F. M.; QUIRINO, C. R.; LANDIM, A. V. Características seminais de carneiros da raça Santa Inês na pré-puberdade, puberdade e na pós-puberdade. **Ars Veterinária**, v. 25, n. 2, p. 90-99, 2009.

PACHECO, A.; QUIRINO C.R. Comportamento sexual em ovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.34, n.2, p.87-97, 2010.



REKWOT, P. I.; OGWU, D.; OYEDIPE, E. O.; SEKONI, V.O. The role of pheromones and biostimulation in animal reproduction. **Animal Reproduction Science**, v.65, p.157-170, 2001.

SAS INSTITUTE; SAS PUBLISHING. **SAS/IML Studio 3.3 for SAS/STAT Users**. SAS institute, 2010.

SILVA, B. D. M.; CASTRO, E. A.; SOUZA, C. J.; PAIVA, S. R.; SARTORI, R.; FRANCO M. M.; AZEVEDO, H. C.; SILVA, T. A.; VIEIRA, A. M.; NEVES, J. P.; MELO, E. O. A new polymorphism in the Growth and Differentiation Factor 9 (GDF9) gene is associated with increased ovulation rate and prolificacy in homozygous sheep. **Animal Genetics**, v. 42, n. 1, p. 89–92, 2011.

SOUZA, C. E. A.; MOURA, A. A.; ARAÚJO A. A.; LIMA, A. C. B. Estudo das interações entre o desenvolvimento gonadal, produção espermática, concentrações de testosterona e aspectos ligados à puberdade em carneiros Santa Inês ao longo do primeiro ano de vida. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.27, n.2, p.199-201, 2003.

SOUZA, C. E. A.; ARAÚJO A. A.; OLIVEIRA, J. T. A.; LIMA SOUZA, A .C.; NEIVA, J. N. M.; MOURA, A. A. Reproductive development of Santa Inês rams during the first year of life: body and testis growth, testosterone concentrations, sperm parameters, age at puberty and seminal plasma proteins. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 45, p. 644–653, 2010.

# Ocorrência e caracterização de folículos multioócitos em ovelhas portadoras da genética prolífica $FecG^E$

Michele Pereira da Silva<sup>1</sup>, Maiana Silva Chaves<sup>2</sup>, Valesca Barreto Luz<sup>3</sup>, Eduardo de Oliveira Melo<sup>4</sup>,  
Samuel Rezende Paiva<sup>5</sup>, Hymerson Costa Azevedo<sup>6</sup>

**Resumo** - Os folículos multioócitos são relatados em muitas espécies de mamíferos, porém são escassos os trabalhos que descrevem sua ocorrência e características em ovelhas em especial daquelas portadoras de mutações gênicas a exemplo da  $FecG^E$  que aumenta a taxa de ovulação. O objetivo desse trabalho foi caracterizar morfolologicamente os folículos multioócitos e associar sua ocorrência e características à variante genética prolífica  $FecG^E$  em ovelhas Santa Inês. As ovelhas foram genotipadas para a  $FecG^E$  e divididas em três grupos genótipos: 19 homozigotas não mutantes ( $FecG^{+/+}$ ), 27 heterozigotas ( $FecG^{+/E}$ ) e 11 homozigotas ( $FecG^{E/E}$ ) mutantes. Os ovários das ovelhas foram coletados e destinados para processamento histológico, a fim de realizar a identificação, classificação quanto ao estágio de desenvolvimento e quantidade de oócitos inclusos, viabilidade folicular e, a análise morfométrica dos folículos e, dos oócitos, núcleos e nucléolos dos multioócitos. As médias obtidas em cada variável analisada foram submetidas à ANOVA ou *Kruskal-Wallis* a depender de sua normalidade e homocedasticidade com pós-teste de *Tukey* ou *Dunn*, respectivamente, e as frequências analisadas pelo teste Qui-quadrado, considerando-se 5% como nível de significância. Não foi observada diferença na frequência de multioócitos entre os genótipos:  $FecG^{E/E}$  (3,5%),  $FecG^{+/E}$  (3,3%) e  $FecG^{+/+}$  (3,0%). Houve uma maior viabilidade dos multioócitos de transição nas fêmeas  $FecG^{E/E}$  (95,0%) e  $FecG^{+/E}$  (90,9%) em relação a  $FecG^{+/+}$  (73,3%). O diâmetro oocitário dos folículos de transição bioócitos de ovelhas portadoras da mutação foi maior que aquele das não mutantes:  $FecG^{E/E}$  (18,4  $\mu$ m);  $FecG^{+/E}$  (16,7  $\mu$ m) e;  $FecG^{+/+}$  (13,9  $\mu$ m). Os folículos multioócitos são verificados em ovelhas da raça Santa Inês e sua frequência não é afetada pela mutação  $FecG^E$ , porém as ovelhas mutantes possuem folículos de transição com maior viabilidade e oócitos com maior diâmetro.

**Termos para indexação:** GDF-9, mutação, oócito, ovino, polioócito, prolificidade.

## Introdução

A ovinocultura contribui com a geração de renda e possibilita a fixação do homem em áreas rurais com diferentes condições edafoclimáticas. Para que essa atividade se torne mais rentável, a melhoria do desempenho reprodutivo dos animais é fundamental, considerando que este fator é limitante para a sua lucratividade (Morais, 2011). Programas de melhoramento genético vêm possibilitando aumentar a frequência de mutações gênicas responsáveis por fenótipos de interesse produtivo, a exemplo do aumento da prolificidade (Milazzotto et al., 2008). Em ovelhas Santa Inês, no gene Fator de Crescimento e Diferenciação- 9 (*Growth Differentiation Factor- 9*, GDF-9), que codifica a proteína de mesmo nome, foi descoberta uma mutação nomeada *Fecundity Gene* - Embrapa ( $FecG^E$ ), responsável por um efeito aditivo na taxa de ovulação (82%) e prolificidade (58%) em homozigose (Silva et al., 2011; Azevedo et al., 2015).

A taxa de ovulação está relacionada com a quantidade de oócitos aptos a serem ovulados por ciclo estral de uma fêmea, sendo normalmente observado que cada gameta está envolvido por células somáticas formando um folículo, o qual lhe disponibiliza um ambiente favorável para sua maturação e posterior fertilização (Hafez; Hafez, 2004). Apesar dessa morfofisiologia característica, trabalhos relatam a ocorrência de folículos contendo mais de um oócito, denominados multioócitos, oriundos de uma incompleta separação das células germinativas no início da foliculogênese ou induzidos por altos níveis de estrógeno durante o desenvolvimento neonatal (Kipp et al., 2007; Tingen et al., 2009).

Os multioócitos estão presentes em muitas espécies de mamíferos, com frequência variável dentro e entre as espécies e, produzindo mais estradiol quando comparados a folículos unioocitários (Payan-Carreira; Pires, 2008; Stankiewicz et al., 2009; Reynaud et al., 2010). Os oócitos dos folículos multioócitos têm uma menor taxa de fertilização in vitro quando comparados aos oócitos de folículos

<sup>1</sup>Graduanda em Medicina Veterinária, bolsista CNPq/Pibic/Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

<sup>2</sup>Médica Veterinária, mestre em Sanidade e Reprodução de Ruminantes, bolsista CAPES, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE.

<sup>3</sup>Médica Veterinária, doutora em Biotecnologia, bolsista de Desenvolvimento Científico e Tecnológico Regional, Fapitec/SE, Aracaju, SE.

<sup>4</sup>Biólogo, doutor em Ciências Biológicas, pesquisador da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF.

<sup>5</sup>Biólogo, doutor em Genética e Melhoramento, pesquisador da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF.

<sup>6</sup>Médico Veterinário, doutor em Reprodução Animal, pesquisador da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

monoocitários, porém com capacidade de produzir embriões no estágio de blastocistos (Stankiewicz et al., 2009). Em ovelhas, os escassos trabalhos que descrevem a ocorrência e características dos multioócitos confirmam a sua viabilidade com possível papel na função ovariana (Hadek, 1958; Oliveira et al., 2017).

Apesar da hipótese de que o aumento da frequência de multioócitos eleva a prolificidade (Spitschak et al., 2007; Payan-Carreira; Pires, 2008) esta relação não tem sido confirmada especialmente no caso das mutações que elevam a taxa de ovulação. Analisar a frequência e caracterizar a população de multioócitos pode elucidar mecanismos de ação gênica como aqueles relacionados à mutação *FecG<sup>E</sup>* e servir como base fisiológica para o desenvolvimento de biotecnologias reprodutivas de multiplicação de animais geneticamente superiores, como a produção de embriões in vitro, que têm como finalidade maximizar o desempenho reprodutivo e produtivo dos rebanhos.

O objetivo desse trabalho foi caracterizar morfológicamente os folículos multioócitos e associar sua ocorrência e características à variante genética prolífica *FecG<sup>E</sup>* em ovelhas Santa Inês.

## Material e Métodos

Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), lei n.º. 11794/2008, aprovados na Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Embrapa Tabuleiros Costeiros (Número de protocolo: 13072016.006) e ocorreram no período de outubro de 2010 até março de 2018. Foram utilizadas 57 ovelhas pertencentes ao Núcleo de Conservação in situ de Ovinos da Raça Santa Inês da Embrapa Tabuleiros Costeiros, localizado no Campo experimental Pedro Arle (CEPA), município de Frei Paulo, Sergipe, Brasil (Latitude: 10°36'08" Sul e Longitude: 37°38'29" Oeste).

A partir de amostras de sangue (5mL), colhidas através de punção da veia jugular e armazenadas em tubos contendo EDTA, as ovelhas foram genotipadas para o *FecG<sup>E</sup>* por Reação de Cadeia da Polimerase – PCR/RFLP (Silva et al., 2011) no laboratório de genética animal da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília/DF, Brasil. Baseando-se no resultado da genotipagem, as ovelhas foram classificadas em três grupos genótipos: 19 homozigotas não mutantes (*FecG<sup>+/+</sup>*) e, 27 heterozigotas (*FecG<sup>+/E</sup>*) e 11 homozigotas (*FecG<sup>E/E</sup>*) mutantes.

Todos os animais foram abatidos e tiveram seus ovários coletados assepticamente e transportados em meio tamponado com antibiótico até o laboratório de Biotecnologia da Reprodução Animal (LABRA), na sede da Embrapa Tabuleiros Costeiros, em Aracaju, Sergipe, Brasil. Fragmentos de tecido (3x3x1 mm) foram retirados em pontos aleatórios do córtex do ovário direito e esquerdo de cada ovelha a fim de serem processados histologicamente: fixados em Carnoy por 12 horas, desidratados em séries crescentes de etanol, diafanizados em xilol, banhados e inclusos em parafina para confecção de lâminas elaboradas a partir de cortes seriados de 7 µm de espessura em micrótomo e, corados utilizando o método hematoxilina e eosina (Behmer et al., 1976).

Com o auxílio de microscópio óptico (400x) e câmera digital, os folículos foram quantificados e classificados quanto à quantidade de oócitos inclusos. Os multioócitos foram analisados quanto à morfologia das células da granulosa que circundavam os oócitos, sendo classificados quanto ao estágio de desenvolvimento: primordiais, presença de células pavimentosas; transição, presença de células pavimentosas e três ou mais células cuboides; primários, presença de uma camada completa de células cuboides; secundários, presença de duas ou mais camadas de células cuboides e; antrais, presença de mais de duas camadas de células cuboides e formação do antro (Ireland et al., 2008; Silva-Santos et al., 2011). Os folículos multioocitários foram classificados morfológicamente como normais ou degenerados com base na integridade da membrana basal do oócito, presença de corpos picnóticos no núcleo do oócito, retração oocitária e, organização das células da granulosa (Carambúla et al., 1999). Por meio das imagens capturadas, realizou-se a mensuração da largura e altura dos folículos, oócitos, núcleos e nucléolos e, a partir da média das duas medidas, foram calculados os diâmetros destas estruturas (Lundy et al., 1999) utilizando-se o software ZEN 2011.

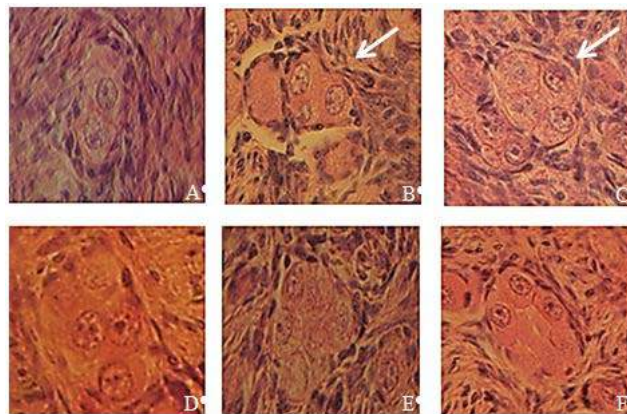
Para análise dos dados, cada ovelha foi considerada uma repetição dentro de cada grupo genótipo e, as características dos multioócitos foram analisadas e comparadas quando apresentavam um número mínimo de repetições (n = 5) segundo a metodologia estatística adotada. Os dados foram submetidos à análise de normalidade (*Shapiro-Wilk*) e homocedasticidade (*Bartlett*) e aqueles com distribuição normal foram submetidos à análise de variância (ANOVA) para verificar se houve influência significativa do genótipo e, ao teste post-hoc de *Tukey* para comparar os grupos genótipos entre si. As características com distribuição não-normal dos dados foram submetidas ao teste de *Kruskal-Wallis* com comparação múltipla de médias e, ao pós-teste *Dunn* para verificar diferenças entre os genótipos. A diferença entre os genótipos quanto às frequências observadas e esperadas de folículos multioócitos normais foi analisada pelo teste de qui-quadrado. As avaliações estatísticas foram realizadas através dos programas computacionais Excel e SISVAR, com 95% de nível de confiança.

## Resultados e Discussão

Os trabalhos que estudam folículos multioócitos em ovelhas são escassos e apesar de comprovarem a ocorrência nesta espécie (Hadek, 1958; Oliveira et al., 2017), não relatam a sua relação com mutações gênicas, em especial com a *FecG<sup>E</sup>*. Os resultados deste trabalho demonstraram que a *FecG<sup>E</sup>* não teve influência sobre a frequência de multioócitos (*FecG<sup>+/+</sup>* - 3,0%; *FecG<sup>+/E</sup>* - 3,3% e *FecG<sup>E/E</sup>* - 3,5%) e, confirmaram sua ocorrência em ovinos Santa Inês, estando presente em 63,1% (36/57) das ovelhas, em 40,3% (46/114) dos ovários e representando 3,2% (315/9.637) do total de folículos observados.

Foram encontrados folículos multioócitos apenas nos estágios iniciais de desenvolvimento (primordial e de transição). Quando analisada a viabilidade desses folículos, foi observado que os multioócitos no estágio de transição sofreram influência do genótipo, com as ovelhas E/E (95,0%) e +/E (90,9%) apresentando uma maior frequência de folículos normais que as ovelhas +/+ (73,3%). O fato dos folículos multioócitos terem maior viabilidade nas ovelhas mutantes pode ter relação com a maior taxa de ovulação verificada como efeito desta mutação (Silva et al., 2011). O GDF-9 tem sido associado à viabilidade e desenvolvimento dos folículos por regular a absorção de substratos energéticos para os oócitos (Sugiura; Eppig, 2005), além de diminuir a apoptose das células da granulosa (Orisaka et al., 2006), mecanismos estes que podem refletir-se na qualidade do folículo.

Foi observada a seguinte frequência de multioócitos de acordo com a quantidade de oócitos inclusos: dois (70,5%), três (20,0%), quatro (6,0%), cinco (2,3%), seis (0,6%) e sete (0,6%) oócitos (Figura 1). A frequência de oócitos por folículo observada neste trabalho está condizente com o relato de Reynaud et al. (2010), os quais identificaram uma menor ocorrência de multioócitos conforme aumenta a quantidade de oócitos. Em coelhas, foi observado que à medida que aumenta a quantidade de oócitos nos multioócitos, uma localização mais centralizada destes gametas está correlacionada com sua viabilidade (Al-Mufit et al., 1998), sendo importante a realização de trabalhos em ovelhas que identifiquem essa relação.



**Figura 1.** Folículos multioócitos observados em ovelhas *FecG<sup>E</sup>*: transição com dois oócitos (A); transição com três oócitos (B); primordial com quatro oócitos (C); primordial com cinco oócitos (D); transição com seis oócitos (E); primordial com sete oócitos (F).  
Fonte: Arquivo pessoal.

Na análise morfométrica, a comparação entre os genótipos foi feita apenas nos folículos bioócitos (Tabela 1) devido ao número insuficiente de repetições dos multioócitos com três ou mais oócitos, cujos resultados estão expostos desconsiderando a mutação *FecG<sup>E</sup>* (Tabela 2). O genótipo teve influência apenas sobre o diâmetro oocitário dos bioócitos em estágio de transição.

**Tabela 1.** Diâmetro médio e erro-padrão de folículos, oócitos, núcleos e nucléolos de bioócitos primordiais e de transição de ovelhas Santa Inês em função do genótipo *FecG<sup>E</sup>*.

Categoria folicular	Genótipos <i>FecG<sup>E</sup></i>		
	+/+	+/E	E/E
	Diâmetro folicular (µm)		
Primordial	28,7±2,0	29,2±1,5	27,4±4,3
Transição	35,4±1,9	29,7±2,0	30,5±2,9
	Diâmetro oocitário (µm)		
Primordial	14,9±1,0	16,8±0,7	15,9±1,1
Transição	13,9±0,9 <sup>b</sup>	16,7±1,0 <sup>a</sup>	18,4±1,2 <sup>a</sup>
	Diâmetro do núcleo (µm)		
Primordial	9,4±0,3	9,7±0,3	9,9±1,2
Transição	10,0±0,2	9,9±0,4	9,5±0,9
	Diâmetro do nucléolo (µm)		
Primordial	2,2±0,2	2,3±0,1	2,0±0,2
Transição	2,1±0,3	2,2±0,2	2,2±0,3

(+/+): genótipo homozigoto não mutante, (+/E): genótipo heterozigoto mutante e (E/E): genótipo homozigoto mutante. Médias acompanhadas de letras diferentes na mesma linha diferem significativamente (P < 0,05).

**Tabela 2.** Médias e erros padrões dos diâmetros dos folículos, oócitos, núcleos e nucléolos de multioócitos primordiais e de transição de ovelhas Santa Inês em função do número de oócitos.

Categoria folicular	Multioócitos			
	3 oócitos	4 oócitos	5 oócitos	6 oócitos
	Diâmetro folicular (µm)			
Primordial	34,9±1,6	42,1±2,8	*	-
Transição	36,6±1,1	40,4±3,1	50,9±3,3	46,6±9,1
	Diâmetro oocitário (µm)			
Primordial	16,7±0,5	16,7±1,2	*	-
Transição	15,7±0,6	15,8±1,0	16,3±1,9	16,4±1,2
	Diâmetro do núcleo (µm)			
Primordial	9,7±0,4	10,7±0,4	*	-
Transição	10,6±0,3	9,9±0,7	8,7±0,3	10,5±1,2
	Diâmetro do nucléolo (µm)			
Primordial	2,2±0,1	2,0±0,4	*	-
Transição	2,4±0,1	2,0±0,1	2,4±0,4	2,6±0,5

(-) Não foi encontrado. (\*) Não foi possível realizar análise descritiva - número de repetições  $\leq 5$ . OBS: Foram identificados apenas dois folículos primordiais com sete oócitos não sendo analisados morfometricamente por terem pertencido a apenas uma ovelha *FecG<sup>+/E</sup>*.

## Conclusões

Os folículos multioócitos são verificados em ovelhas da raça Santa Inês e possuem características específicas. A frequência dos multioócitos não é afetada pela mutação *FecG<sup>E</sup>*, porém as ovelhas mutantes possuem folículos de transição com maior viabilidade e oócitos com maior diâmetro.

## Agradecimentos

Este estudo foi financiado em parte pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Brasil (CNPq), Fundação de Apoio à Pesquisa e a Inovação Tecnológica do Estado de Sergipe (Fapitec/SE) - Brasil, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (Capes - Código 001), e Financiadora de Estudos e Projetos - Brasil (Finep).

## Referências

- AL-MUFTI, W.; BOMSEL-HELMREICH, O.; CHRISTIDÈS, J. P. Oocyte size and intrafollicular position in polyovular follicles in rabbits. **Journal Reproduction and Fertility**, v. 82, p. 15-25, 1988.
- AZEVEDO, H. C.; PAIVA, S. R.; MELO, E. de O.; SILVA, B. D. M.; OLIVEIRA, A. A. de; MUNIZ, E. N. **Estudos da genética *FecG<sup>E</sup>* na prolificidade de ovinos**. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2015. 19 p. (/ Embrapa Tabuleiros Costeiros. Documentos, 193).
- BEHMER, A. O.; TOLOSA, E. M. C.; FERITAS-NETO, A. G. **Manual de técnicas para histologia normal e patológica**. São Paulo: São Paulo University Company, 1976. p. 341.
- CARAMBULA, S. F.; GONCALVES, P. B.; COSTA, L. F.; FIGUEIREDO, J. R.; WHEELER, M. B.; NEVES, J. P.; MONDADORI, R. G. Effect of fetal age and method of recovery on isolation of preantral follicles from bovine ovaries. **Theriogenology**, v. 52, p. 563-571, 1999.
- HADEK, R. Morphological and histochemical study in the ovary of the sheep. **American Journal of Veterinary Research**, v. 19, n. 73, p. 873-881, 1958.
- HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. **Reprodução animal**. São Paulo: Manole, 2004.

IRELAND, J. L. H.; SCHEETZ, D.; JIMENEZ-KRASSEL, F.; THEMME, A. P. N.; WARD, F.; LONERGAN, P.; SMITH, G. W.; PEREZ, G. I.; EVANS, A. C. O.; IRELAND J. J. Antral follicle count reliably predicts number of morphologically healthy oocytes and follicles in ovaries of young adult cattle. **Biology of Reproduction**, v. 79, p. 1219-1225, 2008.

KIPP, J. L.; KILEN, S. M.; BRISTOL-GOULD, S.; WOODRUFF, T. K.; MAYO, K. E. Neonatal exposure to estrogens suppresses activating expression and signaling in the mouse ovary. **Endocrinology**, v. 148, p. 1968-1976, 2007.

LUNDY, T.; SMITH, F.; O'CONNELL, A.; HUDSON, N. L.; MCNATTY, K. P. Populations of granulosa cells in small follicles of the sheep ovary. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 155, p. 251-262, 1999.

MORAIS, L. C. O. de. **Importância do desempenho reprodutivo de bovinos**, 2011. Disponível em:  
<[https://portais.ufg.br/uploads/67/original\\_semi2011\\_Lorraine\\_Cristina\\_2c.pdf](https://portais.ufg.br/uploads/67/original_semi2011_Lorraine_Cristina_2c.pdf)>. Acesso em: 02 jul. 2018.

MILAZZOTTO, M. P.; VISINTIN, J. A. Biotecnologias da reprodução animal-biologia molecular aplicada à biotecnologia. **Ciência Veterinária nos Trópicos**, v. 11, p. 145-148, 2008.

# Enriquecimento e caracterização de germoplasma de nim em Sergipe

Daniela Almeida de Assunção<sup>1</sup>, Ana Letícia Sirqueira Nascimento<sup>2</sup>, Ana Veruska Cruz da Silva<sup>3</sup>

**Resumo** - O gênero *Azadirachta* pertence à família Meliaceae e apresenta duas importantes espécies, *Azadirachta excelsa* (Jack) Jacobs e *Azadirachta indica* A. Juss. É popularmente conhecido como nim indiano, sendo as árvores caracterizadas pelo rápido crescimento e potencial de sombreamento, destacando-se principalmente pelo uso madeireiro, propriedades medicinais e inseticidas. Em 2009 implantou-se o Banco Ativo de Germoplasma de Nim da Embrapa Tabuleiros Costeiros, em Aracaju, SE. O objetivo do presente trabalho foi reorganizar e caracterizar os 42 indivíduos sobreviventes, utilizando descritores morfológicos. Avaliou-se a altura da planta (H), altura de inserção do caule (IC), circunferência do caule (CAC), diâmetro a altura do peito (DAP), comprimento da copa (CC), largura da copa (LC), comprimento da folha composta (CFC), largura da folha composta (LFC) e teor relativo de clorofila (TRC). Os resultados evidenciaram a existência de diversidade em vários aspectos como o formato dos folíolos; tipos de copa e altura de inserção do caule, com destaque o acesso 4 (226 cm) pertencente a espécie *excelsa*, teor relativo de clorofila, com o acesso 5 (44,40 CCI), e acesso 3 com menor valor (20,98 CCI). As avaliações são contínuas e realizadas todos os anos, e os resultados desse trabalho são indispensáveis nas tomadas de decisões que envolvam a gestão de recursos genéticos.

**Termos para indexação:** *Azadirachta indica*, *Azadirachta excelsa*, conservação, descritores morfológicos.

## Introdução

O gênero *Azadirachta* apresenta duas importantes espécies, *Azadirachta excelsa* (Jack) Jacobs e *Azadirachta indica* A. Juss. Pertencentes à família Meliaceae são provenientes de regiões da Índia e sudeste asiático (Kurose; Yatagai, 2005) com ampla distribuição nas Américas e outras regiões de clima tropical e subtropical (Azevedo et al., 2015).

Tem sido alvo de pesquisas para elucidar suas propriedades para o fornecimento de produtos alternativos aos agrotóxicos, como extratos de frutos, sementes, ramos e folhas, bem como para o controle de pragas em culturas onde o uso de agrotóxico não é permitido, como no caso dos cultivos orgânicos (Silva et al., 2017). Além disso, a *Azadirachta indica* é muito apreciada para ornamentação paisagística e uso madeireiro (Lédo et al., 2008; Freire et al., 2010). Em 2009 foi implantado o Banco Ativo de Germoplasma de Nim (BAG Nim) da Embrapa Tabuleiros Costeiros.

Os Bancos Ativos de Germoplasma (BAGs) são considerados uma alternativa para a conservação dos recursos genéticos, onde as principais atividades são coleta e intercâmbio, caracterização e avaliação do germoplasma (Bespalkok et al., 2007). A caracterização morfológica se configura como mecanismo indicador da diversidade genética. Para isso, os acessos precisam ser caracterizados por meio de listas de descritores botânicos, morfológicos e agrônômicos (Gotor et al., 2011). Há três anos o BAG Nim sofre perdas frequentes de acessos, e o presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo de reorganizar e caracterizar os 42 indivíduos sobreviventes, utilizando descritores morfológicos.

## Material e Métodos

O BAG Nim da Embrapa Tabuleiros Costeiros localiza-se em Aracaju (10°56'59"S e 37°03'17"W). Os 42 indivíduos que o compõem têm nove anos de idade. São 41 da espécie *Azadirachta indica* e um indivíduo da espécie *Azadirachta excelsa*, que representam 6 acessos. As avaliações ocorreram no mês de abril de 2018 (Tabela 1).

<sup>1</sup> Graduanda em Engenharia Agrônoma, bolsista Pibic/CNPq/Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

<sup>2</sup> Engenheira-florestal, bolsista Capes/ Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

<sup>3</sup> Engenheira-agrônoma, doutora em Produção Vegetal, pesquisadora da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

**Tabela 1.** Espécie, procedência e número de indivíduos dos acessos que compõem o Banco Ativo de Germoplasma de Nim da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE, 2018.

Espécie	Procedência/Estado	Número de indivíduos
<i>A. Indica</i>	I - Petrobras, AL	14
<i>A. Indica</i>	II - Cruangi, AL	15
<i>A. Indica</i>	III - CPAC, DF	05
<i>A. Excelsa</i>	IV - Cenargen, DF	01
<i>A. Indica</i>	V - Cenargen, DF	01
<i>A. Indica</i>	VI – Cenargen 2, DF	06

As avaliações de crescimento foram: a) altura da planta (H), determinada com o uso de clinômetro eletrônico em plantas mais altas ou trena de madeira nas mais baixas, expressa em metros; b) altura de inserção do caule (IC), valor medido do solo à altura da primeira inserção do caule, indicada em centímetros; c) circunferência do caule (CAC), medida estabelecida a uma distância de 30 cm do solo, expressa em centímetros; d) diâmetro a altura do peito (DAP), obtido através de medição da circunferência do caule a 1,30 m, com o uso de fita métrica, indicado em centímetros; e) comprimento da copa (CC), determinado pela diferença entre o valor da altura total e inserção da copa (H – IC), expresso em metros; f) largura da copa (LC), mensurada por meio de trena, e expressa em metros; g) comprimento da folha composta (CFC), obtida com o uso de régua graduada ou fita métrica, indicada em centímetros; h) largura da folha composta (LFC), também obtida com o uso de régua graduada ou fita métrica, expressa em centímetros; e i) teor relativo de clorofila (TRC), medido com auxílio de clorofilômetro, realizado na terceira folha do ápice para a base do nim.

Os resultados foram submetidos à análise de variância pelo teste F, e as médias foram comparadas pelo teste de Duncan, a 5% de probabilidade. As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do programa SAS®.

## Resultados e Discussão

Não houve enriquecimento do BAG Nim no período proposto, apenas a reorganização do mesmo.

Houve diferença significativa ( $P < 0,05$ ) para altura de inserção do caule (IC) e teor relativo de clorofila (TRC) (Tabela 2).

**Tabela 2.** Altura (H), Inserção do caule (IC), Circunferência do caule (CAC), Diâmetro a altura do peito (DAP), Comprimento da copa (CC), Largura da copa (LC), Comprimento da folha composta (CFC), Largura da folha composta (LFC) e Teor relativo de clorofila (TC) de acessos de nim do Banco Ativo de Germoplasma de Nim da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE, 2018.

Acesso	H (m)	IC (m)	CAC (cm)	DAP (cm)	CC (m)	LC (m)	CFC (cm)	LFC (cm)	TRC
<b>I</b>	3,70a	0,72b	43,58a	28,56a	4,43a	4,59a	37,87a	16,90a	24,48ab
<b>II</b>	4,02a	0,84b	55,01a	32,98a	5,48a	5,58a	39,96a	17,66a	23,17ab
<b>III</b>	3,76a	0,76b	50,36a	26,33a	4,37a	4,51a	36,00a	18,04a	20,98b
<b>IV</b>	5,20a	2,26a	33,90a	29,30a	2,75a	4,30a	34,30a	13,20a	22,40ab
<b>V</b>	3,10a	0,52b	47,00a	23,56a	4,30a	5,90a	40,10a	14,50a	44,40a
<b>VI</b>	3,20a	0,64b	66,16a	38,57a	5,80a	5,65a	38,08a	16,86a	39,38ab
<b>Média</b>	3,83	0,96	49,33	29,88	4,52	5,08	37,71	16,19	29,13
<b>CV%</b>	29,06	46,71	36,46	42,26	38,00	3,21	19,66	16,38	42,56

Médias seguidas de mesma letra nas colunas não diferem significativamente pelo teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade.

A altura média para inserção do caule foi de 0,96 m. Em estudo de arborização urbana, Lucena et al., (2015) encontraram em plantas de porte arbóreo e adultas, IC acima de 1 m.

As leituras efetuadas com o clorofilômetro estimam, adequadamente, o grau de esverdeamento das folhas de nim indiano, e as leituras efetuadas pelo equipamento podem substituir, com boa precisão, as determinações tradicionais do teor de clorofila (Neves et al., 2005).

A altura média de 3,83 m indicou que as plantas do BAG apresentaram crescimento lento, pois quando adultas podem chegar a 20 m (Lima Neto; Souza, 2011). Em trabalho realizado por Guimarães Neto et al. (2004) em um monocultivo de mogno (*Swietenia macrophylla* King), a altura média foi de 3,45 m em 40 meses após o plantio. A altura é um importante descritor do ponto de vista fitotécnico e de melhoramento, pois influi diretamente nos aspectos de densidade de plantio e manejo da planta (Arantes et al., 2010).

A circunferência do caule obteve média de 49,33 cm, valor superior ao encontrado por Vitória et al. (2013) em estudo de caracterização morfológica de acessos do BAG Nim da Embrapa Tabuleiros Costeiros.



O DAP médio dos indivíduos foi de 29,88 cm, e de acordo com Neves e Carpanezzi (2009), o nim adulto atinge no máximo 40 cm. Algumas espécies apresentam crescimento mais lento, como apontado por Tonini et al. (2005), em estudo de plantios homogêneos de andiroba (*Carapa guianensis* Aubl) aos 7 anos de idade, com DAP médio de 10,5 cm.

O comprimento e largura da copa (4,52 m e 5,08 m respectivamente) são características correlacionadas, ou seja, copas mais estreitas foram as de menor comprimento, com exceção das médias encontradas no acesso 6 (5,80 m e 5,65 m). Quanto ao comprimento e largura da folha composta, as médias foram 37,71 cm e 16,19 cm respectivamente, e de acordo com Martinez (2002), as árvores só perdem suas folhas em condições extremas.

## Conclusões

As avaliações são contínuas e realizadas todos os anos. As futuras ações de enriquecimento estão condicionadas ao posicionamento da Unidade em relação do BAG. Os resultados desse trabalho são fundamentais em tomadas de decisões que envolvam a gestão de recursos genéticos das espécies.

## Referências

- ARANTES, A. M.; DONATO, S. L. R.; SILVA, S. O. Relação entre características morfológicas e componentes de produção em plátanos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 45, n. 2, p. 224-227, 2010.
- AZEVEDO, G. T. de. O. S.; NOVAES, A. B. de.; AZEVEDO, G. B. de.; SILVA, H. F. Desenvolvimento de mudas de Nim Indiano sob diferentes níveis de sombreamento. **Floresta e Ambiente**, v. 22, n. 2, p. 249-255, 2015.
- BESPALHOK, J. C. F.; GUERRA, E. P.; OLIVEIRA, R. Uso e conservação do germoplasma. In: BESPALHOK, J. C. F.; GUERRA, E. P.; OLIVEIRA, R. **Melhoramento de Plantas**. Disponível em: < <http://www.bespa.agrarias.ufpr.br/conteudo> (2007)>. Acesso em: 06 maio 2018.
- FREIRE, A. L. O.; SOUSA FILHO, G. M.; MIRANDA, J. R. P.; SOUTO, P. C.; ARAÚJO, L. V. C. Crescimento e nutrição mineral do nim (*Azadirachta indica* A. Juss.) e cinamomo (*Melia azedarach* Linn.) submetidos à salinidade. **Ciência Florestal**, v. 20, n. 2, p. 207-215, 2010.
- GOTOR, E.; ALERCIA, A.; RAMANATHA R. A. O. V.; WATTS, J.; CARACCILO, F. The scientific information activity of Bioversity International: the descriptor lists. Impact Assessment Discussion Paper 3. **Bioversity International**. 2011.16 p.
- GUIMARÃES NETO, A. B.; FELFILI, J. M.; SILVA, G. F.; MAZZEI, L.; FAGG, C. W.; NOGUEIRA, P. E. Avaliação do plantio homogêneo de mogno, *Swietenia macrophylla* King, em comparação com o plantio consorciado com *Eucalyptus urophylla* S. T. Blake, após 40 meses de idade. **Revista Árvore**, v. 28, n. 6, p. 777-784, 2004.
- KUROSE, K.; YATAGAI, M. Components of the essential oils of *Azadirachta indica* A. Juss., *Azadirachta siamensis* Velton, and *Azadirachta excelsa* (Jack) Jacobs and their comparison. **The Japan Wood Research Society**, v. 51, p. 185-188, 2005.
- LIMA NETO, E. M.; SOUZA, R. M. e. Comportamento e características das espécies arbóreas nas áreas verdes públicas de Aracaju, Sergipe. **Scientia Plena**, v. 7, p. 1-10, 2011.
- LUCENA, J. N. de.; SOUTO, P. C.; ZEA-CAMAÑO, J. D.; SOUTO, J. S. S.; SOUTO, L. S. Arborização em canteiros centrais na cidade de Patos, Paraíba. **Revista Verde**, v. 10, n. 4, p. 20-26, 2015.
- MARTINEZ, S. S. O Nim – *Azadirachta indica*: natureza, usos múltiplos, produção. Instituto Agrônomo do Paraná: IAPAR. 2002. 142 p.
- NEVES, B. P.; NOGUEIRA, J. C. M. **Cultivo e utilização do nim indiano (*Azadirachta indica* A. Juss.)** Goiana: EMBRAPA/CNPAP, 1996. 32 p. (EMBRAPA/CNPAP. Circular Técnica, 28).
- NEVES, E. J. M.; CARPANEZZI, A. A. **Prospecção do Cultivo do Nim (*Azadirachta indica*) no Brasil**. Colombo: Embrapa Florestas, 2009. 1 CD-ROM. (Embrapa Florestas. Documentos, 185).
- NEVES, O. S. C.; CARVALHO, J. G.; MARTINS, F. A. D.; PÁDUA, T. R. P.; PINHO, P. J. Uso do SPAD-502 na avaliação dos teores foliares de clorofila, nitrogênio, enxofre, ferro e manganês do algodoeiro herbáceo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, n. 5, p. 517-521, 2005.

SILVA, A.V.C.; JESUS,A.S.; SOARES, A. N. R.; LEDO, A. S. Utilization and conservation of nem (*Azadirachta indica* A. Juss). In: AHUJA, M. R.; JAIN, S. M. (Ed.). **Biodiversity and conservation of woody plants**. [s. l]: Springer, 2017. p. 197-218,

TONINI, H.; ARCO-VERDE, M. F.; SÁ, S. P. P. de. Dendrometria de espécies nativas em plantios homogêneos no Estado de Roraima - Andiroba (*Carapa guianensis* Aubl), Castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa* Bonpl.), Ipê-roxo (*Tabebuia avellanedae* Lorentz ex Griseb) e Jatobá (*Hymenaea courbaril* L.). **Acta Amazonica**, v. 35, n. 3, p. 353-362, 2005.

VITÓRIA, M. F.; SILVEIRA, R. G.; SILVA, A. V. C. Caracterização morfológica e molecular de acessos de nim indiano. **Revista Magistra**, v. 25, p. 228-229, 2013.

# Eficiência de fungicidas e acaricidas sobre as doenças foliares do coqueiro e o ácaro-vermelho-das-palmeiras

Aginaldo José dos Santos<sup>1</sup>, Joana Maria Santos Ferreira<sup>2</sup>, Lourival Costa Paraíba<sup>3</sup>, Samuel Silva da Mata<sup>4</sup>, Semiramis Rabelo Ramalho Ramos<sup>5</sup>, Viviane Talamini<sup>6</sup>

**Resumo** - As doenças foliares e o ácaro-vermelho-das-palmeiras *Raoiella indica* podem impactar negativamente a produção do coqueiro. O objetivo deste trabalho foi estudar o efeito de fungicidas e inseticidas/acaricidas sobre as doenças foliares, queima-das-folhas, lixa grande e lixa pequena e a população do ácaro-vermelho-das-palmeiras. O ensaio foi conduzido no Campo Experimental de Itaporanga, da Embrapa Tabuleiros Costeiros, situado no município de Itaporanga d'Ajuda, SE, com a cultivar coqueiro-anão-verde-do-Brasil-de-Jiqui. Os ingredientes ativos abamectina, tiametoxan, dimetoato, ciproconazol + azoxistrobina, imidacloprido, metalaxyl + clorotalonil foram aplicados diretamente no estipe do coqueiro, por endoterapia (injeção), utilizando um volume de 15 mL do p.c./planta. A testemunha foi injetada apenas com água. Avaliações da infestação do ácaro na planta (número de ácaros/cm<sup>2</sup>), da incidência (total de folhas e folhas infestadas) e da severidade das doenças foliares foram realizadas antes e três meses após a aplicação dos tratamentos. O efeito dos fungicidas testados sobre as doenças foliares não foi evidenciado nessa análise considerando o curto período entre o tratamento e a avaliação. Obteve-se redução populacional efetiva do ácaro-vermelho nos tratamentos com a abamectina (-2,29 ácaros/cm<sup>2</sup>) e no tratamento MIX (mistura de todos os produtos testados) (-2,24 ácaros/cm<sup>2</sup>) em relação à população inicial. Esses tratamentos não diferiram entre si, mas diferiram significativamente ( $p \leq 0,01$ ) dos demais tratamentos e do controle, nos quais houve acréscimo na população da praga.

**Termos para indexação:** fitossanidade, *Cocos nucifera*, *Raoiella indica*, queima das folhas, lixa grande, lixa pequena.

## Introdução

A cultura do coqueiro é suscetível a pragas e doenças que podem afetar negativamente a produção. Na fase adulta, é intensa a ação do ácaro-vermelho-das-palmeiras *Raoiella indica* e das doenças foliares, queima-das-folhas, lixa grande e lixa pequena que têm como agentes etiológicos os fungos *Botryosphaeria cocogena*, *Camarotella acrocomiae* (Mont.) Hyde e Cannon e *C. torrendiella* Batista, respectivamente. Estas doenças podem ocorrer concomitantemente, formando o chamado complexo lixa e queima das folhas do coqueiro. Poucos pesticidas são registrados para o coqueiro junto ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Ampliar o portfólio de produtos registrados para uso é uma demanda do setor produtivo, pois o registro além de dar segurança ao produtor também permite a prática de rotação de princípios ativos no manejo da propriedade o que concorre para minimizar os casos de resistência das pragas e doenças a esses produtos. A convivência do produtor com as pragas e doenças demanda a utilização de técnicas de manejo capazes de manter as populações abaixo do nível de dano. A endoterapia é um método fitossanitário alternativo de tratamento, atualmente, em uso no coqueiro. Esse método consiste na injeção de pesticidas no estipe da planta que supostamente translocam em sentido acropetal, diluído no fluxo das seivas, através dos vasos do xilema/floema. Sabe-se que o movimento de solutos no estipe de uma planta é similar a um processo de advecção e dispersão, ou seja, existe uma dispersão do pesticida por difusão e por dispersão hidrodinâmica em todas as direções e um processo mecânico advectivo que depende do fluxo de transpiração (Trapp et al, 2001). Por ser um processo advectivo, a translocação no interior da planta depende de um fator de retardamento do soluto comparado com o do fluxo da seiva bruta e esse fator é função da afinidade relativa da substância (pesticida) ao material constituinte do estipe, ou seja, compostos com mais afinidade por estipe terão uma translocação mais lenta em direção à parte aérea da planta levados pelo fluxo de transpiração e compostos mais solúveis em água uma translocação mais rápida e um menor fator de retardamento quando comparado com a velocidade de translocação de seiva bruta (água). Há carência de estudos mais abrangentes para uso da técnica da endoterapia no controle das doenças e das pragas em palmeiras embora, se trate de uma técnica bastante promissora considerando o porte elevado das plantas, fator este que dificulta a utilização dos outros métodos de aplicação, a exemplo da pulverização. Objetivou-se com esse trabalho estudar o efeito de inseticidas/acaricidas e fungicidas sobre o ácaro-vermelho-das-palmeiras e as doenças foliares, queima-das-folhas e lixas grande e pequena, aplicados por endoterapia no estipe do coqueiro.

<sup>1</sup> Graduando em Agronomia, estagiário da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

<sup>2</sup> Engenheira-agrônoma, mestre em Entomologia, pesquisadora da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

<sup>3</sup> Estatístico, doutor em Matemática, pesquisador da Embrapa Meio Ambiente, Jaguariuna, SP.

<sup>4</sup> Estatístico, mestre em Pesquisa Operacional, pesquisador da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

<sup>5</sup> Engenheira-agrônoma, doutora em Recurso Genético Vegetal, pesquisadora da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

<sup>6</sup> Engenheira-agrônoma, doutora em Fitopatologia, pesquisadora da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

## Material e Métodos

O ensaio foi conduzido no Campo Experimental de Itaporanga, da Embrapa Tabuleiros Costeiros com a cultivar de coqueiro-anão-verde-do-Brasil-de-Jiqui - AVEBrJ em produção e com 14 anos de idade. O delineamento foi em blocos ao acaso com oito tratamentos e três repetições. Os tratamentos testados foram: T1 – abamectina, T2 – tiametoxan, T3 – testemunha, T4 – dimetoato, T5- ciproconazol + azoxistrobina, T6 – Mix dos produtos, T7 - imidacloprido e T8 metalaxyl + clorotalonil aplicados por endoterapia – injeção no estipe do coqueiro – na dosagem de 15 mL do produto comercial puro/planta. O tratamento mix foi preparado com 15 mL de cada produto e dessa mistura injetado 15 mL na planta. A testemunha recebeu água como tratamento. O equipamento de proteção individual - EPI - completo foi utilizado na aplicação dos produtos. A técnica de aplicação utilizada foi por endoterapia que consiste na abertura de um orifício no estipe da planta e na introdução de um dispositivo plástico com tampa através do qual se injeta o pesticida. Por tratar-se de um processo advectivo, as avaliações da infestação da população do ácaro na planta e da incidência e severidade das doenças foliares foram realizadas antes e somente após três meses da aplicação dos tratamentos.

Foi avaliado o número de ácaros vivos/cm<sup>2</sup> em 6 folíolos das 3 folhas mais velhas, sendo 2 folíolos/folha e 5 amostras/folíolo atribuindo-se uma escala de notas de 0 a 5, onde: 0 = sem ácaro; 1 = até 5 ácaros/cm<sup>2</sup>; 2 = de 6 a 10 ácaros/cm<sup>2</sup>; 3 = 11 a 15 ácaros/cm<sup>2</sup>; 4 = 16 a 20 ácaros/cm<sup>2</sup>; e, 5 =  $\geq 21$  ácaros/cm<sup>2</sup>. Os índices da escala foram submetidos à fórmula:  $DP = (\Sigma(f \times m)) / (Z \times N)$ , em que: DP é a densidade populacional do ácaro na planta; f é a frequência observada para a nota i; e, m é o ponto médio da classe i, em ácaros/cm<sup>2</sup>; Z é o valor numérico da nota máxima na escala, e N é o total de folíolos avaliados. Para a queima das folhas foram avaliadas a incidência e a severidade da doença seguindo metodologia proposta por Talamini et al. (2013), com modificações. O número total de folhas e o número de folhas doentes foram mensurados por planta e os dados obtidos foram expressos em porcentagem. A severidade da doença foi avaliada de acordo com uma escala de notas de 0 a 4, onde: 0 = folha assintomática; 1 = 25% da folha com sintoma; 2 = 50% da folha com sintoma; 3 = 75% da folha com sintoma e 4 = 100% da folha com sintoma ou completamente morta. Posteriormente, os índices da escala foram submetidos à fórmula:  $SDQ(\%) = (\Sigma(n \times f)) / (Z \times N) \times 100$ , em que: SQ (%) é a severidade do dano da queima; n é a nota i da escala conferida a folha; f é o número de folhas avaliadas com a nota i; Z é o valor numérico da nota máxima na escala; e N é o total de folhas avaliadas. Para avaliação da incidência da lixa grande e lixa pequena foi adotada metodologia proposta por Leal et al. (1998), com modificações. Foram coletados seis folíolos de cada planta e encaminhados ao Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Tabuleiros Costeiros para avaliação. A incidência foi calculada pela porcentagem de folíolos com sintomas e para a severidade adotada uma escala de notas onde, para a lixa pequena, 0 = ausência de doença; 1 = uma a duas lesões; 2 = três a quatro lesões; 3 = mais de cinco lesões; 4 = predominância de lesões com necrose; 5 = lesões com necrose em todo o folíolo; e para a lixa grande, 0 = ausência da doença; 1 = uma a cinco lesões; 2 = seis a dez lesões; 3 = mais de dez lesões; 4 = predominância de lesões com necrose; 5 = folíolo completamente seco/necrosado. Os dados coletados foram calculados pela fórmula de severidade:  $SD(\%) = (\Sigma(n \times f)) / (Z \times N) \times 100$ , em que: SQ (%) é a severidade do dano; n é a nota i da escala conferida a folha; f é o número de folhas avaliadas com a nota i; Z é o valor numérico da nota máxima na escala; e N é o total de folhas avaliadas.

As análises estatísticas foram feitas no programa SISVAR (Ferreira, 2011). Os dados foram transformados para  $\sqrt{x + 1}$  e as diferenças das médias realizadas pelo teste Tukey ( $p \leq 0,05$ ) para as doenças e pelo teste Scott Knott ( $p \leq 0,01$ ) para o ácaro-vermelho, em que o efeito natural ocorrido na testemunha foi deduzido dos valores obtidos na avaliação pós-tratamento.

## Resultados e Discussão

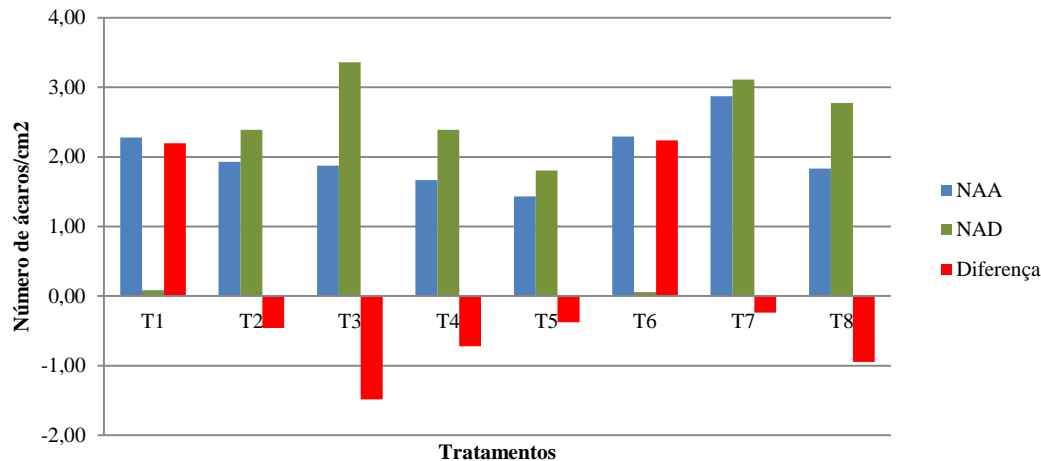
### Doenças foliares

Para o período avaliado não ocorreram diferenças estatísticas significativas ( $p \leq 0,05$ ) para as variáveis analisadas, incidência e severidade das doenças foliares, queima das folhas e das lixas, grande e pequena. No entanto, foi possível observar uma tendência a valores numéricos mais baixos, a exemplo da incidência e da severidade da lixa pequena quando foi utilizado o ciproconazol + azoxistrobina em detrimento dos demais tratamentos. No trabalho de Silva (2016), a molécula isolada do fungicida ciproconazol foi eficiente em controlar o complexo lixa grande e queima-das-folhas do coqueiro onde os menores valores das doenças foram encontrados com aplicações de 10 mL do produto comercial puro/planta, em intervalo de seis meses. Na prática, o efeito de fungicidas para controle das doenças foliares em coqueiro, é evidenciado no campo após, pelo menos, um ano entre o tratamento e a avaliação.

### Ácaro-vermelho

A redução populacional do ácaro foi efetiva nos tratamentos com o acaricida abamectina (-2,29 ácaros/cm<sup>2</sup>) e com o mix preparado com todos os produtos testados (-2,24 ácaros/cm<sup>2</sup>) (Figura 1). Assis et al., (2013) ao estudarem a toxicidade da abamectina para o ácaro vermelho, em testes de laboratório, demonstraram ser essa molécula uma das mais tóxicas à praga, entre as avaliadas,

corroborando com os resultados deste estudo. O tratamento com o dimetoato (T4), mesmo tendo ação inseticida/acaricida, não apresentou redução média efetiva na população do ácaro. Notou-se apenas um menor aumento da praga quando comparado ao controle. Os demais tratamentos, não apresentaram resultados efetivos por tratar-se de fungicidas e inseticidas, embora, tenham apresentado acréscimo na taxa de crescimento do ácaro, mas, em valores numéricos um pouco menores quando comparado ao aumento populacional natural da praga observado no tratamento controle (T3). O incremento natural na população do ácaro observado no tratamento T3 pode ser atribuído às condições climáticas ocorridas no período e local, levemente favoráveis à praga. Na análise estatística dos dados, uma vez deduzido o efeito observado no tratamento controle, verificou-se que os tratamentos T1 e T6 foram os que apresentaram menor crescimento efetivo da população do ácaro, comparado aos demais tratamentos (Figura 1). Não houve diferença significativa ( $p \leq 0,01$ ) entre esses tratamentos (Tabela 1).



**Figura 1.** Número médio de ácaros-vermelhos/cm<sup>2</sup> avaliados antes (NAA) e depois (NAD) da aplicação, por meio da endoterapia, de pesticidas no estipe do coqueiro. Barras em vermelho com valores positivos representam decréscimo da população e com valores negativos acréscimo da população do ácaro.

**Tabela 1.** Média de crescimento da população do ácaro-vermelho após aplicação dos tratamentos, anulado o efeito verificado na parcela controle. Dados transformados para  $\sqrt{x + 1}$  e as diferenças das médias avaliadas pelo teste Scott Knott ( $p \leq 0,01$ ).

#### Análise de variância

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	6	10.450275	1.741712	3.028	0.0086
erro	119	68.450456	0.575214		
Total corrigido	125	78.900730			
CV(%) =	49.35				
Média geral:	1.5368254	Número de observações:	126		

## Conclusões

Os fungicidas testados não apresentaram efeito sobre as doenças no período analisado devido, principalmente, ao curto intervalo de tempo entre os tratamentos e a avaliação. Entretanto, no mesmo período, o tratamento com aplicação do ciproconazol + azoxistrobina já apresenta sinais de menores valores na incidência e severidade da lixa pequena.

Houve uma redução populacional efetiva do ácaro nos tratamentos com o acaricida abamectina.

## Agradecimentos

Agradecimentos à Fapitec pela concessão da bolsa e a Fapesp pelo financiamento do projeto - Processo 2016/16566-1 e à Embrapa pelo apoio e mão de obra fornecida pelos técnicos e assistentes do Campo Experimental de Itaporanga.

## Referências

ASSIS, C. P. O. de; MORAIS, E. G. F. de; GONDIM JUNIOR, M. G. C. Toxicity of acaricides to *Raoiella indica* and their selectivity for its predator *Amblyseius largoensis* (Acari: Tenuipalpidae: Phytoseiidae). **Experimental Applied Acarology**, v. 60, p. 357-365, 2013.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, p. 1039-1042, 2011.

LEAL, E. C.; WARWICK, D. R. N.; LEAL, M. de L. da S.; RAM, C.; TUPINAMBÁ, E. A. Evaluacion de germoplasma de cocotero gigante en relacion a las lijas *Phyllachora torrendiella* e *Sphaerodothis acrocomiae* en Sergipe, Brasil. **Fitopatologia**, v. 33, n. 4, p. 220-223, 1998.

SILVA, J. M. **Complexo lixa e queima das folhas em coqueiro-anão: avaliação de germoplasma e estratégias de controle químico por cyproconazole**. 2016. 74 f. Dissertação (Mestrado em Agricultura e Biodiversidade)-Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão. 2016.

TALAMINI, V.; FERREIRA, J. M. S.; RAMOS, S. R. R. **Incidência e severidade da queima-das-folhas em cultivares de coqueiro em Pernambuco**. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2013. 14 p. (Embrapa Tabuleiros Costeiros. Boletim de Pesquisa, 81).

TRAPP, S.; MIGLIORANZA, K. S. B.; MOSBAEK, H. Sorption of lipophilic organic compounds to wood and implications for their environmental fate. **Environmental Science and Technology**, v. 35, n. 8, p. 1561-1566, 2001.

# Coleta e caracterização morfológica de acessos de inhame provenientes dos municípios produtores de Alagoas e Sergipe

Saniel Carlos dos Santos<sup>1</sup>, Manoel Ferreira de Amorim Neto<sup>2</sup>, Maria Eugênia Vieira Xavier<sup>3</sup>,  
Marissônia de Araújo Noronha<sup>4</sup>, João Gomes da Costa<sup>5</sup>

**Resumo** - O gênero *Dioscorea*, o qual pertence o inhame, possui mais de 600 espécies, das quais 10 têm seus rizóforos utilizados comercialmente, sendo o continente Africano o principal centro de dispersão. No Brasil, o inhame tem como principal produtor a região Nordeste, sobretudo em áreas de agricultura familiar caracterizada por plantios em pequenas áreas de cultivo, onde desempenha um importante papel sociocultural e econômico. Porém, há relatos dos agricultores sobre o desaparecimento de vários tipos de inhame cultivados anteriormente. Assim, o risco de perda de diversidade é grande principalmente devido a pressões sofridas por esses agricultores. Dentro desse contexto, o resgate e o conhecimento da variabilidade genética da espécie desempenha importante função, podendo contribuir para o desenvolvimento de novos genótipos. Dessa maneira, este trabalho teve como objetivo coletar e caracterizar acessos da espécie *Dioscorea cayennensis* provenientes em diferentes municípios e regiões produtoras dos Estados de Alagoas e Sergipe. O material coletado foi plantado na Unidade de Execução e Pesquisa (UEP), da Embrapa Tabuleiros Costeiros, no município de Rio Largo, AL. A caracterização dos acessos de inhame foi realizada individualmente nas plantas de acordo com uma chave proposta pelo IPGRI/IITA (1997) para espécies de *Dioscorea*, avaliando-se 14 caracteres, sendo cinco observações realizadas nas folhas e nove relacionados ao caule das plantas de inhame. Os resultados obtidos mostraram que existe pouca variabilidade para os descritores como coloração do pecíolo, presença/ausência de asas e espinhos no caule e para o sentido da direção do crescimento. Já com relação aos descritores quantitativos constatou-se que os acessos foram agrupados em sete grupos distintos mostrando uma certa variabilidade entre os mesmos. De acordo com os resultados obtidos, até o presente, constata-se a importância da coleta e da necessidade de resgatar tipos de inhame cultivados no passado e a introdução de novos materiais nos municípios produtores de Alagoas e Sergipe, visando a sustentabilidade da cadeia produtiva do inhame.

**Termos para indexação:** germoplasma, descritores morfológicos, *Dioscorea cayennensis*.

## Introdução

O inhame é uma planta pertencente à família Dioscoreaceae e ao gênero *Dioscorea*, o qual possui mais de 600 espécies, das quais 10 têm seus rizóforos utilizados na alimentação (Lebot, 2009). Dentre essas destaca-se as espécies *D. cayennensis*, *D. esculenta*, *D. alata* e *D. rotundata* como as mais utilizadas (Bressan, 2005). Essa hortaliça produtora de rizóforos possui alto valor nutricional e tem como principal centro de dispersão o continente Africano.

O Brasil apresentou em 2016 uma produção estimada em aproximadamente 250.000 t de rizóforos, sendo o segundo maior produtor de inhame da América do Sul (FAO, 2018). A região Nordeste do Brasil concentra a maioria dos cultivos de inhame, sobretudo em áreas de agricultura familiar, também concentrando a comercialização e consumo, no qual desempenham importante papel sociocultural e econômico. Os estados da Paraíba, Pernambuco, Bahia, Alagoas, Sergipe e Maranhão, apresentam-se como principais produtores da região (Brito et al., 2011).

O perfil do produtor de inhame no Nordeste do Brasil se caracteriza por plantios em pequenas áreas de cultivo, com uso de mão de obra familiar e baixa utilização de insumos agrícolas (Brito et al., 2011). Portanto, o uso de material resistente para as principais doenças que acometem a cultura, torna-se fundamental. Porém, os agricultores no Nordeste do Brasil têm relatado o desaparecimento de alguns tipos de inhame, o que pode resultar numa erosão genética com perda de variabilidade genética. Assim, o risco de perda da diversidade genética é grande principalmente devido a pressões sofridas por esses agricultores. Silva (2012) constatou que os agricultores tradicionais de inhame afirmaram que já plantaram variedades de inhame que hoje não plantam mais. Assim, destaca-se a importância do resgate através de expedições de coletas desses materiais junto aos agricultores familiares produtores de inhame nas áreas de cultivo do Nordeste.

Dessa maneira, o trabalho tem como objetivo coletar e caracterizar acessos da espécie *Dioscorea cayennensis* provenientes em diferentes municípios e regiões produtoras dos estados de Alagoas e Sergipe, com o intuito de verificar o nível de diversidade genética presentes nessas regiões.

<sup>1</sup> Graduando em Agronomia, bolsista da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Unidade de Execução de Pesquisa de Rio Largo (UEP-Rio Largo), Rio Largo, AL.

<sup>2</sup> Graduando em Agronomia, bolsista da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Unidade de Execução de Pesquisa de Rio Largo (UEP-Rio Largo), Rio Largo, AL.

<sup>3</sup> Engenheira-agrônoma, Rio Largo, AL.

<sup>4</sup> Engenheira-agrônoma, doutora em Fitopatologia, pesquisadora da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Unidade de Execução de Pesquisa de Rio Largo (UEP-Rio Largo), Rio Largo, AL.

<sup>5</sup> Engenheiro-agrônomo, doutor em Biotecnologia, pesquisador da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Unidade de Execução de Pesquisa de Rio Largo (UEP-Rio Largo), Rio Largo, AL.

## Material e Métodos

Para a realização do estudo foram obtidos acessos de inhame por meio de expedições de coletas em pequenas propriedades nos municípios produtores de Alagoas e Sergipe. Com o auxílio dos produtores locais o material coletado foi devidamente identificado com o maior número de informações para posterior implantação do experimento.

Os acessos coletados foram armazenados em local com condições ideais para ocorrer brotações no material propagativo, no qual foram utilizados para o plantio. Os rizóforos-sementes foram seccionados em três porções: cabeça, meio e ponta. Em seguida foram plantados em vasos e instalados em área de telado, sendo distribuídos em delineamento de blocos casualizados para realização do estudo.

A condução do experimento foi realizada na Unidade de Execução e Pesquisa da Embrapa Tabuleiros Costeiros situada no Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Alagoas, no Município de Rio Largo, AL.

As plantas de inhame foram caracterizadas individualmente de acordo com descritores selecionados a partir de uma chave proposta pelo International Plant Genetic Resources Institute/International Institute of Tropical Agriculture (IPGRI/IITA 1997) para espécies de *Dioscorea*, onde avaliou 14 caracteres, sendo cinco observações realizadas no caule e nove relacionados às folhas das plantas de inhame (Tabela 1). A caracterização morfológica da parte aérea foi realizada em apenas uma etapa com auxílio de régua e paquímetro, após cinco meses da implantação do experimento.

**Tabela 1.** Descritores utilizados para avaliação morfológica do caule e das folhas de inhame. Rio Largo, AL, 2017.

Descritores	
1. Cor do caule	8. Número de lóbulos da folha
2. Ausência/presença de asas no caule	9. Comprimento do pecíolo
3. Ausência/presença de espinhos no caule	10. Cor do pecíolo
4. Direção de crescimento	11. Distância entre a inserção do pecíolo na folha à extremidade superior da folha
5. Diâmetro do caule	12. Distância entre a inserção do pecíolo na folha à extremidade inferior da folha
6. Posição das folhas	13. Largura da folha na maior porção
7. Forma das folhas	14. Largura entre os lóbulos

Para a caracterização morfológica foram utilizados caracteres qualitativos e quantitativos, sendo os quantitativos obtidos a partir da média de cinco medidas para cada planta. Os dados da caracterização foram submetidos à análise estatística descritiva e de divergência genética através do método de agrupamento de Tocher utilizando o Programa Genes.

## Resultados e Discussão

Nas coletas realizadas em Alagoas e Sergipe verificou-se a presença dos seguintes tipos de inhame cultivados conhecidos pela denominação: Branco, Barba de Arame, Gereba, Roxo, Roxo Liso e Corneta. De acordo com o depoimento dos produtores constatou-se que vários tipos de inhame não são mais cultivados na região de estudo.

Em relação aos descritores qualitativos, os resultados obtidos mostraram que 58% dos acessos apresentam coloração verde do pecíolo, 35% de coloração roxa e 8% verde/marrom; 91% não apresentam asas e espinhos no caule e 99% apresentaram as folhas distribuídas de forma oposta e 1% na forma alternada. Já em relação à direção do crescimento todos os acessos apresentaram sentido



anti-horário. Portanto, nota-se a baixa variabilidade dos acessos coletados para esses descritores. Esses resultados são semelhantes aos obtidos por Silva (2012) quando caracterizou acessos de *D. cayennensis* e *D. rotundata* obtidos em diferentes regiões brasileiras.

Na caracterização em relação ao diâmetro do caule verificou-se que 87% dos acessos apresentaram diâmetro entre 0,4 cm e 0,6 cm, 9% com diâmetro maior que 0,6 cm e 4% com diâmetro menor do que 0,4 cm.

Com relação aos descritores quantitativos, realizou-se o agrupamento pelo método de Tocher e sete grupos distintos foram formados, sendo o grupo I formado por 13 acessos, o grupo II com 3 acessos, III e IV formados por dois acessos e os grupos V, VI e VII com apenas um acesso cada (Tabela 2). O grupo I foi composto por 13 acessos, o que corresponde a aproximadamente 57% do material coletado.

**Tabela 2.** Agrupamento de 23 acessos de inhame (*Dioscorea* sp) coletados nos em Alagoas e Sergipe. Rio Largo, AL, 2018.

Grupo	Acessos
1	19, 21, 15, 1, 23, 18, 16, 12, 3, 6, 10, 8, 9
2	7, 22, 5
3	17, 20
4	13, 14
5	2
6	4
7	11

Considerando-se todos os descritores utilizados constata-se que, apesar de existir variabilidade, é necessário o resgate de tipos cultivados no passado que já não estão sendo mais cultivados pelos produtores da região estudada.

## Conclusão

Existe pouca variabilidade genética entre os acessos coletados em relação aos descritores utilizados evidenciando a necessidade de ações visando o resgate de materiais e introdução de material genético nos municípios produtores de Alagoas e Sergipe.

## Referências

- BRESSAN, E. A. **Diversidade isoenzimática e morfológica de inhame (*Dioscorea* spp.) coletados em roças de agricultura tradicional do Vale do Ribeira – SP**. 2005. 186 f. Dissertação (Mestrado)-Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.
- BRITO, T. T. de; SOARES, L. S.; FURTADO, M. C.; CASTRO, A. A.; CARNELOSSI, M. A. G. Composição centesimal de inhame (*Dioscorea* sp.) in natura e minimamente processado, **Scientia Plena**, v. 7, n. 6, p. 17, 2011.
- FAO. **World Agricultural Information Center**, 2005. Disponível em: < <http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/S> >. Acesso em: 19 de abr. de 2018.
- IPGRI/IITA. **Descritores para el ñame (*Dioscorea* spp.)**. Ibadán: Instituto Internacional de Agricultura Tropical; Roma: Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos, 1997. 64 p.
- LEBOT, V. **Tropical root and tuber crops**: cassava, sweet potato, yams and aroids. London: CABI, 2009. 413 p.
- SILVA, R. A. **Caracterização agrônômica em *Dioscorea* ssp. no Recôncavo Baiano**. 2012. 34 f. Monografia (Graduação)-Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, 2012.
- SILVA, L. R. G. **Desenvolvimento de marcadores microsatélites e caracterização genética de etnovarietades de inhame do complexo *Dioscorea cayensis*/*D. rotundata***. Tese (Doutorado)-Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, São Paulo. 2012.

# Líquido da casca de coco verde: caracterização química e possíveis alternativas de uso na agricultura

Anilson Silva Pereira<sup>1</sup>, Maria Urbana Corrêa Nunes<sup>2</sup>

**Resumo** - Este trabalho teve como objetivo gerar conhecimento sobre a composição química de macro e micronutrientes do líquido da casca de coco verde (LCCV), no estado líquido e no estado sólido, vislumbrando novas alternativas de uso desse resíduo. A partir do LCCV extraído das cascas de coco verde, provenientes de dois locais com diferentes sistemas de produção, foram realizadas análises de macronutrientes (P, S, Na, K, Ca, Mg) e micronutrientes (Cu, Fe, Mn e Zn). Dentre os macronutrientes analisados, tanto no estado líquido quanto no estado sólido, o maior teor foi de potássio. No resíduo sólido houve maior teor de todos os nutrientes em relação ao líquido. Os teores de nutrientes no LCCV variaram com a procedência dos frutos. Pelos resultados obtidos, a parte sólida do LCCV constitui matéria prima natural e potencial para complementar a adubação de diversas culturas. Os resultados obtidos confirmam o alto potencial do LCCV como fonte de nutrientes importantes para a produção vegetal, embora seja uma fonte potencialmente poluidora do solo e de lenções freáticos, necessitando de novos conhecimentos e tecnologias visando à destinação correta desse resíduo.

**Termos para indexação:** lccv, líquido, resíduo do coqueiro.

## Introdução

A cultura do coco vem se expandindo no Brasil, saltando da 10ª posição no ranking mundial, em 1990, com uma produção ao torno de 477 mil toneladas de coco para a 4ª posição em 2010 com uma produção de aproximadamente 2,8 milhões de toneladas (Martins; Jesus Júnior, 2014). A produção do coqueiro-anão é destinada basicamente ao mercado de água de coco (Aragão, 2002). O arranjo produtivo brasileiro do coco verde vem se consolidando principalmente pelo crescimento do consumo da água de coco impulsionado pela inclusão de hábitos saudáveis no comportamento da população brasileira, o que tem estimulado o aumento das áreas de plantio (Martins; Jesus Júnior, 2014).

As cascas do coco verde, recolhidas nas praias e nos locais de venda de coco nas cidades e resultantes das agroindústrias têm sido descartadas nos aterros sanitários e/ou em lixões, reduzindo a vida útil desses depósitos, uma vez que leva de oito a dez anos para se degradar devido ao alto teor de lignina, proliferando focos de vetores transmissores de doenças (Nunes, 2011), causando mau cheiro e possíveis contaminações do solo e corpos d'água tornando um passivo ambiental grave (Corradini et al., 2006) e, conseqüentemente, sobrecarga os aterros sanitários. Dados da Embrapa Tabuleiros Costeiros revelam que, a cada 125 cocos descartados, após consumo de sua água, ocupam 1 m³ de espaço nos aterros (Cintra et al., 2009). Estudos realizados pela Embrapa Agroindústria Tropical estimam que 70% do lixo coletado nas praias brasileiras são compostos por cascas de coco verde (Aproveitamento..., 2012) e destinam aos lixões/aterros sanitários.

A área destinada à colheita de coco em 2015 foi de 253.383 ha com produção 1.926.857.000 fruto de coco seco e verde por ano (IBGE, 2015). Considerando a estimativa do consumo de coco no mercado brasileiro correspondente a 35% como coco verde (Cuenca et al., 2002), é estimada uma produção de 1.233.693 t/ano de casca de coco verde.

O líquido da casca de coco verde (LCCV) é gerado durante o processo de trituração e prensagem dessas cascas produzindo um resíduo com elevada carga orgânica. O descarte inadequado deste líquido ocasiona um grande impacto ambiental, tornando indispensável buscar tratamentos adequados para os despejos líquidos produzidos no processo de beneficiamento da casca de coco verde. (Sousa, 2007), uma vez que atualmente no Brasil não existem estações de tratamento para esse tipo de resíduo.

Estudos realizados mostram que o LCCV no estado líquido pode ser utilizado como complemento da adubação de coqueiros como fonte de potássio e como alternativa para redução da quantidade de fertilizante químico (Crisóstomo; Aragão, 2011). Outra forma de uso estudada é no processo de produção do álcool etílico, pelo fato do LCCV possuir um grande potencial fermentativo, sendo um meio seletivo para leveduras de grande importância na produção de etanol (Teixeira, 2007).

<sup>1</sup>Graduando em Agroecologia, bolsista da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

<sup>2</sup>Engenheira-agrônoma, doutora em Produção Vegetal, pesquisadora da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

Na literatura existente há poucos trabalhos científicos sobre o uso do LCCV, sendo de grande importância a geração de novos conhecimentos e de novas alternativas tecnológicas de uso correto desse resíduo resultante do consumo da água de coco. Diante desse fato, este trabalho teve como objetivo gerar conhecimento sobre a composição química de macro e micronutrientes do LCCV no estado líquido e no estado sólido, vislumbrando novas alternativas de destinação desse resíduo.

## Material e Métodos

Foram utilizadas cascas de coco verde coletadas em plantios na Fazenda Caju da Embrapa Tabuleiros Costeiros situada no município de Itaporanga D'Ajuda, SE e na área de produção da Fazenda Obrigado 2 localizada no município de Conde, BA. Foram coletados 30 frutos em cada local, pesados após a retirada da água e triturados em um triturador específico para desfibramento das cascas. Na Fazenda Obrigado 2, as cascas foram prensadas manualmente para obtenção do LCCV. As amostras foram identificadas conforme seu local de coleta e acondicionadas sob refrigeração para transporte até o laboratório da Embrapa Tabuleiros Costeiros para caracterização química.

Inicialmente aferiu-se o pH das amostras dos dois locais, utilizando um medidor de pH. Em seguida foram separadas duas alíquotas, uma de 10 ml para as análises do líquido in natura e uma de 1,0 L para secagem em estufa de circulação de ar forçado a 70 °C para obtenção do resíduo sólido. As análises foram realizadas seguindo a metodologia de Silva (2009). Após solubilização por meio do processo de digestão nitroperclórico das amostras líquida e sólida, foram quantificados os analitos de P, S, Na, K, Ca, Mg, Cu, Fe, Mn e Na (Tabelas 1 e 2). Os analitos P e S foram quantificados por espectrofotometria de absorção molecular e os analitos Na, K, Ca, Mg, Cu, Fe, Mn e Zn por espectrofotometria de absorção atômica.

## Resultados e Discussão

Em relação ao rendimento do líquido da casca de coco verde (LCCV) são necessários 2,87 kg de casca de coco verde com albúmen sólido para obter dois litros desse líquido. Considerando uma produção estimada de 1.233.693 t/ano de casca de coco verde (Nunes, 2011), o Brasil tem potencial para gerar 859.716.376 litros de LCCV/ano. Quanto a relação entre a parte líquida e sólida do LCCV, foi constatado nesse trabalho que cada litro desse líquido in natura gera em média 59 g de sólido contendo vários nutrientes importantes para a nutrição de plantas.

Dentre os macronutrientes analisados no LCCV, tanto no estado líquido quanto no estado sólido, o maior teor foi de potássio com maior concentração na parte sólida (Tabelas 1, 2). Os teores de potássio encontrados no líquido (1,65 g/kg e 1,94 g/kg nos frutos coletados na Fazenda Caju e na Obrigado 2 (respectivamente), (Tabela1) é aproximado ao valor médio de 2,3 g L<sup>-1</sup>, relatado por (Crisóstomo; Aragão 2011).

Na parte sólida do LCCV (Tabela 2) foi constatado teores de potássio de 36,9 g/kg (frutos coletados na Fazenda Caju) e 35,02 g/kg (frutos coletados na Fazenda Obrigado 2), quantitativamente superiores aos encontrados na parte líquida e com valores semelhantes para os dois locais de coleta dos frutos.

Comparando os resultados obtidos na parte líquida do LCCV das cascas coletadas nos dois locais (Tabela 1), verifica-se que no LCCV das cascas de coco dos frutos produzidos na Fazenda Caju, os teores de nutrientes em ordem decrescente foram: K > Na > Mg > Ca > P > S > Fe > Zn > Mn > Cu e para os frutos coletados na Fazenda Obrigado 2 foram: K > Ca > Na > Mg > P > S > Fe > Mn > Zn, provavelmente devido as diferentes adubações adotadas em cada sistema de produção.

**Tabela 1.** Teores médios de nutrientes no líquido da casca de coco verde in natura procedente de dois locais. Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2018.

Local	K	Na	Mg	Ca	P	S	Fe	Zn	Mn	Cu
	<b>mg/kg</b>									
<b>Fazenda Obrigado 2</b>	1937,0	166,9	157,3	295,5	85,0	61,6	30,2	0,7	0,8	0,6
<b>Fazenda Caju</b>	1651,8	296,8	116,0	94,2	70,8	50,2	30,3	2,0	1,0	0,2

Análise realizada no Laboratório de Ecofisiologia Vegetal e Nutrição de Plantas da Embrapa Tabuleiros Costeiros. Médias de três repetições.

**Tabela 2.** Teores médios de nutrientes na parte sólida do líquido da casca de coco verde procedente de dois locais. Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2018.

Local	K	Na	Mg	Ca	P	S	Fe	Zn	Mn	Cu
					mg/kg					
<b>Fazenda Obrigado 2</b>	35020,4	2402,0	2768,5	3214,0	933,5	464,3	306,3	13,4	14,9	4,7
<b>Fazenda Caju</b>	36907,4	3857,4	2303,0	2422,2	1447,1	597,5	740,8	44,5	25,6	8,2

Análise realizada no Laboratório de Ecofisiologia Vegetal e Nutrição de Plantas da Embrapa Tabuleiros Costeiros. Médias de três repetições.

Segundo o Conselho Nacional de Meio Ambiente (Conama) resolução 430/2011, os efluentes de qualquer fonte poluidora somente podem ser lançados no corpo receptor se apresentarem pH entre 5 e 9, teores de ferro até 15,0 mg/L, manganês até 1,0 mg/L, zinco até 5,0 mg/L e cobre até 1,0 mg/L. Pelos resultados encontrados nesse trabalho, o LCCV apresenta teor de ferro o dobro do permitido (30 mg/L) e o teor de manganês (LCCV dos frutos da Fazenda Obrigado 2) no limite máximo (Tabela 1). A parte sólida do LCCV (Tabela 2), apresentou altos teores de manganês, ferro, cobre e zinco, muito superiores ao permitido pelo Conama, inviabilizam o descarte desse resíduo diretamente no meio ambiente. Em relação ao pH do LCCV das cascas dos frutos coletados nos dois locais, os valores encontrados de 5,21 (Fazenda Caju) e 5,48 (Fazenda Aurantiaca), estão dentro do limite permitido pelo Conama.

Sendo o LCCV uma fonte potencialmente poluidora do solo e de lenções freáticos e, ao mesmo tempo, uma fonte de nutrientes importantes para a produção vegetal, deve-se estudar alternativas de uso desse resíduo na agricultura, como por exemplo, complemento de adubação de diversas espécies vegetais tanto via solo quanto via foliar, além de uso em biofertilizantes e substratos.

## Conclusões

O LCCV é uma fonte potencialmente poluidora do solo e de lenções freáticos e, ao mesmo tempo, uma fonte de nutrientes importantes para a produção vegetal.

Na parte sólida do LCCV está a maior concentração de todos os nutrientes em relação à parte líquida, podendo ser usada como fonte complementar de nutrientes na adubação do coqueiro e de diversas espécies vegetais.

Sugere-se fazer lagoas de sedimentação para o LCCV gerado no processo de trituração da casca de coco verde e posterior secagem da parte sólida para ser usada em adubação.

## Agradecimentos

À Fapitec pela bolsa concedida. À Embrapa Tabuleiros Costeiros pelo apoio necessário à realização do trabalho. Ao Robson Dantas pelas análises realizadas e à empresa Aurantiaca pela doação dos frutos de coco verde a apoio na trituração e retirada do LCCV.

## Referências

APROVEITAMENTO de resíduos: coco, qual o destino da casca? **A Lavoura**. v. 690, a. 115, 2012. Disponível em: < [https://issuu.com/sociedadenedeagricultura/docs/a\\_lavoura\\_690](https://issuu.com/sociedadenedeagricultura/docs/a_lavoura_690) >.

ARAGÃO, W. M. (Ed.). **Coco: pós-colheita**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica; Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2002. 76 p. (Frutas do Brasil, 29).

CRISÓSTOMO, L. A.; ARAGÃO, F. A. S. Utilização do líquido da casca de coco-verde em pomar de coqueiro anão e efeitos sobre as características do solo e da planta. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2011. (Embrapa Agroindústria Tropical. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 56).

CINTRA, F. L. D.; FONTES, H. R.; PASSOS, E. E. M. et al. (Ed.). **Fundamentos tecnológicos para a revitalização das áreas cultivadas com coqueiro gigante no Nordeste do Brasil**. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2009. 232 p. p. 37-60.

- CORRADINI, E.; ROSA, M. F.; MACEDO, B. P. de; PALADIN, P. D.; MATTOSO, L. H. C. Composição química, propriedades mecânicas e térmicas da fibra de frutos de cultivares de coco verde. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 31, n. 3, 2006.
- CUENCA, M. A. G.; RESENDE, J. M.; SAGGIN JÚNIOR, O. J.; REIS, C. dos S. Mercado brasileiro do coco: situação atual e perspectivas. In: ARAGÃO, W. M. (Ed.). **Coco: pós-colheita**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2002. p. 11- 18.
- IBGE. PRODUÇÃO AGRÍCOLA MUNICIPAL 2015. Rio de Janeiro, 2015. Disponível em: <http://ibge.gov.br>. Acesso em: 11 jun. 2018.
- SILVA, F. C. da (Ed.). Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes. 2. ed. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica; Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 2009. 627 p.
- MARTINS, C. R.; JESUS JUNIOR, L. A. **Evolução da produção de coco no Brasil e o comércio internacional: panorama 2010**. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2014. 51 p. (Embrapa Tabuleiros Costeiros. Documentos, 184). Disponível em: <https://www.embrapa.br/tabuleiros-costeiros/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1014433/producao-e-comercializacao-de-coco-no-brasilfrente-ao-comercio-internacional--panorama-2014> >. Acesso em: 18 de jul. 2018.
- NUNES, M. U. C. Aproveitamento de resíduos do coqueiro na indústria e na agricultura. In: II CONGRESSO BRASILEIRO DE RESÍDUOS ORGÂNICOS, 2., 2011, Vitória. Anais... Vitória: Incaper, 2011.
- SOUSA, O. L. **Tratamento do líquido gerado no beneficiamento da casca de coco verde em sistema de lodos ativados**. 2007. 113 f. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2007.
- TEIXEIRA, R. B. **Fermentação alcoólica utilizando líquido da casca de coco verde como fonte de nutrientes**. 2007. 94 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química)-Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Centro de Tecnologia, Natal, 2007.

# Levantamento de cigarrinhas potencialmente vetoras de fitoplasmas causadores de LYTS em coqueiro e suas plantas hospedeiras em Alagoas

Luciana Vanessa Anselmo Sampaio<sup>1</sup>, Adriana Neutzling Bierhals<sup>2</sup>, Ana Paula do Nascimento Prata<sup>3</sup>, Elio Cesar Guzzo<sup>4</sup>

**Resumo** - O coqueiro (*Cocos nucifera*) é uma das espécies de palmeira de maior importância econômica no mundo. Com seu centro de origem na Ásia, o coqueiro se adaptou bem ao Brasil, transformando o país em um dos principais produtores do fruto. As doenças chamadas de Síndromes do Tipo Amarelecimento Letal (conhecidas pela sigla LYTS, em inglês) são hoje o principal problema da produção de coco, sendo que o amarelecimento letal é considerado a doença mais letal e devastadora da cultura no mundo. Esta doença é causada por um fitoplasma, e transmitida pela cigarrinha *Haplaxius crudus* (Hemiptera: Cixiidae), no entanto, outras espécies de cigarrinhas, inclusive de outras famílias, podem estar envolvidas na transmissão. O objetivo do presente trabalho foi identificar as cigarrinhas potencialmente vetoras de fitoplasmas causadores de Síndromes do Tipo Amarelecimento Letal em coqueiro, e suas plantas hospedeiras em Alagoas. Em uma plantação de coqueiros localizada no município de São Miguel dos Milagres, litoral norte de Alagoas, foi feito o levantamento das espécies de cigarrinhas por meio de armadilhas adesivas amarelas, trocadas a cada duas semanas, e de sugadores bucais. Foi coletado um total de 620 cigarras/cigarrinhas, pertencentes a 11 famílias, com predominância de indivíduos das famílias Cicadellidae e Derbidae. Plantas das famílias Cyperaceae e Poaceae presentes no interior do coqueiral também foram coletadas e montadas em exsicatas para a posterior identificação. Até o momento, foram encontradas cinco morfoespécies (duas Cyperaceae e três Poaceae), cujo processo de identificação ao nível específico ainda está em andamento.

**Termos para indexação:** amarelecimento letal, Cixiidae, *Cocos nucifera*, cocoicultura, inseto vetor.

## Introdução

O Brasil é um dos maiores produtores mundiais de coco, com uma área plantada de 228.920 ha, e uma produção de mais de 1,8 bilhões de frutos no ano de 2016 (Agrianual, 2017). Dentre as principais doenças da cocoicultura destaca-se um grupo chamado de Síndromes do Tipo Amarelecimento Letal (conhecidas pela sigla LYTS, em inglês) (Oropeza et al., 2011; Myrie et al., 2012). Deste grupo, o amarelecimento letal é a doença da cultura do coqueiro mais devastadora no mundo (Eziashi; Omamor, 2010; Oropeza et al., 2011; Myrie et al., 2012). Os sintomas da doença incluem necrose da inflorescência, queda prematura e repentina de todos os frutos e amarelecimento das folhas baixas, levando a palmeira à morte entre três a seis meses após o aparecimento dos primeiros sintomas (Broschat et al., 2002; Myrie et al., 2006; Dollet et al., Dollet et al., 2009). Esse tipo de doença ainda não ocorre no Brasil, no entanto, como já se encontra disseminada por vários países da América Latina e Caribe, seu risco de introdução é considerado iminente. O fitoplasma causador do amarelecimento letal é transmitido pela cigarrinha *Haplaxius crudus* (Hemiptera: Cixiidae) (Howard et al., 1983; Howard, 1997), cujos adultos se alimentam nas folhas do coqueiro, e as ninfas se desenvolvem nas raízes de diversas espécies de plantas das famílias Cyperaceae e Poaceae (Cabi, 2016), que geralmente crescem espontaneamente nos plantios, junto à base dos coqueiros, nas entrelinhas, ou ao redor dos coqueirais. No Brasil, no final dos anos 1980, um inseto encontrado em coqueiros no Pará foi identificado como *Myndus crudus* (Celestino Filho et al., 1998), hoje considerados sinônimo de *H. crudus*. Recentemente, espécimes foram coletados novamente no Pará e, por meio de técnicas mais modernas de identificação morfológica e também molecular, foi confirmado que se trata mesmo da espécie *H. crudus* (dados não publicados). Em Cuba e na Jamaica, no entanto, fitoplasmas do amarelecimento letal também foram encontrados em *Nymphocixia caribbea*, outra cigarrinha da família Cixiidae (Dollet et al., 2010). Como o papel de *H. crudus* como vetor da doença não foi comprovado nestas ilhas, *N. caribbea* poderia ser considerada como outro possível vetor para o amarelecimento letal. Além disso, cigarrinhas de outras famílias, como Cicadellidae e Derbidae, por exemplo, são conhecidas por transmitirem fitoplasmas, sendo que possíveis vetores devem ser identificados para a avaliação do maior ou menor risco de disseminação na região em caso de entrada da doença no Brasil. Assim, se faz necessário investigar quais são as espécies de cigarrinhas potencialmente vetoras do amarelecimento letal em todo o Brasil, para a avaliação do maior ou menor risco de disseminação em cada região no caso de entrada da doença no país, bem como a distribuição e

<sup>1</sup> Graduanda em Agronomia, bolsista da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Unidade de Execução de Pesquisa de Rio Largo (UEP-Rio Largo), Rio Largo, AL.

<sup>2</sup> Bióloga, bolsista da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Unidade de Execução de Pesquisa de Rio Largo (UEP-Rio Largo), Rio Largo, AL.

<sup>3</sup> Bióloga, doutora em Botânica, professora da Universidade Federal de Alagoas, Rio Largo, AL.

<sup>4</sup> Biólogo, doutor em Entomologia, pesquisador da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Unidade de Execução de Pesquisa de Rio Largo (UEP-Rio Largo), Rio Largo, AL.

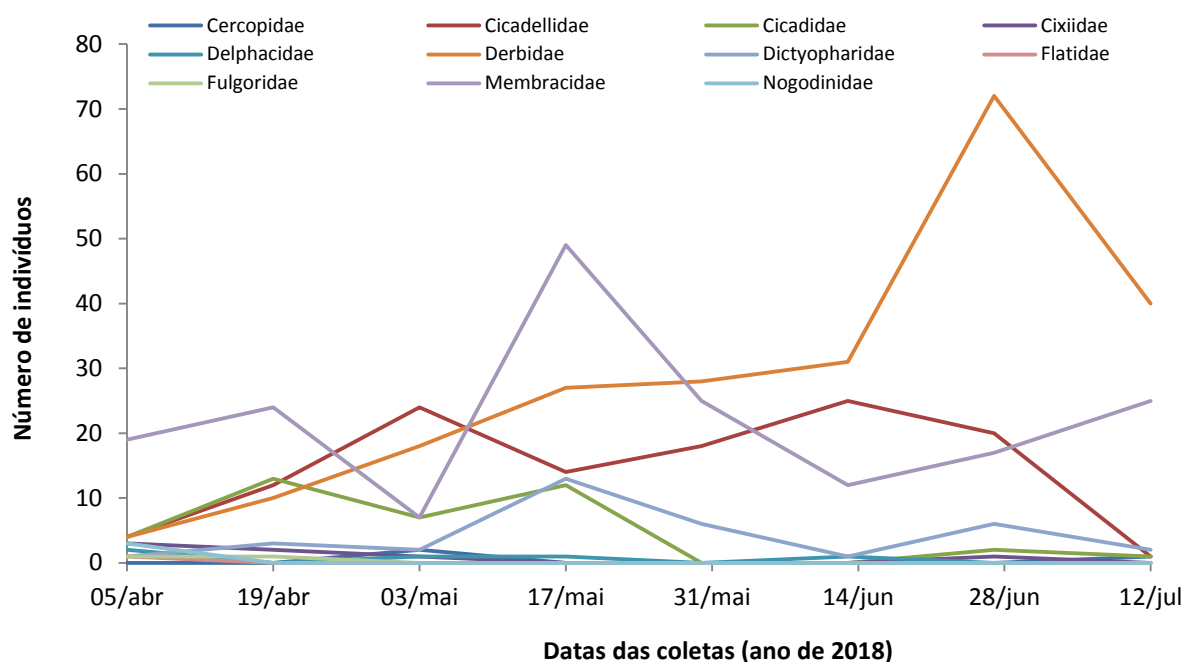
os hospedeiros desses insetos, a fim de se estabelecer medidas de controle eficazes. O presente trabalho teve como objetivo, identificar as cigarrinhas potencialmente vetoras de fitoplasmas causadores de Síndromes do Tipo Amarelecimento Letal em coqueiro e suas plantas hospedeiras em Alagoas.

## Material e Métodos

O levantamento foi conduzido em uma área de produção de coco no município de São Miguel dos Milagres, localizado no litoral norte de Alagoas, durante quatro meses. A área foi selecionada por estar situada próxima a uma lagoa, visto que Cixiidae têm sido encontrados em maior abundância em locais com solo úmido. Na área experimental, foram coletadas cigarrinhas em coqueiros e em vegetação rasteira. As amostragens foram feitas durante quatro meses, no período entre abril e julho de 2018. Utilizaram-se armadilhas adesivas amarelas (30 cm × 10 cm), com cola nos dois lados, fixadas às folhas do coqueiro, as quais eram retiradas e substituídas por outras novas a cada duas semanas. Por ocasião da inspeção e substituição das armadilhas, os insetos visíveis na folhagem também eram capturados com o auxílio de aspirador de boca. Todas as cigarrinhas coletadas eram levadas ao laboratório, sendo que as coletadas vivas eram mortas por congelamento, e aquelas fixadas às armadilhas adesivas eram retiradas com auxílio de solvente à base de óleo cítrico e pincel, sob microscópio estereoscópico. Os exemplares foram conservados em álcool a 70% e posteriormente foram agrupados por famílias com o auxílio de chaves dicotômicas dos grupos. Na mesma área de estudo, as plantas das famílias Cyperaceae e Poaceae foram coletadas, levadas ao laboratório, e montadas em exsicatas para a identificação das espécies.

## Resultados e Discussão

Durante o período de amostragem, foi coletado um total de 620 cigarras/cigarrinhas, pertencentes a 11 famílias. As famílias das cigarrinhas potencialmente vetoras de fitoplasmas que ocorreram com maior abundância foram Derbidae e Cicadellidae, com 230 e 118 indivíduos, respectivamente. Da família Cixiidae, foram coletados sete indivíduos (Figura 1). Observou-se que a família Derbidae predominou em quatro coletas, chegando a 72 indivíduos na sétima coleta (28/06). A família Cicadellidae predominou na terceira coleta (03/05), com 24 indivíduos. Ainda que não seja considerada vetora de fitoplasmas, a família Membracidae foi predominante em três coletas, chegando a ter 49 indivíduos na quarta coleta (17/05), e sendo a segunda mais coletada entre todas as famílias, com um total de 178 indivíduos.



**Figura 1.** Famílias de cigarras e cigarrinhas coletadas com armadilhas adesivas amarelas e sugador bucal, em coqueiral, no município de São Miguel dos Milagres, AL.

Com relação às plantas possivelmente hospedeiras das ninfas de Cixiidae, até o momento, foram coletadas 5 morfoespécies (3 pertencentes à família Poaceae, e 2 à família Cyperaceae), sendo que a identificação ao nível de espécie ainda está em andamento. A amostragem das cigarrinhas e das possíveis plantas hospedeiras das ninfas continuará por mais 20 meses. Tentar-se-á identificar o maior número possível de insetos até o nível específico, bem como correlacionar a sua abundância com as variáveis climáticas, e verificar quais são exatamente as plantas hospedeiras de cada espécie. Assim, espera-se contribuir com o manejo dos insetos vetores e, consequentemente do amarelecimento letal do coqueiro, caso o mesmo entre no Brasil.

## Conclusões

Foram coletadas 11 famílias de cigarras e cigarrinhas na área experimental. As famílias de cigarrinhas potencialmente vetoras de fitoplasmas capturadas em maior abundância foram Derbidae e Cicadellidae. Foram encontradas 5 morfoespécies de plantas potencialmente hospedeiras de Cixiidae, em associação com o coqueiro, sendo 3 da família Poaceae e 2 de Cyperaceae.

## Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Alagoas (Fapeal), pela concessão de bolsas de iniciação científica à primeira autora; à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pela concessão de bolsa de doutorado à segunda autora; e à Agência de Defesa e Inspeção Agropecuária de Alagoas (Adeal), pelo fornecimento das armadilhas adesivas utilizadas no levantamento.

## Referências

A AGRIANUAL: **Anuário da Agricultura Brasileira**. 21 ed. São Paulo: FNP Consultoria e Agroinformativos, 2016.

BROSCHAT, T. K.; HARRISON, N. A.; DONSELMAN, H. Losses to lethal yellowing cast doubt on coconut cultivar resistance. **Palms**, v. 46, n. 4, p. 185-189, 2002.

CABI. *Haploxys crudus* (American Palm cixiid). **Invasive Species Compendium**. Disponível em <<http://www.cabi.org/isc/datasheet/35465>>. Acesso em: 09/11/2016.

CELESTINO FILHO, P.; VAN SLOBBE, W.; FREIRE, F. O.; SOUZA, L. A.; LOUISE, C. **Relatório de viagem às plantações de dendê e coco no estado do Pará**. Belém: Centro Nacional de Pesquisa de Seringueira e Dendê, 1988. (Documentos, 5).

DOLLET, M.; QUAICOE, R.; PILET, F. Review of Coconut “Lethal Yellowing” type diseases, Diversity, variability and diagnosis. **OCL – Oilseeds and fats, Crops and Lipids**, v. 16, n. 2, p. 97-101, 2009.

EZIASHI, E.; OMAMOR, I. Lethal yellowing disease of the coconut palms (*Cocos nucifera* L.); An overview of the crises. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 54, p. 9122-9127, 2010.

HOWARD, F. W.; NORRIS, R. C.; THOMAS D. L. Evidence of transmission of palm lethal yellowing agent by a planthopper, *Myndus crudus* (Homoptera: Cixiidae). **Tropical Agriculture**, v. 60, p. 168-171, 1983.

HOWARD, F. W. Lethal yellowing vector studies in the Americas. In: INTERNATIONAL WORKSHOP ON LETHAL YELLOWING – LIKE DISEASES OF COCONUT, 1995, Elmina, Ghana. Chatam, UK: Natural Resources Institute, 1997.

MYRIE, W. A.; DOUGLAS, L.; HARRISON, N. A.; MCLAUGHLIN, W.; JAMES, M. First report of lethal yellowing disease associated with subgroup 16 SrIV, a phytoplasma on St. Kitts in the Lesser Antilles. **New Disease Reports**, v. 26, p. 25, 2012.

MYRIE, W. A.; PAULRAJ, L.; DOLLET, M.; WRAY, D.; BEEN, B. O.; MCLAUGHLIN, W. First report of lethal yellowing disease of coconut palms caused by phytoplasma on Nevis Island. **Plant Disease**, v. 90, p. 834, 2006.

OROPEZA, C.; CORDOVA, I.; CHUMBA, A.; NARVAEZ, M.; SAENZ, L.; ASBURNER, R.; HARRISON, N. Phytoplasma distribution in coconut palms affected by lethal yellowing disease. **Annals of Applied Biology**, v. 159, p. 109-117, 2011.



# Avaliação de isolados de nematoides entomopatogênicos para controle de *Rhynchophorus palmarum*

Patricia da Silva Santos<sup>1</sup>, Elisson Teixeira da Silva<sup>2</sup>, Natália Tavares Santos Ferreira<sup>3</sup>, Aldomário Santo Negrison Junior<sup>4</sup>, Juan Pablo Molina Acevedo<sup>5</sup>, Valdemir Albuquerque da Silva Junior<sup>6</sup>

**Resumo** - O *Rhynchophorus palmarum* L., 1764 (Coleoptera: Curculionidae), está dentre as principais pragas de relevância econômica na cultura do coqueiro. A sua fase larval, responsável por causar os danos diretos à cultura, ocorre no interior da planta. Os nematoides entomopatogênicos (NEPs) possuem o comportamento de busca e localização de agentes nocivos à planta. Em países da Europa, o uso de nematoides vem sendo utilizado visando o controle do *Rhynchophorus ferrugineus* em Arecaceae, demonstrando seu potencial no controle biológico desta espécie de inseto. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a patogenicidade e virulência de sete espécies de NEPs em larvas de *R. palmarum*, testando a hipótese se este método pode vir a se tornar uma medida de controle eficiente. As larvas foram inoculadas com os nematoides das espécies *Steinernema carpocapsae*, *Heterorhabditis amanzonensis* JPM4, *S. feltiae*, *Heterorhabditis* P5, *H. amanzonensis* RSC 05, *S. brasiliense* e *H. bacteriophora*. nas concentrações de 100JIs e 500JIs, sendo a avaliação da mortalidade dos insetos realizada diariamente durante 12 dias. Com uma concentração de 100JIs os resultados indicam uma maior virulência com *S. brasiliense* e *S. feltiae* com 80% e 50%, respectivamente, seguidas de *Heterorhabditis* P5 e *S. carpocapsae* com 40% e 30%. Ao utilizar concentração de 500JIs, a porcentagem de mortalidade de larvas de *R. palmarum* foi maior com a inoculação das espécies *S. feltiae*, *S. carpocapsae*, *H. bacteriophora* e *H. amanzonensis* JPM4, com 100%, 90%, 90% e 80%, respectivamente, seguidas de *S. brasiliense* e *H. amanzonensis* RSC 05 com 70% e 50%.

**Termos para indexação:** entomopatogênico, controle biológico, virulência.

## Introdução

O coqueiro (*Cocos nucifera*) é uma cultura amplamente cultivada na região intertropical de todo planeta. Na faixa litorânea do nordeste brasileiro encontra-se condições propícias para um bom rendimento da cultura, entretanto, o crescimento na incidência de pragas e o manejo inadequado e de forma empírica, acarreta baixa produtividade e rendimento, sendo assim as pragas em especial as coleobrocas um dos fatores limitantes da cultura.

*Rhynchophorus palmarum* (L.) tem sido hoje uma das grandes preocupações no que diz respeito às coleobrocas em palmeiras de modo geral, é um inseto de hábito diurno, podendo ser encontrado em todas as fases de seu desenvolvimento e em qualquer época do ano, o que favorece o crescimento populacional de forma exponencial. O maior dano é causado pela fase de larva, já que a larva se alimenta do tecido meristemático da planta, abrindo galerias que são portas de entrada para pragas e doenças secundárias. Além de causar danos diretos, o inseto também é vetor do nematoide *Bursaphelenchus cocophilus* (Cobb), agente causal do “anel vermelho”, que ocasiona a morte das plantas (Sánchez; Cerda, 1993).

Existe atualmente uma dificuldade do controle da broca-do-olho no coqueiro pela complexidade no manejo de inseticidas capazes de controlar a densidade população do inseto, visto que as larvas que causam o maior dano, estão no interior da planta, impossibilitando o uso de um inseticida de contato, ou controle biológico com bactérias ou fungos. A possibilidade de uso de nematoides entomopatogênicos pode trazer para a cultura uma sobrevida e ainda com a vantagem de não de utilizar químicos, que garante ao produtor uma maior biossegurança e ao consumidor uma qualidade superior aos produtos que recorrem aos químicos na fase de produção.

Os nematoides entomopatogênicos são agentes encontrados no solo, em diversas regiões do globo, e após penetrarem no hospedeiro pelas aberturas naturais, liberam uma bactéria entomopatogênica que carregam em seu trato digestório, causando septicemia no inseto entre 24 e 48 horas (Ferraz, 1998; Hominick, 2002).

<sup>1</sup>Graduanda em Engenharia Agrônoma, bolsista da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Unidade de Execução de Pesquisa de Rio Largo (UEP-Rio Largo), Rio Largo, AL.

<sup>2</sup>Graduando em Engenharia Agrônoma, bolsista da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Unidade de Execução de Pesquisa de Rio Largo (UEP-Rio Largo), Rio Largo, AL.

<sup>3</sup>Graduanda em Engenharia Agrônoma, bolsista da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Unidade de Execução de Pesquisa de Rio Largo (UEP-Rio Largo), Rio Largo, AL.

<sup>4</sup>Engenheiro-agrônomo, doutor em Fitossanidade/Entomologia, Embrapa Tabuleiros Costeiros, Unidade de Execução de Pesquisa de Rio Largo (UEP-Rio Largo), Rio Largo, AL.

<sup>5</sup>Engenheiro-agrônomo, doutor em Entomologia, Corpoica, Colômbia.

<sup>6</sup>Engenheiro-agrônomo, Rio Largo, AL.

No estágio larval, o inseto tem seu crescimento dentro das galerias no interior do coqueiro, o que dificulta os métodos de controle biológico com bactérias e fungos, já que estes não têm estruturas que possibilitem a busca da presa. Por sua vez, o comportamento dos nematoides entomopatogênicos (NEP's) permite a busca e a localização desta praga. Esses atributos tornam estes inimigos naturais, uma promissora alternativa para ser usada no controle de *R. palmarum* (Gaugler; Campbell, 1991). O presente trabalho teve como objetivo avaliar a patogenicidade de sete espécies de nematoides entomopatogênicos em larvas de *R. palmarum*, testando a hipótese se esse método pode vir a se tornar uma medida de controle eficiente.

## Material e Métodos

Os experimentos foram conduzidos no laboratório de Entomologia da Embrapa Tabuleiros Costeiros, UEP Rio Largo, AL. A obtenção dos adultos de *R. palmarum* foi realizada no coqueiral situado no Município de São Miguel dos Milagres, Alagoas. A coleta foi feita com o auxílio de armadilhas tipo balde com iscas à base de cana-de-açúcar e feromônio de agregação Rincoforol®.

Os nematoides que foram usados para o experimento foram multiplicados em larvas de *Galleria mellonella* através da criação já estabelecida no laboratório. Foram feitas avaliações da patogenicidade e virulência utilizando os nematoides *Steinernema carpocapsae*, *Heterorhabditis amanzonensis* JPM4, *Steinernema feltiae*, *Heterorhabditis* P5, *Heterorhabditis amanzonensis* RSC 05, *Steinernema brasiliense* e *Heterorhabditis bacteriophora*, nas concentrações 100 juvenis infectantes por mililitro (JIs/ mL). Como controle, foi utilizado 1 mL de água destilada. Foram realizadas dez repetições, cada repetição constituída por uma larva de *R. palmarum*. Em um segundo momento, utilizando a mesma quantidade de repetições e com intervalo de tempo com uma dose maior houve a reinoculação, com uma concentração de 500 JIs/ mL. O ensaio foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado. Aplicaram-se as suspensões com o auxílio de uma pipeta. Os tratamentos foram mantidos em BOD com temperatura de  $25 \pm 1$  °C, foto fase de 12 horas e umidade relativa de  $60 \pm 10\%$ .

Nas avaliações de ambos os experimentos, a mortalidade das larvas de *R. palmarum* foi observada durante doze dias consecutivos. Após a morte das larvas, estas foram individualizadas em câmara seca (White, 1927), e posteriormente colocados 2 mL água destilada. No dia seguinte, os insetos foram observados em microscópio estereoscópio e assim dissecados com auxílio de pinças retirando-se a hemolinfa das larvas, deste modo verificando se haviam NEPs e/ou sintomas. Os dados de mortalidade dos insetos foram utilizados para determinar a patogenicidade de cada isolado, bem como a virulência, em diferentes isolados.

Foi avaliada a porcentagem de mortalidade (PM), a qual foi estimada como relação entre o número de larvas de *R. palmarum* mortas e o número de larvas total utilizadas (vivas e mortas).

$$PM = \left( \frac{\text{Nº de lagartas mortas}}{\text{Nº total de lagartas vivas e mortas}} \right) \times 100$$

Após a obtenção das porcentagens de mortalidade para cada isolado de nematoide e para a testemunha foi estimada a porcentagem de mortalidade corrigida (PMC) para os tratamentos segundo Abbott (Alves, et. al., 1998).

$$PMC = \left( \frac{PM \text{ do tratamento} - PM \text{ da testemunha}}{100 - PM \text{ da testemunha}} \right) \times 100$$

A avaliação do índice de mortalidade foi efetuada considerando o percentual de mortalidade corrigida (PMC) das larvas: Alta de 80% a 100%, média de 50% a 80% e baixa de 50% a 10%.

## Resultados e Discussão

A porcentagem de mortalidade (PM) de larvas de *R. palmarum* foi maior nos tratamentos com *S. brasiliense* e *S. feltiae* com 80% e 50% respectivamente, seguidas de *Heterorhabditis* P5 e *S. carpocapsae* com 40% e 30%. A partir das porcentagens de mortalidade (PM) de larvas de *R. palmarum* foram calculadas as porcentagens de mortalidade corrigida (PMC) sendo que a espécie *S. brasiliense* foi a que apresentou maior virulência com 71%, sendo seguida pelas espécies *S. feltiae* e *Heterorhabditis* P5 com 28,6% e 14,3%, respectivamente. Tais resultados indicam uma maior virulência destas espécies de nematoides entomopatogênicos (Tabela 1).

**Tabela 1.** Porcentagem de mortalidade (PM) e porcentagem de mortalidade corrigida (PMC) de *R. palmarum* infectadas com diferentes isolados de nematoides entomopatogênicos.

NEPs	PM (%)	PMC $\pm$ EP (%)
<i>S. brasiliense</i>	80	71,4 $\pm$ 9,31A
<i>S. feltiae</i>	50	28,6 $\pm$ 6,84B
<i>Heterorhabditis</i> P5	40	14,3 $\pm$ 4,63C
<i>S. carpocapsae</i>	30	0
<i>H. bacteriophora</i>	20	0
<i>H. amanzonensis</i> RSC 05	10	0
<i>H. amanzonensis</i> JPM4	10	0
Testemunha	30	-

Letras diferentes nas colunas representam diferenças significativas a 5% entre médias, pelo teste de Duncan ( $P < 0,05$ )

No teste de patogenicidade, avaliado após seis dias de inoculação dos NEPs, verificou-se que a espécie *S. brasiliense* ocasionou sintomas de infecção por nematoides em 30% das larvas de *R. palmarum*. Além disso, 20% das larvas inoculadas com a espécie *S. feltiae* também apresentaram tais sintomas (Tabela 2).

Durante as avaliações foi observado que alguns insetos mortos com sintomatologia de infecção por NEPs, mas não foram encontrados nematoides. Isto sugere que o sistema imunológico das larvas de *R. palmarum* foram eficientes para contenção da infecção por nematoides, mas não impediu que estes liberassem suas bactérias.

**Tabela 2.** Sintomatologia, produção de juvenis infectantes (JI) e duração do ciclo dos nematoides entomopatogênicos.

NEPs	Sintomatologia por infecção	Produção de juvenis (JIs)**	Duração do ciclo*
<i>S. brasiliense</i>	30% das larvas com sintomas (6 dias)	Não houve	Longo
<i>S. feltiae</i>	20% das larvas com sintomas (6 dias)	10% das larvas JI (1dia)	Longo
<i>Heterorhabditis</i> P5	20% das larvas com sintomas (6 dias)	Não houve	Curto
<i>S. carpocapsae</i>	Não houve sintomas	Não houve	Longo
<i>H. bacteriophora</i>	Não houve sintomas	Não houve	Longo
<i>H. amanzonensis</i> RSC 05	Não houve sintomas	Não houve	Longo
<i>H. amanzonensis</i> JPM4	Não houve sintomas	Não houve	Longo

\*Ciclo Curto (até 5 dias) Ciclo Longo (Mais de 5 dias). \*\*JIs = juvenis infectantes.

As porcentagens de mortalidade (PM) de larvas de *R. palmarum* foram maiores com a inoculação das espécies *S. feltiae*, *S. carpocapsae*, *H. bacteriophora* e *H. amanzonensis* JPM4, com 100%, 90%, 90% e 80%, respectivamente, seguidas de *S. brasiliense* e *H. amanzonensis* RSC 05 com 70% e 50%.

A partir dos dados de mortalidade (PM) de larvas de *R. palmarum* foram calculadas as porcentagens de mortalidade corrigida (PMC), onde as espécies *R. feltiae*, *S. carpocapsae*, *H. bacteriophora* e *H. amanzonensis* JPM4 apresentaram valores de 100%, 80%, 80% e 60%, respectivamente, confirmando a maior virulência destes nematoides entomopatogênicos (Tabela 3).

**Tabela 3.** Porcentagem de mortalidade (PM) e porcentagem de mortalidade corrigida (PMC) de larvas de *R. palmarum* infectadas com diferentes isolados de nematoides entomopatogênicos (Reinoculação com 500 JIs/ mL).

NEPs	PM (%)	PMC±EP (%)
<i>S. feltiae</i>	100	90±4,28A
<i>S. carpocapsae</i>	90	80±6,45B
<i>H. bacteriophora</i>	90	80±6,45B
<i>H. amanzonensis</i> JPM4	80	60±7,11C
<i>S. brasiliense</i>	70	0
<i>H. amanzonensis</i> RSC 05	50	40±5,35D
<i>Heterorhabditis</i> P5	30	0
Testemunha	50	-

Letras diferentes nas colunas representam diferenças significativas a 5% entre médias, pelo teste de Duncan ( $P < 0,05$ ).

No teste de patogenicidade, efetuado 24 horas após a inoculação dos NEPs, verificou-se que os NEPs que mais desencadearam sintomas de infecção nas larvas de *R. palmarum* foram das espécies *S. carpocapsae*, *H. amanzonensis* JPM4 e *S. feltiae*, em 70%, 60% e 50%, respectivamente. Além disso, as espécies *H. bacteriophora* e *S. brasiliense* também provocaram sintomas de infecção em 30% das larvas aos 3 e 8 dias após a inoculação, respectivamente (Tabela 4).

**Tabela 4.** Sintomatologia, produção de juvenis infectantes (JI) e duração do ciclo dos nematoides (Reinoculação com 500 JIs/ mL).

NEPs	Sintomatologia por infecção	Produção de juvenis (JIs)	Duração do ciclo
<i>S. carpocapsae</i>	60% das larvas com sintomas (1 dia)	Não houve	Curto
<i>H. amanzonensis</i> JPM4	50% das larvas com sintomas (1 dia)	Não houve	Curto
<i>S. feltiae</i>	40% das larvas com sintomas (1 dia)	Não houve	Curto
<i>H. bacteriophora</i>	25% das larvas com sintomas (3 dias)	Não houve	Curto
<i>S. brasiliense</i>	25% das larvas com sintomas (8 dias)	Não houve	Longo
<i>H. amanzonensis</i> RSC 05	Não houve sintomas	Não houve	Longo
<i>Heterorhabditis</i> P5	Não houve sintomas	Não houve	Longo

## Conclusões

Com uma concentração de 100 JIs os resultados indicam uma maior virulência com *S. brasiliense* e *S. feltiae* com 80% e 50% respectivamente, seguidas de *Heterorhabditis* P5 e *S. carpocapsae* com 40% e 30%. Ao utilizar concentração de 500JIs a porcentagem de mortalidade de larvas de *R. palmarum* foram maiores com a inoculação das espécies *S. feltiae*, *S. carpocapsae*, *H. bacteriophora* e *H. amanzonensis* JPM4, com 100%, 90%, 90% e 80%, respectivamente, seguidas de *S. brasiliense* e *H. amanzonensis* RSC 05 com 70% e 50%. Esses resultados demonstram que os nematoides entomopatogênicos possuem capacidade de matar as larvas de *R. palmarum*, bem como apresentam capacidade de busca por esta praga. Estudos posteriores serão realizados para avaliar o efeito dos NEPs em outros estágios deste inseto, como ovos, adultos e pupas.

## Agradecimentos

Agradecemos primeiramente ao CNPq pela concessão da bolsa à primeira autora; à Embrapa por ceder sua estrutura para realização desta pesquisa; e ao Dr. Aldomário Santo Negrisoni Junior pela orientação.

## Referências

- GAUGLER, R.; CAMPBELL, J. Behaviour response to the entomopathogenic nematodes *Steinernema carpocapsae* and *Heterorhabditis bacteriophora* to oxamyl. **Annals of Applied Biology**, v. 119, p. 131-138, 1991.
- FERRAZ, L. C. C. B. Nematoides entomopatogênicos. In: ALVES, S. B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz, 1998. p. 541-569.
- HOMINICK, W. M. Biogeography. In: GAUGLER, R. (Ed.). **Entomopathogenic nematology**. New Jersey: Rutgers University, 2002. p. 115-143.
- SÁNCHEZ, P. A.; CERDA, H. El complejo *Rhynchophorus palmarum* (L.) (Coleoptera: Curculionidae) – *Bursaphelenchus cocophilus* (Cobb) (Tylenchida: Aphelenchoididae), en Palmeras. **Boletín de Entomología Venezolana**, v. 8, n. 1 p. 1 – 18, 1993.

# Avaliação da vulnerabilidade de aquíferos presentes na região de atuação da Embrapa Tabuleiros Costeiros, SE

Rafael Oliveira Franca Rocha<sup>1</sup>, Marcus Aurélio Soares Cruz<sup>2</sup>

**Resumo** - A exploração desregrada dos recursos hídricos e a ocupação desorganizada do solo comprometem a qualidade natural das águas subterrâneas. Este trabalho visa estimar a vulnerabilidade dos aquíferos presentes na região dos Tabuleiros Costeiros do Nordeste por meio da aplicação de geotecnologias, a partir do levantamento e organização de uma base de dados com informações quali-quantitativas de poços localizados na região de estudo, espacialização da informação pontual por meio de técnicas de interpolação e geoestatística e, por fim, a aplicação do método GOD para avaliação da vulnerabilidade de aquíferos associado à geoprocessamento na região de interesse, a fim de produzir cartogramas com diferentes níveis de vulnerabilidade, possibilitando a geração de diretrizes para o planejamento de usos dos solos e contribuir para o processo de gestão dos recursos hídricos. Em geral, as formações superficiais sedimentares, por apresentarem características litológicas de alta permeabilidade, bem como baixo grau de confinamento (não confinado), estão classificadas como áreas de vulnerabilidade intermediária a extrema.

**Termos para indexação:** sig, vulnerabilidade, águas subterrâneas.

## Introdução

A demanda hídrica global é fortemente influenciada pelo crescimento da população, pela urbanização, pelas políticas de segurança alimentar e energética, e pelos processos macroeconômicos, tais como a globalização do comércio, as mudanças na dieta e o aumento do consumo. Sabe-se que a água é encontrada na natureza em quantidades aleatórias no tempo e no espaço, sendo também extremamente vulnerável à deterioração qualitativa.

Dentre as reservas de disponibilidade hídrica para consumo humano, destacam-se as águas subterrâneas, além da abundância, essa reserva possui vantagens em relação a águas superficiais, tais como: apresenta uma relativa estabilidade físico-química e biológica, não sofre influência climática e sua exploração não necessita de grandes investimentos. Entretanto, a ocupação desordenada, atividades antrópicas, despejos inadequados e os elementos característicos do meio ambiente, especialmente do solo, fazem com que as águas subterrâneas sejam cada vez mais propensas à poluição. Em virtude dessa exploração crescente nas últimas décadas, é de suma importância o estudo da vulnerabilidade das águas subterrâneas, ou seja, a suscetibilidade dos aquíferos de serem afetados por cargas contaminantes de origem antrópica (Feitosa et al., 2008). Tendo em vista que um dos grandes problemas que esse recurso enfrenta é o desconhecimento de sua importância, o que leva à falta de atenção por parte da sociedade, urbanização desordenada, uso intensivo de pesticidas nas lavouras, reflorestamento, salinização e outros; e dos gestores, sendo esse um agravante, pois esse desconhecimento faz com que esse recurso não seja discutido nas grandes tomadas de decisão no planejamento urbano ou mesmo rural.

Para aplicabilidade dos métodos o uso de geotecnologias é de suma importância como ferramentas de apoio para integração, geração e interpretação dos dados, sendo possível efetuar o planejamento e estudar os fatores das áreas mais susceptíveis à contaminação, a partir da através da espacialização dos poços em cartogramas, gerando subsídios para o planejamento do uso e ocupação do solo.

Este trabalho tem como objetivo analisar a vulnerabilidade dos diversos tipos de aquíferos presentes na área de atuação da Embrapa Tabuleiros Costeiros por meio da aplicação de geotecnologias, buscando contribuir para o processo de gestão territorial do estado.

---

<sup>1</sup>Graduando em Geologia, bolsista Pibic CNPq, Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

<sup>2</sup>Engenheiro Civil, doutor em Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental, pesquisador da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

## Material e Métodos

A região de estudo, denominada de Tabuleiros Costeiros no Nordeste brasileiro (TCNEB), contempla também algumas áreas adjacentes, que representam a área total de atuação da Embrapa Tabuleiros Costeiros. Essa região está compreendida entre as coordenadas geográficas 2°47'S, 41°26'W e 18°21'S, 34°46'W, abrangendo 570 municípios nos estados do Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe e Bahia, com uma área total de aproximadamente 219,5 mil km<sup>2</sup>. Abriga uma população total de 27,1 milhões de habitantes, com grande concentração nas regiões metropolitanas, com cerca de 22,7 milhões de pessoas.

Para este trabalho, foram utilizados os dados de poços disponíveis no SIAGAS, vinculado ao Serviço Geológico Brasileiro (CPRM). Os arquivos foram baixados em formato "csv". A partir daí foi feita uma seleção de poços que apresentavam data de perfuração posterior a 1º de janeiro de 2000. Em seguida, os poços selecionados foram espacializados através do georreferenciamento das informações de coordenadas e armazenados em um banco de dados geoespacial.

Para avaliar a vulnerabilidade natural dos aquíferos foi aplicado o Método GOD, Groundwater hydraulic confinement (grau de confinamento hidráulico – Confinado, Semi-Confinado e Livre), Overlaying Strata (ocorrência das características do substrato litológico - grau de consolidação da zona não saturada), e Depth to groundwater table (distância do nível da água ou teto do aquífero - profundidade do nível d'água subterrânea), criado por Foster e Hirata (1988).

A metodologia proposta para estimar a vulnerabilidade do aquífero quanto à contaminação corresponde a identificação do tipo de confinamento do aquífero, e atribuição de valores desses parâmetros na escala de 0,0–1,0; definição dos estratos de cobertura da zona saturada do aquífero relacionado ao grau de consolidação e tipo de litologia correspondendo a uma segunda pontuação, numa escala de 0,4–1,0; e posteriormente a estimativa da profundidade até o lençol freático ou da profundidade do primeiro nível principal de água subterrânea, com posterior classificação na escala de 0,6–1,0.

Para o cálculo do Índice GOD, foram utilizadas as coordenadas geográficas em SIRGAS 2000 para cada poço, além das características fundamentais para execução desse método como grau de confinamento do aquífero, características litológicas e a profundidade do nível estático. Posterior a geração do banco de dados, essas informações foram inseridas no software de geoprocessamento livre QGIS onde foram realizadas atividades de localização e inserção dos poços da área de trabalho, e posterior interpolação espacial onde foram testadas técnicas como IDW e krigagem.

A multiplicação dos mapas resultantes do método GOD foi realizada a partir da ferramenta Álgebra de mapa cuja finalidade é a construção de expressões usando álgebra de mapas no formato rasters, sendo possível atribuir os pesos do método. Assim, ao final, foram elaborados mapas e gráficos das variáveis quali-quantitativas levantadas, por meio de planilhas eletrônicas e do QGIS, bem como a classificação das diferentes regiões da área de estudo quanto à vulnerabilidade dos aquíferos na forma de mapas síntese indexada.

## Resultados e Discussão

O mapa obtido por meio de modelagem em ambiente SIG (Figura 1), permitiu a visualização dos Tabuleiros Costeiros segundo a classificação de índice de vulnerabilidade. Pode-se perceber que as áreas mais suscetíveis à contaminação estão localizadas mais próximas do litoral. No extremo sul e no litoral norte da Bahia foi onde houve as maiores concentrações de áreas com vulnerabilidade extrema, sendo as outras localizadas em Sergipe, nos municípios de Estância, Indiaroba e Santa Luzia do Itanhy e no Ceará, no município de Jaguaruana. As áreas com vulnerabilidade intermediária e alta estão localizadas desde o litoral norte do Ceará até os arredores de Recife, em Pernambuco, com exceção de Alagoas, que, em geral, possui áreas com baixa e insignificante vulnerabilidade.

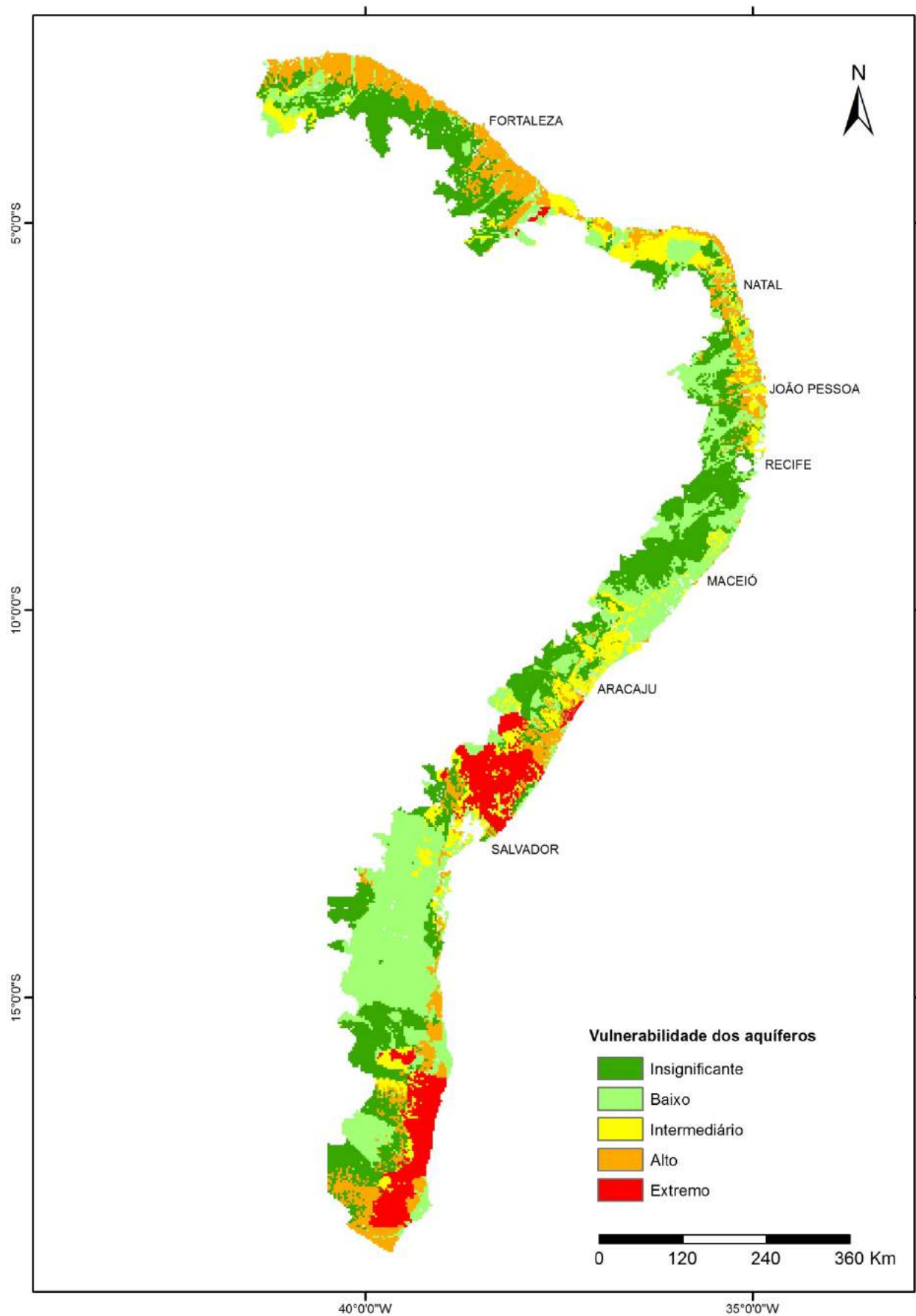


Figura 1. Mapa de vulnerabilidade



Analisando a álgebra de mapas, nota-se que os critérios relacionados ao grau de confinamento e ocorrência litológica tiveram maior influência no cálculo dos índices. Os sedimentos inconsolidados de depósitos marinhos continentais costeiros e terrenos de aluviões formados principalmente por areia fina a grossa e cascalho possuem alta permeabilidade, possibilitando assim, a rápida contaminação dos aquíferos localizados nessas regiões. Sedimentos inconsolidados de depósitos fluvio-lagunares representados por argilas e areias finas possuem baixa permeabilidade, no entanto, sua alta porosidade, promove a contaminação dos aquíferos nessas regiões em casos de prolongada exposição a contaminantes. Formações magmáticas e metamórficas, bem como terrenos cársticos e bacias de rifte possuem camadas confinantes que impossibilitam a contaminação significativa do aquífero.

## Conclusões

O método GOD apresenta potencial na análise da vulnerabilidade à contaminação de aquíferos, pois só requer três parâmetros físicos para gerar bons índices, com precisão, tornando-o uma das metodologias mais utilizadas em estudos e análises para definir o risco de poluição da água subterrânea. Foi constatado que as formações sedimentares com aquíferos não confinados são os que apresentam maior suscetibilidade à contaminação. Desta forma, é necessário estabelecer planos de gestão dos recursos hídricos de modo a assegurar a qualidade das águas subterrâneas, como um programa de monitoramento que fiscalize os aquíferos conhecidos e, caso seja constatada a contaminação, identifique a fonte poluidora e a recomendação de ações, nas áreas classificadas com vulnerabilidade intermediária, alta e extrema, que evitem a infiltração de contaminantes relacionados ao uso da terra.

## Agradecimentos

Ao CNPq pela bolsa PIBIC que está dando suporte ao desenvolvimento do estudo e à Embrapa Tabuleiros Costeiros pelo apoio.

## Referências

- FEITOSA, F. A. C.; MANOEL FILHO, J.; FEITOSA, E. C.; DEMETRIO, J. G. A. (Org.). **Hidrogeologia: conceitos e aplicações**. 3. ed. rev. e ampl. Rio de Janeiro: CPRM: LABHID, 2008. p. 179207.
- FOSTER, S. S. D.; HIRATA, R. C. A. **Groundwater pollution risk evaluation: the methodology using available data**. Lima: CEPIS/PAHO/WHO, 1988.
- IBGE. Censo Demográfico 2010.
- PEREIRA, V. H. C.; CESTARO, L. A. A unidade geoambiental Tabuleiro Costeiro e o planejamento municipal: o caso de Senador Gorgino Avelino/RN. **Revista Geonorte**, v. 3, n. 4, p. 390-401, 2012. Edição Especial.
- PEÑA-ARANCIBIA, J. L.; MAINUDDIN, M.; KIRBY, J. M.; CHIEW, F. H. S.; MCVICAR, T. R.; VAZE, J. Assessing irrigated agriculture's surface water and groundwater consumption by combining satellite remote sensing and hydrologic modelling. **Science of The Total Environment**, v. 542 (A), p. 372-382, Jan. 2016.
- VAN STEMPOORT, D.; EWERT, L.; WASSENAAR, L. **AVI: A Method for Groundwater Protection Mapping in the Prairie Provinces of Canada**. Saskatoon: National Hydrology Research Institute, 1992. PPWD pilot project, Sept. 1991 - March 1992. Groundwater and Contaminants Project, Environmental Sciences Division.

# Caracterização dos regimes hidrológicos de bacias hidrográficas presentes na área de atuação da Embrapa Tabuleiros Costeiros, SE

Luan Oliveira Lima<sup>1</sup>, Marcus Vinícius Gonçalves de Abreu Porto<sup>2</sup>, Marcus Aurélio Soares Cruz<sup>3</sup>

**Resumo** - O estudo de bacias hidrográficas tem se tornado um mecanismo fundamental na gestão estratégica dos recursos hídricos. A região em estudo está inserida na área de atuação da Embrapa Tabuleiros Costeiros, SE, compreendida entre as coordenadas geográficas 2°47'S, 41°26'W e 18°21'S, 34°46'W. Neste trabalho, foram utilizados dados de vazões de referência, variáveis fisiográficas e variáveis climáticas que são informações de suma importância para a caracterização dos regimes hidrológicos de bacias hidrográficas. Foram calculadas as vazões de referência Qm (vazão média diária de longo período) e Q90 (vazão com 90% de permanência na série), por serem frequentemente usadas nos planos estaduais de recursos hídricos no Brasil. A Qm foi definida pela média aritmética das vazões diárias da série histórica disponível. A vazão Q90 foi obtida a partir da elaboração da curva de permanência nos postos selecionados segundo a técnica simplificada de ordenamento de vazões. Dentre as variáveis fisiográficas calculadas estão: a área da bacia contribuinte ao posto, a declividade média da bacia e o comprimento da bacia, calculadas por meio do software QGIS sobre o modelo digital de elevação SRTM de resolução espacial 30 m. Já a variável climática é a precipitação média anual, obtida a partir da ponderação pela área considerando o produto *Brazil Gridded Meteorological Data*. Após a determinação das vazões de referência e das variáveis fisiográficas e climáticas, se avaliou a existência de uma correlação entre os grupos das variáveis e as vazões, considerando as bacias monitoradas em regiões e dimensões similares. O melhor valor de R obtido foi 0.963, que correlaciona a vazão Q90 com o perímetro, para bacias com área entre 2.000 Km<sup>2</sup> e 2.500 Km<sup>2</sup>. O segundo melhor valor de R foi 0,947, que correlaciona os valores de  $[(Qm/Área)*1000]$  com as áreas, para bacias variando entre 1.500 Km<sup>2</sup> e 2.000 Km<sup>2</sup>.

**Termos para indexação:** água, bacias hidrográficas, gestão, recursos hídricos, variáveis, vazões.

## Introdução

A água é o elemento mais importante para a sobrevivência de todos os seres vivos na Terra, no entanto, se observa que a humanidade tem desperdiçado este valioso recurso, seja poluindo os corpos hídricos, seja utilizando de forma inadequada (ONU, 2013).

A Lei 9.433/97, que trata da Política Nacional de Recursos Hídricos, preconiza a aplicação de instrumentos para o gerenciamento do uso da água, dentre os quais está a outorga de direito de uso da água. Neste sentido, estudos de disponibilidade hídrica devem considerar vazões mínimas e vazões médias de longo período em um curso d'água (Agência..., 2005). Por outro lado, a determinação de limites de ocupação das áreas de inundação dos rios utiliza vazões máximas com períodos de retorno padronizados (Tucci, 2007). A materialização destes limites faz uso das chamadas vazões de referência (Agência..., 2013). A vazão de referência é, portanto, um valor de vazão que passa a representar o limite de utilização da água em um curso d'água para um determinado fim (Silva et al., 2006).

Apesar de o assunto ser de suma importância para o melhor uso dos recursos hídricos, no Brasil não existe um parâmetro único para o estabelecimento de vazões de referência para todos os estados, principalmente para vazões mínimas, o que implica na utilização de valores diferenciados como referencial, por exemplo, para outorga da água (Cabral, 1997; Silva et al., 2010). No estado de Sergipe, por exemplo, é utilizada a vazão Q90 (vazão garantida em 90% do ano hidrológico) como referência nos estabelecimentos das vazões outorgáveis (Sergipe, 2011).

Ainda existe uma deficiência na quantidade de análises estatísticas sobre a determinação das vazões de referência de séries históricas de vazão em uma seção de interesse de um manancial. Muitos rios brasileiros ainda não têm esse tipo de estatística, principalmente os contidos em médias e micro bacias. Na carência de dados observados na seção de interesse, deve-se proceder a estudos hidrológicos que possam conduzir às estimativas das vazões de referência com um bom grau de confiabilidade.

<sup>1</sup> Graduando em Geologia, Aracaju, SE.

<sup>2</sup> Graduando em Geologia, bolsista Fapitec/SE, Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

<sup>3</sup> Engenheiro Civil, doutor em Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental, pesquisador da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

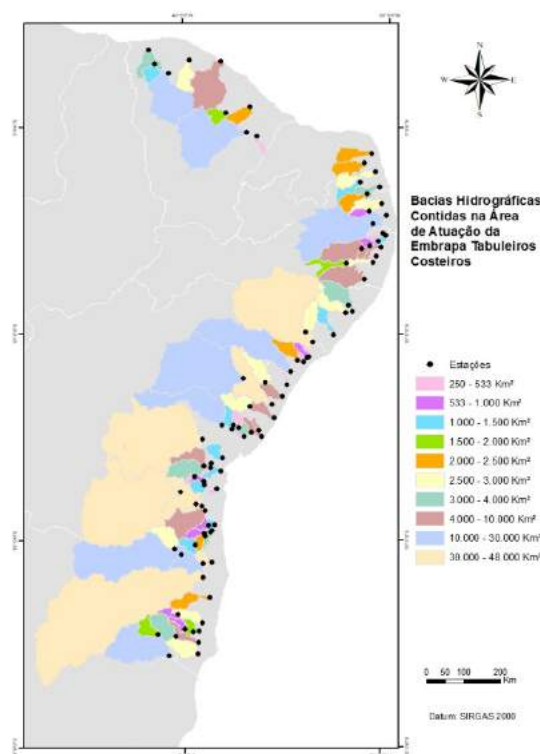
A determinação de informações hidrológicas em bacias hidrográficas pressupõe cada vez mais a aplicação de ferramentas de geotecnologias, visando a integração, geração e interpretação dos dados, permitindo o planejamento e avaliação dos fatores intervenientes nas variáveis que compõem o balanço hídrico. Por meio de técnicas de geoprocessamento é possível correlacionar características físicas e climáticas das bacias com o seu regime hidrológico, representado pela curva de permanência de vazões e pelas vazões médias de longo período.

Este trabalho tem como objetivo caracterizar as bacias hidrográficas presentes na área de atuação da Embrapa Tabuleiros Costeiros, em termos de regime hidrológico e características fisiográficas e climáticas, com apoio de geotecnologias, buscando contribuir para o processo de gestão dos recursos hídricos na região.

## Material e Métodos

Com consultas às bases de dados das estações fluviométricas mantidas pela Agência Nacional de Águas (ANA), através do seu portal HidroWeb, foi feito o levantamento de dados históricos de vazões de estações inseridas na área de atuação da Embrapa Tabuleiros Costeiros. Estes dados foram submetidos a uma análise exploratória utilizando rotina implementada no software R v.3.2.2 (R Core Team, 2017) para que fosse verificado sua consistência, bem como a avaliação das falhas e *outliers*. A partir das informações contidas nas séries históricas de cada posto fluviométrico que continham dados de pelo menos 8 meses por ano, foram calculadas as vazões média diária de longo período (Qm) e vazão com 90% de permanência na série (Q90), escolhidas, aqui, por serem utilizadas frequentemente nos planos estaduais de recursos hídricos do Brasil. A Qm foi definida pela média aritmética das vazões diárias da série histórica disponível, já a vazão Q90 foi obtida a partir da elaboração da curva de permanência nos postos selecionados segundo a técnica simplificada de ordenamento de vazões (Collischonn; Dornelles, 2013).

A delimitação das bacias foi feita utilizando-se técnicas de geoprocessamento com as ferramentas TauDEM e Hydrology do software livre QGIS para processar modelos digitais de elevação (MDE) do satélite *Shuttle Radar Topography Mission* (SRTM) com resolução espacial de 30 metros, obtidos através da *National Aeronautics and Space Administration* (NASA) disponibilizados pela USGS em seu site Earth Explorer. Inicialmente, foi feito um tratamento na imagem, removendo as depressões. Após isso, calculados o caminho de fluxo (direções), declividade, área de contribuição usando métodos de direção de fluxo simples e múltiplos, delimitação de rede de canais com base no fluxo de gotas e finalmente a delimitação das bacias e sub-bacias hidrográficas (Figura 1).



**Figura 2.** Mapa contendo todas as bacias hidrográficas inseridas na área de atuação da Embrapa Tabuleiros Costeiros e suas respectivas estações fluviométricas.

Agora delimitadas, ainda utilizando o software QGIS, foi calculado área, perímetro e declividade de cada bacia, sendo este último, calculado utilizando a régua do software e os dados de altitude contidas na imagem SRTM. A declividade foi calculada utilizando-se na fórmula  $D = (dh/dH)$ , sendo  $dh$  a diferença entre a altitude da estação e ponto de maior altitude da bacia e  $dH$  a distância horizontal entre o ponto mais alto e a estação. O resultado final foi multiplicado por 100 para obter o valor em porcentagem.

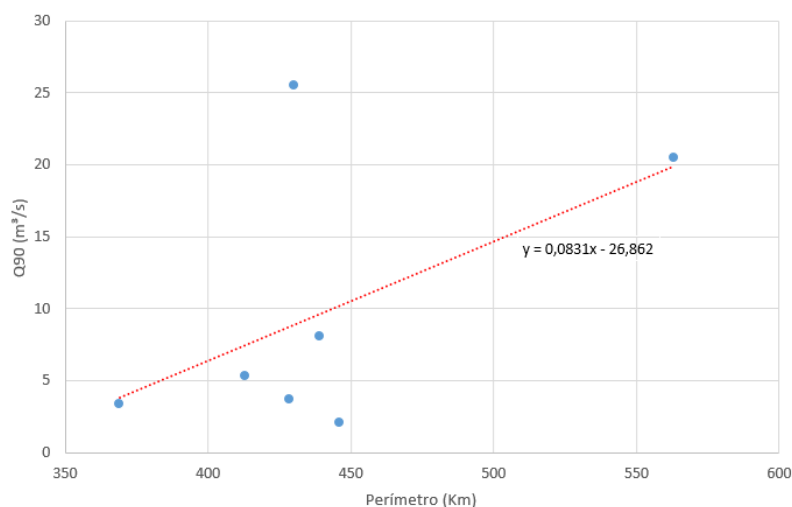
As precipitações médias anuais de cada bacia contribuinte foram obtidas a partir do produto *Brazil Gridded Meteorological Data (BGMD)* (Xavier et al., 2016), conhecido também como Grade de Xavier, com resolução espacial de  $0,25^\circ$ , disponibilizado pelo site da Universidade do Texas, EUA. A Grade de Xavier possui informações de todas precipitações diárias entre os anos de 1970 a 2015. Para extração dessas séries climatológicas foi utilizado o software R v.3.2.2 (R Core Team, 2017) que através de uma rotina específica, calculou as precipitações médias anuais e interpolou com os dados de latitude, longitude e dos centroides de todos os municípios incluídos nas bacias hidrográficas em estudo, gerando assim uma tabela com informações da precipitação média anual de cada bacia.

Posteriormente, os dados foram submetidos a análises de regressão linear simples e regressão linear múltipla, calculadas por meio do programa Excel, a fim de encontrar os melhores coeficientes de correlação entre as variáveis e as vazões. Para isto, foram criadas dez diferentes classes baseadas nas áreas das bacias, que variam entre  $250 \text{ Km}^2$  a  $48.000 \text{ Km}^2$ . Além dos valores das vazões  $Q_{90}$  e  $Q_m$ , foram também geradas novas variáveis  $y$ :  $[(Q_m/\text{Área}) \cdot 1000]$  e  $[(Q_{90}/\text{Área}) \cdot 1000]$ . A partir dos resultados encontrados, os cálculos que obtiveram o valor de  $R$  múltiplo mais próximo de 1, foram analisados para geração de gráficos de dispersão.

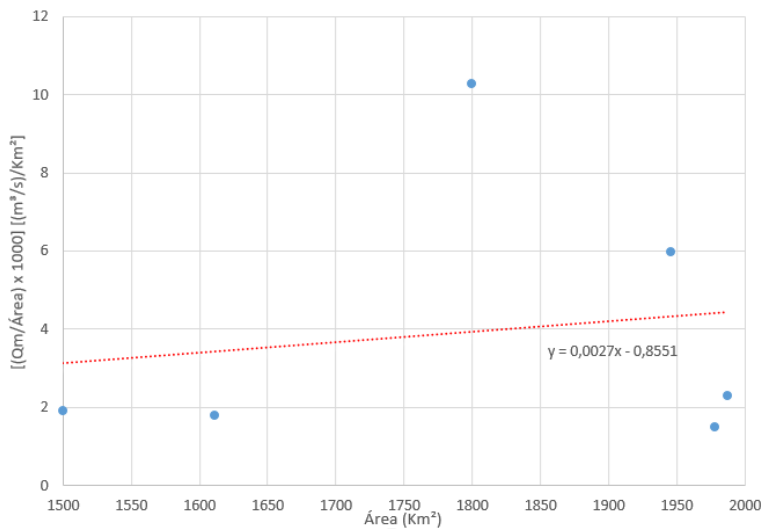
## Resultados e Discussão

Os gráficos de dispersão gerados no trabalho foram submetidos a uma interpretação, a fim de extrair o máximo de informações contidas neles. Os gráficos 2, 3, 4 e 5 a seguir mostram como os valores se dispõem ao longo dos eixos  $x$  e  $y$ . O eixo  $y$  contém os valores das vazões  $Q_{90}$ ,  $Q_m$ ,  $[(Q_m/\text{Área}) \cdot 1000]$  e  $[(Q_{90}/\text{Área}) \cdot 1000]$ . No eixo  $x$  encontram-se as variáveis fisiográficas e climáticas. Além disso, todos os gráficos contêm uma linha de tendência, juntamente com sua equação linear.

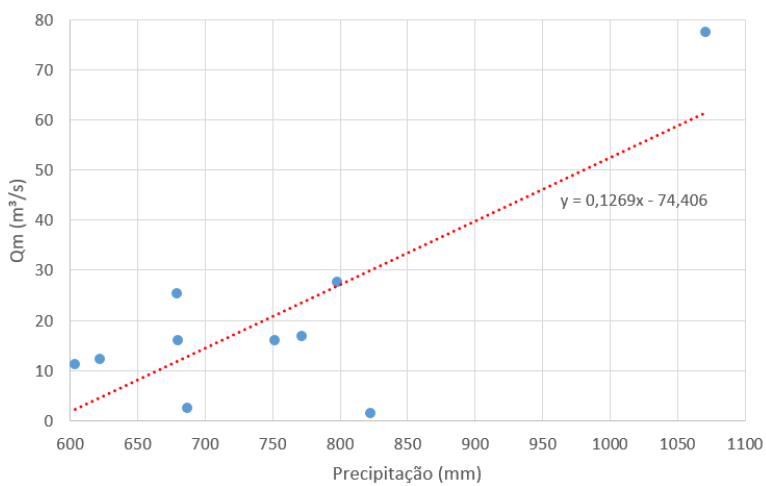
Na Figura 2 obteve-se um valor de  $R$  múltiplo igual a 0.963. Neste gráfico, a linha de tendência possui um padrão ascendente, logo há uma relação positiva entre os valores. Nota-se também uma aproximação significativa entre a linha de tendência e a dispersão, portanto a correlação entre esses pontos é forte. Na figura 3 foi calculado um valor de  $R$  múltiplo igual a 0.947. A linha de tendência, neste gráfico, assume uma relação positiva, porém com ângulo ascendente menor, portanto, ao se comparar com os gráficos 2, 4 e 5, a correlação entre as variáveis não se mostra tão forte, devido ao distanciamento significativo entre a linha de tendência e a dispersão dos pontos. Nas Figuras 4 e 5, o resultado do valor de  $R$  múltiplo foi igual a 0.735 e 0.796, respectivamente. Estes gráficos assumem uma correlação forte e positiva entre os valores, de modo que, os pontos da dispersão se aproximam da linha de tendência de forma mais expressiva, chegando a interceptá-la em alguns pontos.



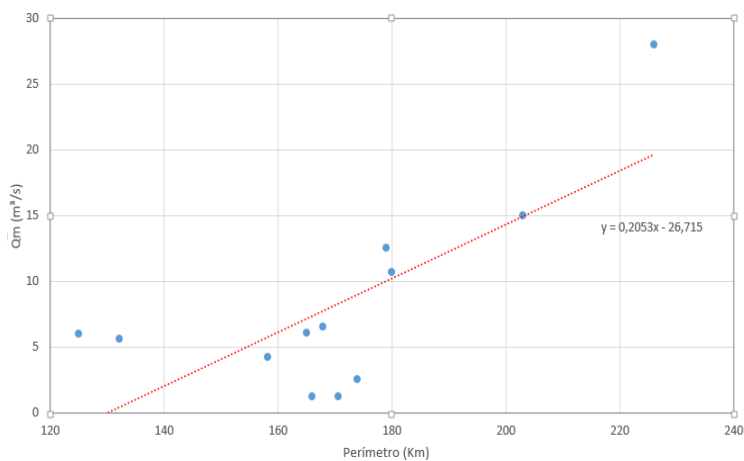
**Figura 2.** Gráfico de dispersão correlacionando as vazões com 90% de permanência ( $Q_{90}$ ) para o mês de junho e os perímetros para as bacias que possuem área entre  $2.000$  e  $2.500 \text{ km}^2$ .



**Figura 3.** Gráfico de dispersão correlacionando as vazões médias (Qm) do mês de junho com as áreas das bacias que possuem entre 1.500 e 2.000 km².



**Figura 4.** Gráfico de dispersão correlacionando as vazões médias (Qm) do mês de junho e os perímetros para as bacias que possuem área entre 250 e 533 km²



**Figura 5.** Gráfico de dispersão correlacionando as vazões médias (Qm) do mês de junho e as precipitações para as bacias que possuem áreas entre 10.000 km² e 30.000 km².

## Conclusões

A análise dos gráficos mostrou como as vazões Q90 e Qm se comportam em relação às variáveis obtidas. Nestas interpretações, pôde-se notar que os gráficos 4 e 5 foram aqueles que obtiveram a melhor correlação entre os pontos. No entanto, todos os gráficos se comportaram de maneira similar, de tal forma que as correlações positivas foram as que predominaram. Desse modo, em relação às variáveis perímetro, área e precipitação, ocorre um aumento das vazões, à medida que se aumentam os valores destas variáveis.

O melhor valor de R obtido foi 0.963, que correlaciona a vazão Q90 com o perímetro, para bacias com área entre 2.000 Km<sup>2</sup> e 2.500 Km<sup>2</sup>. O segundo melhor valor de R foi 0,947, que correlaciona os valores de  $[(Q_m/\text{Área}) \cdot 1000]$  com as áreas, para bacias variando entre 1.500 Km<sup>2</sup> e 2.000 Km<sup>2</sup>. Através destes resultados, assume-se, portanto, que as variáveis área e o perímetro foram os mais bem avaliados neste estudo.

## Referências

- AGÊNCIA NACIONAL DAS ÁGUAS. **Portal Hidroweb**. Brasília, DF, 2017. Disponível em: <<http://hidroweb.ana.gov.br/>>. Acesso em: 19 mar. 2017.
- AGÊNCIA NACIONAL DAS ÁGUAS. **Manual de procedimentos técnicos e administrativos de outorga de direito de uso de recursos hídricos da Agência Nacional de Águas**. Brasília, DF, 2013. 237 p.
- CABRAL, B. **Legislação Estadual de Recursos Hídricos**. v. 2. Cadernos Legislativos n° 002/97. Brasília, DF: Senado Federal, 1997.
- COLLISCHONN, W.; DORNELLES, F. **Hidrologia para Engenharia e Ciências Ambientais**. Porto Alegre: ABRH, 2013.
- ONU. **Managing water report under uncertainty and risk**. The United Nations world water development - Report 4. Volume 1. 2012. Disponível em: <<http://unesdoc.unesco.org/images/0021/002156/215644e.pdf>>. Acesso em: 18 mar. 2017.
- SCHMITT, A.; MOREIRA, C. R. Manejo e gestão de bacia hidrográfica utilizando o software gratuito Quantum-GIS. **Revista Cultivando o Saber**, n. edição especial, 2015.
- SERGIPE. **Plano Estadual de Recursos Hídricos de Sergipe. Relatório Final. Secretaria de Estado do Meio Ambiente e dos Recursos Hídricos**. Aracaju: Programa Nacional de Desenvolvimento dos Recursos Hídricos, 2011. p. 215.
- SILVA, J. F.; LUZ NETTO, F. M. de; RODRIGUES, S. C. Análise comparativa entre a vazão real e a vazão de referência para outorga de água do córrego Barrerinho-Uberlândia-MG. **REVISTA GEOGRÁFICA ACADÊMICA**. v. 4, n. 2, p. 86-95, 2010.
- TUCCI, C. E. M. **Hidrologia: ciência e aplicação**. 4. ed. Porto Alegre: Editora da Universidade: ABRH, 2007.

# Avaliação da contaminação de pesticidas no músculo de tambaquis (*Colossoma macropomum*) cultivados e de sedimento na região do Baixo São Francisco

Cindy Caroline Moura Santos<sup>1</sup>, Fernanda dos Santos Cunha<sup>2</sup>, Tereza Vitória Brito D'ávila<sup>3</sup>, Bruno Santos Lima<sup>4</sup>,  
Yasmim Maria Barbosa Gomes de Carvalho<sup>5</sup>, Adriano Antunes de Souza Araújo<sup>6</sup>,  
José Guedes de Sena Filho<sup>7</sup>, Paulo Cesar Falange Carneiro<sup>8</sup>, Ricardo Coelho de Sousa<sup>9</sup>,  
Rodrigo Yudi Fujimoto<sup>10</sup>, Alexandre Nízio Maria<sup>11</sup>

**Resumo** - Atualmente, a cipermetrina e deltametrina são inseticidas amplamente utilizados na agricultura e na medicina, devido a sua eficiência no controle de insetos e pragas, apresentarem baixa toxicidade aos mamíferos e aves, e persistirem menos no meio ambiente. No entanto, estes piretroides são altamente tóxicos para organismos aquáticos e podem alcançar o ecossistema aquático por uma variedade de mecanismos, tornando-os vulneráveis a contaminação. Diante disso, a região do Baixo São Francisco de Sergipe apresenta-se como uma área preocupante, pois já foi identificado a utilização da cipermetrina e deltametrina na região e existe a proximidade entre as atividades agrícolas e a atividade piscícola. Com isso, o objetivo do presente estudo foi identificar e avaliar a concentração de resíduos de piretroides no sedimento das pisciculturas assim como sua bioconcentração no músculo de Tambaquis cultivados na região do Baixo São Francisco sergipano. Para isto, as coletas foram realizadas em dez pisciculturas no período seco e sete no período chuvoso, sendo coletados 500g de sedimento e capturados cinco peixes por piscicultura. Os parâmetros de água de cada piscicultura foram aferidos e posteriormente os peixes foram coletados, transportados até o laboratório para posterior eutanásia e coleta do tecido muscular. Após a retirada de 50 g de músculo, de cada peixe, este material foi armazenado a - 20°C até o momento da análise por cromatografia delgada e líquida. Para observar a eficiência do método extrativo foi realizada a avaliação do solvente. Uma indução da contaminação em alevinos de Tambaquis por cipermetrina e deltametrina foi realizada e então retirada um grama de tecido muscular desses animais e realizada a extração líquido-líquido com cinco tipos de solvente, sendo analisados por cromatografia de camada delgada (CCD) e cromatografia de alta eficiência (CLAE). Para o sedimento, alíquotas de amostras coletadas foram submetidas à extração por clorofórmio e então analisadas em CCD e CLAE. No teste de avaliação do melhor solvente extrativo do músculo observou-se que o acetato de etila apresentou um resultado mais satisfatório, e quando analisadas pela CCD mostrou que as amostras apresentaram uma possível contaminação por piretroides, porém nenhuma delas apresentou contaminação por cipermetrina e deltametrina ao serem analisadas no CLAE. Para o sedimento não foi observada contaminação por piretroides nas pisciculturas pela análise de CCD e CLAE. Através deste trabalho não foi detectada a contaminação do sedimento das pisciculturas e nem bioconcentração nos animais, porém destaca-se a importância de novas investigações para a presença de outros contaminantes nos tambaquis.

**Termos para indexação:** CCD, cipermetrina, CLAE, contaminação, deltametrina, peixe.

## Introdução

Os inseticidas são utilizados na agricultura para o controle de pragas a fim de aumentar a produção. Além disso, são utilizados para uso doméstico no controle de insetos como mosquitos, moscas e térmitas e na medicina contra piolhos. (Koç et al., 2012).

Dentre os inseticidas, se destacam a cipermetrina e a deltametrina, que pertencem a classe dos piretroides, sendo utilizados por apresentarem alta eficiência em baixas dosagens, serem poucos nocivos aos mamíferos e aves, já que apresentam uma rápida metabolização do produto e consequentemente menor probabilidade de acumular e são menos persistentes no meio ambiente em relação à organoclorados, organofosforados e carbamatos. (Aznar-Alemanly et al., 2017).

Porém, os piretroides podem alcançar o ecossistema aquático por uma variedade de mecanismos, incluindo lixiviação, escoamento superficial ou deposição atmosférica. Essa facilidade com que esses contaminantes podem alcançar os corpos hídricos, e associar-se as partículas sólidas suspensas e sedimento, expõe os organismos aquáticos à contaminação, seja através da ingestão ou

<sup>1</sup> Graduanda em Farmácia, bolsista PIBIC da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

<sup>2</sup> Engenheira de pesca, Aracaju, SE.

<sup>3</sup> Graduanda em Farmácia, bolsista PIBIC da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

<sup>4</sup> Farmacêutico, mestre em Ciências Farmacêuticas, Aracaju, SE.

<sup>5</sup> Farmacêutico, mestre em Ciências Farmacêuticas, Aracaju, SE.

<sup>6</sup> Farmacêutico, doutor em Ciências Farmacêuticas, professor da Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, SE.

<sup>7</sup> Farmacêutico, doutor em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, analista da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

<sup>8</sup> Engenheiro-agrônomo, doutor em Agronomia, pesquisador da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

<sup>9</sup> Engenheiro Mecânico, mestre em Engenharia mecânica, analista da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

<sup>10</sup> Zootecnista, doutor em Aquicultura, pesquisador da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

<sup>11</sup> Zootecnista, doutor em Zootecnia, pesquisador da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

simplesmente pelo próprio contato com as partículas do sedimento ou água. Nesse sentido, os peixes ficam vulneráveis à contaminação seja pela dieta ou pela fácil absorção através das brânquias, devido ao caráter lipofílico desses compostos. (Santos et al., 2014; Britto et al., 2015).

Os piretroides são altamente tóxicos para os peixes e quando expostos a concentrações consideradas subletais tendem a bioconcentrar. Este fato foi evidenciado por Áznar-Alemany et al. (2017) que identificaram concentrações de piretroides em salmões cultivados ( $1.31 \pm 1.39$  ng/g) e selvagens ( $0.02 \pm 0.03$  ng/g). O principal motivo dessa bioconcentração é devido à lenta metabolização desses compostos pelos peixes, quando comparada aos mamíferos e aves, retardando o processo de excreção. (Lewis et al., 2016; Svartz et al., 2016).

A biococentração dos piretroides em peixes pode acarretar em problemas futuros para a saúde pública, uma vez que estes peixes contaminados podem ser destinados ao consumo humano. Com isso a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) determinou a Ingestão Diária Aceitável (IDA) para alguns piretroides, como a da deltametrina e cipermetrina, com valores de 0,01 mg/kg e 0,05 mg/kg peso corpóreo, respectivamente (Anvisa, 2016).

Devido aos efeitos tóxicos acima mencionados, a evidência da bioconcentração de piretroides em peixes, a região do Baixo São Francisco de Sergipe se tornou uma área de risco, pois na mesma foi relatado o uso de cipermetrina e deltametrina nas atividades agrícolas (Britto et al., 2015) desenvolvidas próximas às áreas de pisciculturas. Desta forma o presente estudo tem como objetivo avaliar a contaminação do sedimento e a bioconcentração dos piretroides, em específico a cipermetrina e deltametrina, em pisciculturas da região do Baixo São Francisco.

## Material e Métodos

### Coleta das amostras na Região do Baixo São Francisco Sergipano.

As coletas de sedimento e dos Tambaquis (*Colossoma macropomum*) foram realizadas no período seco (de outubro de 2016 a fevereiro de 2017, n=10) e chuvoso (agosto a outubro de 2017, n=7) em pisciculturas situadas no município de Propriá, na região do Baixo São Francisco Sergipano. Foram coletados 500g de sedimento e cinco peixes em cada piscicultura. Dez centímetros da região superficial do sedimento foram retirados com auxílio de uma pá, armazenados em um frasco de polietileno e transportados em refrigeração. Já os espécimes foram capturados e transportados com aeração constante até o laboratório de aquicultura situado na Embrapa Tabuleiros Costeiro para a preparação e análises das amostras. No momento da coleta, em cada piscicultura os parâmetros de água foram mensurados: o pH medido com a utilização de pHmetro Akrom modelo KR20; o oxigênio dissolvido (OD) e a temperatura com a utilização de uma sonda multiparâmetros HANNA modelo HI93715 e condutividade elétrica (CE) por auxílio de uma sonda YSI modelo 55-12FT.

### Preparação das amostras

As amostras de sedimento foram armazenadas em frasco de polietileno, protegidos da incidência de luz e mantidos a -20 °C até momento da análise. Já os peixes coletados tiveram seu peso, comprimento total e padrão aferidos e posteriormente foram eutanasiados por secção medular para a coleta do músculo (CEUA - Unit n° 04815R). Este material foi identificado e mantido a -20 °C até o momento da análise. A porção muscular era constituída de 50g de tecido muscular retirado da região latero-dorsal sempre do lado esquerdo.

### Preparo das soluções padrões dos piretroides

Foram preparadas soluções estoque dos padrões de cipermetrina (C<sub>22</sub>H<sub>19</sub>Cl<sub>2</sub>NO<sub>3</sub>) e deltametrina (C<sub>22</sub>H<sub>19</sub>Br<sub>2</sub>NO<sub>3</sub>) (Sigma-Aldrich®). Os padrões foram diluídos em Metanol (J.T. Baker®, HPLC – Grade) na concentração de 100 µg/L. Cada solução foi submetida a banho de ultrassom durante 30 minutos e então filtradas com membrana PTFE – 0.45 µm (Chromafil® Xtra PTFE). Estas foram utilizadas durante as análises cromatográficas como controle do procedimento analítico.

### Avaliação de solventes extratores

Um experimento foi realizado para determinar o melhor processo de extração de piretroides do músculo. Para tanto, foi utilizado um total de 36 alevinos de tambaqui, sendo 18 expostos à cipermetrina e 18 à deltametrina. Para cada tipo de piretroide foi realizada a formulação de uma solução mãe que consistia em 99% de água deionizada e 1% do produto. Com isso, os peixes (peso médio: 4,09 g) foram expostos a três concentrações subletais de cipermetrina (0,0035 mg/L, 0,007 mg/L, 0,0105 mg/L) e deltametrina (0,007 mg/L, 0,010 mg/L, 0,015 mg/L), em recipientes com um volume de três litros, em duplicata e constantemente aerados. Foram avaliados diferentes tipos de solventes extratores baseados na literatura, sendo eles: Acetato de etila - água (4:1), Clorofórmio - água (1:1), Diclorometano - água (1:1), Hexano - água (1:1), Isopropanol - água (4:1) (Alemany et al., 2017; Jabeen et al., 2015; Jia et al., 2012; Mao et al., 1993)



Para cada tipo de solvente extrator foi utilizado 1 g de tecido muscular de cada animal previamente contaminado, esse material foi macerado em gral com auxílio do pistilo, e em sequência foi adicionado um total de 6 mL de cada solvente extrator. Essa mistura foi submetida ao vórtex durante 5 min., posteriormente filtrada em papel filtro Qualy (205 µm), sopradas com um fluxo de nitrogênio gasoso até a secagem do solvente extrator, reconstituídas com 1,5 mL de metanol e transferidas para vials. Por fim, foi feita a análise de cada amostra por cromatografia em camada delgada (CCD) e líquida (CLAE).

O processo de extração de cada amostra de sedimento foi realizada de forma semelhante ao descrito para o músculo, porém utilizando o clorofórmio como solvente extrator como sugerido por Wang et al. (2011)

#### **Extrações dos piretroides do sedimento e músculo dos peixes nas pisciculturas do Baixo São Francisco**

Para o processo de extração, cada amostra muscular foi descongelada em geladeira a uma temperatura de 4 °C, na sequência, 1 g de um pool de tecido muscular constituído de porções iguais dos cinco peixes coletados em cada piscicultura foi macerado em um gral com auxílio de um pistilo. Foi adicionado a amostra, 6 mL de acetato de etila (Synth®, P.A – A.C.S.) (acetato de etila - água (4:1)) (melhor resultado obtido no teste anterior) em tubos de ensaios e submetido ao vórtex durante 5 min.

Em seguida, as amostras foram filtradas em papel filtro Qualy (205 µm) (Figura 3), sopradas com um fluxo de nitrogênio gasoso até a secagem do solvente extrator, reconstituídas com 1,5 mL de metanol e transferidas para vials. Por fim, as amostras foram novamente filtradas com filtros de membrana (PTFE – 0.45 µm) para posteriormente serem analisadas em CCD e CLAE (Jabeen et al., 2015; JIA et al., 2012).

Para a análise das amostras de sedimento, as mesmas foram descongeladas em geladeira a uma temperatura de 4°C e então foi pesado 1 g de sedimento de cada piscicultura. Em seguida, a amostra foi solubilizada em 3 mL de água destilada no vórtex durante 1 min, na sequência foi adicionado 7,5 mL clorofórmio (VETEC®, P.A – A.C.S.) e homogeneizado no vórtex durante 1 min, feito isso a solução foi transferida para o filtro de separação onde foi novamente homogeneizada manualmente. Para a separação do analito na mistura foi necessário 10 min até a decantação completa. Posteriormente, as amostras foram filtradas com papel filtro Qualy (205 µm), sopradas com um fluxo de nitrogênio gasoso até a secagem do solvente extrator, reconstituídas com 1,5 mL de metanol e transferidas para vials (Wang et al., 2011)

#### **Condições cromatográficas para análise por Cromatografia em Camada Delgada (CCD)**

De posse dos extratos, estes foram submetidos às análises por CCD. Estas foram realizadas em cromatofolhas de sílica gel 60 F254 (Merck, Darmstadt, Alemanha). Alíquotas (10 µL) de solução metanólica de cada amostra do extrato do músculo e sedimento foram aplicadas e comparadas com padrão de cipermetrina e deltametrina na concentração de 100 µg/mL. A Fase móvel utilizada foi EtOAc–HCOOH–AcOH–H<sub>2</sub>O (100 : 11 : 11 : 26, v:v).

Os cromatogramas foram desenvolvidos em cubas saturadas. A visualização das manchas correspondentes aos piretroides foi feita com auxílio de luz ultravioleta, a 254 nm, em câmara ultravioleta Spectroline CM-10 (César et al., 2007), e então determinados os fatores de retenção segundo Medham et al., (2002)

#### **Análises por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)**

As análises por CLAE foram realizadas em um cromatógrafo líquido da marca Shimadzu®, determinadas em uma coluna analítica Shim-Pack® C18- 250 x 4,6 mm (5 µm tamanho de partícula), conectada à uma pré-coluna Phenomenex® C18- 30 x 4 mm (4 µm tamanho de partícula). Como fase móvel foi utilizada água ultrapura (A) e acetonitrila (B). As análises foram realizadas utilizando um sistema gradiente de eluição, iniciando com 70% de B durante 1 minuto, 70- 95% de B durante 1 -2 minutos, 95-100% de B durante 2 minutos-10 minutos, 100%-70% de B durante 10 minutos-15 minutos, retornando as condições iniciais e finalizando a análises.

## **Resultados e Discussão**

Durante o projeto não foram observadas mortalidades de peixes nas pisciculturas amostradas e os parâmetros da qualidade de água das pisciculturas apresentaram condições ideais para cultivo de *Colossoma macropomum* (Silva e Fujimoto, 2015) com média de temperatura de 28,1°C; 6,5 (mg.L<sup>-1</sup>) de oxigênio dissolvido; 8,01 de pH; e 0,47 (mS.cm<sup>-1</sup>) de condutividade elétrica.

Os piretroides são considerados compostos complexos de serem analisados devido a grande quantidade de análogos e isômeros encontrados em sua molécula (Santos, 2007). Devido a isso, técnicas simples, de rápida detecção e de baixo custo se tornam interessantes para a identificação desses compostos, como por exemplo, a cromatografia em camada delgada (Degani et al., 1998) Através deste teste foi possível observar que dentre os cinco tipos de solventes utilizados, o isopropanol – água (4:1) e o acetato de etila - água (4:1) foram os solventes que apresentam os tempos de retenção de 0,90 e 0,83, respectivamente, semelhantes aos padrões analíticos (F<sub>r</sub> = 0,94).

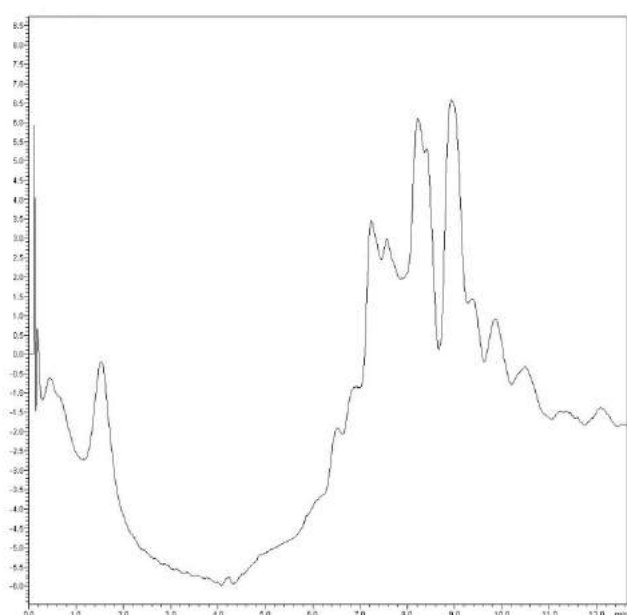
Diante disso, o solvente utilizado na análise de tecido muscular foi o acetato de etila, devido este ser mais volátil comparado ao isopropanol (Brisco, 2016), o que otimizou o tempo de extração, como também possibilitou a redução de custo devido a menor quantidade de gás utilizado no processo de secagem. Vieira et al. (2007) também observou que o acetato de etila se mostrou o melhor solvente extrator devido a característica hidrofóbica dos piretroides, que possui uma maior afinidade por moléculas polares como o acetato de etila, facilitando assim a extração dos piretroides.

Ao realizar a cromatografia delgada nas 17 amostras (pool do músculo dos Tambaquis coletados na região) foram observados fatores de retenção semelhantes aos dos padrões ( $F_r = 0,924$ ), indicando assim uma possível contaminação por piretroides (Tabela 1).

**Tabela 1.** Fatores de retenção ( $F_r$ ) das amostras de sedimento e musculo advindas das pisciculturas da região do Baixo São Francisco.

Ponto de coleta	Local	$F_r$	$F_r$	$F_r$	$F_r$
		Período Seco Músculo	Período Chuv. Músculo	Período Seco Sedimento	Período Chuv. Sedimento
P 2	Piscicultura	0,873	0,888	Não detectado	Não detectado
P 6	Piscicultura	0,871	0,944	Não detectado	Não detectado
P 8	Piscicultura	0,932	0,951	Não detectado	Não detectado
P 11	Piscicultura	0,937	0,932	Não detectado	Não detectado
P 12	Piscicultura	0,938	0,920	Não detectado	Não detectado
P 13	Piscicultura	0,938	-	Não detectado	Não detectado
P 17	Piscicultura		0,944	Não detectado	Não detectado
P 19	Piscicultura	0,924	-	Não detectado	Não detectado
P 23	Piscicultura	0,937	0,921	Não detectado	Não detectado
P 24	Piscicultura	0,938	0,939	Não detectado	Não detectado

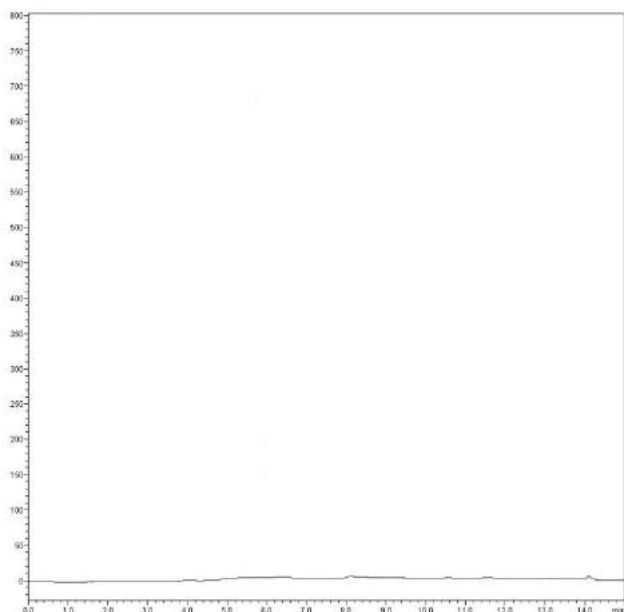
No entanto, quando as amostras foram analisadas por CLAE não foi possível identificar a presença da cipermetrina e deltametrina nas amostras. Os resultados através das duas metodologias podem ser explicados pela diferença entre a precisão de cada uma das técnicas, sendo a CCD de baixa exatidão e a CLAE de alta (Freedman et al., 1984). Na técnica considerada mais simples, os fatores de retenção semelhantes aos dos padrões analíticos pode ser explicada devido estruturas químicas semelhantes a alguns outros piretroides, como por exemplo a deltametrina e a flumetrina, onde a única diferença são os átomos de halogênio no grupo vinil (Liang et al., 2010). Este fato indica que as amostras possivelmente estão contaminadas com outros piretroides que não são a cipermetrina e a deltametrina, já que pelo cromatograma observa-se picos tempos de retenção diferentes dos padrões, que apresentaram tempos de retenção de 5,2 minutos para cipermetrina e 5,8 minutos para a deltametrina (Figura 1).



**Figura 1.** Cromatograma da piscicultura 17 período chuvoso demonstrando picos em outros tempos de retenção que não aos padrões cipermetrina e deltametrina.

Essa não bioconcentração no músculo do tambaqui pode ser decorrente de que a espécie é de águas tropicais, e peixes de temperaturas mais elevadas apresentam alta taxa metabólica que induz a fácil excreção de compostos químicos, o que possivelmente permitiu maior facilidade em excretar os piretroides (Howe et al., 1994).

Além desse fator, a região do Baixo São Francisco por se situar numa região de clima tropical, apresenta altas taxas de incidência de luz solar, o que pode ter interferido na presença desses piretroides no ambiente, tendo em vista que são substâncias muito sensíveis à luz, reduzindo assim o tempo de meia vida que pode variar de 17 a 110 dias e impedindo assim a bioconcentração desses produtos. Além disso, nosso trabalho observou que as águas da região apresentaram um pH médio de 8,01, considerado alcalino, tornando os piretroides mais instáveis, pois quando dispersos em soluções aquosas os piretroides ficam mais susceptíveis a hidrólise (Laskowski, 2002). Esses fatores podem ter influenciado também na presença da cipermetrina e deltametrina nas amostras de sedimento, visto que não foi observada a presença desses compostos nem por CCD nem por CLAE (Tabela 1 e Figura 2).



**Figura 2.** Cromatograma do sedimento da piscicultura 17 período chuvoso não demonstrando picos em qualquer tempo de retenção.

Os resultados obtidos neste trabalho indicam que apesar dos peixes não apresentarem contaminação por cipermetrina e deltametrina no músculo e sedimento, faz-se necessário à realização de futuras análises, para a identificação de novos compostos, visto que já foi observada a utilização de vários inseticidas na região (Britto et al., 2015). Além disso, é importante investigar a presença desses compostos em outros tecidos dos tambaquis, pois estes produtos podem estar afetando indiretamente na produção desses animais, e consequentemente na economia da região.

## Conclusões

Através deste trabalho não foi identificada a presença de cipermetrina e deltametrina nos músculos e sedimento dos peixes coletados na região do Baixo São Francisco Sergipano, porém destaca-se a importância de novas investigações para a presença de outros contaminantes nos tambaquis.

## Referências

ANVISA. **Resolução RE nº 1.897 de 15 de julho de 2016.** Disponível em:  
<http://portal.anvisa.gov.br/documents/111215/117782/C10%2B%2BCipermetrina.pdf/37400888-3f11-44ed-b53f-dea1abacb865.>>  
 Acesso em: 01 mar. 2018.

ANVISA. **Resolução - RE nº 2.002, de 28 de julho de 2016.** Disponível em:  
<http://portal.anvisa.gov.br/documents/111215/117782/D06%2B%2BDeltametrina.pdf/f3f40b14-63aa-43d1-bf05-3245e8437e74.>>  
 Acesso em: 01 mar. 2018

ÁZNAR-ALEMANY, O.; ELJARRAT, E.; BARCEL, D. Effect of pyrethroid treatment against sea lice in salmon farming regarding consumers' health. **Food and Chemical Toxicology**, v. 105, p. 347-354, abr. 2017.

BRISCO. **Ficha de informações de segurança de produto químico:** Acetato de Etila. Disponível em: <<http://www.brisco.com.br/fispq/acetato-de-etila.pdf>> Acesso em: 10 jul.2018.

BRITTO, F. B.; SILVA, T. M. M.; VASCO, A. N.; NETTO, A. O. A.; CARVALO, C. M. Avaliação do risco de contaminação hídrica por agrotóxicos no perímetro irrigado Betume no Baixo Rio São Francisco. **Revista Brasileira de Agricultura Irrigada**, v. 9, n. 3, p. 158-170, set. 2015.

CÉSAR, I. C.; BRAGA, F. C.; VIANNA-SOARES, C. D. Determinação de daidzeína, genisteína e gliciteína em cápsulas de isoflavonas por cromatografia em camada delgada (CCD). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 4, p. 616- 625, dez. 2007.

DEGANI, A. L.; CASE, Q. L.; VIERA, P. C. Cromatografia Um Breve Ensaio. **Química Nova Na Escola**, v. 7, p. 21-25, maio 1998.

FREEDMAN, B.; PRYDE, H.; KWOLEK, W. F. Thin layer chromatography/flame ionization analysis of transesterified vegetable oils. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 61, n. 7, p. 1215-1220, jul. 1984.

HOWE, G. E.; MARKING, L. L.; BILLS, T. D.; RACH, J. J.; MAYER, F. L. Effects of watertemperature and pH on toxicity of terbufos, trichlorfon, 4-nitrophenol and 2,4-dinitrophenol to the amphipod *Gammarus pseudolimnaeus* and rainbowtrout *Oncorhynchus mykiss*. **Environ Toxicol Chem.**, v. 13, n. 1, p. 51-66, jan. 1994.

JABEEN, F.; CHAUDHRY, A. S.; MANZOOR, S.; SHAHEEN, T. Examining pyrethroids, carbamates and neonicotinoids in fish, water and sediments from the Indus River for potential health risks. **Environ Monit Asses**, v. 187, n. 2, fev. 2015.

JIA, F.; WANG, W.; WANG, J.; YIN, J.; LIU, Y.; LIU, Z. New strategy to enhance the extraction efficiency of pyrethroid pesticides in fish samples using a modified QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) method. **Analytical Methods**, v. 4, n. 2, p. 449-543, 2012.

KOÇ, N. D.; AKBULUT, C.; KAYHAN, F. E.; KAYMAK, G. Histopathological changes in testis of the swordtail fish, *Xiphophorus helleri* (Pisces: Poeciliidae) exposed to deltamethrin. **Fresenius Environmental Bulletin**, v. 21, n. 10, out. 2012.

LASKOWSKI, D. A. Physical and chemical properties of pyrethroids. **Reviews Of Environmental Contamination Toxicology**, v. 174, p. 49-170, 2002.

LEWIS, K. A.; TZILIVAKIS, J.; WARNER, D. J.; GREEN, A. An international database for pesticide risk assessments and management. **Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal**, v. 22, n. 4, p. 1050-1064, mar. 2016.

LIANG, Y.; ZHOU, S.; HU, L.; LI, L.; ZHAO, M.; LIU, H. Class-specific immunoaffinity monolith for efficient on-line clean-up of pyrethroids followed by high-performance liquid chromatography analysis. **Journal of Chromatography B Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 15, n. 878, p. 278-282, jan. 2010.

MEDHAM, J.; DENNEY, R. C.; BARNES, J. D.; THOMAS, M. J. K. **Vogel: Análise química quantitativa**. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 2002. 488 p.

SANTOS, M. A. T.; AREAS, M. A.; REYES, F. G. R. Piretroides: uma visão geral. **Alimentos e Nutrição**, v. 18, n. 3, p. 339-349, set. 2007.

SANTOS, W. M. C.; ALVES, G. B. M. Modelagem do potencial de poluição hídrica da Bacia Hidrográfica do Rio Manso – MT. **Brazilian Geographical Journal: Geosciences and Humanities research medium**, v. 5, n. 1, p. 289-304, fev. 2014.

SILVA, C. A.; FUJIMOTO, R. Y. Crescimento de tambaqui em resposta a densidade de estocagem em tanques-rede. **Acta Amazonica**, v. 45, n. 3, p. 323-332, 2015.

SVARTZ, G.; MEIJIDE, F.; COLL, C. P. Effects of a fungicide formulation on embryo-larval development, metamorphosis, and gonadogenesis of the south American toad *Rhinella arenarum*. **Environ Toxicol Pharmacol**, v. 45, p. 1-7, jul. 2016.

VIEIRA, H. P.; NEVES, A. A.; QUEIROZ, de M. L. R. Otimização e validação da técnica de extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura (ELL-PBT) para piretroides em água e análise por CG, **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 535-540, 2007.

WANG, H.; YAN, H.; QIAO, J. Miniaturized matrix solid-phase dispersion combined with ultrasound-assisted dispersive liquid- liquid microextraction for the determination of three pyrethroids in soil. **Journal of Separation Science**, v. 35, n. 2, p. 292-298, jan. 2012.

# Análise da diversidade e estrutura genética de acessos de coqueiro-anão

Carlos Thailan de Jesus Santos<sup>1</sup>, Quezia Cristina S. Correia<sup>2</sup>, Renata Santos Archimínio<sup>3</sup>, Tatiana Santos Costa<sup>4</sup>, Semíramis Rabelo Ramalho Ramos<sup>5</sup>, Leandro Eugenio Cardamone Diniz<sup>6</sup>

**Resumo** - O Brasil é o quarto maior produtor mundial de coco, espécie de grande importância na indústria alimentícia. A Embrapa Tabuleiros Costeiros sedia o Banco Ativo de Germoplasma (BAG) de coqueiro para América Latina e Caribe, importante para a conservação da espécie. Diante da necessidade de conhecer a estrutura genética das populações presentes neste BAG, este trabalho buscou caracterizar seis populações de coqueiro-anão presentes no Campo Experimental de Itaporanga (CEI), da Embrapa Tabuleiros Costeiros, situado no município de Itaporanga d'Ajuda, SE. Para a realização deste trabalho foram utilizados sete marcadores SSR que possibilitaram avaliar a diversidade e estrutura genética com acurácia de 190 plantas pertencentes às seis populações. A partir dos 21 loci obtidos foi alcançado alto grau de polimorfismo (95,24%). Com base na análise dos resultados obtidos para a Análise de Variância Molecular (AMOVA) (constatou-se que há alta variabilidade genética entre as seis populações analisadas, sendo esta maior entre indivíduos (69%). Apesar de serem das mesmas regiões geográficas, os dois acessos mais distantes geneticamente, segundo o gráfico de coordenadas principais (ACoP) foram Anão Vermelho de Gramame (AVG) e Anão Amarelo de Gramame (AAG). As populações analisadas apresentaram um alto grau de riqueza genotípica, representadas pelos altos valores do índice de Shannon (I), sendo as populações Anão Vermelho de Camarões (AVC) e Anão Amarelo de Gramame (AAM) as que apresentaram maiores e menores valores, respectivamente (1,56 e 1,25). Os resultados aqui apresentados indicam que entre as seis populações analisadas há alta diversidade genética, indicando boa representatividade genética entre os indivíduos avaliados.

**Termos para indexação:** diversidade genética, SSR, *cocos nucifera*, BAG.

## Introdução

O coqueiro é uma planta originária da Ásia e é muito difundida no Brasil. O país é o quarto maior produtor mundial possuindo em 2012 uma área colhida de 287 mil ha de coqueiros. O consumo da fruta é geralmente ligado ao uso da polpa e água que é vendida in natura ou processada. Da casca do coco é possível se extrair a fibra que é utilizada para produção de produtos de baixo valor agregado, como tapeçarias e cordoaria, além de estofamentos de carros. Cerca de 70% da produção de coco no Brasil encontra-se no Nordeste, onde se destacam a Bahia com 29,4% da produção nacional, Sergipe contando com 12,5% e o Pará com 11,2%. O estado de Sergipe ocupa a segunda colocação como maior produtor de coco no país e o terceiro em área plantada ocupando aproximadamente 38.000 ha, dos quais 80% estão localizados na área de baixa litorânea e Tabuleiros Costeiros (Jesus Junior, 2015).

Embora ocorra a expansão da cocoicultura para diferentes regiões não tradicionais de plantio no Brasil, observa-se o predomínio de regiões litorâneas. Apresentando assim um problema, pois coqueiro, assim como outras culturas, vem sofrendo erosão genética devido à ação do homem que retira as plantas do ambiente dando espaço à indústria hoteleira e construção de estradas (Siqueira; Aragão; Tupinambá, 2002). Como alternativa de conservação da espécie, em 1982 é criado o Banco Ativo de germoplasma (BAG) de coco que é de responsabilidade da Embrapa Tabuleiros Costeiros. O Banco mantém a variabilidade genética por meio de conservação in vivo de cerca de dois mil indivíduos, correspondentes a 29 acessos de coqueiro gigante e anão (Ramos et al., 2015). Em 2006, o Banco de Germoplasma foi associado à Rede Internacional de Recursos Genéticos de coco (COGENT) e foi rebatizada como Banco de germoplasma de coco para a América Latina e o Caribe (ICG-LAC) (Loiola et al., 2016).

A caracterização do germoplasma é uma importante atividade, pois possibilita que novos materiais de interesse sejam incluídos em programas de melhoramento genético e serve como base estratégica de conservação. Marcadores moleculares do tipo Simple Sequence Repeats (SSR) são amplamente utilizados na análise de estrutura de populações, eles são compostos de sequências simples

<sup>1</sup>Graduando em Ciências Biológicas, bolsista CNPq, Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

<sup>2</sup>Graduanda em Ciências Biológicas, bolsista Fapitec/SE, Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

<sup>3</sup>Graduanda em Biomedicina, Aracaju, SE.

<sup>4</sup>Bióloga, doutora em Biotecnologia Vegetal, pesquisadora DCR Fapitec/CNPq, pesquisadora visitante da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

<sup>5</sup>Engenheira-agrônoma, doutora em Genética e Melhoramento de Plantas, pesquisadora da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

<sup>6</sup>Biólogo, doutor em Genética e Melhoramento, pesquisador da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

repetidas de dois a cinco nucleotídeos na sequência de DNA. O polimorfismo nestes locus é resultado de variações do número de repetições das sequências de nucleotídeos (Loiola, 2014). O uso de tecnologias mais apuradas se torna útil na caracterização do BAG como o uso da eletroforese capilar, que é uma ótima alternativa para fracionamento de moléculas que possuem carga, por ser rápida, por oferecer boa resolução e eficiência, além de necessitar de uma pequena quantidade de amostra favorecendo a eficiência das análises. Este trabalho objetivou caracterizar e avaliar, por meio de marcadores moleculares microsatélites (SSR), acessos de coqueiro-anão do Banco Ativo de Germoplasma de Coco, a fim de detectar a diversidade e estrutura genética deles.

## Material e Métodos

Folículos de 190 plantas pertencentes a seis acessos de coqueiro-anão: Anão Verde de Jequi (AVJ), Anão Vermelho de Camarões (AVC), Anão Vermelho da Malásia (AVM), Anão Vermelho de Gramame (AVG), Anão Amarelo de Gramame (AAG) e Anão Amarelo da Malásia (AVM) foram coletados no Banco Ativo de Germoplasma (BAG) da Embrapa Tabuleiros Costeiros (CEI-Itaporanga d'Ajuda, SE). Após a coleta, estes folículos foram higienizados com etanol (70%), transportados ao Laboratório de Biologia Molecular e armazenados em ultrafreezer -80 °C até o momento da extração.

A caracterização molecular foi realizada seguindo quatro etapas: 1º extração do DNA; 2º quantificação e padronização das amostras; 3º PCR (primers CAC02, CAC03, CAC04, CAC06, CAC10, CNZ1 e CNZ2); 4º eletroforese capilar e análise dos dados. Para a extração de DNA foram utilizadas aproximadamente 300 mg de tecido foliar seguindo o protocolo de LOIOLA et al. (2016). Em seguida, as amostras foram quantificadas em espectrofotômetro (Nanodrop 2000c) e diluídas para a concentração padrão de 15 ng.µL<sup>-1</sup>. Com todas as amostras de DNA padronizadas, foram feitas as reações de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), onde o mix foi preparado em um volume final de 20 µL contendo: 1X de Tampão (10X), 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub> (50mM), 0,2 mM de cada dNTP (2,5 mM), 0,5 µM de cada primer (25 pmol), 2,5 unidades de Taq DNA polimerase (5 U/ µL), 30 ng de DNA molde e água milliQ estéril (q.s.p.). Estas reações de PCR foram feitas no Termociclador 96 Fast (Applied Biosystems/USA) nas seguintes condições: uma etapa inicial de desnaturação por 5 min. à 94 °C, seguida de 35 ciclos de 30 seg. a 94 °C para desnaturação; 1 min. a 53 °C - 57 °C (temperatura variável em função do marcador utilizado) para anelamento e 1 minuto à 72 °C para extensão, ao final uma extensão final por 5 min. à 72 °C.

A validação dos produtos de PCR foi feita em gel de agarose 3% e tampão TBE 1X, submetido a eletroforese, corado com brometo de etídio (0,5 µg.mL<sup>-1</sup>) e visualizado sob luz ultravioleta. A eletroforese capilar foi realizada com o equipamento Fragment Analyzer (Advanced Analytical Technologies, EUA). Para a análise foram utilizados 20 µL de produto de PCR e 4 µL de solução de tamponamento utilizando o kit DNF 905-K1000 (Advanced Analytical/Fragment Analyzer, AATI/USA). Os resultados dos perfis eletroforéticos de cada marcador SSR possibilitou a construção de uma matriz de dados, que foi utilizada para as estimativas de diversidade genética. Utilizando o software GeneALEX 6.5 (Peakall; Smouse, 2012) foram realizadas análises de riqueza genética, matrizes de distância genética, análises de coordenadas principais (ACoP) e Análise de Variância Molecular (AMOVA).

## Resultados e Discussão

A partir dos sete marcadores SSR utilizados, foram gerados 21 loci, os quais obtiveram alto grau de polimorfismo entre os acessos (94,24%). Os seis acessos de coqueiro-anão apresentaram a seguinte porcentagem de polimorfismo: AVG (100%), AVJ, AVC, AVM e AAG (95,24%), e por fim o acesso AAM (90,48%) com a menor porcentagem de polimorfismo.

As estimativas de riqueza genotípica (Tabela 1) indicam que as populações analisadas apresentaram alto valor para o índice de Diversidade Genética de Shannon (I), com valores acima de 1 (média de 1,43). As populações com maior e menor valor foram AVC (1,56) e AAM (1,25), respectivamente. As altas riquezas genotípicas entre os acessos de coqueiro já foram apresentadas em outros trabalhos: Loiola (2014) encontraram resultados semelhantes aos apresentados neste trabalho, com elevada média entre os valores de I (1,01), o que reforça a alta variação genotípica nos indivíduos. Estes resultados indicam que para os acessos de coqueiro conservados no Banco Ativo de Germoplasma de Coco, há uma boa representatividade de riqueza genotípica. Estes resultados podem ser reforçados ao observar os valores de heterozigosidade esperada (He) e a heterozigosidade observada (Ho). Estes valores medem a proporção de alelos heterozigotos e homozigotos em cada loco analisado. Os valores de He foram maiores que os de Ho em todas as populações analisadas, 0,65 e 0,12, respectivamente, indicando uma maior proporção de alelos homozigotos. Os valores de He variaram entre 0,59 (AAM) e 0,70 (AVC), enquanto os valores de Ho variaram entre 0,09 (AAM) e 0,17 (AVG). A proporção de He maior que Ho condizem com resultados publicados por Loiola et al. (2016); estes dados podem indicar predominância de panmixia, isto é, a ocorrência de cruzamentos aleatórios nas populações. Assim, os acessos se encontram em equilíbrio de Hardy-Weinberg e, consequentemente, o coeficiente de endogamia (F) não foi maior que o valor unitário atingindo maior valor na população AAM (0,88) e menor em AVG (0,80).

**Tabela 1:** Estimativas de riqueza genotípica entre os acessos de coqueiro-anão do Banco Ativo de Germoplasma de Coco para América Latina e Caribe (ICG-LAC).

Acesso	N	Na	Ne	I	Ho	He	F
<b>AVJ</b> <sup>(1)</sup>	28,52	7,52	4,25	1,51	0,15	0,68	0,81
<b>AVC</b> <sup>(2)</sup>	28,95	7,76	4,10	1,56	0,12	0,70	0,83
<b>AVM</b> <sup>(3)</sup>	27,09	5,95	3,58	1,33	0,11	0,63	0,86
<b>AVG</b> <sup>(4)</sup>	28,28	7,62	4,61	1,55	0,17	0,68	0,80
<b>AAG</b> <sup>(5)</sup>	31,1	7,05	3,80	1,36	0,11	0,61	0,86
<b>AAM</b> <sup>(6)</sup>	29,43	6,00	3,32	1,25	0,09	0,59	0,88
<b>Média</b>	<b>28,91</b>	<b>6,98</b>	<b>3,94</b>	<b>1,43</b>	<b>0,12</b>	<b>0,65</b>	<b>0,83</b>

<sup>(1)</sup>AVJ = Anão Verde de Jequi. <sup>(2)</sup>AVC = Anão Vermelho de Camarões. <sup>(3)</sup>AVM = Anão Vermelho da Malásia. <sup>(4)</sup>AVG = Anão Vermelho de Gramame. <sup>(5)</sup>AAG = Anão Amarelo de Gramame. <sup>(6)</sup>AAM = Anão Amarelo da Malásia.

O índice de fixação ou índice de endogamia (F) (Tabela 1) resulta em redução da variabilidade genética e aumento da homozigotidade dentro dos diferentes acessos. Os valores analisados mostram-se positivos e significativamente acima de 0, sendo os maiores valores encontrados no acesso AAM (0,878) e o menor, mas ainda acima do valor unitário, no acesso AVG (0,80). Apesar de positivos, valores como estes são considerados baixos. Loiola et al. (2016) encontraram em seus estudos valores semelhantes com estes para acessos de coqueiro gigante também pertencentes ao Banco Internacional de Coco para América Latina e Caribe (ICG-LAC). Este fato, segundo a mesma, se deve ao processo de origem e disseminação das populações. Presume-se que as populações tenham sofrido cruzamentos preferenciais com indivíduos aparentados por estarem geograficamente próximos e isolados de outros indivíduos.

O índice de fixação populacional (entre acessos) (FIT) foi de 0,86 ( $p < 0,0001$ ) e o índice de fixação entre indivíduos (FIS) foi de 0,83 ( $p < 0,0001$ ), e pode implicar em alto grau de endogamia, valores positivos e acima de zero indicam um possível déficit de heterozigotos dentro dos acessos. O valor encontrado para FST foi de 0,166 indicando um fluxo gênico moderado entre os acessos. Este dado reflete na AMOVA, onde se vê (Tabela 2) que a maior porcentagem de diversidade genética é observada entre os acessos (69%) e a menor diversidade entre indivíduos (14%).

**Tabela 2.** Análise de Variância Molecular (AMOVA) de dados SSR realizada entre 190 indivíduos pertencentes a 6 acessos de coqueiro-anão presentes ICG-LAC. Grau de Liberdade (GL), Soma dos Quadrados (SQ), Quadrado Médio (QM), Porcentagem de Variação (V), Coeficiente de Variação (CV), Probabilidade de ter um componente de variação maior que os valores observados ao acaso (P). As probabilidades foram calculadas por 1.000 permutações ao acaso.

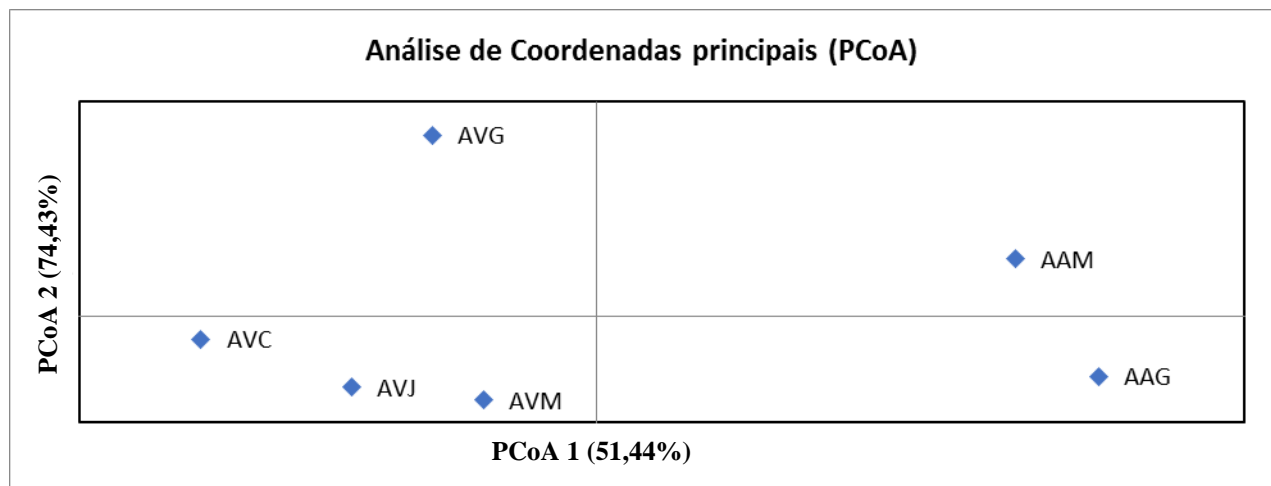
Fonte de variação	GL	SQ	QM	CV	V (%)	P
Entre indivíduos	5	515,83	103,16	1,44	17%	<0,0001
Entre acessos	181	2398,44	13,25	6,02	69%	<0,0001
Dentro de indivíduos	187	225,50	1,20	1,20	14%	<0,0001
<b>Total</b>	<b>373</b>	<b>3139,78</b>	<b>117,62</b>	<b>8,67</b>	<b>100%</b>	
Fst						0,166

Com base na matriz gerada a partir do coeficiente de dissimilaridade de Nei (Tabela 3) foi possível avaliar a diversidade genética entre os seis acessos analisados. Isto permitiu inferir que os acessos AVJ e AVM são mais similares geneticamente (0,221) enquanto AVC e AAG são as mais distantes entre si (1,193) mesmo estando presentes no mesmo campo experimental. O coeficiente de dissimilaridade também permitiu agrupar esses acessos em quatro distintos, com base na análise de coordenadas principais (PCoA) apresentada (Figura 1). Assim, os acessos com maior similaridade genética foram separados em grupos.

**Tabela 3.** Matriz de distância genética de NEI, calculada entre os 06 acessos de coqueiro-anão.

AVJ <sup>(1)</sup>	AVC <sup>(2)</sup>	AVM <sup>(3)</sup>	AVG <sup>(4)</sup>	AAG <sup>(5)</sup>	AAM <sup>(6)</sup>	
0,000						AVJ <sup>(1)</sup>
0,368	0,000					AVC <sup>(2)</sup>
0,221	0,533	0,000				AVM <sup>(3)</sup>
0,612	0,619	0,613	0,000			AVG <sup>(4)</sup>
0,949	1,193	0,706	1,095	0,000		AAG <sup>(5)</sup>
0,798	1,117	0,740	0,733	0,339	0,000	AAM <sup>(6)</sup>

<sup>(1)</sup>AVJ = Anão Verde de Jequi. <sup>(2)</sup>AVC = Anão Vermelho de Camarões. <sup>(3)</sup>AVM = Anão Vermelho da Malásia. <sup>(4)</sup>AVG = Anão Vermelho de Gramame. <sup>(5)</sup>AAG = Anão Amarelo de Gramame. <sup>(6)</sup>AAM = Anão Amarelo da Malásia.



**Figura 3.** Análise de coordenadas principais PCoA da diversidade genética de 06 acessos de coqueiro-anão, estimadas a partir da distância genética de Nei, sendo AVJ - Anão Verde de Jequi, AVC - Anão Vermelho de Camarões, AVM - Anão Vermelho da Malásia, AVG - Anão Vermelho de Gramame, AAG - Anão Amarelo de Gramame e AAM - Anão Amarelo da Malásia.

A partir dos dados obtidos para os 190 indivíduos analisados, foi elaborada uma matriz de dissimilaridade considerando o índice de média ponderada, essa matriz possibilitou elaborar um gráfico pelo método de agrupamento UPGMA que permitiu formar x grupos distintos separados de acordo com a similaridade: No grupo 1, os pares de indivíduos mais próximos geneticamente são AAG 3 X AAM 23 pertencentes a acessos diferentes, AAG 17 X AAG 8 pertencentes ao mesmo acesso; No grupo 2, os pares de indivíduos AVG 7 X AVG 19 pertencentes ao mesmo acesso são os mais similares geneticamente; No grupo 3 os pares de indivíduos AVG 22 X AVG 23, AVG 25 X AVG 8 são os mais similares geneticamente e pertencem aos mesmo acesso. No grupo 4 os pares de indivíduos AVJ 6 X AVJ 7, AVM 26 X AVM 6 são os mais similares geneticamente; No grupo 5 os pares de indivíduos AVC 14 X AVC 21 e AVJ 18 X AVJ19 pertencentes ao mesmo acesso e o par AVM 4 X AVJ 29 pertencente a acessos diferentes são os mais similares geneticamente. Os pares de indivíduos mais distantes geneticamente são AVC 6 X AAM 21.

## Conclusões

Através desse trabalho foi possível verificar uma alta taxa de polimorfismo nas populações presentes no Banco Ativo de Germoplasma (BAG) da Embrapa Tabuleiros Costeiros (CEI - Itaporanga d'Ajuda, SE) podendo ser útil para futuros estudos de melhoramento e conservação. Os acessos de coqueiro-anão mais distantes geneticamente foram Anão Vermelho de Camarões e Anão Amarelo de Gramame.

## Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa Pibic e à Fapitec/SE pela bolsa DCR.



## Referências

- JESUS JUNIOR, L. A. Análise da produção da cultura do coco no Brasil, **Nordeste E.** v. 3, n. esp., p. 317–324, 2015.
- LOIOLA, C. M. **Diversidade genética em coqueiro-gigante (*Cocos nucifera* L.) por meio de marcadores microssatélites e características morfoagronômicas.** 2014. 100 f. Dissertação (Doutorado em Fitotecnia: Área de Concentração em Agricultura Tropical) - Universidade Federal Rural do Semiárido, Mossoró, 2014.
- LOIOLA, C. M. et al. Genetic relationships among tall coconut palm (*Cocos nucifera* L.) accessions of the international coconut genebank for Latin America and the Caribbean (ICG-LAC), evaluated using microsatellite markers (SSRs). **PLoS ONE**, v. 11, n. 3, p. 1–11, 2016.
- RAMOS, S. R. R.; FERREIRA, J. M. S.; LEDO, A. da S.; TALAMINI, V.; SOBRAL, K. M. B.; ANDRADE, J. B.; SANTOS, D. N.; PINTO, M. dos S. Banco ativo de germoplasma de coco da Embrapa: histórico, manejo e utilização dos acessos no período de 2012 a 2014. In: SIMPÓSIO DA REDE DE RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS DO NORDESTE, 2., 2015, Fortaleza. **Valorização e uso da plantas Caatinga.** Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical: Universidade Federal do Ceará, 2015.
- SIQUEIRA, L. A.; ARAGÃO, W. M.; TUPINAMBÁ, E. A. **A introdução do coqueiro no Brasil:** importância histórica e agronômica. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2002. 24 p. (Embrapa Tabuleiros Costeiros. Documentos, 47).

# Estimativa da transferência de pressões aplicadas na superfície a camadas subsuperficiais de um argissolo de Tabuleiros Costeiros

Davi Souza de Santana<sup>1</sup>, Edson Patto Pacheco<sup>2</sup>

**Resumo** - O horizonte subsuperficial coeso dos Argissolos de Tabuleiros Costeiros reduz a profundidade efetiva desses solos, podendo comprometer a produtividade e longevidade das lavouras de cultivo perene. Essa limitação pedogenética pode ser potencializada, quando a pressão aplicada na superfície do horizonte Ap, durante o tráfego de máquinas agrícolas, é transmitida para horizontes mais profundos (AB ou Bt), em níveis superiores a capacidade de suporte de carga dessas camadas, causando compactações subsuperficiais adicionais. O objetivo desse trabalho foi estimar a transferência de pressões aplicadas à superfície do horizonte Ap de um Argissolo para camadas subsuperficiais, por meio de ensaios de laboratório. Para a realização dos ensaios, foi utilizado o delineamento experimental em blocos ao acaso, com quatro repetições, no esquema fatorial 5x3x6. Para compor os tratamentos foram consideradas cinco espessuras do horizonte Ap (0,05; 0,10; 0,15; 0,20 e 0,25 m), três níveis de umidades do solo com base na capacidade de campo -  $\theta_{cc}$  (solo seco, 25% e 50% da  $\theta_{cc}$ ), e seis níveis de pressão aplicadas no topo do corpo de prova (25, 50, 100, 150, 200 e 250 KPa). As cinco espessuras do horizonte Ap foram obtidas por meio da contenção de uma massa de solo, com densidade aparente de  $1,42 \text{ Mg ton}^{-3}$ , em cilindros de PVC com diâmetro de 0,10 m, com as respectivas alturas. Os seis níveis de pressão na superfície foram aplicados por meio de uma prensa mecânica da marca Solotest. Foram realizados dois ensaios distintos, utilizando dois discos de metal com área de 20,43 e 65,04  $\text{cm}^2$ , respectivamente, que foram posicionados no topo do corpo de prova. A pressão transmitida foi medida por meio de um disco com área de 6,61  $\text{cm}^2$ , localizado na base dos corpos de prova, e acoplado a uma célula de carga com capacidade de 20 kgf conectada ao “datalogger” do penetrógrafo de bancada da marca Marconi. A umidade do solo apresentou efeito de amortecimento sobre a pressão transmitida de camadas superiores para subsuperfície. A pressão transmitida para subsuperfície apresenta comportamento exponencial com correlação negativa em função da profundidade, independente da pressão aplicada na superfície. O aumento da área de contato para aplicação de pressões na superfície do solo, atenua a transmissão de pressão para camadas inferiores, quando é comparado à mesma pressão aplicada em áreas menores.

**Termos para indexação:** argissolo, capacidade de suporte de carga, compactação subsuperficial.

## Introdução

Os solos dos Tabuleiros Costeiros que incluem os Argissolos são em geral, pobres em nutrientes e em matéria orgânica e são caracterizados pela presença de camadas adensadas (camadas coesas), localizadas quase sempre entre 20 cm e 60 cm de profundidade (Jacomine, 2001).

A cana de açúcar dos Estados da Bahia, Sergipe e Alagoas está assentada predominantemente em Argissolos e Latossolos Amarelos. Assim, apesar do grande potencial dos Tabuleiros Costeiros para a exploração agrícola, relacionado à topografia favorável à mecanização e à proximidade de grandes centros consumidores, há limitações edafoclimáticas que comprometem a produtividade da cultura. A baixa fertilidade desses solos e a má distribuição das chuvas, associada aos horizontes coesos, destacam-se dentre as principais limitações à produção de cana nos Tabuleiros Costeiros (Resende et al., 2015).

A degradação nas propriedades físicas do solo, causado pelas operações motomecanizadas, vem sendo instrumentos de pesquisa, por estar diretamente ligada aos efeitos negativos da compactação do solo e desenvolvimento da produtividade das plantas. Com a modernização da mecanização nas operações agrícolas, a introdução de máquinas mais pesadas vem intensificando o aumento da carga aplicada na superfície e subsuperfície dos solos.

A compactação e o adensamento do solo acarretam uma série de problemas que afetam direta ou indiretamente a produção agrícola ao causarem restrição ao crescimento e desenvolvimento radicular (Resende, 2000). Entretanto Cintra (1997) sugere que a camada coesa exerce ação benéfica, por se constituir, também, numa barreira física à perda de água. A citada barreira favorece o armazenamento da água no solo, amenizando o estresse hídrico da planta no início da estação seca. A esses fatores limitantes ao pleno desenvolvimento da atividade sucroalcooleira, deve ser acrescentada a impossibilidade da prática de irrigação na maior parte da área, atualmente ocupada pela cultura da cana, o que torna necessária a seleção de porta-enxertos com boa tolerância à seca.

<sup>1</sup>Graduando em Engenharia Agrícola, bolsista da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

<sup>2</sup>Engenheiro-agrônomo, doutor em Ciência do Solo, pesquisador da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

Nas áreas canavieiras, esses aspectos pedogenéticos podem ser agravados pela grande quantidade de operações motomecanizadas, o que submete esses solos a pressões excessivas em condições de baixa capacidade de suporte de carga, resultando em compactações adicionais e consequente processo de degradação física do solo. Esta degradação, associada à irregularidade das chuvas e aos períodos de estiagem, podem diminuir a produtividade devido à deficiência das plantas na absorção de nutrientes em condições de solo compactado.

O presente trabalho objetivou-se em avaliar a eficiência de um método de laboratório para estimar a transferência de pressões aplicadas na superfície do solo para camadas subsuperficiais. Obter um modelo para estimar a pressão aplicada no topo do horizonte AB de um Argissolo de Tabuleiros Costeiros, em função da variação de pressão aplicada na superfície do horizonte Ap com diferentes espessuras e umidade. Recomendar a máxima carga no eixo e tipo de rodados de máquinas agrícolas adequados para diminuição da compactação do solo.

## Material e Métodos

O trabalho foi desenvolvido no laboratório de Física do Solo da Embrapa Tabuleiros Costeiros, os volumes de solo, com estrutura não preservada utilizados nos ensaios, foram obtidos de uma área cultivada com cana-de-açúcar, localizado no paralelo 10°02'60''S e meridiano 36°10'31'', da Fazenda Progresso, de propriedade da Usina Coruripe – Alagoas. O solo foi extraído na profundidade 0 a 20 m, representado pelo horizonte Ap, respectivamente, classificado como Argissolo Amarelo Distrocoeso (Embrapa, 2006), relevo plano, textura média (leve)/argilosa, formado do sedimento grupo Barreiras, característico da unidade geomorfológica Tabuleiros Costeiros (Jacomini et al., 1975).

O delineamento experimental inteiramente ao acaso, com quatro repetições, no esquema fatorial 5x3x6, totalizando 90 tratamentos, sendo consideradas cinco espessuras do horizonte Ap (0,05 m; 0,10 m; 0,15 m; 0,20 m e 0,25 m), três níveis de umidades do solo com base na capacidade de campo -  $\theta_{cc}$  (solo seco, 25% da  $\theta_{cc}$  e 50% da  $\theta_{cc}$ ) e seis níveis de pressão aplicadas no topo do corpo de prova (25 kPa, 50 kPa, 100 kPa, 150 kPa, 200 kPa e 250 kPa), totalizando 720 ensaios.

As cinco espessuras do horizonte Ap (EHAp) serão obtidas por meio da contenção de uma massa de solo, em cilindros de PVC com diâmetro de 0,10 m e com alturas variadas, conforme especificado anteriormente. A massa de solo será calculada conforme o volume de solo necessário, para obter uma densidade do solo ( $D_s$ ) avaliada por meio de amostras indeformadas coletados com trado de Huland.

Para os três níveis de umidade do solo ( $\theta$ ) serão considerados solo seco a sombra, e adição de água ao solo seco para obtenção das umidades volumétricas de 25% e 50% da capacidade de campo ( $\theta_{cc}$ ).

Os seis níveis de pressão na superfície (PS) serão obtidos por meio de uma prensa mecânica de acionamento manual, da marca Solotest. Dois disco de metal de 0,051 m e 0,091 m de diâmetro (20 cm<sup>2</sup>, 43 cm<sup>2</sup> e 65,04 cm<sup>2</sup>) será posicionado no topo do corpo de prova, e sobre ele acionada uma carga de 18,07 kgf; 36,15 kgf; 72,30 kgf e 144,59 kgf que corresponderão aos seis níveis de pressão preestabelecidos de 25 kPa, 50 kPa, 100 kPa, 150 kPa, 200 kPa e 250 kPa, respectivamente. A manivela da prensa deverá ser acionada até que o micrômetro digital para medida da deformação do anel dinamométrico da prensa, indique a leitura correspondente à carga desejada no ensaio em questão.

A leitura da força transmitida até a base do corpo de prova será medida por meio de uma célula de carga com capacidade de 20 kgf, que conectada ao *datalogger* do penetrógrafo de bancada da marca Marconi registrará a força em kgf transmitida a cada segundo. Utilizando software específico, os dados de força serão registrados em um arquivo txt, do qual deverá ser selecionado o maior valor registrado. Esse valor será utilizado para calcular a pressão transmitida do topo para a base do corpo de prova, conforme equação a seguir:

$$PTPS = \left( \frac{FMS}{6,16} \right) * 98,0665$$

Em que:

PTPS = pressão transmitida para subsuperfície (kPa);

FMS = força máxima na subsuperfície (kgf);

6,16 = área de contato da célula de carga com a subsuperfície (cm<sup>2</sup>);

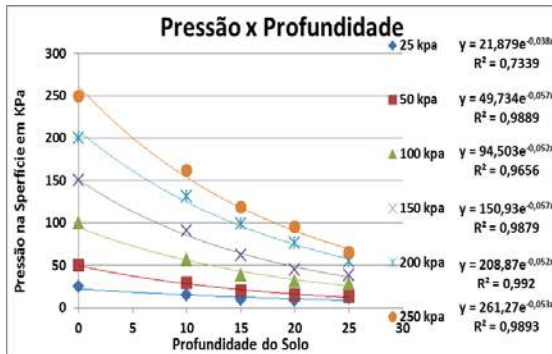
98,0665 = transformação de kgf cm<sup>-2</sup> para kPa.

Após a determinação das PTPS para cada ensaio, será elaborado um modelo, por meio de regressão, para estimativa da pressão transmitida para subsuperfície (PTPS) em função da espessura do horizonte Ap (EHAp), umidade do solo ( $\theta$ ) e pressão na superfície (PS), portanto:  $PTPS = f(EHAp; \theta; PS)$ .

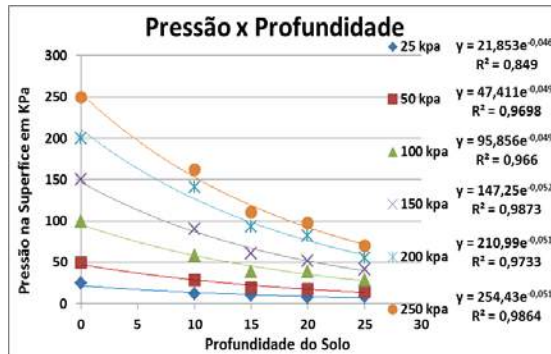
## Resultados e Discussão

Os gráficos a seguir foram obtidos a partir de pressões aplicadas por meio de dois discos com área de contato 20,43 cm<sup>2</sup> e 65,04 cm<sup>2</sup>, respectivamente, que foram posicionados no topo do corpo de prova. Os pontos foram obtidos pela média de quatro repetições. Para obtenção das curvas de regressão apresentadas nas figuras 1, 2 e 3, por motivos operacionais durante os ensaios, optou-se por excluir os pontos referentes à profundidade de 5 cm, o que conferiu um melhor ajuste das curvas de regressão.

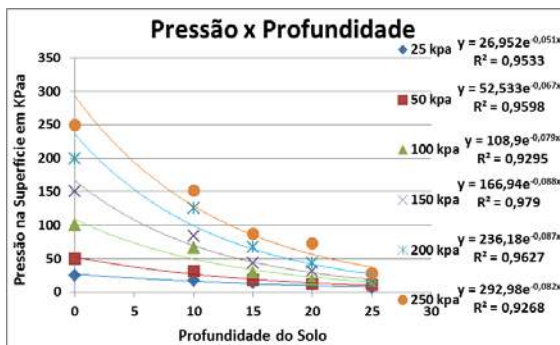
### 3.1 Transmissão de pressão com menor área de contato



**Figura 1.** Curvas de regressão para pressão transmitida para subsuperfície (PSS) em função da profundidade, para solo com 0% da capacidade de campo e seis pressões aplicadas na superfície (PS).



**Figura 2.** Curvas de regressão para pressão transmitida para subsuperfície (PSS) em função da profundidade, para solo com 25% da capacidade de campo e seis pressões aplicadas na superfície (PS).



**Figura 3.** Curvas de regressão para pressão transmitida para subsuperfície (PSS) em função da profundidade, para solo com 50% da capacidade de campo e seis pressões aplicadas na superfície (PS).

Para estimar a pressão transmitida para camadas inferiores durante a aplicação de uma pressão aplicada no topo do horizonte superficial, o melhor ajuste dos modelos de regressão foi do tipo exponencial  $y = a \cdot e^{-bx}$ , onde  $y$  é a pressão transmitida para a subsuperfície (PSS) em função da profundidade ( $x$ ). As equações de regressão foram obtidas por meio do software Excel, considerando os três níveis de umidade e seis níveis de pressão aplicadas no topo do corpo de prova (PS), simulando pressões aplicadas na superfície do solo durante o tráfego de máquinas agrícolas. Para os ensaios realizados com pressão aplicada com o disco de menor área (Figuras 1, 2 e 3), pode-se observar um comportamento distinto quando as pressões foram aplicadas ao solo com umidade de 50 % CC (Figura 3), sendo que, para a profundidade de 15 cm a PSS não atingiu 100 kPa, mesmo para uma pressão de 250 kPa aplicada na superfície do corpo de prova. A explicação para esse comportamento é o menor atrito entre as partículas do solo proporcionado pela água, fazendo que o corpo de prova apresente uma maior deformação durante a aplicação da pressão na sua superfície, funcionando como uma “mola”, consequentemente, diminuindo as pressões transmitidas para camadas mais profundas. Isso pode ser comprovado por meio da diminuição do coeficiente “b” das equações de regressão, chegando a -0,088 para a curva referente à PS de 150 kPa, para umidade do solo de 50% CC (Tabela 1).

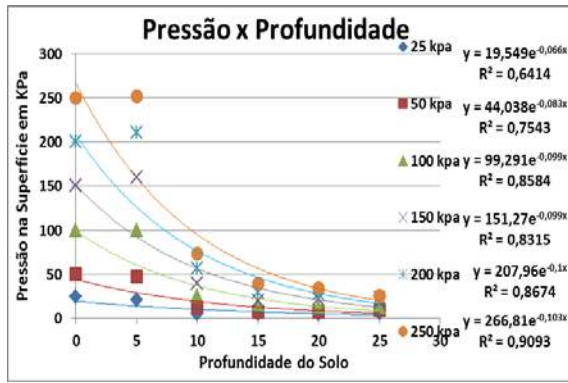
**Tabela 1.** Coeficientes de regressão para PSS em função da profundidade, para três Umidades e seis PS, para ensaios com disco menor (área de contato 20,43 cm<sup>2</sup>).

Umidade (%CC)	Pressão (kPa)	Coeficientes de Regressão		R <sup>2</sup>
		a	b	
0%	25	21,879	-0,038	0,7339
	50	49,734	-0,057	0,9889
	100	94,503	-0,052	0,9656
	150	150,93	-0,057	0,9879
	200	208,87	-0,052	0,992
	250	261,27	-0,053	0,9893
25%	25	21,853	-0,046	0,849
	50	47,411	-0,049	0,9698
	100	95,856	-0,049	0,966
	150	147,25	-0,052	0,9873
	200	210,99	-0,051	0,9733
	250	254,43	-0,051	0,9864
50%	25	26,952	-0,051	0,9533
	50	52,533	-0,067	0,9598
	100	108,9	-0,079	0,9295
	150	166,94	-0,088	0,979
	200	236,18	-0,087	0,9627
	250	292,98	-0,082	0,9268

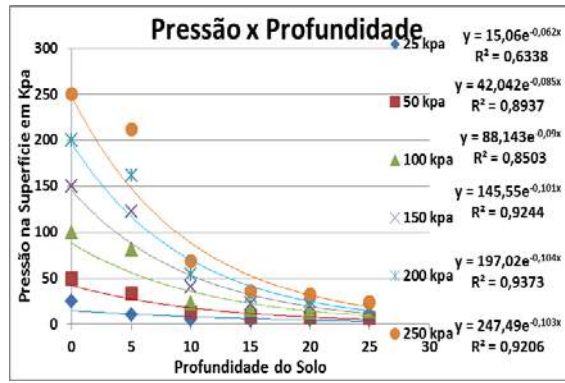
Segundo Hillel (1980) e Dias Junior (1994), esse comportamento ocorre porque a água exerce de duas formas sobre a resistência do solo ao cisalhamento: diminuindo a coesão entre as partículas sólidas e formando filmes entre as partículas sólidas, resultando em menor atrito entre as mesmas. Segundo (Silva et al., 2000) o volume de água é um importante fator, que identifica a possível intensidade de deformação que pode acontecer no solo durante a aplicação da pressão, pois atua como lubrificante entre as partículas, permitindo o deslocamento das mesmas, o qual é favorecido à medida que aumenta. Portanto para o tipo de solo considerado no estudo, por se tratar de um solo com alto teor de areia no horizonte superficial, com aumento de argila nas camadas mais profundas, maiores umidades nas camadas superficiais podem conferir uma maior deformação dessas camadas, funcionando assim com um amortecedor, atenuando as pressões transmitidas para as camadas argilosas adjacentes, onde compactações adicionais podem comprometer o aprofundamento de raízes e o desenvolvimento das lavouras.

### 3.2 Transmissão de pressão com maior área de contato

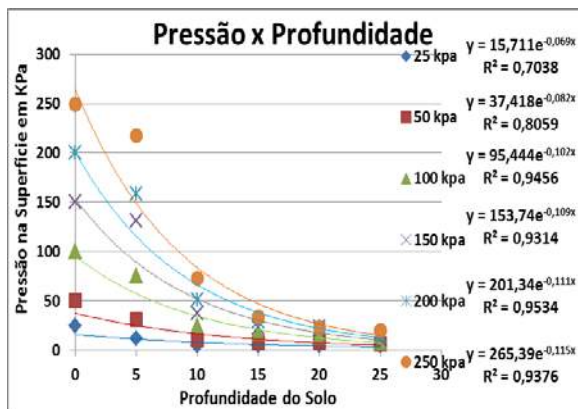
Comparando as duas áreas de contato observa-se que o aumento da área de contato para aplicação da pressão na superfície, resultou em uma diminuição das pressões transmitidas para as camadas inferiores. Nesse caso, a água ainda teve um papel de lubrificante entre as partículas do solo, funcionando como um amortecedor das pressões aplicadas na superfície. Para os corpos de prova com teor de água de 50% CC, a pressão transmitida para subsuperfície não atinge 50 kpa mesmo para a pressão de 250 kpa aplicada na superfície (Figura 6), valor que é ultrapassado na profundidade de 15 cm quando a pressão era aplicada no solo com umidade de 0% e 25% CC, conforme pode ser observado nas Figuras 4 e 5. O teor de água teve importância na atenuação das pressões transferidas, no entanto, o aumento da área de contato foi mais expressivo, para pressões constante, reduzindo a PSS de aproximadamente 100 kpa (Figuras 1, 2 e 3) para 50 kpa (Figuras 4, 5 e 6) na profundidade de 15 cm, quando a pressão aplicada no topo dos corpos de prova era de 250 kpa. Isso pode ser comprovado observando que os valores do coeficiente “b”, das equações de regressão obtidas nos ensaios com o disco de área maior (Tabela 2), são menores do que os das equações obtidas por meio dos ensaios com o disco de área menor (Tabela 1), o que confere uma maior inclinação das curvas, principalmente para as camadas menos espessas, o que significa atenuação das pressões transmitidas.



**Figura 4.** Curvas de regressão para pressão transmitida para subsuperfície (PSS) em função da profundidade, para solo com 0% da capacidade de campo e seis pressões aplicadas na superfície (PS).



**Figura 5.** Curvas de regressão para pressão transmitida para subsuperfície (PSS) em função da profundidade, para solo com 25% da capacidade de campo e seis pressões aplicadas na superfície (PS).



**Figura 6.** Curvas de regressão para pressão transmitida para subsuperfície (PSS) em função da profundidade, para solo com 50% da capacidade de campo e seis pressões aplicadas na superfície (PS).

**Tabela 2.** Coeficientes de regressão para PSS em função da profundidade, para três umidades e seis PS, para ensaios com disco menor (área de contato 65,04 cm²).

Umidade (%CC)	Pressão (kPa)	Coeficientes de Regressão		
		a	b	R²
0%	25	19,549	-0,066	0,6414
	50	44,038	-0,083	0,7543
	100	99,291	-0,099	0,8584
	150	151,27	-0,099	0,8315
	200	207,96	-0,1	0,8674
	250	266,81	-0,103	0,9093
25%	25	15,06	-0,062	0,6338
	50	42,042	-0,085	0,8937
	100	88,143	-0,09	0,8503
	150	145,55	-0,101	0,9244
	200	197,02	-0,104	0,9373
	250	247,49	-0,103	0,9206
50%	25	15,711	-0,069	0,7038
	50	37,418	-0,082	0,8059
	100	95,444	-0,102	0,9456
	150	153,74	-0,109	0,9314
	200	201,34	-0,111	0,9534
	250	265,39	-0,115	0,9376

Com o aumento da área de contato a pressão que chega aos horizontes subsuperficiais é menor, devido à melhor distribuição das forças. Segundo Fernandes et al. (2013), a diminuição do prejuízo de compactação é efetivamente obtida quando se reduz a pressão

aplicada por unidade de área e eleva-se a área de contato por meio da utilização de esteiras ou de pneus mais largos com menor pressão de inflação. Um exemplo são os pneus radiais de baixa pressão e alta flutuação destinados aos veículos de transporte de cana-de-açúcar e carretas agrícolas que tem como características maior capacidade de carga com baixas pressões de calibragem, possibilitando o transporte de cargas pesadas em baixas pressões do pneu sobre o solo.

## Conclusões

1. A umidade do solo apresentou efeito de amortecimento sobre a pressão transmitida de camadas superiores para subsuperfície.
2. A pressão transmitida para subsuperfície apresenta comportamento exponencial com correlação negativa em função da profundidade, independente da pressão aplicada na superfície.
3. O aumento da área de contato para aplicação de pressões na superfície do solo atenua a transmissão de pressão para camadas inferiores, quando é comparado à mesma pressão aplicada em áreas menores.

## Referências

- CINTRA, F. L. D. **Disponibilidade de água no solo para porta-enxertos de citros em ecossistema de Tabuleiro Costeiro**. 1997. 90 f. Tese (Doutorado)- ESALQ, Piracicaba, São Paulo, 1997.
- DIAS JUNIOR, M. S. Compactação do solo. **Tópicos em ciência do solo**, v. 1, p. 56-94, 2000.
- SANTOS, H. G. dos; JACOMINE, P. K. T.; ANJOS, L. H. C. dos; OLIVEIRA, V. A. de; OLIVEIRA, J. B. de; COELHO, M. R.; LUMBRERAS, J. F.; CUNHA, T. J. F. (Ed.). **Sistema brasileiro de classificação de solos**. 2. ed. Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 2006. 306 p.
- HILLEL, D. **Fundamentals of soil physics**. New York: Academic Press, 1980. 413 p.
- JACOMINE, P. K. T. Evolução do conhecimento sobre solos coesos no Brasil. In: CINTRA, F. L. D.; ANJOS, J. L.; IVO, W. M. P. M. WORKSHOP COESÃO EM SOLOS DOS TABULEIROS COSTEIROS, 2001, Aracaju. **Anais...** Aracaju: EMBRAPA-CPATC, 2001. p. 19-46.
- JACOMINE, P. K. T.; CAVALCANTI, A. C.; PESSÔA, S. C. P.; SILVEIRA, C. O. da. **Levantamento exploratório - reconhecimento de solos do Estado de Alagoas**. Recife: EMPBRAPA-CPP, 1975. 532 p. (EMBRAPA-CPP. Boletim técnico, 35; SUDENE-DRN. Recursos de solos, 5). Acompanha 1 mapa color. Escala 1:400.000.
- REZENDE, J. de O.; MAGALHÃES, A. F. de J.; SHIBATA, R. T. **Citricultura nos solos coesos dos tabuleiros costeiros: análises e sugestões**, Salvador: SEAGRI/SPA, 2002a, 96 p. (SEAGRI/SPA, Série Estudos Agrícolas, 3).
- REZENDE, J. O. ; SHIBATA, R. T.; SOUZA, L. S. **Justificativa e recomendações técnicas para o "plantio direto" dos citros nos Tabuleiros Costeiros: ênfase na citricultura dos Estados da Bahia e Sergipe**. Cruz das Almas: Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2015. v. 1. 240 p.
- SILVA, A. P.; R. L.; MOLIN, J. P. ; AMARAL, J. R. Caracterização de um penetrômetro hidráulico montado em trator com instrumentação eletrônica para aquisição de dados. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA AGRÍCOLA, 29., 2000, Fortaleza. **Anais...** Jaboticabal: SBEA, 2000. 1 CD-ROM.
- FEITOSA, J. R.; FERNANDES, H. C.; TEIXEIRA, M. M.; CECON, P. R. Influência da pressão interna dos pneus e velocidade de deslocamento nos parâmetros operacionais de um trator agrícola e nas propriedades físicas do solo. **Engenharia Agrícola**, v. 35, n. 1, 2016.
- FERNANDES, H. C.; LOPES, S. E.; LEITE, D. M.; MILAGRES, R. S.; SANTOS, L. N. Compactação do solo em função do tráfego de máquinas florestais. **Revista Agrotecnologia**, v. 4, n. 2, p. 85-98, 2013.

# Impacto da gliricídia (*Gliricidia sepium*) sob indicadores de qualidade química do solo para uso em sistemas de ILPF (Integração Lavoura-Pecuária-Floresta)

Guilherme de Oliveira Argolo Delfino<sup>1</sup>, Samuel Figueiredo de Souza<sup>2</sup>, Brisa Marina da Silva Andrade<sup>3</sup>,  
Cosme Washington Santos de Jesus<sup>4</sup>, Erick Yanomami Barros Souza<sup>4</sup>, Joelly Souza Brito<sup>5</sup>,  
José Henrique de Albuquerque Rangel<sup>6</sup>, Evandro Neves Muniz<sup>7</sup>

**Resumo** - O presente estudo teve por objetivo mensurar, avaliar e comparar os principais indicadores químicos de qualidade do solo nas diversas aplicações da gliricídia em sistemas adensado e consorciado, considerando sua alta capacidade de produção de biomassa rica em nutrientes para adubação orgânica, uma ótima cobertura e proteção do solo, a melhoria das condições físicas, químicas e biológicas do solo, sendo uma boa fixadora de nitrogênio e a manutenção da microfauna em profundidade. O presente estudo foi realizado em seis municípios do estado de Sergipe localizados nas regiões do Alto e Médio Sertão, Centro Sul, Sertão Ocidental e Baixo São Francisco, onde a implantação da gliricídia foi realizada mediante produção de mudas avaliando-se os solos em sistemas de plantio consorciado (fileiras duplas de gliricídia intercaladas por alamedas de 5 m a 7 m) para produção de grãos, raízes e cactáceas; e em sistemas de plantio adensado (distância entre as plantas de 1 m x 1 m) para uso como banco de proteína exclusivamente. Os indicadores de qualidade química avaliados foram: matéria orgânica, pH em água, cálcio, magnésio, alumínio, fósforo, potássio, sódio e micronutrientes. Observou-se que o plantio adensado onde só contém a Gliricídia, apresentou uma melhor característica nos atributos químicos do solo seguido do sistema de plantio consorciado onde se encontra a Gliricídia e outros componentes agrônômicos, quando comparado a testemunha, sendo que dos indicadores da qualidade química do solo: a matéria orgânica, o cálcio, o magnésio e o fósforo, apresentam diferenças significativas que demonstram isso. Os resultados demonstram que a Gliricídia pode ter um importante papel nos sistemas de ILPF, aonde ela apresenta uma ótima redundância nos sistemas, pois apresenta uma estabilidade de resistência (a capacidade de se manter estável diante do estresse) e a estabilidade de elasticidade (a capacidade de se recuperar rapidamente). Diante disso, além de ser protagonista de uma retroalimentação positiva onde uma parte da saída volta para o sistema ou ecossistema como entrada (na forma de serapilheira e como forragem para alimentação animal) acelerando os desvios do ecossistema sendo, naturalmente necessária para crescimento e a sobrevivência dos organismos presentes nos sistemas.

**Termos para indexação:** ecossistemas, estabilidade, leguminosa, serapilheira.

## Introdução

Perante a atual situação de degradação dos solos brasileiros, na qual significa a deterioração de suas propriedades químicas e físicas, é de fundamental importância a intervenção para que seja feita não só a correção como a conservação. Essa degradação vem de diversas maneiras erradas de se lidar com o solo, consequentemente abalando sua composição e produtividade (Manuel Macedo, 2000). Desse modo, a *Gliricidia sepium* é uma grande espécie leguminosa, pois se destaca por apresentar um rápido crescimento, alta capacidade de regeneração, resistência à seca e facilidade em propagar-se (Drumond; Marcos Antônio, 2011). Visando que a implantação da gliricídia traz consigo grandes vantagens na recuperação de áreas degradadas. Considerando sua alta capacidade de produção de biomassa rica em nutrientes para adubação orgânica, uma ótima cobertura e proteção do solo, a melhoria das condições físicas, químicas e biológicas do solo, sendo uma boa fixadora de nitrogênio e a manutenção da microfauna em profundidade (Barreto; Fernandes, 2001). Diante disso, o presente estudo teve por objetivo mensurar, avaliar e comparar os principais indicadores químicos de qualidade do solo nas diversas aplicações da gliricídia em sistemas adensado e consorciado.

<sup>1</sup>Graduando em Medicina Veterinária, bolsista Fapitec/Pibic, Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

<sup>2</sup>Médico Veterinário, doutor em Produção Animal, analista da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

<sup>3</sup>Graduanda em Zootecnia, bolsista CNPq/Pibic, Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

<sup>4</sup>Graduando em Medicina Veterinária, bolsista CNPq/Pibic, Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

<sup>5</sup>Graduanda em Medicina Veterinária, Aracaju, SE.

<sup>6</sup>Engenheiro-agrônomo, doutor em Agricultura Tropical, pesquisador da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

<sup>7</sup>Engenheiro-agrônomo, doutor em Zootecnia, pesquisador da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.



## Material e Métodos

O presente estudo foi realizado no estado de Sergipe com dados coletados nos municípios de Nossa Senhora da Glória (Alto Sertão Sergipano), Nossa Senhora das Dores (Médio Sertão Sergipano), Salgado (Centro Sul Sergipe), Pacatuba (Baixo São Francisco), Tobias Barreto e Simão Dias (Sertão Ocidental). Nessas localidades a implantação da gliricídia foi realizada mediante produção de mudas com transplante dessas aos 50 dias de idade (aproximadamente de 20 cm de altura). Foram avaliados os solos em sistemas de plantio consorciado (fileiras duplas de gliricídia intercaladas por alamedas de 5 m a 7 m) para produção de grãos, raízes e cactáceas; e em sistemas de plantio adensado (distância entre as plantas de 1 m x 1 m) para uso como banco de proteína exclusivamente.

As análises laboratoriais foram realizadas de acordo com os protocolos compilados em Embrapa (1998) e que fazem parte do protocolo geral de análises de solos utilizado no Laboratório de Análise de Solos da Embrapa Tabuleiros Costeiros (Figura 06), sendo analisados os seguintes parâmetros: pH em água por medição da concentração efetiva de íons  $H^+$ ; Cálcio, Magnésio e Alumínio por extração com KCl 1M; Fósforo, Potássio, Sódio e Micronutrientes por extração com solução de Mehlich1; Matéria Orgânica pelo método do bicromato de potássio.

O estudo foi realizado utilizando delineamento em blocos ao acaso e suas análises utilizando modelos mistos, sendo considerado como efeitos fixos o sistema de plantio (2 graus de liberdade) e as regiões (2 graus de liberdade), e como efeito aleatório os blocos (17 graus de liberdade) e o resíduo. Utilizou-se o procedimento PROC MIXED do Pacote Estatístico SAS (versão 9.2) e quando significativas, as médias dos indicadores químicos dos solos nos diferentes sistemas de plantio e nas diferentes regiões foram comparadas entre si utilizando a diferença mínima significativa de Tukey (i.e., a opção DIFF ADJUST do comando LSMEANS), declarando-se significância a  $P \leq 0,05$ .

## Resultados e Discussão

A tabela 1 apresenta as concentrações médias dos atributos químicos do solo Matéria Orgânica (MO), pH em água, cálcio, magnésio, hidrogênio mais alumínio (H+Al), alumínio, fósforo, potássio, sódio, nitrogênio e capacidade de troca catiônica (CTC), no tratamento testemunha e nos sistemas de plantio adensado e consorciado. Essas análises nos permitem avaliar de que forma a leguminosa possui influência sobre determinadas características químicas do solo.

**Tabela 1.** Concentrações médias dos atributos químicos do solo Matéria Orgânica (MO), pH em água, cálcio, magnésio, hidrogênio mais alumínio (H+Al), alumínio, fósforo, potássio, sódio, nitrogênio e capacidade de troca catiônica (CTC), no tratamento testemunha e nos sistemas de plantio adensado e consorciado.

Atributos químicos <sup>†</sup>	Testemunha	Adensado	Consorciado	EPM	P*
MO (g.Kg <sup>-1</sup> )	8,72 c	20,81 a	12,04 b	3,806	0,036
pH em água	5,290	5,31	5,28	0,153	0,987
Cálcio (cmol <sub>c</sub> .dm <sup>-3</sup> )	1,65 b	2,30 a	2,03 a	0,595	0,005
Magnésio (cmol <sub>c</sub> .dm <sup>-3</sup> )	1,13 c	1,53 a	1,31 b	0,387	0,005
H+Al (cmol <sub>c</sub> .dm <sup>-3</sup> )	1,60 c	2,50 a	2,34 b	0,448	0,003
Alumínio (mmol <sub>c</sub> .dm <sup>-3</sup> )	0,29	0,29	0,29	0,153	0,072
Fósforo (mg.dm <sup>-3</sup> )	9,21 b	21,890 a	21,48 a	3,022	0,046
Potássio (cmol <sub>c</sub> .dm <sup>-3</sup> )	0,19	0,23	0,21	0,073	0,002
Sódio (cmol <sub>c</sub> .dm <sup>-3</sup> )	0,08	0,09	0,08	0,026	0,004
Nitrogênio (g.Kg <sup>-1</sup> )	0,73 c	1,03 a	0,98 b	0,190	0,036
CTC (cmol <sub>c</sub> .dm <sup>-3</sup> )	4,66	6,66	5,97	1,529	0,020

\* Valores seguidos de letras minúsculas distintas na mesma linha diferem significativamente entre si a 5% de significância. (EPM = erro padrão da média; P = probabilidade).

Quanto ao parâmetro de matéria orgânica, observou-se no presente estudo diferenças significativas, onde o sistema de plantio adensado apresentou maiores concentrações médias que o sistema consorciado, que por sua vez foi significativamente superior ao testemunha. Embora todos apresentem valores que os enquadrem como “altos” em teores de matéria orgânica (>3,0%), as diferenças entre eles foi muito evidente, demonstrando claramente o efeito positivo da gliricídia para o aumento das concentrações da matéria orgânica nos solos. Diante disso, e sabendo-se que o aumento dos teores de matéria orgânica do solo geralmente relaciona-se diretamente com o aumento na eficiência de utilização dos nutrientes, os dados obtidos para esse indicador químico no presente

estudo nos remete a considerar a gliricídia como uma ferramenta para promover o aumento na produtividade das culturas consorciadas com a leguminosa.

O pH em água é um indicador tradicionalmente utilizado para qualificar a reação do solo, e no presente estudo, observou-se que embora não tenha havido diferenças significativas entre os sistemas avaliados, todos eles apresentaram valores próximos ao ideal para esse parâmetro, indicando que a inclusão da leguminosa não causou nenhuma alteração negativa à esse atributo químico.

Para os valores de cálcio no presente estudo, apenas os solos testemunha (áreas de pastagens degradadas) apresentaram valores considerados de “baixa concentração”, enquanto que as áreas de plantio adensado e consorciado apresentaram valores de “média concentração” desse elemento químico. Além disso, observou-se que não houve diferença significativa entre os tratamentos adensado e consorciado, entretanto nos solos testemunha as concentrações de cálcio foram significativamente inferiores à dos outros tratamentos. Embora o conteúdo de cálcio no solo seja em função do material de origem do mesmo (rocha), sendo influenciado pela sua textura, teor de matéria orgânica e pela remoção das culturas (Malavolta, 1976), observou-se no presente estudo que a gliricídia permitiu que essas concentrações fossem mais elevadas onde a leguminosa foi implantada, o que pode ter ocorrido devido ao seu poder de enraizamento profundo, promovendo “destorroamento e descompactação” das áreas, permitindo assim que camadas mais profundas (mais ocupadas por rochas e, conseqüentemente, mais ricas em cálcio) liberassem maiores teores de cálcio para proximidade da superfície, onde as amostras foram coletadas.

Nas análises do magnésio, obsevou-se que nos sistemas de plantio adensado, consorciado e testemunha se encontrava na classe dos “altos”, mas observando-se ainda diferenças significativas entre eles, onde o sistema de plantio adensado apresenta os maiores teores desse elemento químico, seguido pelo sistema de plantio consorciado e, por fim, e com valores significativamente inferiores aos demais, o testemunha. Assim sendo, a hipótese apresentada para os valores de cálcio se aplicam ao magnésio, pois esses apresentam o mesmo mecanismo de dispersão e disponibilidade nos solos, assim como sua derivação também é decorrente da composição das rochas que deram origem aos solos avaliados. Dessa forma, reforça-se a ação da gliricídia permitindo que concentrações mais elevadas desses minerais onde a leguminosa foi implantada, devido ao seu poder de enraizamento profundo, permitindo assim que camadas mais profundas liberassem maiores teores de magnésio para a superfície.

O fósforo no solo ocorre na forma orgânica e em centenas de formas inorgânicas, sendo que a maioria do fósforo inorgânico ocorre na fração argilosa do solo, ligado ao cálcio (PCa), ferro (PFe), alumínio (PAL) e na quase totalidade não está disponível às plantas. O fósforo disponível às plantas tende a ser facilmente fixado por argilas do solo (Malavolta, 1976). No presente estudo, apenas o testemunha apresentou-se na classe dos “médios”, enquanto que nos sistemas adensado e consorciado o Fosforo se encontra na classe dos “altos”. Além disso, observou-se que não houve diferença significativa noos tratamentos adensado e consorciado entre si, entretanto nos solos testemunha as concentrações de cálcio foram significativamente inferiores à dos outros tratamentos.

Por outro lado, ao avaliar as frequências dos teores de potássio trocável do solo, observou-se que no presente estudo os sistemas de plantio adensado e consorciado e na testemunha o potássio se encontra na classe dos “altos”, não havendo sequer diferenças significativas entre eles.

A capacidade de troca de cations constitui-se num indicador de fundamental importância para a definição de padrões de qualidade do solo, por refletir a capacidade do solo de reter cátions essenciais às plantas, de maneira que no presente estudo, observou-se que os sistemas adensado e consorciado se encontram no limiar inferior dos teores médios, enquanto que apenas a testemunha apresentou-se enquadrada como teor baixo, mas num limiate superior da classificação. Quanto às diferenças estatísticas, essas não foram observadas entre os sistemas ou testemunha, denotando que a gliricídia não exerceu influência sobre esses parâmetros nas áreas analisadas.

## Conclusão

O sistema de plantio adensado onde só contém a Gliricídia, apresentou uma melhor característica nos atributos químicos do solo seguido do sistema de plantio consorciado onde se encontra a Gliricídia e outros componentes agrônômicos, comparado a testemunha, sendo que dos indicadores da qualidade química do solo: a matéria orgânica, o cálcio, o magnésio e o fósforo, apresentam diferenças significativas que demostram isso.

Desta maneira conclui-se que a Gliricidia pode ter um importante papel nos sistemas de ILPF, aonde ela apresenta uma ótima redundância nos sistemas, pois apresenta uma estabilidade de resistência (a capacidade de se manter estável diante do estresse) e a estabilidade de elasticidade (a capacidade de se recuperar rapidamente). Além de ser protagonista de uma retroalimentação positiva onde uma parte da saída volta para o sistema ou ecossistema como entrada (na forma de serapilheira e como forragem para alimentação animal) acelerando os desvios do ecossistema sendo, naturalmente necessária para crescimento e a sobrevivência dos organismos presentes nos sistemas.

## Agradecimentos

À Fapitec/SE pela concessão da bolsa de iniciação científica e à Embrapa Tabuleiros Costeiros pelo suporte à pesquisa e aos demais colaboradores do projeto.

## Referências

- BALBINO, L. C.; BARCELLOS, A. de O.; STONE, L. F. (Ed.). **Marco referencial: integração lavoura-pecuária-floresta**. Brasília, DF: Embrapa, 2011. 130 p. il. color. Edição bilíngue: português e inglês.
- BALBINO, L. C.; CORDEIRO, L. A. M.; PORFIRIO da SILVA, W. ; MORAES, A. de; MARTINEZ, G. B.; ALVARENGA, R. C.; KICHEL, A. N.; FONTANELI, R. S.; SANTOS, H. P.; FRANCHINI, J. C.; GALERANI, P. R. Evolução tecnológica e arranjos produtivos de sistemas de integração lavoura-pecuária-floresta no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** v. 46, n. 10, p. i-xii, out. 2011.
- BARRETO, A. C.; FERNANDES, M. F.; CARVALHO FILHO, O. M. de. **Cultivo de alamedas de gliricídia (*Gliricidia sepium*) em solos de Tabuleiros Costeiros**. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2004. 4 p. il.; color. (Embrapa Tabuleiros Costeiros. Circular Técnica, 36).
- CARVALHO FILHO, O. M.; DRUMOND, M. A.; LANGUIDEY, P. H. ***Gliricidia sepium* - leguminosa promissora para regiões semi-áridas**. Petrolina: EMBRAPA- CPATSA, 1997. 16 p. il. (EMBRAPA-CPATSA. Circular técnica, 35).
- DIAS-FILHO, M. B. **Diagnóstico das pastagens no Brasil**. Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental, 2014. 36 p. (Embrapa Amazônia Oriental. Documentos, 402).
- FRANCO, A. A.; RESENDE, A. S. de; CAMPELLO, E. F. C. Importância das leguminosas arbóreas na recuperação de áreas degradadas e na sustentabilidade de sistemas agroflorestais. In: SEMINÁRIO SISTEMAS AGROFLORESTAIS E DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL, 2003, Campo Grande. **Anais...** Corumbá: Embrapa Pantanal, 2003. 24 p.
- GOMES, M. A. F.; FILIZOLA, H. F. **Indicadores físicos e químicos de qualidade de solo de interesse agrícola**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2006.
- IBGE. **Censo agropecuário 1920/2006**. Até 1996, dados extraídos de: Estatística do Século XX. Rio de Janeiro: IBGE, 2007. Disponível em: < <http://seriesestatisticas.ibge.gov.br/>>. Acesso em: 12 jul. 2013.
- IAPAR. **Amostragem de solo para análise química: plantio direto e convencional, culturas perenes, várzeas, pastagens e capineiras**. Londrina, 1996. 28 p. (IAPAR. Circular, 90).
- MALAVOLTA, E. **Manual de química agrícola: nutrição de plantas e fertilidade do solo**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1976. 528 p.
- MAPA. **Dados agropecuários: recuperação de áreas degradadas**. Disponível em: < <http://www.agricultura.gov.br/desenvolvimento-sustentavel/recuperacao-areas-degradadas> >. Acesso em: 11 jul. 2015.
- PRITCHETT, W. L. **Properties and management of forest soils**. New York: J. Wiley, 1979. 500 p.
- RANGEL, J. H. de A.; MUNIZ, E. N.; SA, C. O. de; SA, J. L. de. **Implantação e manejo de legumineira com gliricídia (*Gliricidia sepium*)**. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2011. 5 p. (Embrapa Tabuleiros Costeiros. Circular Técnica, 63).
- SILVA, F. C.; EIRA, P. A.; BARRETO, W. O.; PÉREZ, D. V.; SILVA, C. A. **Manual de métodos de análises químicas para avaliação da fertilidade do solo**. Rio de Janeiro: Embrapa-CNPS, 1998. 56 p. (Embrapa-CNPS. Documentos, 3).
- SOBRAL, L. F.; VIEGAS, P. R. A.; SIQUEIRA, O. J. W. de; ANJOS, J. L. dos; BARRETTO, M. C. de V.; GOMES, J. B. V. (Ed.). **Recomendações para o uso de corretivos e fertilizantes no estado de Sergipe**. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2007. 251 p.
- UNITED NATIONS ENVIRONMENT PROGRAMME. **Land degradation in drylands (LADA)**: GEF grant request. Nairobi, Kenya, 2004.

# Avaliação da indução de resistência em coqueiro à mosca-branca *Aleurodicus pseudugesii* Martin (Hemiptera: Aleyrodidae)

César Gonçalves dos Santos<sup>1</sup>, Jonathan David Santos das Neves<sup>2</sup>, João Gomes da Costa<sup>3</sup>, Antônio Euzébio Goulart Santana<sup>4</sup>, Elio Cesar Guzzo<sup>5</sup>

**Resumo** - A mosca-branca *Aleurodicus pseudugesii* (Hemiptera: Sternorrhyncha: Aleyrodidae: Aleurodicinae) foi recentemente registrada atacando coqueiro na maioria dos estados do Nordeste no Brasil, não havendo ainda um método que controle eficientemente a praga. Um método que pode manter a população das pragas abaixo do nível de dano é o uso de plantas resistentes. A busca por uma variedade de coqueiro cuja resistência a *A. pseudugesii* possa ser induzida por cis-jasmona, pode vir a constituir um importante método de controle. Assim, o presente trabalho teve como objetivo, avaliar a indução da resistência de variedades de coqueiro à mosca-branca *A. pseudugesii* pela cis-jasmona. Plantas das variedades anão amarelo da Malásia (AAM), anão amarelo de Gramame (AAG), anão verde do Brasil de Jiqui (AVBrJ), anão vermelho da Malásia (AVM), anão vermelho de Camarões (AVC) e anão vermelho de Gramame (AVG) foram pulverizadas com cis-jasmona ou com água destilada (testemunha). Em teste de livre escolha, folíolos de cada variedade tratados com cis-jasmona foram colocados em gaiolas com adultos da mosca-branca, avaliando-se a quantidade de adultos e de ovos presentes em cada tratamento após 24 horas. Em testes de confinamento, folíolos de cada um dos tratamentos foram colocados separadamente em gaiolas com adultos não sexados da mosca-branca. Após 24 horas, os adultos foram removidos, avaliando-se: viabilidade da fase de ovo, duração do período de incubação, viabilidade do período ninfal e fecundidade dos adultos. Os compostos voláteis emitidos pelas plantas das variedades, tratadas e não tratadas, foram coletados e utilizados em ensaios comportamentais com adultos de *A. pseudugesii*, em olfâmetro horizontal. Nos testes de livre escolha, as variedades AVBrJ e AVC apresentaram maior número de adultos/folíolo e ovos/folíolo. A variedade AVG apresentou menor número de ovos/folíolo. No entanto, não houve diferença significativa entre as variedades AAM, AVM, AAG e AVG. Não houve diferença significativa para o período de pré-oviposição, e nem alteração na duração das fases de ovo e de ninfa, para as variedades sem e com cis-jasmona. A aplicação de cis-jasmona diminuiu a fecundidade em todas as variedades. A viabilidade dos ovos de *A. pseudugesii* foi reduzida nas variedades AVC, AVM e AAM, após a aplicação de cis-jasmona. Observou-se também que, após a aplicação da cis-jasmona, os genótipos AVBrJ, AVM, AVG, AAG e AAM mostraram resistência do tipo antixenose a *A. pseudugesii*. Nos ensaios de olfâmetria, não houve diferença significativa entre a preferência dos insetos para as variedades AAM e AAG, ou para o controle. Houve diferença significativa a 1% para as variedades AVBrJ e AVC, e a 5% para a variedade AVM, em relação às testemunhas. O teste realizado com a variedade AVG mostrou diferença significativa a 1%, no entanto, com preferência dos insetos para o controle. Assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito da cis-jasmona na indução da resistência de variedades de coqueiro contra a mosca-branca *A. pseudugesii*.

**Termos para indexação:** cis-jasmona, *Cocos nucifera*, Aleurodicinae, resistência induzida.

## Introdução

O coqueiro é atacado por um complexo de moscas-brancas no Brasil (Evans, 2007; 2008); sendo que a principal espécie na região Nordeste é *Aleurodicus pseudugesii* (Hemiptera: Sternorrhyncha: Aleyrodidae: Aleurodicinae) (Ferreira et al., 2011). Esta praga ataca principalmente os folíolos do coqueiro, sendo que a sucção contínua da seiva pelos insetos retira nutrientes essenciais necessários ao seu desenvolvimento e reprodução, o que leva à redução da produtividade. Entretanto, atualmente não se dispõe de informações sobre métodos de controle eficientes, os quais são extremamente necessários. Neste sentido, destaca-se o uso de variedades resistentes, que podem manter as pragas abaixo dos níveis de dano econômico, sem causar distúrbios, poluição ambiental ou intoxicação dos operadores, sem deixar resíduos nos alimentos, sem exigir conhecimentos específicos por parte do agricultor, além de apresentar ação contínua contra os insetos sem acarretar qualquer ônus adicional e estar em consonância com a filosofia do Manejo Integrado de Pragas (Gallo et al., 2002; Vendramim; Guzzo, 2009; 2012). Segundo Vendramim e França (2005),

<sup>1</sup> Graduando em Agronomia, bolsista da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Unidade de Execução de Pesquisa de Rio Largo, Rio Largo, AL.

<sup>2</sup> Biólogo, doutor em Proteção de Plantas, bolsista da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Unidade de Execução de Pesquisa de Rio Largo, Rio Largo, AL.

<sup>3</sup> Engenheiro-agrônomo, doutor em Biotecnologia, pesquisador da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Unidade de Execução de Pesquisa de Rio Largo, Rio Largo, AL.

<sup>4</sup> Farmacêutico Bioquímico, doutor em Química, professor da Universidade Federal de Alagoas, Rio Largo, AL.

<sup>5</sup> Biólogo, doutor em Entomologia, pesquisador da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Unidade de Execução de Pesquisa de Rio Largo, Rio Largo, AL.

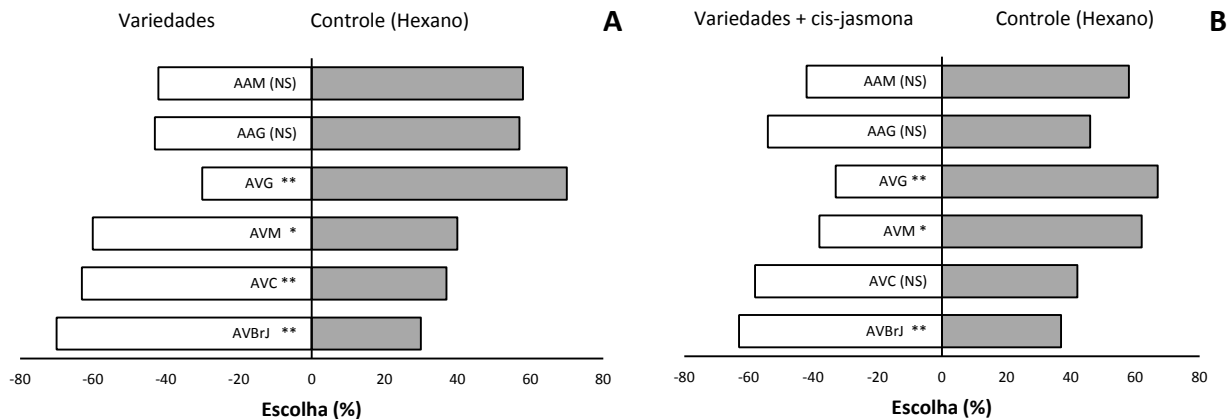
a resistência de uma planta a uma dada praga é determinada por genes constitutivos e também por genes induzíveis. Neste último caso, ela é chamada de resistência induzida. As respostas induzidas em plantas danificadas são mediadas por compostos provenientes da via octadecanoide, entre os quais estão o ácido jasmônico e o jasmonato de metila (Wasternack et al., 2006), que proveem informação sobre o estado do ataque da planta induzida. A cis-jasmona, que está associada à via octadecanoide induzida por estresse, é um composto cujo envolvimento na ativação de resistência de plantas a vários insetos já foi demonstrado (Birkett et al., 2000; Bruce et al., 2003; Costa et al., 2011). Portanto, a busca por uma variedade de coqueiro cuja resistência a *A. pseudugesii* possa ser induzida por cis-jasmona, pode vir a constituir um importante método de controle da praga.

## Material e Métodos

Os adultos da mosca-branca *A. pseudugesii* utilizados nos bioensaios de resistência induzida foram obtidos a partir de população mantida em telado, criada em coqueiro híbrido desde 2016 na Unidade de Execução de Pesquisa (UEP) da Embrapa Tabuleiros Costeiros, em Rio Largo, AL. Foram avaliadas seis variedades de coqueiro provenientes do Banco Ativo de Germoplasma (BAG) de Coqueiro da Embrapa Tabuleiros Costeiros (localizado em Itaporanga d'Ajuda, SE), integrante da Rede Internacional de Recursos Genéticos de Coco – Cogent. Utilizaram-se as variedades anão amarelo da Malásia (AAM), anão amarelo de Gramame (AAG), anão verde do Brasil de Jiqui (AVBrJ), anão vermelho da Malásia (AVM), anão vermelho de Camarões (AVC) e anão vermelho de Gramame (AVG). No campo, as plantas foram pulverizadas com emulsão de 125 µL de cis-jasmona em 0,5 L de água e 0,5 µL de Tween 20, usando-se um pulverizador manual. As plantas não tratadas (testemunha) foram pulverizadas com água destilada. Após a pulverização, realizaram-se testes de livre escolha, para avaliar a preferência para oviposição e alimentação. Folíolos de cada um dos tratamentos foram colocados em gaiolas plásticas revestidas com papel alumínio, no interior das quais se liberou 100 adultos não sexados da mosca-branca. Após 24 horas, avaliou-se a quantidade de adultos e de ovos presentes em cada tratamento. Realizaram-se também testes de confinamento, onde avaliou-se a resistência. Folíolos de cada um dos tratamentos foram colocados separadamente em gaiolas plásticas de garrafa PET com aberturas laterais tampadas com voil, no interior das quais foram liberados 20 adultos não sexados da mosca-branca. Após 24 horas, os adultos foram removidos, mantendo-se os folíolos ainda ligados à planta, até a eclosão dos ovos, para evitar a rápida deterioração do folíolo. Durante o período ninfal os folíolos eram retirados da planta e levados ao laboratório, onde permaneceram em condição ambiente ( $25 \pm 3$  °C; UR:  $70 \pm 10\%$ ). Em cada um dos tratamentos, avaliou-se: viabilidade da fase de ovo, duração do período de incubação, viabilidade do período ninfal e fecundidade dos adultos. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado com 10 repetições. O programa estatístico utilizado foi o GENES (Cruz, 2013; 2016). A fim de complementar a avaliação do efeito da cis-jasmona sobre os aspectos comportamentais de *A. pseudugesii*, os compostos voláteis emitidos pelas plantas das seis variedades, tratadas e não tratadas, foram coletados. Folíolos das plantas foram colocados dentro de sacos de polietileno, onde foi injetado ar, passando antes por um filtro de carvão ativado, a um fluxo de 400 mL/min, e coletado pelos tubos com o adsorvente (Porapak Q 80/100 mesh, 0,05 g; Supelco) localizados no topo do saco. Após 24 horas de aeração, realizou-se a dessorção, passando-se 500 µL de éter dietílico nos tubos contendo o adsorvente, sendo a solução então armazenada a -20 °C. Ensaios comportamentais com adultos de *A. pseudugesii* foram então conduzidos em olfatômetro horizontal, usando os extratos contendo os constituintes voláteis extraídos das variedades de coqueiro com e sem a aplicação da cis-jasmona. Alíquotas (10 µL) das amostras foram aplicadas a uma tira de papel filtro, e o solvente foi deixado evaporar durante 30s. Então, colocou-se o papel filtro no final do braço do lado tratado. O braço controle foi igualmente tratado com 10 µL de éter dietílico em papel de filtro. Cada experimento foi repetido 20 vezes e os resultados analisados pelo teste de qui-quadrado.

## Resultados e Discussão

Nos ensaios de olfatomia, não houve diferença significativa entre a preferência dos insetos para os compostos orgânicos voláteis das variedades AAM e AAG em relação ao controle (hexano). Para as variedades AVBrJ e AVC, houve diferença significativa pelo teste do qui-quadrado a 1% e, para a variedade AVM, houve diferença a 5% na preferência pelos voláteis, enquanto que, o teste realizado com a variedade AVG apresentou diferença significativa a 1% na preferência pelo controle (hexano) (Figura 1A). Resultados obtidos com extratos voláteis após a aplicação da cis-jasmona evidenciaram que, para as variedades AAM, AAG e AVC, não houve diferença significativa a 5% entre a escolha das variedades ou do controle. No entanto, para as variedades AVG e AVM, ocorreu diferença significativa na preferência pelo controle, indicando uma resistência do tipo antixenose para essas duas variedades. Destaca-se que AVM só revelou essa não-preferência após a aplicação da cis-jasmona. Já a variedade AVBrJ, mesmo após a aplicação da cis-jasmona, mostrou-se mais preferida pelos insetos, com diferença significativa a 1% pelo teste do qui-quadrado (Figura 1B).



**Figura 1.** Preferência de *A. pseudugesii* por voláteis de variedades de coqueiro antes (A) e após (B) a aplicação de cis-jasmona, em olfatômetro horizontal. Variedades: anão verde do Brasil de Jiqui (AVBrJ); anão vermelho de Camarões (AVC); anão vermelho da Malásia (AVM); anão vermelho de Gramame (AVG); anão amarelo de Gramame (AAG); anão amarelo da Malásia (AAM). \*\*Significativo a 1%; \*Significativo a 5%; (NS) Não significativo pelo teste qui-quadrado.

No teste de preferência com livre escolha, as variedades que apresentaram maiores médias foram a AVBrJ e AVC, não diferindo entre si pelo teste de Scott-Knott ( $p = 0,05$ ). A variedade AVG apresentou menor média com relação ao número de ovos por folíolo. Porém, não houve diferença significativa entre as variedades AAM, AVM, AAG e AVG nas variáveis número de ovos e adultos, pelo teste de Scott-Knott ( $p = 0,05$ ) (dados não apresentados). Após a aplicação da cis-jasmona, no teste de livre escolha, constatou-se que não houve diferença significativa entre as seis variedades de coqueiro AVBrJ, AVC, AVM, AVG, AAG, AAM, quanto às variáveis número de adultos e ovos por folíolo, pelo teste de Scott-Knott ( $p = 0,05$ ), verificou-se ainda que, para a duração média em dias das fases de ovo-adulto, não houve diferença significativa para as variedades de coqueiro sem e com cis-jasmona, o que ocorreu também com o período ninfal (dados não apresentados). Com relação à viabilidade da fase de ovo, houve redução significativa nas variedades AVC, AVM e AAM após a aplicação da cis-jasmona (Tabela 1). Entretanto, para a fase de ninfa não houve diferença significativa para nenhuma das variedades sem e com cis-jasmona. Também não houve diferença significativa para o período de pré-oviposição (dados não apresentados). No entanto, houve diferença significativa para a fecundidade das fêmeas emergidas das plantas tratadas com cis-jasmona, observando-se redução no número médio de ovos por fêmea em todas as variedades (Tabela 2).

**Tabela 1.** Viabilidade da fase de ovo e período ninfal de *A. pseudugesii* em seis variedades de coqueiro, sem (SCJ) e com aplicação de cis-jasmona (CCJ).

Variedade	Viabilidade (%)			
	Ovos		Ninfas	
	SCJ	CCJ	SCJ	CCJ
AVBrJ	33,35% Aa	28,20% Aa	44,70% Aa	44,76% Aa
AVC	36,20% Aa	20,67% Ab	45,50% Aa	41,50% Aa
AVM	37,00% Aa	24,00% Ab	56,92% Aa	54,00% Aa
AVG	40,60% Aa	35,29% Aa	42,81% Aa	55,26% Aa
AAG	40,81% Aa	44,00% Aa	54,07% Aa	42,85% Aa
AAM	33,33% Aa	23,34% Ab	62,40% Aa	54,73% Aa

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna, e minúscula na linha, para um mesmo parâmetro, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ( $p = 0,05$ ). Variedades anão verde do Brasil de Jiqui (AVJ); anão vermelho de Camarões (AVC); anão vermelho da Malásia (AVM); anão vermelho de Gramame (AVG); anão amarelo de Gramame (AAG); anão amarelo da Malásia (AAM).

**Tabela 2.** Fecundidade de *A. pseudugesii* em seis variedades de coqueiro, sem (SCJ) e com aplicação de cis-jasmona (CCJ).

Variedade	Fecundidade	
	SCJ	CCJ
AVBrJ	130,7 $\pm$ 6,33 Aa	106,0 $\pm$ 4,88 Ab
AVC	133,8 $\pm$ 5,69 Aa	104,0 $\pm$ 4,99 Ab
AVM	132,2 $\pm$ 4,59 Aa	103,5 $\pm$ 5,34 Ab
AVG	122,9 $\pm$ 4,87 Aa	98,5 $\pm$ 5,77 Ab
AAG	120,7 $\pm$ 4,07 Aa	103,5 $\pm$ 5,34 Ab
AAM	120,5 $\pm$ 4,48 Aa	96,5 $\pm$ 5,04 Ab

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna, e minúscula na linha, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ( $p = 0,05$ ). Variedades anão verde do Brasil de Jiqui (AVBrJ); anão vermelho de Camarões (AVC); anão vermelho da Malásia (AVM); anão vermelho de Gramame (AVG); anão amarelo de Gramame (AAG); anão amarelo da Malásia (AAM).

Para a variável fertilidade, não houve diferença significativa entre as plantas sem e com cis-jasmona (dados não apresentados). No parâmetro número médio de ovos/folículo, houve diferença significativa Scott-Knott ( $p = 0,05$ ) para as variedades AVBrJ, AVM, AVG, AAG e AAM, observando-se uma redução no número de ovos para as plantas tratadas com cis-jasmona (Tabela 3), evidenciando que a aplicação deste composto estimula uma defesa do tipo antixenose para mosca-branca *A. pseudugesii* em coqueiro.

**Tabela 3.** Média ( $\pm$  EP) de ovos/folículo de *A. pseudugesii* em seis variedades de coqueiro, sem (SCJ) e com aplicação de cis-jasmona (CCJ).

Variedade	Ovos/Folículo	
	SCJ	CCJ
<b>AVBrJ</b>	98,8 $\pm$ 6,59 Aa	39,0 $\pm$ 11,47 Ab
<b>AVC</b>	110,0 $\pm$ 4,47 A	134,2 $\pm$ 18,13 A
<b>AVM</b>	96,5 $\pm$ 7,04 Aa	23,3 $\pm$ 10,67 Ab
<b>AVG</b>	94,2 $\pm$ 4,83 Aa	27,2 $\pm$ 11,47 Ab
<b>AAG</b>	81,1 $\pm$ 7,48 Aa	25,0 $\pm$ 12,21 Ab
<b>AAM</b>	99,0 $\pm$ 5,85 Aa	40,7 $\pm$ 17,98 Ab

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna, e minúscula na linha, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ( $p = 0,05$ ). Variedades anão verde do Brasil de Jiqui (AVBrJ); anão vermelho de Camarões (AVC); anão vermelho da Malásia (AVM); anão vermelho de Gramame (AVG); anão amarelo de Gramame (AAG); anão amarelo da Malásia (AAM).

## Conclusões

A variedade AVG apresenta fontes de resistência do tipo antixenose para *A. pseudugesii*. Nas seis variedades estudadas, a aplicação de cis-jasmona induz resistência do tipo antibiose a *A. pseudugesii*. A aplicação de cis-jasmona induz resistência do tipo antixenose a *A. pseudugesii* nas variedades AVBrJ, AVM, AVG, AAG e AAM.

## Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro ao projeto; à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Alagoas (Fapal), pela concessão de bolsa de iniciação científica ao primeiro autor; e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pela concessão de bolsa de doutorado ao segundo autor.

## Referências

- BIRKETT, M. A.; COLIN, A. M.; CAMPBELL, K. C.; GUERRIERI, E. HICK, A. J.; MARTIN, J. L.; MATTHES, M.; NAPIER, J. A.; PETTERSSON, J.; PICKETT, J. A.; POPPY, G. M.; POW, E. M.; PYE, B. J.; SMART, L. E.; WADHAMS, G. H.; WADHAMS, J. L.; WOODCOCK, C. M. New roles for cis-jasmone as an insect semiochemical and in plant defense. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, p. 9329-9334, Agu. 2000.
- BRUCE, T. J. A.; PICKETT, J. A.; SMART, L. E. Cis-jasmone switches on plant defense against insects. **Pesticide Outlook**, v. 14, p. 96-98, 2003.
- EVANS, G. A. **Host plant list of the whiteflies (Aleyrodidae) of the world**, version 07-06-11, 2007. USDA.
- EVANS, G. A. **The whiteflies (Hemiptera: Aleyrodidae) of the world and their host plants and natural enemies**, version 08-23-08, 2008. USDA.
- FERREIRA, J. M. S.; LINS, P. M. P.; OMENA, R. P. M. de; LIMA, A. F. de; RACCA FILHO, F. Ocorrência da mosca branca *Aleurodicus pseudugesii* Martin (Hemiptera: Aleyrodidae), método de controle e dano causado à produção do coqueiro anão-verde. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 21., 2010, Natal. **Anais...** Natal: SBF, 2010.

FERREIRA, J. M. S.; LINS, P. M. P.; OMENA, R. P. M. de; LIMA, A. F. de; RACCA FILHO, F. **Mosca branca**: uma ameaça à produção do coqueiro no Brasil. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2011. 5 p. (Embrapa Tabuleiros Costeiros. Circular Técnica, 62).

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R. P. L.; BAPTISTA, G. C. de; BERTI FILHO, E.; PARRA, J. R. P.; ZUCCHI, R. A.; ALVES, S. B.; VENDRAMIM, J. D.; MARCHINI, L. C.; LOPES, J. R. S.; OMOTO, C. **Entomologia agrícola**. Piracicaba: FEALQ, 2002. 920 p. il. (Biblioteca de Ciências Agrárias Luiz de Queiroz, 10).

OMENA, R. P. M. de; GUZZO, E. C.; FERREIRA, J. M. S.; MENDONÇA, F. A. C. de; LIMA, A. F. de; RACCA FILHO, F.; SANTANA, A. E. G. First report on the whitefly, *Aleurodicus pseudugesii* on the coconut palm, *Cocos nucifera* in Brazil. **Journal of Insect Science**, v. 12, artg. 26, 2012.

VENDRAMIM, J. D.; GUZZO, E. C. Resistência de plantas e a bioecologia e nutrição dos insetos. In: PANIZZZI, A. R.; PARRA, J. R. P. (Ed.). **Bioecologia e nutrição dos insetos**: base para o manejo integrado de pragas. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica; Londrina: Embrapa Soja, 2009. p. 1055-1105.

WASTERNACK, C.; STENZEL, I.; HAUSE, B.; HAUSE, G.; KUTTER, C.; MAUCHER, H.; NEUMERKEL, J.; FEUSSNER, I.; MIERSCH, O. The wound response in tomato - role of jasmonic acid. **Journal of Plant Physiology**, v. 163, p. 297-306.



# Desenvolvimento de protocolo para avaliação morfológica dos espermatozoides de peixes de água doce

Jéssica Queiroz Pardo<sup>1</sup>, Alexandre Nizio Maria<sup>2</sup>, Hymerson Costa Azevedo<sup>3</sup>, Rodrigo Yudi Fujimoto<sup>4</sup>, Paulo César Falanghe Carneiro<sup>5</sup>, Natalino da Costa Sousa<sup>6</sup>, Márcia Valéria Silva do Couto<sup>7</sup>, Peterson Emmanuel Guimarães Paixão<sup>8</sup>, João Carlos Nunes de Souza<sup>9</sup>

**Resumo** - A morfologia espermática é um parâmetro que avalia a estrutura física das células identificando possíveis alterações que possam ocorrer nos espermatozoides. Alterações nessas estruturas podem afetar a funcionalidade do espermatozoide interferindo na sua capacidade de deslocamento, fecundação e geração de descendentes. O objetivo do presente estudo foi desenvolver um protocolo para avaliação morfológica dos espermatozoides de peixes de água doce, utilizando o tambaqui (*Colossoma macropomum*) como modelo. Para isso os seguintes parâmetros foram avaliados: soluções fixadoras (formol citrato, formol salina e glutaraldeído), tempo de armazenamento da amostra fixada (0, 7, 14, 21 e 30 dias), método de preparo de lâmina (esfregão e câmaras úmida) e número de espermatozoides analisados (100, 200, 400 e 800 células). Os procedimentos utilizados neste estudo são preconizados pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal para outras espécies. Sêmen de 10 machos sexualmente maduros foram avaliados inicialmente quanto a qualidade espermática, sendo selecionadas para o estudo amostras de sêmen que obtiveram mais de 80% de espermatozoides móveis. Essas amostras foram então fixadas em cada uma das soluções testadas e as células classificadas quanto às alterações morfológicas na cabeça (macrocefalia, microcefalia, cabeça degenerada e cabeça isolada) e na cauda (cauda fraturada, enrolada, degenerada e dobrada). Houve influência do tipo de fixador e do tempo de armazenamento da amostra na morfologia dos espermatozoides. As soluções fixadoras formol salina e glutaraldeído promoveram aumento nas alterações morfológicas quando comparadas ao formol citrato. Os métodos de preparo de lâminas bem como o número de células analisadas não influenciaram significativamente o resultado da avaliação da morfologia espermática. Desse modo, recomenda-se a diluição do sêmen em solução de formol citrato, o qual pode permanecer armazenado por 30 dias até a análise. A confecção da lâmina, por uma questão de praticidade, pode ser realizada por meio da técnica de esfregão e 100 células espermáticas analisadas para fins de avaliação morfológica dos espermatozoides.

**Termos para indexação:** morfologia, patologia, sêmen, peixe, solução fixadora.

## Introdução

O tambaqui (*Colossoma macropomum*) é o peixe nativo mais cultivado no país principalmente pelas suas características de rusticidade e desempenho. Dentre os manejos empregados na criação estão aqueles voltados à reprodução, que fomentam a cadeia produtiva com as formas jovens, sendo fortemente influenciados pelo desempenho das matrizes e, em especial, dos machos reprodutores.

A escolha de reprodutores férteis, atestada por meio de avaliação andrológica, deve ser considerada como importante etapa do manejo reprodutivo nas pisciculturas. A seleção de machos com boa qualidade de sêmen pode garantir um bom desempenho reprodutivo e produtivo do plantel, possibilitando ainda a aplicação de práticas biotecnológicas na conservação e disseminação de material genético. A análise morfológica tem como objetivo avaliar a integridade das estruturas espermáticas como cabeça, peça intermediária e cauda, tendo em vista a capacidade fertilizante dos espermatozoides e consequentemente a fertilidade do sêmen. Qualquer alteração em uma dessas estruturas pode afetar a funcionalidade do espermatozoide por alterar basicamente a sua capacidade de deslocamento, fecundação e de geração de alevinos viáveis. Na preparação da amostra de sêmen para a avaliação morfológica dos espermatozoides geralmente há necessidade do uso de soluções fixadoras para manter inalteradas as características espermáticas. Além disso, os esfregaços podem ser confeccionados com corantes específicos que auxiliam a visualização das estruturas espermáticas que são translúcidas (Arruda et al., 2011; Streit-Jr et al., 2004) e de dimensão reduzida. A morfologia espermática é um parâmetro que avalia a estrutura física dos espermatozoides identificando as distintas alterações morfológicas que possam estar presentes na célula espermática, com o objetivo avaliar a integridade das estruturas espermáticas como cabeça, peça intermediária e cauda, tendo em vista a capacidade fertilizante dos espermatozoides e consequentemente a fertilidade do sêmen. As

<sup>1</sup>Grahuanda em Medicina Veterinária, bolsista da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

<sup>2</sup>Zootecnista, doutor em Zootecnia, pesquisador da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

<sup>3</sup>Médico Veterinário, doutor em Reprodução Animal, pesquisador da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

<sup>4</sup>Zootecnista, doutor em Aquicultura, pesquisador da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

<sup>5</sup>Engenheiro-agrônomo, doutor em Zootecnia, pesquisador da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

<sup>6</sup>Engenheiro de pesca, bolsista Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

<sup>7</sup>Engenheira de pesca, bolsista Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

<sup>8</sup>Engenheiro de pesca, bolsista Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

<sup>9</sup>Grahuanda em Medicina Veterinária, bolsista da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

alterações na morfologia dos espermatozoides podem ser reflexos do estágio fisiológico, sanitário ou nutricional dos animais, além de efeitos do ambiente. Algumas dessas alterações podem ocorrer no processo de espermatogênese devido à má nutrição, ocorrência de enfermidades e estresse do reprodutor, sendo classificadas como alterações primárias. Já as alterações tidas como secundárias têm sua origem na manipulação do sêmen no momento da coleta, como por exemplo a excessiva pressão exercida sobre a cavidade celomática durante a coleta de sêmen de peixes (Maria et al., 2012). Outras alterações secundárias podem ter origem no preparo das lâminas quando da realização do esfregaço ou da câmara úmida (Miliorini et al., 2011), ou de artefatos da técnica pela incompatibilidade da solução fixadora com as características intrínsecas de uma determinada amostra de sêmen. A análise morfológica dos espermatozoides pode, juntamente com outras avaliações, prever o desempenho reprodutivo do macho no manejo da piscicultura e aumentar a efetividade da aplicação de biotecnologias da reprodução como a criopreservação do sêmen. Entretanto, a maioria das metodologias e práticas utilizadas para avaliação andrológica é baseada em procedimentos desenvolvidos para mamíferos sem a devida validação para peixes.

O desenvolvimento e padronização de um método de avaliação andrológica específico para peixes poderá aumentar a eficiência na seleção de espécimes destinados à formação de plantéis de reprodutores e como doadores de germoplasma para formação de bancos de sêmen para fins de conservação e disseminação de material genético em programas de melhoramento. Assim o presente estudo teve como objetivo desenvolver um protocolo para avaliação morfológica dos espermatozoides de peixes de água doce, utilizando o tambaqui (*Colossoma macropomum*) como modelo, por meio da avaliação de soluções fixadoras, tempo de armazenamento da amostra fixada, método de preparo de lâmina e número de espermatozoides analisados.

## Material e Métodos

O experimento foi realizado na Piscicultura Santa Clara, situada no município de Propriá, Sergipe e no Laboratório de Biotecnologia da Reprodução Animal da Embrapa Tabuleiros Costeiros, localizado em Aracaju, Sergipe.

Para realização dos experimentos 10 machos sexualmente maduros foram selecionados para indução hormonal e posterior coleta do sêmen, segundo metodologia descrita por Maria et al. (2012). Após a coleta, o sêmen de cada animal foi inicialmente avaliado quanto à qualidade por meio da análise da motilidade espermática, sendo selecionadas para compor as parcelas experimentais as amostras que apresentaram motilidade superior a 80%.

O primeiro experimento teve como objetivo avaliar o efeito das soluções fixadoras e do tempo de armazenamento da amostra fixada sobre a morfologia espermática. Para isso, alíquotas de sêmen (n=10 peixes) foram diluídas em soluções fixadoras de formol-citrato, formol-salino e glutaraldeído 0,2% na proporção 1:99 (sêmen:solução). As amostras foram mantidas em temperatura ambiente por 30 dias e avaliadas semanalmente (0, 7, 14, 21 e 30 dias) após realização de esfregaços em lâmina. Os esfregaços foram realizados em uma lâmina por meio da adição de uma gota de sêmen fixado e uma gota do corante rosa bengala (Streit-Jr, et al., 2004) na proporção 1:30 (sêmen fixado:corante). Após a secagem, as lâminas foram visualizadas em microscópio óptico (1000x), sendo analisadas 200 células na avaliação da morfologia espermática em diversos campos da lâmina, percorrida em zigue-zague.

As alterações morfológicas foram classificadas segundo Maria et al. (2010): a) alterações na cabeça: macrocefalia, microcefalia, cabeça degenerada e cabeça isolada; b) alterações na cauda: cauda fraturada, cauda enrolada, cauda degenerada e cauda dobrada. A peça intermediária não foi avaliada neste estudo devido à baixíssima incidência de alterações morfológicas observada nessa região.

O segundo experimento teve como objetivo avaliar duas metodologias de preparo de lâmina para análise morfológica: a) esfregaço para visualização em microscópio de luz, conforme descrita acima e; b) câmara úmida para visualização em microscópio de luz com contraste de fase. Na câmara úmida, uma alíquota do sêmen fixado foi colocada sobre uma lâmina e posteriormente coberta com lamínula e levada ao microscópio para análise. O sêmen (n=10 peixes) foi fixado na melhor solução determinada no primeiro experimento sendo analisadas 200 células por lâmina.

O terceiro experimento teve como objetivo avaliar se o número de células espermáticas analisadas tem influência no resultado da análise morfológica. Para isso o sêmen (n=10 peixes) foi fixado na melhor solução do primeiro experimento. Uma amostra foi adicionada em uma lâmina com corante rosa bengala onde foi realizado o esfregaço. Foram analisadas 100, 200, 400 e 800 células espermáticas em cada lâmina conforme metodologia descrita acima.

Os dados foram submetidos ao teste de normalidade (Shapiro-Wilk) e posteriormente submetidos a análise de variância. As médias foram comparadas pelo teste de Skott-Knott ( $p < 0,05$ ).

## Resultados e Discussão

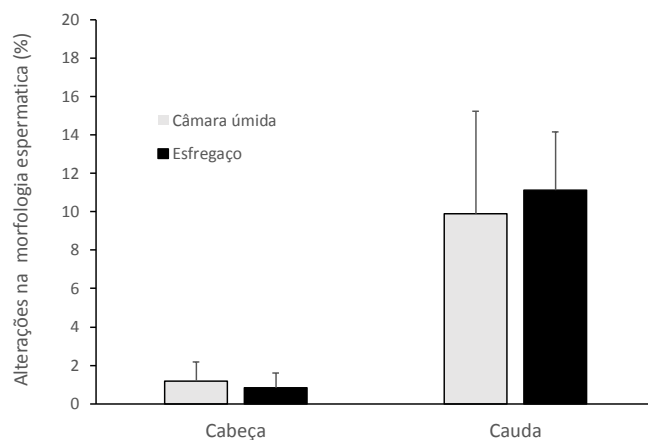
Houve influência do tipo de fixador e do tempo de armazenamento da amostra na morfologia dos espermatozoides. As soluções formol salina e glutaraldeído 0,2% promoveram aumento nas alterações morfológicas dos espermatozoides em relação ao formol citrato (Tabela 1). Após uma semana de armazenamento, as amostras fixadas em glutaraldeído 0,2% apresentaram aumento significativo nas alterações morfológicas da cauda dos espermatozoides. Além disso, a interação entre o corante e o fixador causou uma intensa sujidade nas lâminas, dificultando a análise. Essas sujidades, no entanto, não foram observadas nas amostras fixadas nas soluções que continham formol em sua composição. Estes fixadores proporcionaram melhor distribuição das células espermáticas na lâmina após o esfregão, tornando a amostra mais homogênea e livre de aglutinação. Soluções fixadoras contendo formol em sua constituição têm sido empregadas na rotina de muitos laboratórios, devido sua eficiência (Salviano et al., 2011), no entanto, existem reações espécie-específicas entre fixadores e corantes (Harasymowycz et al., 1976) que devem ser avaliadas para fins de padronização da análise de sêmen. Ao contrário do observado no presente estudo, Streit-Jr et al. (2004), recomendam a utilização da solução formol salina juntamente com o corante rosa bengala na análise morfológica dos espermatozoides de pacu (*Piaractus mesopotamicus*). No presente estudo esta combinação promoveu aumento nas alterações morfológicas na cabeça e na cauda dos espermatozoides imediatamente após a adição do sêmen à solução, permanecendo durante todo período avaliado.

**Tabela 1.** Alterações morfológicas (%; média±desvio-padrão) na cabeça e cauda dos espermatozoides fixados em formol citrato, formol salina e glutaraldeído e avaliados semanalmente durante 30 dias.

Alterações Morfológicas (%)	Solução fixadora	Tempo de Avaliação (dias)				
		0	7	14	21	30
<b>Cabeça</b>	F. Citrato	1,0±1,0aA	1,1±1,1 aA	0,7±0,4aA	1,8±1,7 aA	1,2±1,4 aA
	F. Salina	1,7±1,4 bA	1,8±2,0 bA	2,9±2,5 bA	2,5±1,7 bA	1,6±1,4 bA
	Glutaraldeído	1,6±1,3 bA	1,7±1,6 bA	1,8±1,5 bA	2,0±1,6 bA	2,8±4,0 bA
<b>Cauda</b>	F. Citrato	10,7±4,8aA	12,3±6,0aA	10,8±5,4aA	10,4±4aA	9,8±3,9aA
	F. Salina	15,2±5,7bA	16,1±6,4bA	16,4±6,8bA	18,2±7,5bA	15,6±5,0bA
	Glutaraldeído	12,1±5,2aA	22,1±8,9bB	19,6±7,1bB	22±9,9bB	22,8±14,7bB

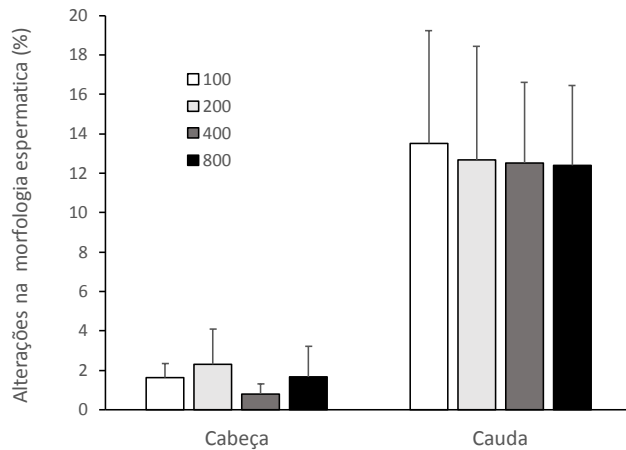
<sup>aA</sup> Médias seguidas por letras distintas minúsculas na coluna e maiúsculas na linha diferem entre si pelo teste de Skott-Knott ( $p < 0,05$ ).

Os métodos de preparo de lâminas não influenciaram significativamente ( $p > 0,05$ ) o resultado da avaliação da morfologia espermática (Figura 1). Desse modo, recomenda-se a preparação de lâmina com a técnica de esfregão, pois necessita apenas de um microscópio de luz para visualização das células coradas. A câmara úmida por outro lado necessita a utilização do microscópio de luz com contraste de fase, que é um equipamento de custo mais elevado. Os dois métodos permitem uma boa visualização do contorno e divisões da célula espermática, permitindo identificar alterações na morfologia de forma simples e prática.



**Figura 1.** Porcentagem de alterações na morfologia da cabeça e cauda dos espermatozoides de acordo com o método de preparo de lâmina (câmara úmida e esfregão).

No presente estudo foi observado que o número de células analisadas não influenciou significativamente o resultado da avaliação da morfologia espermática (Figura 2), sendo indicado por questões práticas a avaliação de 100 células.



**Figura 2.** Porcentagem de alterações na morfologia da cabeça e cauda dos espermatozoides de acordo com o número de células avaliadas (100, 200, 400 e 800 células).

## Conclusões

Concluimos que o sêmen deve ser fixado em solução de formol citrato, o qual pode permanecer armazenado por 30 dias até a análise. A confecção da lâmina, por uma questão de custo e praticidade, pode ser realizada por meio da técnica de esfregaço e 100 células espermáticas analisadas para fins de avaliação da morfologia dos espermatozoides.

## Referências

- ARRUDA, R. P. de.; CELEGHINI, E. C. C.; ALONSO, M. A.; CARVALHO, H. F.; OLIVEIRA, L. Z.; NASCIMENTO, J.; SILVA, D. F.; AFFONSO, F. J.; LEMES, K. M.; JAIMES, J. D. Métodos de avaliação da morfologia e função espermática: momento atual e desafios futuros. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 35, n. 2, p. 145-151, 2011.
- HARASYMOWYCZ, J.; BALL, L.; SEIDEL, E. Evaluation of bovine spermatozoal morphological features after staining or fixation. **American Journal of Veterinary Research**, v. 37, p. 1053-1057, 1976.
- MARIA, A. N.; AZEVEDO, H. C.; SANTOS, J. P.; CARNEIRO, P. C. F. Hormonal induction and semen characteristics of tambaqui *Colossoma macropomum*. **Zygote**, v. 20, n. 1, p. 39-43, 2012.
- MARIA, A. N.; AZEVEDO, H. C.; SANTOS, J. P.; SILVA, C. A.; CARNEIRO, P. C. F. Semen characterization and sperm structure of the Amazon tambaqui *Colossoma macropomum*. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 26, p. 779-783, 2010.
- MILIORINI, A. B.; MURGAS, L. D. S.; ROSA, P. V.; OBERLENDER, G.; PEREIRA, G. J. M.; DACOSTA, D. V. A morphological classification proposal for curimba (*Prochilodus lineatus*) sperm damages after cryopreservation. **Aquaculture Research**, v. 42, p. 177-187, 2011.
- SALVIANO, M. B.; SOUZA, J. A. T.; VIDIGAL, K. F. Efeitos da fixação do sêmen pós-teste hiposmótico para avaliação da membrana espermática de caprinos. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v. 9, n. 16, 2011.
- STREIT JÚNIOR, D. P.; MORAES, G. V.; RIBEIRO, R. P.; POVH, J. A.; SOUZA, E. D.; OLIVEIRA, C. A. L. Avaliação de diferentes técnicas para coloração de sêmen de peixes. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia**, v. 7, p. 157-162, 2004.

# Avaliação de extratos vegetais no manejo da queima-das-folhas-do-inhame

Everton Sebastião do Nascimento<sup>1</sup>, Marissônia de Araujo Noronha<sup>2</sup>, André Felipe Câmara Amaral<sup>3</sup>

**Resumo** - A queima-das-folhas do inhame é a principal doença da cultura, cujo agente causal é o fungo *Curvularia eragrostidis*. Na busca por medidas de controle que sejam capazes de reduzir a doença sem causar impactos ambientais, este trabalho teve como objetivo avaliar a eficiência de extratos vegetais no manejo alternativo da queima-das-folhas do inhame. Foram realizados quatro ensaios com os extratos de graviola, mulungu, pinha e velame, onde se variou o modo de preparo, concentrações e diluições dos mesmos. Os extratos foram adicionados ao meio de cultura BDA, o qual foi vertido em placas de Petri que receberam um disco contendo crescimento de *C. eragrostidis*. A testemunha consistiu no crescimento do fungo em placas contendo apenas o meio de cultura. O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado, em arranjo fatorial, com quatro repetições, representada por uma placa de Petri. As avaliações do crescimento micelial e da esporulação de *C. eragrostidis* foram realizadas, respectivamente, diariamente até o oitavo dia e após 15 dias. Apenas os extratos de velame nas concentrações de 50% e 100% e diluição de 1 ml reduziram significativamente ( $P \leq 0,05$ ) o crescimento micelial e a esporulação de *C. eragrostidis*. A realização de mais estudos que validem este resultado, assim como a avaliação da eficiência de outros extratos vegetais se faz necessária.

**Termos para indexação:** *Curvularia eragrostidis*, *Dioscorea cayenensis*, manejo alternativo.

## Introdução

O inhame (*Dioscorea cayenensis* Lam.) é a espécie que predomina nas áreas de cultivo desta olerícola na região Nordeste (Santos; Macêdo, 2002). Nesta região os cultivados são realizados em unidades de produção familiar, que geram emprego e renda, sendo os estados da Paraíba, Pernambuco, Bahia, Alagoas, Sergipe e Maranhão, os principais produtores (Brito et al., 2011).

Apesar da importância que o inhame representa para o Nordeste, tem ocorrido uma acentuada redução da área plantada, de aproximadamente 40%, acompanhado de redução de 23% a 56% na produção (Oliveira et al., 2012). Estima-se que nas áreas produtoras de inhame a produtividade média da cultura é considerada baixa, cerca de 10.647 kg/ha (Santos; Macêdo, 2002). Dentre os fatores responsáveis por esta baixa produtividade, está a elevada intensidade de doenças, com destaque para a queima-das-folhas-do-inhame, também denominada de pinta-preta cujo agente etiológico é o fungo *Curvularia eragrostidis* (Henn.) Meyer [teleomorfo *Cochliobolus eragrostidis* Tsuda & Ueyama] (Michereff; Noronha; Maffia, 2008).

Os sintomas de queima-das-folhas-do-inhame podem ocorrer nos ramos, pecíolos e folhas da planta, onde se observam manchas foliares necróticas, com formato tendendo para circular, de coloração marrom-escuro, com centro claro e, frequentemente circundadas por um halo amarelo. A coalescência dessas manchas foliares induz a formação de grandes áreas necrosadas, e consequentemente, a presença de folhas retorcidas, que caem facilmente. Quando a severidade da doença é alta no início do ciclo vegetativo, pode levar a intensa desfolha da planta de inhame, o que compromete o desenvolvimento das tubéras comerciais e tubéras sementes (Moura, 2005).

Considerando que a produção de inhame na região Nordeste se caracteriza por pequenas áreas de cultivo, com utilização de mão de obra familiar e baixa adoção de insumos agrícolas, o manejo ecológico da queima das folhas, representa uma ferramenta que pode ser adotada visando uma redução dos danos causados por esta doença.

Resultados promissores têm sido obtidos por meio de estudos in vitro e in vivo com relação à eficácia de produtos alternativos, como os extratos de alho (*Allium sativum* L.), de citronela (*Cymbopogon nardus* (D.C.) Stapf), gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe), nim (*Azadirachta indica* A. Juss.) e de folhas de juazeiro (*Ziziphus joazeiro* Mart.) (Almeida et al., 2013; Brito; Nascimento, 2015; Santos; Carvalho; Lacerda, 2008). Contudo, a pesquisa por substâncias com ação fungicida oriundas de produtos naturais se constitui numa estratégia que deve ser ininterruptamente considerada, desenvolvida e aprimorada (Carvalho et al., 2002).

Na busca por novas comprovações científicas quanto a alternativas de controle ecologicamente viáveis, este trabalho teve como objetivo a avaliar o efeito de extratos vegetais no manejo alternativo da queima das folhas do inhame.

<sup>1</sup>Graduando em Agronomia, bolsista da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Unidade de Execução de Pesquisas de Rio Largo (UEP-Rio Largo), Rio Largo, AL.

<sup>2</sup>Engenheira-agrônoma, doutora em Fitopatologia, pesquisadora da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Unidade de Execução de Pesquisas de Rio Largo (UEP-Rio Largo), Rio Largo, AL.

<sup>3</sup>Químico, mestre em Química Orgânica Analista da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Unidade de Execução de Pesquisas de Rio Largo (UEP-Rio Largo), Rio Largo, AL.

## Material e Métodos

### 1. Obtenção dos materiais vegetais e do fungo *Curvularia eragrostidis*

Os ensaios foram conduzidos no Laboratório de Fitopatologia da Unidade de Execução de Pesquisa da Embrapa Tabuleiros Costeiros, em Rio Largo, AL. As folhas de velame (*Croton* sp.) e mulungu (*Erythrina* sp.) foram coletadas no município de Paulo Jacinto (S 09°20.697'; O 36°21.486') e as de gravioleira (*Annona muricata* L.) e pinheira (*A. squamosa* L.) em Rio Largo (S09°20.697'; O36°21.486'), estado de Alagoas.

O isolado de *C. eragrostidis* utilizado nos ensaios foi obtido a partir de folhas de inhame com sintomas de queima-das-folhas, sendo a coleta realizada no município de Taquarana (S09°39.589'; O36°27.337'), AL.

### 2. Avaliação da eficiência de extratos de vegetais na inibição do crescimento micelial e esporulação de *Curvularia eragrostidis*

#### 2.1. Ensaio I - Obtenção do extrato de velame por métodos de esterilização

Folhas de velame foram previamente secas em estufa de circulação forçada de ar (60 °C) e trituradas em liquidificador. No preparo dos extratos adotou-se a proporção de 100 g de material vegetal e 1000 mL de água destilada esterilizada (ADE), sendo inicialmente preparado um chá por infusão das folhas trituradas em ADE por 24 horas. Após esse período o chá e um extrato, imediatamente preparado, foram filtrados em papel Whatman nº 01 com o auxílio de uma bomba de sucção. Parte dos extratos feitos a partir do chá e da filtragem imediata (EFI), assim como folhas de velame trituradas foram autoclavados por 5 min. a 120 °C. Outra parte do extrato (EFI) foi submetida ao banho-maria nas temperaturas de 60 °C e 80 °C por 30 min. Um tratamento obtido do extrato de chá não foi exposto a processos de esterilização. Com as folhas de velame esterilizadas elaborou-se outro extrato pela adição de ADE.

Para realização do ensaio foram preparadas quatro concentrações dos tratamentos (25%, 50%, 75% e 100%), sendo adicionado ao meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA) fundente ( $\pm 45$  °C) 0,5 ml de cada concentração, que após homogeneizado foi vertido em placas de Petri. No centro de cada placa foi colocado um disco (4mm) contendo crescimento de *C. eragrostidis*. A testemunha consistiu da presença do fungo em placas contendo apenas o meio BDA. Os tratamentos foram mantidos em incubadora tipo BOD sob temperatura de 27 °C com fotoperíodo de 12 horas, durante 15 dias. As avaliações do crescimento micelial foram realizadas a cada 24h até o oitavo dia pela mensuração do diâmetro das colônias em dois sentidos opostos, com o auxílio de uma régua milimetrada.

#### 2.2. Ensaios II, III e IV - Obtenção dos extratos de gravioleira, mulungu, pinheira e velame com esterilização por membrana

Visando excluir o efeito de uma possível termosensibilidade dos compostos bioativos, foram elaborados extratos aquosos de folhas frescas de velame e mulungu na proporção de 1:3, sendo a filtragem realizada conforme o item 2.1. Extratos orgânicos foram obtidos de folhas de velame secas e trituradas, onde adicionou-se os solventes acetona, etanol e hexano na proporção de 1:10, os quais permaneceram sob agitação por 72 h, seguido de filtração e evaporação dos solventes em capela de exaustão.

Após a obtenção dos extratos aquosos diluídos na concentração de 50% e 100% e orgânicos a 100%, procedeu-se a esterilização de 1 ml de cada tratamento em milipore (0, 20  $\mu$ m), o qual foi adicionado ao meio de cultura BDA fundente. Os demais procedimentos incluindo as avaliações foram semelhantes ao descrito no item 2.1

No terceiro ensaio foram elaborados extratos aquosos na proporção de 1:3 de folhas frescas de gravioleira e velame e de 1:7 para pinheira, sendo a filtragem realizada conforme descrito anteriormente. Os extratos foram utilizados na concentração de 100%, procedendo-se a esterilização das diluições de 2,5 mL e 5 mL dos tratamentos de gravioleira e velame em milipore, não sendo possível esterilizar o extrato de pinheira devido as suas características físico-químicas.

Com o objetivo de validar os resultados obtidos no item 3.2.2 se avaliou os extratos de velame nas concentrações de 50% e 100%, realizando-se por meio do milipore a esterilização das diluições de 1 mL e 2,5 mL. O extrato de pinheira foi elaborado na proporção de 1:5 a 100%, com filtragem em membrana de 0,50  $\mu$ m. Nos ensaios III e IV, após os extratos serem adicionados ao meio de cultura BDA fundente, seguiu-se os mesmos procedimentos efetuados no item 2.1. Embora tenha sido estimada a produção de esporos em ambos os ensaios, não foi possível efetuar a análise dos dados, pois a testemunha apresentou baixa esporulação.

A produção de conídios em cada tratamento foi estimada após 15 dias de incubação do fungo, por meio de uma suspensão preparada pela deposição de 10 mL de ADE em cada placa de Petri e filtragem em dupla camada de gaze esterilizada. A estimativa concentração de conídios de *C. eragrostidis* foi realizada em microscópio óptico com o auxílio da câmara de Neubauer, sendo realizadas três leituras por repetição.

Em todos os ensaios o delineamento utilizado foi inteiramente casualizado em arranjo fatorial (concentrações x diluições x extratos), com quatro repetições, representada por uma placa de Petri. A porcentagem de inibição do crescimento micelial (PIC) foi obtida por meio da fórmula:  $PIC = [(diâmetro da testemunha - diâmetro do tratamento)/diâmetro da testemunha] \times 100$ , para cada extrato em relação à testemunha. Os dados de cada ensaio foram submetidos à análise de variância e para o caso de diferenças significativas entre os tratamentos aplicou-se o teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ). As análises foram efetuadas com o auxílio do programa SISVAR, versão 5.6 (Ferreira, 2011).

## Resultados e Discussão

Os extratos de velame elaborados no primeiro ensaio não foram capazes de inibir o crescimento do fungo *C. eragrostidis* e/ou apresentaram contaminações nas placas de Petri que impediram de efetuar avaliações. Esta última situação também ocorreu em tratamentos dos outros ensaios.

De acordo com a análise de variância realizada para os ensaios II, III e IV, constataram-se diferenças significativas ( $P \geq 0,01$ ) para o efeito dos extratos de vegetais na inibição do crescimento micelial e esporulação de *C. eragrostidis*. Entre os extratos de velame utilizados, os aquosos nas concentrações de 50% e 100% apresentaram a maior inibição do crescimento micelial com 15,63% e 12,33% e menor esporulação, com 8,72 e 4,42 x 10<sup>5</sup> conídios/ml, respectivamente, não havendo diferenças estatísticas ( $P \leq 0,05$ ) entre eles. Não houve efeito dos extratos orgânicos no desenvolvimento vegetativo de *C. eragrostidis* (Tabela 1).

A tabela 2 apresenta os resultados obtidos nos ensaios III e IV, onde se verifica que apenas o extrato de velame na concentração de 100% e diluição de 1 ml foi capaz de inibir o crescimento micelial do patógeno, diferindo significativamente dos demais tratamentos e validando o resultado observado no ensaio II. Embora o efeito no desenvolvimento vegetativo do fungo tenha sido pequeno nos dois ensaios, o extrato de velame foi capaz de reduzir em 90,66% a esporulação de *C. eragrostidis*, quando comparado com a testemunha (Tabelas 1 e 2), interferindo assim na sua fase reprodutiva.

O efeito de extratos de velame com ação sobre patógenos de plantas não foram encontrados na literatura pesquisada. Matias et al. (2010) destaca que extratos metanólicos e hexânicos de velame-do-campo (*C. campestris* A.) demonstraram ser uma promissora fonte de pesquisa na área de produtos naturais com ação antibacteriana. Um estudo in vitro sugere a eficiência do extrato de *C. campestris* na modulação da resistência microbiana a eritromicina. O autor inferiu que o extrato poderia facilitar a entrada do antibiótico na célula bacteriana, inibindo a ação de enzimas que o inativem ou bloqueando mecanismos que expulsem o fármaco do interior da célula (Barbosa, 2014).

**Tabela 1.** Efeito de extratos de folhas de velame na inibição do crescimento micelial e esporulação de *Curvularia eragrostidis*.

Extratos	Inibição do crescimento micelial (%)	Esporulação (x10 <sup>5</sup> con/ml)
Velame 50%	15,63 a <sup>(1)</sup>	8,72 a <sup>(2)</sup>
Velame 100%	12,33 a	4,42 a
Velame hexano	1,48 b	39,81 b
Velame acetona	1,48 b	54,50 b
Velame etanol	1,15 b	51,95 b
Testemunha	0,00 b	47,33 b
CV(%)	32,48	24,37

<sup>(1)</sup>Médias originais de quatro repetições. Os dados foram transformados em  $\sqrt{x + 1}$  para realização da análise de variância. As médias seguidas pela mesma letra na vertical não diferem entre si (Tukey, 5%).

<sup>(2)</sup>Médias originais de três repetições. As médias seguidas pela mesma letra na vertical não diferem entre si (Tukey, 5%).

**Tabela 2.** Efeito de extratos de folhas velame e graviroleira na inibição do crescimento micelial de *Curvularia eragrostidis*.

Extratos	Inibição do crescimento micelial (%)
Velame 100% (1,0) <sup>(2)</sup>	8,39 a <sup>(1)</sup>
Velame 50% (1,0)	2,47 b
Velame 100% (2,5)	2,37 b
Graviola (2,5)	1,15 b
Graviola (5,0)	0,98 b
Velame 100% 2,5	0,00 b
Testemunha	0,00 b
CV(%)	36,35

<sup>(1)</sup>Médias originais de quatro repetições. Os dados foram transformados em  $\sqrt{x + 1}$  para realização da análise de variância. As médias seguidas pela mesma letra na vertical não diferem entre si (Tukey, 5%).

<sup>(2)</sup>Números entre parênteses correspondem as diluições em ml das concentrações dos extratos no meio de cultura.

Com relação à eficiência de extratos vegetais sobre *C. eragrostidis*, resultados preliminares, in vitro, utilizando extratos de alho, capim citronela, gengibre e nim na concentração de 25% mostraram efeito fitotóxico sobre o patógeno (Brito; Nascimento, 2015).

Os resultados apresentados neste trabalho mostram que a escolha do método de obtenção do extrato pode interferir na sua eficácia. Leme et al. (2007) verificaram que a forma de esterilização e o tempo de armazenamento do extrato de capim-limão interferiram na atividade do mesmo em relação ao desenvolvimento micelial de *Colletotrichum acutatum*. Portanto, é importante a realização de mais ensaios que possam aferir o potencial de outros extratos vegetais e métodos de extração.

## Conclusões

O extrato de velame na concentração de 100% e diluição de 1 ml reduziu o crescimento micelial e a esporulação de *C. eragrostidis*. Contudo, mais estudos se fazem necessários, uma vez que a eficiência do extrato só ficou mais evidente na fase de reprodução do fungo.

## Referências

- ALMEIDA, D. O. C.; SOUZA, J. T.; MOREIRA, R. F. C. Uso de extratos vegetais na proteção de plantas de inhame contra *Curvularia eragrostidis* e *Phyllosticta* sp. **Agrotropica**, v. 25, n. 3, p. 187-198, 2013.
- BARBOSA, A. S. **Atividade moduladora de extratos de plantas medicinais sobre a resistência de cepas de Staphylococcus aureus à eritromicina**. 2014. 19 f. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Farmácia)-Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, João Pessoa, 2014.
- BRITO, N. M.; NASCIMENTO, L. C. Potencial fungitóxico de extratos vegetais sobre *Curvularia eragrostidis* (P. Henn.) Meyer in vitro. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 17, n. 2, p. 230-238, 2015.
- BRITO, T. T.; SOARES, L. S.; FURTADO, M. C.; CASTRO, A. A.; CARNELOSSI, M. A. G. Composição centesimal de inhame (*Dioscorea* sp.) in natura e minimamente processado, **Scientia Plena**, v. 7, n. 6, p. 1-7, 2011.
- CARVALHO, R. A.; LACERDA, J. T.; OLIVEIRA, E. F.; SANTOS, S. S. Extratos de plantas medicinais como estratégia para o controle de doenças fúngicas do inhame (*Dioscorea* sp.) no Nordeste. SIMPÓSIO NACIONAL SOBRE AS CULTURAS DO INHAME E DO TARO, 2., 2002, João Pessoa. **Anais...** João Pessoa: EMEPA, 2002.
- FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, p. 1039-1042, 2011.
- LEME, M. I. S.; CAMARGO, M.; FURLANI, A. C. F. A.; PANIZZI, R. C.; LEITE, R. F.; ROSA, J. Efeito in vitro de capim-limão no desenvolvimento micelial de *Colletotrichum acutatum*. **Summa Phytopathologica**, v. 33, p. 92, 2007. Suplemento.
- MATIAS, E. F.; SANTOS, K. K. A.; ALMEIDA, T. S.; COSTA, J. G. M.; COUTINHO, H. D. M. Atividade antibacteriana in vitro de *Croton campestris* A., *Ocimum gratissimum* L. e *Cordia verbenacea* DC. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 8, n. 3, p. 294-298, 2010.
- MICHEREFF, S. J.; NORONHA, M. A.; MAFFIA, L. A. Sample size for assessment of yam leaf blight severity. **Summa Phytopathologica**, v. 34, n. 2, p. 189-191, 2008.
- MOURA, R. M. Doenças do Inhame-da-Costa. In: AMORIM et al. Manual de Fitopatologia / Doenças das Plantas Cultivadas. 5 ed. Ouro Fino - MG: **Agronômica Ceres**, v. 2, p. 477 – 483, 2016.
- OLIVEIRA, A. P.; SILVA, D. F.; SILVA, J. A.; OLIVEIRA, A. N. P.; SANTOS, R. R.; SILVA, N. V.; OLIVEIRA, F. J. M. Tecnologia alternativa para produção de túberas-semente de inhame e seus reflexos na produtividade. **Horticultura Brasileira**, v. 30, n. 3, p. 553- 556, 2012.
- SANTOS, E. S.; CARVALHO, R. A.; LACERDA, J.T.; Alternativas naturais e ecológicas no controle de doenças fúngicas do inhame (*Dioscorea* spp.). **Tecnologia & Ciência Agropecuária**, v. 2, n. 2, p. 1-6, 2008.
- SANTOS, E. S.; MACÊDO, L. S. Tendências e perspectiva da cultura do inhame (*Dioscorea* sp.) no nordeste do Brasil. In: SIMPÓSIO NACIONAL SOBRE AS CULTURAS DE INHAME E TARO, 2., 2002, João Pessoa. **Anais...** João Pessoa: EMEPA-PB.2002.



# A hidrólise alcalina como acelerador da degradação da casca de coco seco

Manoel Ferreira de Amorim Neto<sup>1</sup>, Saniel Carlos dos Santos<sup>2</sup>, André Felipe Câmara Amaral<sup>3</sup>,  
Fabiano da Silva Brito<sup>4</sup>, Tâmara Cláudia de Araújo Gomes<sup>5</sup>

**Resumo** - A cocoicultura é uma das principais atividades socioeconômicas da região Nordeste. Para fins não agrícolas, apenas parte das cascas geradas pelo beneficiamento da polpa do coco maduro é aproveitada e o excedente resulta em grandes problemas ambientais, causados por volumes significativos de resíduos. Nesse sentido, a reciclagem de resíduos orgânicos por meio da compostagem, constitui em uma alternativa importante para a utilização das cascas de coco na propriedade agrícola. Sua lenta degradação, resultante de sua alta relação C/N e alto teor de lignina, dificulta, no entanto, o processamento do composto, que se torna mais demorado. Uma estratégia potencial para a degradação das fibras do coco é o uso de agentes alcalinos, como a cal virgem, a cal hidratada ou o hidróxido de sódio (hidrólise química). No presente trabalho foi avaliado o efeito da hidrólise alcalina sobre o comportamento de parâmetros bioquímicos durante a incubação da casca de coco seco com cal hidratada e hidróxido de sódio. O experimento foi conduzido na Unidade de Execução e Pesquisa (UEP) da Embrapa Tabuleiros Costeiros, em Rio Largo, AL. Para tanto, amostras de 300 g (secas a 50 °C) de casca de coco seco trituradas receberam 100 ml de soluções aquosas com doses crescentes de  $\text{Ca(OH)}_2$  P.A. (0; 0,135; 0,270; 0,405 ou 0,540 mol L<sup>-1</sup>) ou NaOH P.A. (0; 0,25; 0,5; 0,75 ou 1,0 mol L<sup>-1</sup>) equivalentes à proporção de 0%, 1%, 2%, 3% e 4% da massa seca de casca de coco seco. O ensaio foi desenvolvido em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2 x 5, com três repetições. As amostras, coletadas aos 0, 7, 15, 30 e 60 dias após início da incubação, foram pesadas, secas a 50 °C, moídas e submetidas à determinação da condutividade elétrica (CE), pH em água, matéria seca a 65 °C e 105 °C, cinzas, fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA), lignina, hemicelulose e celulose. Para a comparação dos agentes químicos, os dados obtidos em cada caráter avaliado foram submetidos à análise de variância. A avaliação do efeito das doses de  $\text{Ca(OH)}_2$  e NaOH sobre a degradação da casca de coco, foram feitas por meio de análise de regressão. Foram observados efeitos significativos tanto dos agentes alcalinos quanto das doses testadas. Ao final do período, o uso do NaOH resultou em maiores valores de pH, CE e de cinzas na CCS e a cal hidratada, foi mais efetiva em reduzir a FDN, FDA e os teores de celulose. O pré-tratamento da casca de coco seco para fins de compostagem por meio da hidrólise alcalina com  $\text{Ca(OH)}_2$ , se mostrou mais adequado em acelerar a degradação desse resíduo que o NaOH. Seu uso permitiu significativo ataque as fibras da casca de coco seco, sem alterar características da quem possam vir a prejudicar seu uso para fins de compostagem.

**Termos para indexação:** cal hidratada, fibra de coco, hidróxido de sódio, resíduo agroindustrial.

## Introdução

No Brasil, a agroindústria da polpa do coco seco, gera volumes significativos de resíduos. De acordo com o IBGE (2017), a produção nacional de coco alcançou 1.754.425 mil frutos na safra 2016. Para fins não agrícolas, apenas parte das cascas geradas por esta grande quantidade de frutos é aproveitada e o excedente resulta em grandes problemas ambientais. Por descascar os frutos na propriedade agrícola, são os produtores de coco seco que, em primeira instância assumem o passivo ambiental da geração das cascas decorrentes da industrialização coco. Nos coqueirais, esse resíduo favorece a multiplicação de agentes causadores de doenças e de pragas que podem causar grandes prejuízos à própria cultura do coqueiro, além de representar a perda de um material orgânico que, adequadamente tratado, poderia retornar ao sistema produtivo na forma de fertilizante.

Nesse sentido, a reciclagem de resíduos orgânicos por meio da compostagem, constitui em uma alternativa importante para viabilizar a utilização das cascas de coco no âmbito da propriedade agrícola. A compostagem tem sido reconhecida como uma alternativa ambientalmente sustentável para o manejo e reciclagem de resíduos orgânicos sólidos, objetivando a obtenção de produtos orgânicos de qualidade, conhecidos como compostos, usados como fertilizantes orgânicos (Pagans et al. 2006). No entanto, um dos desafios para o uso das cascas de coco seco (CCS) para a obtenção de compostos orgânicos é a sua lenta degradação, resultante de sua alta relação C/N e alto teor de lignina, exigindo maior tempo de processamento. Quanto à relação C/N da casca de coco seco, Rosa et al. (2001) referem-se a valores que variaram de 74 a 186:1. A fibra de coco é formada basicamente por celulose, hemicelulose e lignina além de pectina, e outras substâncias em menor proporção (Rocha et al., 2015). A celulose é um polímero

<sup>1</sup> Graduando em Agronomia, bolsista PIBIC/CNPq, Embrapa Tabuleiros Costeiros, Unidade de Execução de Pesquisa de Rio Largo, Rio Largo, AL.

<sup>2</sup> Graduando em Agronomia, bolsista PIBIC/FAPEAL, Embrapa Tabuleiros Costeiros, Unidade de Execução de Pesquisa de Rio Largo, Rio Largo, AL.

<sup>3</sup> Químico, mestre em Química Orgânica, analista da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Unidade de Execução de Pesquisa de Rio Largo, Rio Largo, AL.

<sup>4</sup> Graduando em Agronomia, Rio Largo, AL.

<sup>5</sup> Engenheira-agrônoma, doutora em Agronomia, pesquisadora da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Unidade de Execução de Pesquisa de Rio Largo, Rio Largo, AL.

linear, contendo unidades de glicose e apresenta algumas regiões cristalinas. A hemicelulose é um polímero ramificado, feito de vários polissacarídeos. A Lignina é uma mistura amorfa e heterogênea de polímeros aromáticos condensados e monômeros de fenilpropano (Duchese; Daniel, 1999). As fibras das cascas de coco têm percentual menor de celulose, entretanto a quantidade de lignina é muito grande em comparação a outras fibras vegetais, estando em torno de 35% no fruto maduro (Castro, 2011).

Uma estratégia potencial para a degradação das fibras da casca do coco é o uso de agentes alcalinos, como a cal virgem, a cal hidratada ou o NaOH (hidrólise química) os quais solubilizam parcialmente a hemicelulose, expandem a celulose, causam a ruptura das pontes de hidrogênio, facilitando o ataque dos microrganismos à parede celular (Jackson, 1977). Silva et al (2015) verificaram a retirada de constituintes superficiais da fibra de coco, como cutículas, partículas globulares, cavidades e também lignina em amostras imersas em solução de NaOH 12,5 mol L<sup>-1</sup>. Após um período de oitenta e um dias, apresentaram 67,95% de perda de massa das fibras em relação à massa inicial.

Apesar do comprovado efeito da hidrólise alcalina sobre a degradação de fibras, ainda há carência de conhecimentos que viabilizem seu uso em nível de campo, promovendo a aceleração da degradação das fibras da CCS sem alterar significativamente características desse resíduo que venham a interferir na eficiência do processo de compostagem. A condutividade elétrica e pH, por exemplo, podem interferir não só na atividade da microbiota que se estabelece em leiras de composto, mas também nas perdas de nitrogênio durante seu processamento (Sánchez-Monedero et al., 2001). Neste sentido, o presente trabalho tem por objetivo analisar os efeitos da hidrólise alcalina sobre a fibra e características químicas da casca de coco seco resultante do uso de Ca(OH)<sub>2</sub> e NaOH em ensaio de laboratório.

## Material e Métodos

Foi estudada a dinâmica de parâmetros bioquímicos durante o processo de hidrólise alcalina da casca de coco seco, em ensaio de incubação em laboratório, na Unidade de Execução de Pesquisa da Embrapa Tabuleiros Costeiros, situada no Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Alagoas, localizado na BR 104 Norte, Km 85, em Rio Largo, AL. Para tanto, amostras de 300 g (secas a 50 °C) de casca de coco seco trituradas (triturador de coco Laboremus, modelo TCL12) foram incubadas em bandejas de polietileno (45cm x 28 cm), onde receberam 100 ml de soluções aquosas com doses crescentes de Ca(OH)<sub>2</sub> P.A. (0; 0,135; 0,270; 0,405 ou 0,540 mol L<sup>-1</sup>) ou NaOH P.A. (0; 0,25; 0,5; 0,75 ou 1,0 mol L<sup>-1</sup>) equivalentes à proporção de 0%, 1%, 2%, 3% e 4% da massa seca de casca de coco tratada. O ensaio foi desenvolvido em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2 x 5, com três repetições. Durante o período de incubação de sessenta dias, de forma a se monitorar o processo, o material incubado foi amostrado ao 0, 7, 15, 30 e 60 dias após início da incubação. As amostras foram pesadas, secas a 50 °C, moídas e submetidas à determinação da condutividade elétrica (CE) (Simard et al., 1988) e pH em água (relação CCS:água igual a 1:10); matéria seca a 65 °C e 105 °C e teor de cinzas por ignição em mufla a 550 °C por duas horas. As análises de fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA) e lignina foram realizadas conforme proposto por Van Soest e Wine (1968), adotando-se modificações referentes ao emprego de saquinhos de TNT (tecido não-tecido) e uso de autoclave (Cichoski et al., 2009; Valente et al., 2011). Para a comparação dos agentes químicos (cal hidratada e NaOH), os dados obtidos em cada caráter avaliado foram submetidos à análise de variância. A avaliação do efeito das doses de Ca(OH)<sub>2</sub> e NaOH sobre a degradação da casca de coco, foi feita por meio de análise de regressão utilizando-se o programa estatístico SAEG (Sistema de Análises Estatísticas e Genéticas) da Universidade Federal de Viçosa (UFV).

## Resultados e Discussão

A análise de variância dos dados obtidos mostrou (Tabela 1) que a maioria das variáveis consideradas foi modificada de modo significativo tanto pelas doses quanto pelos agentes alcalinos utilizados (P < 0,01). Só não foi observada distinção entre os efeitos da cal hidratada e do NaOH, sobre os teores de lignina e hemicelulose.

**Tabela 1.** Análise de variância geral dos dados obtidos aos sessenta dias após o início da incubação das cascas de coco seco (CCS) trituradas com diferentes doses de Ca(OH)<sub>2</sub> e NaOH em laboratório. Rio Largo, AL, outubro a dezembro de 2017.

FV	GL	Quadrado Médio							
		pH	CE	Cinzas	SVT <sup>(1)</sup>	FDN <sup>(2)</sup>	FDA <sup>(3)</sup>	Hemic <sup>(4)</sup>	Lignina
<b>Doses (D)</b>	4	4,432**	1,865**	37,407**	37,407**	33,813**	36,913**	0,225	2,843
<b>Hidróxidos(H)</b>	1	2,170**	4,540**	48,775**	48,775**	101,582**	70,099**	2,912	69,947**
<b>D x H</b>	4	0,418**	0,438	11,461**	11,462**	2,540	0,538	0,999	11,564
<b>Resíduo</b>	20	0,040	0,289	1,583	1,583	5,718	5,100	2,286	7,204
<b>CV (%)</b>		<b>2,93</b>	<b>11,92</b>	<b>10,51</b>	<b>1,43</b>	<b>3,00</b>	<b>3,24</b>	<b>25,20</b>	<b>9,18</b>

\*\* Significativo a 1% de probabilidade. <sup>(1)</sup> SVT = sólidos voláteis totais; <sup>(2)</sup> FDN = Fibra insolúvel em Detergente Neutro; <sup>(3)</sup> FDA = Fibra insolúvel em Detergente ácido;

<sup>(4)</sup> Hemic = Hemicelulose.

No início do período de incubação, o pH, a CE e o teor de cinzas da CCS eram, respectivamente, 5 mS/cm, 25 mS/cm, 3 mS/cm, 96 mS/cm e 8%. A FDN e a FDA iniciais estiveram, respectivamente, em torno de 78,62% e 74,54%. Os teores iniciais de celulose (38,32%) e de lignina (36,22%) da CCS foram menores que aqueles reportados por Mohanty et al. (2000), os quais observaram teores de 36% a 43% de celulose e 41 a 45% de lignina. Faruk et al. (2012) também se refere a faixas de valores de 32% a 43% de celulose e 40% a 45% de lignina, mas a valores muito menores de hemicelulose (0,15% a 0,25%) que os encontrados no início do ensaio (4,08%).

Ao final do período, o uso do NaOH resultou em maiores valores de pH, CE e de cinzas na CCS que aqueles proporcionados pelo  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  (Tabela 2). Por sua vez, a hidrólise alcalina resultante do uso da cal hidratada, foi mais efetiva em reduzir a FDN, FDA e os teores de celulose da CCS que o NaOH.

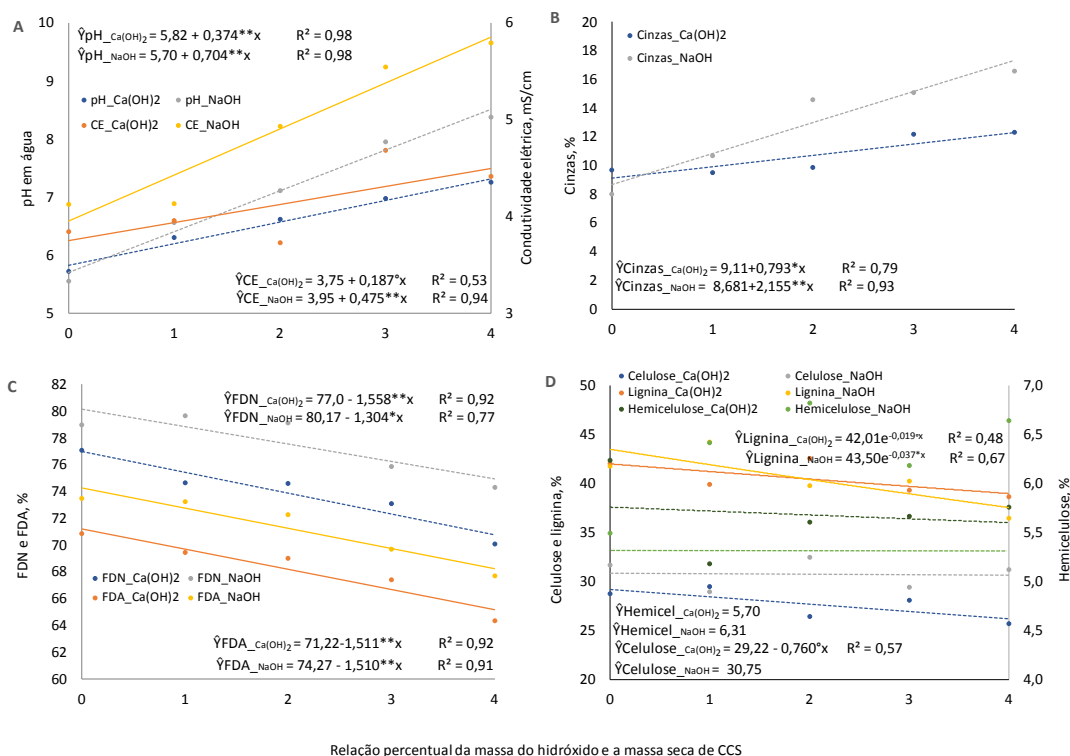
**Tabela 2.** Valores médios dos dados obtidos aos sessenta dias após o início da incubação das cascas de coco seco (CCS) trituradas com  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  e NaOH em laboratório. Médias de quinze repetições. Rio Largo, AL, outubro a dezembro de 2017.

	pH	CE (mS/cm)	Cinzas	SVT	FDN	FDA	Hemicel	Celulose	Lignina
$\text{Ca}(\text{OH})_2$	6,57 B	4,12 B	10,69 B	89,31 A	73,88 B	68,19 B	5,69	27,70 B	40,50
NaOH	7,11 A	4,90 A	13,24 A	86,76 B	77,56 A	71,25 A	6,31	30,75 A	40,50

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si ( $p < 0,01$ ). <sup>(1)</sup> SVT = sólidos voláteis totais; <sup>(2)</sup> FDN = Fibra insolúvel em Detergente Neutro; <sup>(3)</sup> FDA = Fibra insolúvel em Detergente ácido.

Para a maioria das variáveis consideradas, os dados obtidos em função dos aumentos das doses dos agentes alcalinos, apresentaram ajuste linear (Figura 1). Ao final do período de incubação, embora o aumento do pH da casca de coco seco tenha se mostrado altamente correlacionado tanto com o aumento das doses do  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  quanto do NaOH ( $r = 99,05$  e  $r = 99,19$ ,  $P < 0,01$ , respectivamente), este último proporcionou aumentos mais expressivos (Figura 1A). O acréscimo de 3% e 4% de NaOH elevaram o pH a valores médios de 7,95 e 8,38, os quais predisporiam a maiores perdas de amônia por volatilização durante processos de compostagem, a qual pode ser particularmente alta em pH maiores que 7,5 (Bernal et al., 2009). O aumento das doses do NaOH também influenciaram mais fortemente a condutividade elétrica e o teor de cinzas da CCS que àquelas do  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ .

Embora o aumento das doses do  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  e NaOH tenham fortemente influenciado a FDN ( $r = -99,69$ ,  $P < 0,01$  e  $r = -87,95$ ,  $P < 0,05$ , respectivamente) e a FDA ( $r = -99,69$  e  $r = -87,95$ ,  $P < 0,01$ , respectivamente), o efeito foi discreto sobre a lignina ( $r = -68,85$ ,  $P < 0,1$  e  $r = -81,00$ ,  $P < 0,05$ , respectivamente) e celulose ( $r_{\text{Ca}(\text{OH})_2} = -75,39$ ,  $P < 0,1$ ), e não influenciou os teores de hemicelulose.



**Figura 1.** Condutividade elétrica (CE), pH, cinzas, fibra em detergente neutro (FDN), Fibra em detergente ácido (FDA), celulose, hemicelulose e lignina, obtidos aos sessenta dias após o início da incubação de cascas de coco seco (CCS) com doses crescentes de  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  e NaOH, em laboratório. Médias de três repetições. Rio Largo, AL, outubro a dezembro de 2017.

## Conclusões

O pré-tratamento da casca de coco seco para fins de compostagem por meio da hidrólise alcalina com cal hidratada, se mostrou mais adequado em acelerar a degradação desse resíduo que o NaOH. Seu uso permitiu significativo ataque as fibras da casca de coco seco, sem alterar características da quem possam vir a prejudicar seu uso para fins de compostagem.

## Agradecimentos

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos do primeiro autor.

## Referências

- BERNAL, M. P.; ALBURQUERQUE, J. A.; MORAL, R. Composting of animal manures and chemical criteria for compost maturity assessment. A review. **Bioresource technology**, v. 100, n. 22, p. 5444-5453, 2209.
- CASTRO, C. D. P. D. C. **Avaliação da fibra de coco verde como material de acolchoamento em sistemas de embalagens para mamão e manga**. 2011. 121 f. Tese (Doutorado)-Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2011.
- CICHOSKI, E.; SANTOS, G. T.; SILVA, G. T.; CECATO, U.; SANTOS, W. B. R.; MARTINS, E. N.; GASPARINO, E. Diferentes tipos de sacos para análise de digestibilidade in vitro de forrageiras. **Archivos de Zootecnia**, v. 58, n. 224, p. 749-752, 2009.
- DUCHESSE, I.; DANIEL, G. Wood ultrastructure of wood fibre surfaces as shown by a variety of microscopical methods - a review. **Nordic Pulp and Paper Research Journal**, v. 14, n. 2, p. 129-38, 1999.
- FARUK, O.; BLEDZKI, H.; FINK, H. P.; SAIN, M. Biocomposites reinforced with natural fibers: 2000-2010. **Progress Polymer Science**, v. 37, p. 1552-1596, 2012.
- IBGE. **Levantamento sistemático da produção agrícola**. Rio de Janeiro, v. 30 n.1 p. 1-81, jan. 2017.
- JACKSON, M. G. Review article: the alkali treatment of straws. **Animal Feed Science and Technology**, v. 2, n. 2, p. 105-130, 1977.
- MOHANTY, A. K., MISRA, M., & HINRICHSSEN, G. Biofibres, biodegradable polymers and biocomposites: an overview. **Macromolecular materials and Engineering**, v. 276, n. 1, p. 1-24, 2000.
- PAGANS, E.; BARRENA, R.; FONT, X.; SANCHEZ, A. Ammonia emissions from the composting of different organic wastes: dependency on process temperature. **Chemosphere**, v. 62, p. 1534-1542, 2006.
- ROCHA, A. M.; SILVA, M. S.; FERNANDES, F. M.; SOARES, P. M.; KONISHI, F. Aproveitamento de fibra de coco para fins energéticos: revisão e perspectivas. In: CONGRESSO SOBRE GERAÇÃO DISTRIBUÍDA E ENERGIA NO MEIO RURAL, 10., 2015, São Paulo. **Anais...** São Paulo: USP, 2015.
- ROSA, M. de F.; ABREU, F. A. P. de; FURTADO, A. A. L.; BRÍGIDO, A. K. L.; NORÕES, E. R. de V. **Processo agroindustrial: obtenção de pó de casca de coco verde**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2001. 3 p. (Embrapa Agroindústria Tropical. Comunicado Técnico, 61).
- SÁNCHEZ-MONEDERO, M. A.; ROIG, A.; PAREDES, C.; BERNAL, M. P. Nitrogen transformation during organic waste composting by the Rutgers system and its effects on pH, EC and maturity of the composting mixtures. **Bioresource technology**, v. 78, n. 3, p. 301-308, 2001.
- SILVA, E. J.; MARQUES, M. L.; VELASCO, F. G.; FORNARI JUNIOR, C.; LUZARDO, F. H. Degradação da fibra de coco imersa em soluções alcalinas de cimento e NaOH. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental-Agriambi**, v. 19, n. 10, p. 981-988, 2015.
- VAN SOEST, P. J.; WINE, R. H. Determination of lignin and cellulose in acid detergent fiber with permanganate. **Journal of Association of Official Agricultural Chemists**, v. 51, p. 780-785, 1968.

# Avaliação de clones de capim-elefante para fins energéticos nas condições dos Tabuleiros Costeiros de Sergipe

Brisa Marina da Silva Andrade<sup>1</sup>, Cosme Washington Santos de Jesus<sup>2</sup>, Erick Yanomami Barros Souza<sup>3</sup>, Guilherme de Oliveira Argolo Delfino<sup>4</sup>, José Henrique de Albuquerque Rangel<sup>5</sup>, Evandro Neves Muniz<sup>6</sup>, Daniel Oliveira Santos<sup>7</sup>

**Resumo** - Os principais usos da biomassa como insumo energético são a produção de energia térmica (combustão direta, carvão vegetal e resíduos), produção de energia mecânica (álcool combustível e bio-óleos), produção de energia elétrica (pela combustão, gaseificação e queima de gases), e produção de outros componentes da química verde (bioprodutos e metabólitos de interesse industrial). Em todos os casos, o capim-elefante é considerado como uma alternativa de destaque, em razão da sua alta eficiência fotossintética (mecanismo C4 de fixação de carbono), grande capacidade de acumulação de matéria-seca e de fixação biológica de nitrogênio; além de suas propriedades químicas. O objetivo do projeto foi desenvolver produtos pré-tecnológicos que sejam úteis para potencializar o uso do capim-elefante como insumo energético e para embasar a estruturação de um programa de melhoramento de capim-elefante específico para esse uso. Foram avaliados 20 acessos de capim-elefante com frequência de dois cortes anuais pelo período mínimo de dois anos. Foi avaliada a produção de matéria-seca da planta inteira de cada acesso. Os cortes realizados após o período chuvoso tiveram médias gerais de produção significativamente maiores do que as dos cortes realizados ao fim do período seco. Dentro de cada época de corte verificou-se a formação de dois grupos de clones estatisticamente diferentes, no entanto, nem sempre os clones que produziram mais em uma época foram os mesmos com maiores produções nas demais épocas.

**Termos para indexação:** bioenergia, avaliação de genótipos, biomassa energética.

## Introdução

A temática ambiental destaca-se nas discussões sobre os impactos no desenvolvimento social e econômico mundial, sobretudo em função da perspectiva de esgotamento das reservas de fontes de energia de origem fóssil. Nesse contexto, a utilização da biomassa como insumo energético vem ganhando importância no desenvolvimento de alternativas para uma matriz energética sustentável (Samson et al., 2005).

Os principais usos da biomassa como insumo energético são a produção de energia térmica (combustão direta, carvão vegetal e resíduos), produção de energia mecânica (álcool combustível e bio-óleos), produção de energia elétrica (pela combustão, gaseificação e queima de gases), e produção de outros componentes da química verde (bioprodutos e metabólitos de interesse industrial) (Nogueira; Lora, 2003).

Em todos os casos, o capim-elefante é considerado como uma alternativa de destaque (Anderson et al., 2008; Ra et al., 2012), em razão da sua alta eficiência fotossintética (mecanismo C4 de fixação de carbono), grande capacidade de acumulação de matéria-seca e de fixação biológica de nitrogênio; além de suas propriedades químicas (Morais et al., 2009).

Estudos para identificação de genótipos com alta eficiência na fixação biológica de nitrogênio foram pioneiros, visando o uso do capim-elefante como fonte de energia (Quesada, 2001). Em relação ao melhoramento genético, os principais avanços foram o desenvolvimento de populações e clones de capim-elefante com foco no uso forrageiro, que estão em fase final de registro e proteção; além de permitir o lançamento das cultivares Pioneiro, BRS Canará e BRS Kurumi, desenvolvidas para alimentação animal. Aliado as ações de melhoramento são conduzidas atividades de recursos genéticos por meio do Banco Ativo de Germoplasma de Capim-elefante da Embrapa (BAGCE).

<sup>1</sup>Graduando em Zootecnia, bolsista CNPq/Pibic, Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

<sup>2</sup>Graduando em Medicina Veterinária, bolsista, Fapitec/Pibic, Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

<sup>3</sup>Graduando em Medicina Veterinária bolsista CNPq/Pibic, Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

<sup>4</sup>Graduando em Medicina Veterinária, bolsista CNPq/Pibic, Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

<sup>5</sup>Engenheiro-agrônomo, doutor em Agricultura Tropical, pesquisador da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

<sup>6</sup>Engenheiro-agrônomo, doutor em Zootecnia, pesquisador da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

<sup>7</sup>Químico, analista da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

O BAGCE, sob responsabilidade da Embrapa Gado de Leite e têm como finalidade a conservação, ampliação, valoração e uso da diversidade genética da espécie. Ao longo desses anos foram realizadas caracterizações e avaliações morfológica, agronômica e molecular dos acessos, de forma a permitir a compreensão da variabilidade existente na coleção (Azevedo et al., 2012; Machado et al., 2012). Como ações futuras faz-se necessário prospectar variabilidade genética e avaliar o germoplasma em relação as características de interesse para produção de bioenergia bem como desenvolver programas de pesquisa específicos para o uso energético.

A ampliação dos esforços de melhoramento e pré-melhoramento genético, aliado a expansão das atividades de caracterização, avaliação e valoração do germoplasma visando produção de bioenergia, favorecerá o uso do capimelefante como fonte alternativa de energia, e contribuirá para diminuição do desmatamento de florestas nativas e para mitigação da emissão de gases de efeito estufa (GEE) derivados de fontes energéticas de origem fóssil.

Nesse sentido, o objetivo do projeto foi prospectar variabilidade genética, identificar alelos e desenvolver produtos pré-tecnológicos que sejam úteis para potencializar o uso do capim-elefante como insumo energético e para embasar a estruturação de um programa de melhoramento de capim-elefante específico para esse uso.

## Material e Métodos

Foram avaliados 20 acessos de capim-elefante pré-selecionados no PA2, com frequência de dois cortes anuais pelo período mínimo de 2 anos e adubação anual de 60 Kg de N/ha, 40 kg/h de  $P_2O_5$  e 48 kg de  $K_2O$ /ha. A parcela experimental era constituída de 3 fileiras de 4,0 m (14,4 m<sup>2</sup>), com espaçamento entre fileiras de 1,2 m. A área útil foi constituída pela linha central, desprezando-se 0,5 m nas margens das linhas. Foram realizados cortes anuais a cada seis meses, sendo um em janeiro (estação seca) e outro em agosto (estação das águas). As características agronômicas e físico-químicas avaliadas na Embrapa Tabuleiros Costeiros foram: a produção de matéria-seca e verde de caule, folhas e planta inteira; porcentagem de matéria-seca do caule, folha e planta inteira; altura da planta; número de perfilhos. Em fase posterior, também será realizada pela Embrapa Gado de Leite a caracterização energética da matéria-seca, onde serão avaliados: a granulometria, massa específica e densidade; celulose; hemicelulose, lignina, extrativos e cinzas; análise química imediata da matéria-seca – carbono fixo, materiais voláteis e teor de cinzas (norma ASTM D1762/64); poder calorífico (norma ABNT NBR 8633/84) – bomba calorimétrica; carbonização em forno mufla, rendimento gravimétrico, rendimento em licor pirolenhoso e gases não condensáveis; granulometria; análise química imediata do carvão – carbono fixo, materiais voláteis e teor de cinzas (norma ABNT NBR 8112/83). O ensaio está sendo conduzido em área do campo Experimental Jorge do Prado Sobral, da Embrapa Tabuleiros Costeiros, no município de Nossa Senhora das Dores, SE, em um Latossolo Amarelo Distrocoeso, com precipitação média anual de 1.100 mm.

Os dados foram submetidos a análise da variância utilizando-se o pacote estatístico SISVAR e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Neste trabalho são apresentados os dados de produção de matéria seca total.

## Resultados e Discussão

A análise estatística dos dados de produção de matéria seca total mostrou efeito significativo para os tratamentos de época de corte, clone e para as interações época de corte x clone. As médias de produção de matéria seca de cada clone dentro dos diferentes cortes são apresentadas na Tabela 1. Como era esperado, os cortes realizados após o período chuvoso tiveram médias gerais de produção significativamente maiores do que as dos cortes realizados ao fim do período seco. Dentro de cada época de corte o teste de Skott-Knott separou dois grupos de clones estatisticamente diferentes, no entanto, verifica-se que nem sempre os clones que produziram mais em uma época foram os mesmos com maiores produções nas demais épocas. Muitas vezes clones que apresentaram bom comportamento produtivo no corte após a estação chuvosa não conseguiram se colocar entre os mais produtivos no corte realizado no fim da estação seca. Como exceção a esse comportamento estão os clones BAG CE 64 King Grass, BAG CE 62 Cuba 116, BSAG CE 3 Três Rios e o BAG CE 91 Pasto Paraná, que estiveram colocados no grupo dos mais produtivos em todas as quatro épocas de corte ou pelo menos em três delas. Esses clones, além da constância na produtividade, alcançaram produções médias elevadas em relação aos demais. Essa constância de produtividade é fator importante na produção de biomassa energética visto que as indústrias que necessitam esse tipo de biomassa requerem um fornecimento constante desse material.

**Tabela 1.** Médias de produção de matéria seca total de clones de capim-elefante em quatro cortes realizados entre janeiro 2016 a agosto 2017. Comparação de médias pelo teste de Skott-Knott a 5%.

Parcela	Clone	Produção em kg/ha/corte				
		Janeiro 2016	Agosto 2016	Janeiro 2017	Agosto 2017	Média
10	BAG CE 64 King Grass	22641 a	23809 a	13636 a	22867 a	20738 a
15	BAG 60 Guaco	20030 a	16948 b	10392 b	14194 b	15391 a
7	BRS Canará	18943 a	15538 b	14372 a	17840 a	16673 a
4	BSG 69 CPAC	18217 a	17517 b	4980 b	10666 b	12845 b
8	Madeira	17866 a	17053 b	6642 b	8905 b	12616 b
5	BAG 38 Camerom Piracicaba	17453 a	14885 b	6967 b	15986 a	13823 b
9	BAG CE 62 Cuba 116	16185 a	24827 a	8176 b	17038 a	16557 a
6	BSAG CE 3 Três Rios	15650 a	18919 a	19593 a	16129 a	17573 a
3	BAG CE 91 Pasto Paraná	15215 a	21677 a	15867 a	201145 a	18218 a
12	BAGCE 22 Taiwan A - 144	13976 b	20433 a	9585 b	20070 a	16016 a
16	BAGCE 51	13739 b	15945 b	10495 b	11627 b	12951 b
20	BAGCE 6 Pusa Napier nº 2	13344 b	16059 b	5724 b	12602 b	11932 b
1	BRS Capiacú	11676 b	16974 b	14093 a	20701 a	15886 a
2	BAGCE 66 Mineirão	10780 b	15604 b	11454 a	19330 a	14292 b
14	BAGCE 59	10648 b	12621 b	9588 b	11575 b	11108 b
17	BAGCE 1 Elefante da Colômbia	10450 b	13818 b	12104 a	13124 b	12386 b
11	BAGCE 23 Napier S.E.A.	10248 b	20271 a	11920 a	24176 a	16654 a
19	BAGCE 50	10220 b	15332 b	14672 a	16278 a	14125 b
13	BAGCE 57 Roxo	10158 b	12655 b	12893 a	13100 b	12201 b
18	BAGCE 19 Merkeron de Pinda	8345 b	18729 a	17168 a	16486 a	15182 a
	Media	14292 B	17481 A	11516 C	16145 A	

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem estatisticamente entre si. Skott-Knott 5%.

## Conclusão

Caso as análises das características energéticas confirmem a boa qualidade dos clones BAG CE 64 King Grass, G CE 62 Cuba 116, BSAG CE 3 Três Rios e o BAG CE 91 Pasto Paraná, esses materiais devem ser selecionados para comporem avaliações em áreas maiores.

## Agradecimentos

Ao CNPq pela concessão da bolsa de iniciação científica e à Embrapa Tabuleiros Costeiros pelo suporte à pesquisa.

## Referências

- ANDERSON, W.; CASLER, M.; BALDWIN, B. Improvement of Perennial Forage Species as Feedstock for Bioenergy. In: VERMERRIS, W. (Ed.). **Genetic Improvement of Bioenergy Crops**. [s.l.]: Springer, 2008. p. 308-345.
- AZEVEDO, A. L. S.; COSTA, P. P.; MACHADO, J. C.; MACHADO, M. A.; PEREIRA, A. V.; LÉDO, F. J. S. Cross Species Amplification of Pennisetum glaucum Microsatellite Markers in Pennisetum purpureum and Genetic Diversity of Napier Grass Accessions. **Crop Science**, v. 52, p. 1776-1785, 2012.
- MACHADO, J. C.; MARTINS, C. E.; AUAD, A. M.; ROCHA, W. S. D.; LÉDO, F. J. S.; PEREIRA, A. V.; SOUZA SOBRINHO, F.; BENITES, F. R. G. **Banco Ativo de Germoplasma de Capim-Elefante**: avaliação da resistência à cigarrinha-das-pastagens e tolerância à toxidez por alumínio. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2012. 27 p. (Embrapa Gado de Leite. Documentos, 159).
- MORAIS, R. F.; SOUZA, B. J.; LEITE, J. M.; SOARES, L. H. B.; ALVES, B. J. R.; BODDEY, R. M.; URQUIAGA, S. Elephant grass genotypes for bioenergy production by direct biomass combustion. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 44, n. 2, p. 133-140, fev. 2009.

NOGUEIRA, L. A. H.; LORA, E. E. S. **Dendroenergia**: fundamentos e aplicações. 2. ed. Rio de Janeiro: Interciência, 2003. 199 p.

QUESADA, D. M. **Seleção de genótipos de capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schum.) para a alta produção de biomassa e eficiência da fixação biológica de nitrogênio (FBN)**. 2001. 86 f. Dissertação (Mestrado)-Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2001.

RA, K; SHIOTSU, F.; ABE, J.; MORITA, S. Biomass yield and nitrogen use efficiency of cellulosic energy crops for ethanol production. **Biomass and Bioenergy**, v. 37, p. 330-334, 2012.

SAMSON, R.; MANI, S.; BODDEY, R.; SOKHANSANJ, S.; QUESADA, D.; URQUIAGA, S; REIS, V.; HOLEM, C. The potential of C4 perennial grasses for developing a global BIOHEAT industry. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 24, p. 461-495, 2005.



# Avaliação da cratília (*Cratylia argentea*) em cultivos adensados

Cosme Washington Santos de Jesus<sup>1</sup>, Erick Yanomami Barros Souza<sup>2</sup>, Brisa Marina da Silva Andrade<sup>3</sup>, Guilherme de Oliveira Argolo Delfino<sup>4</sup>, José Henrique de Albuquerque Rangel<sup>5</sup>, Evandro Neves Muniz<sup>6</sup>, Daniel Oliveira Santos<sup>7</sup>

**Resumo** - A cratília (*Cratylia argentea*) é caracterizada por sua ampla adaptação a zonas tropicais, com secas prolongadas e solos ácidos de baixa fertilidade e, nessas condições, possui bom rendimento de forragem e tem a capacidade de rebrotar durante o período seco, devido ao seu desenvolvido e vigoroso sistema radicular. Sendo assim, surge como uma alternativa viável para melhorar o padrão alimentar dos animais, notadamente durante o período de estiagem, já que ela, em relação às gramíneas, apresenta alto conteúdo protéico, melhor digestibilidade e maior resistência ao período seco. Estes vegetais podem ser utilizados para fenação, ensilagem, consorciação com gramíneas em sistemas de integração pecuária/floresta ou plantadas em áreas exclusivas denominados de bancos de proteína. O trabalho teve como objetivo avaliar o teor de matéria seca, produtividade de biomassa e teor de proteína bruta da cratília nas condições do agreste sergipano. O ensaio obedeceu a um delineamento de blocos casualizados em esquema de parcelas subdivididas, com quatro repetições. Nas parcelas foram estudadas as densidades 10 mil plantas/ha; 15 mil plantas/ha; 20 mil plantas/ha; e 25 mil plantas/ha e nas subparcelas as alturas de 50 cm, 75 cm, 100 cm do solo. Foram avaliados os parâmetros de: teores de matéria seca de folhas e de caules, teores de proteína bruta de folhas e caules, produção de biomassa seca total e de biomassa seca de folhas e caules. Em relação frequência de corte as maiores produção de matéria seca de folhas e caules foi alcançada no intervalo de 90 dias e caule no intervalo de corte com 75 dias não teve diferença significativa, entretanto o intervalo de corte com 60 e 90 dias se destacou com maior produção com 860,43 kg/ha a (37,98 ) da folha e (42,02 a) do caule. Altura de corte para a folha não houve diferença significativa entre si, o caule teve maior produção na altura de 50 cm (39,77 a), 75 cm (38,85 ab) produziu menos que 50 cm e maior de 100 cm (36,91 b). A produção de Biomassa Seca kg/ha/corte no intervalo de corte da folha e caule com 60 dias e 90 dias não teve diferença significativa entre si, porém o intervalo de corte de 75 dias se destacou por produzir (294,50 b) de folha e (55,2033) de caule. Para a população de plantas na avaliação da folha não houve diferença entre si. Avaliação do caule a população de 15.000 plantas (64,82 b) teve uma menor produção e a população de 20.000 plantas (189,79 a) se destacou por maior produção. Para a avaliação da altura de corte não diferiu entre si estatisticamente. Ambos os dados representado segundo as médias comparadas pelo teste de Tukey.

**Termos para indexação:** camaratuba, semiárido.

## Introdução

A produção de forragens no Brasil apresenta períodos desfavoráveis ao longo do ano, esta situação é ainda mais grave na região Nordeste, principalmente no bioma Caatinga, que possui características semiáridas.

A caatinga, que está presente em todos estados nordestinos, enfrenta grandes dificuldades no período de estiagem, em função da má distribuição do seu regime pluviométrico (Araújo Filho; Crispim, 2002).

Este bioma apresenta evapotranspiração elevada, comprometendo a produção de massa verde, provocando escassez de forragem, em qualidade e quantidade, limitando a produtividade dos rebanhos. Assim, surge, portanto a necessidade de práticas de produção e conservação de culturas para produção de volumosos em solteiro ou em consórcio durante a estação chuvosa para o uso no período seco. Embora curto, o aproveitamento do período chuvoso visando à produção de forragem para os rebanhos é de fundamental importância para que haja constância na oferta de alimentos utilizados na época seca. Dessa forma a redução da utilização de fertilizantes nitrogenados é demandada com urgência. A consorciação de gramíneas com leguminosas forrageiras tropicais surge como uma alternativa bastante viável para substituição do N mineral. Através da associação simbiótica com bactérias dos gêneros *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*, as leguminosas podem fixar quantidades expressivas de N, o que contribui para melhorar a fertilidade do solo, bem como aumentar o rendimento e qualidade da forragem produzida Fisher et al. (1997).

Adicionalmente, a utilização de leguminosas forrageiras arbóreas é uma alternativa viável para melhorar o padrão alimentar dos animais, notadamente durante o período de estiagem, já que elas, em relação às gramíneas, apresentam alto conteúdo proteico,

<sup>1</sup>Graduando em Medicina Veterinária, bolsista Fapitec/Pibic, Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

<sup>2</sup>Graduando em Medicina Veterinária, bolsista CNPq/Pibic, Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

<sup>3</sup>Graduando em Zootecnia, bolsista CNPq/Pibic, Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

<sup>4</sup>Graduando em Medicina Veterinária, bolsista CNPq/Pibic, Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

<sup>5</sup>Engenheiro-agrônomo, doutor em Agricultura Tropical, pesquisador da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

<sup>6</sup>Engenheiro-agrônomo, doutor em Zootecnia, pesquisador da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

<sup>7</sup>Químico, analista da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

melhor digestibilidade e maior resistência ao período seco. Estes vegetais podem ser utilizados para fenação, ensilagem, consorciação com gramíneas em sistemas de integração pecuária-floresta ou plantadas em áreas exclusivas denominados de bancos de proteína.

No caso do Nordeste, por apresentar elevada produtividade e qualidade da forragem, a leucena (*L. leucocephala*) é uma das espécies mais conhecidas. No entanto, devem-se viabilizar estudos com outras espécies arbóreo-arbustivas, com capacidade de adaptação às condições edafoclimáticas do semiárido e com potencial produtivo e qualidades nutricionais semelhante a da leucena. Assim sendo, a *Gliricidia sepium*, a *Cratylia argentea* e a *Moringa oleifera* apresentam potencial para este pleito.

A cratília é caracterizada por sua ampla adaptação a zonas tropicais, com secas prolongadas e solos ácidos de baixa fertilidade e, nessas condições, possui bom rendimento de forragem e tem a capacidade de rebrotar durante o período seco, devido ao seu desenvolvido e vigoroso sistema radicular.

Segundo Argel e Lascano (1998) a cratília é um gênero neotropical com distribuição natural no Peru, Bolívia, Argentina e Brasil, aonde pode ser encontrada nos biomas Caatinga, Cerrado e Mata Atlântica.

Existem poucos estudos sobre a cratília no Brasil, principalmente para a região Nordeste. Este trabalho objetivou estudar a resposta da *Cratylia argentea* a diferentes densidades de cultivo e diferentes manejos de corte nas condições da sub-região do Agreste de Sergipe.

## Material e Métodos

O experimento foi conduzido em um plano solo do Campo Experimental Pedro Arle da Embrapa Tabuleiros Costeiros, localizado no Município de Frei Paulo, SE, distando 100 km de Aracaju.

O experimento teve o cultivo adensado de cratília para formação de legumineira. O ensaio teve um delineamento de blocos casualizados, em esquema de parcelas subdivididas, com quatro repetições. O tratamento consistiu em quatro densidades de cultivo da cratília (10.000; 15.000; 20.000 e 25.000 plantas/ha), três frequências de corte durante a estação chuvosa em sub-parcelas (cortes a cada 60, 75 e 90 dias), com um corte na estação seca para todas as frequências, e 3 alturas de corte (0,5m; 0,75m e 1,0 m do solo).

Foram registrados os parâmetros de número de plantas ao longo do experimento (ensaio de cultivo adensado) e peso da massa verde colhida na área útil da parcela do cultivo adensado. Em laboratório, determinou os teores de MS e PB, da cratília quando presente. De posse das análises laboratoriais foi avaliada a produção de MS/ha e PB/ha da leguminosa em cada tratamento.

Os dados de número de plantas, MS/ha e %PB, da cratília foi submetidos à análise da variância de um esquema estatístico de parcelas subdivididas com 4 tratamentos em parcelas, três em sub-parcelas e três em sub-sub-parcelas, com 4 repetições. As análises foram processadas pelo pacote SISVAR de análise estatística e as médias comparadas pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

## Resultados e Discussão

Os resultados da tabela 1. Permitiram verificar que a produção de matéria seca da folha e caule no intervalo de corte com 60 dias e 75 dias não teve diferença significativa, entretanto o intervalo de corte com 90 dias se destacou com maior produção chegando a (37,98 a) da folha e (42,02 a) do caule. Para a população de plantas não diferiu entre si estatisticamente, onde as médias foram semelhantes. Esperava-se um aumento crescente na produção do teor de matéria seca em função do aumento progressivo em função da população de plantas. O que não ocorreu. Tal fato deve ter ocorrido em função de uma irregularidade na idade das plantas, visto que muitas dessas plantas foram plantadas no ano de 2016 morreram com a estiagem, e foram replantadas na estação chuvosa de 2017.

Altura de corte para a folha não houve diferença significativa entre si, o caule teve maior produção na altura de 50cm (39,77 a), 75cm (38,85 ab) produziu menos que 50 cm e maior de 100cm (36,91 b). Os resultados obtidos nesse trabalho contrastam com obtidos por Sobral et al, (2017) que relatou maiores produções na altura de corte de 50cm.

A produção de biomassa seca kg/ha/corte no intervalo de corte da folha e caule com 60 dias e 90 dias não teve diferença significativa entre si, porém o intervalo de corte de 75 dias se destacou por produzir (294,50 b) de folha e (55,2033) de caule.

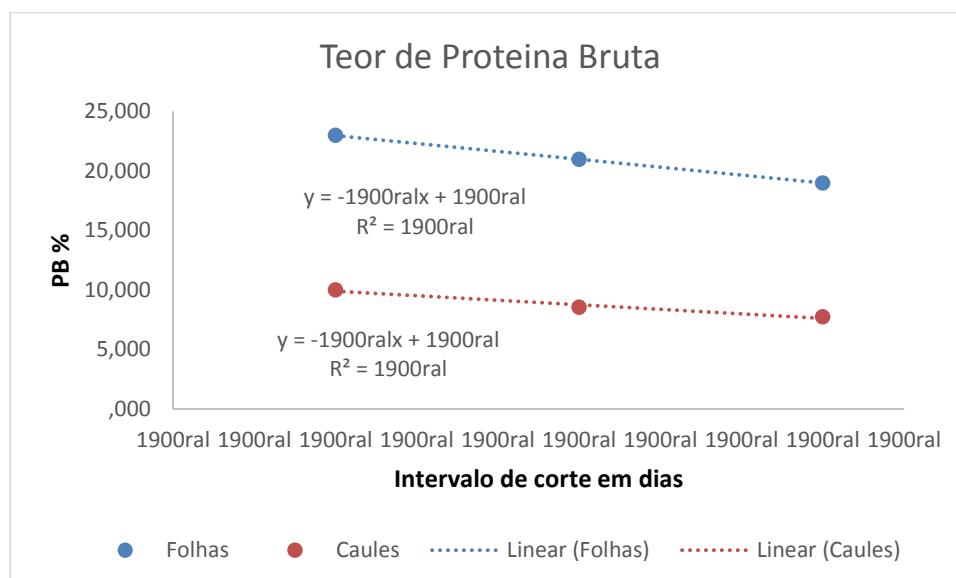
Para a população de plantas na avaliação da folha não houve diferença entre si. Avaliação do caule a população de 15.000 plantas (64,82 b) teve uma menor produção e a população de 20.000 plantas (189,79 a) se destacou por maior produção. Para a avaliação da altura de corte não diferiu entre si estatisticamente. Ambos os dados representado segundo as médias comparadas pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

A figura 1. Mostra o declínio do teor da proteína bruta com o avanço do tempo de rebrota após o corte. Pode ser explicado devido a um aumento da proporção de folhas no interior do dossel da planta com senescência induzida pelo sombreamento.

**Tabela 1.** Dados de teor de matéria seca de folha e caule, produção de biomassa seca em função das variáveis de intervalo de corte, população de corte e altura de corte.

MS <sup>(1)</sup> %			
Intervalo de corte	Folha	Caule	
60 dias	35,78 b	37,79 b	
75 dias	34,49 b	37,71 b	
90 dias	37,98 a	40,02 a	
População de plantas/ha	Folha	Caule	
25.000	35,42 a	38,13 a	
20.000	35,57 a	39,16 a	
15.000	36,74 a	38,71 a	
10.000	36,60 a	38,04 a	
Altura de corte	Folha	Caule	
50cm	35,78 a	39,77 a	
75cm	35,93 a	38,85 ab	
100cm	36,55 a	36,91 b	
Produção de Biomassa Seca kg/ha/corte			
Intervalo de corte	Folha	Caule	Total
60 dias	652,11 a	76,4 b	728,5408 ab
75 dias	294,50 b	55,2033 b	349,7122 b
90 dias	860,43 a	240,2269 a	1100,6464 a
População de plantas/ha	Folha	Caule	Total
25.000	729,82 a	96,85 ab	826,68 ab
20.000	782,67 a	189,79 a	972,75 a
15.000	352,20 a	64,82 b	417,03 b
10.000	544,7 a	144,33 ab	689,02 ab
Altura de corte	Folha	Caule	Total
50cm	473,35 a	134,26 a	607,61 a
75cm	675,50 a	138,37 a	813,86 a
100cm	658,19 a	99,23 a	757,42 a

<sup>(1)</sup>MS= Matéria seca; Produção de biomassa seca da folha e caule; Intervalo de corte: 60 dias, 75 dias e 90 dias. População de plantas: 25.000 plantas/ha, 20.000 plantas/ha, 15.000 plantas/ha e 10.000 plantas/ha; Altura de corte: 50cm, 75cm e 100cm. Médias seguidas da mesma letra, nas colunas, não diferem entre si pelo Teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.



**Figura 1.** Curva de regressão dos teores de proteína bruta de folha e caule em função dos intervalos de corte.

## Conclusão

O teor de proteína bruta da cratília (*Cratylia argentea*) decline com o avanço do tempo de rebrota após o corte.

É necessário continuidade do ensaio para que haja homogeneidade da plantas a fim de evitar erros de amostragem.

## Agradecimentos

À Fapitec/SE pela concessão da bolsa de iniciação científica e à Embrapa Tabuleiros Costeiros pelo suporte à pesquisa.

## Referências

SOBRAL, A. J. S.; SOUZA, E. Y. B.; ANDRADE, C. de O.; TETI, H. da S.; ANDRADE, B. M. da S.; RANGEL, J. H. de A.; MUNIZ, E. N. Avaliação da cratília (*Cratylia argentea*) em cultivos adensados ou em consórcio com o capim urocloa (*Urochloa mosambicensis*). In: SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E PÓS-GRADUAÇÃO DA EMBRAPA TABULEIROS COSTEIROS, 6., Aracaju, 2016. **Anais...** Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2016. p. 31.

ARAÚJO FILHO, J. A.; CRISPIM, S.M.A. Pastoreio combinado de bovinos, caprinos e ovinos em áreas de caatinga no Nordeste do Brasil. In: CONFERÊNCIA VIRTUAL GLOBAL SOBRE PRODUÇÃO ORGÂNICA DE BOVINOS DE CORTE, 2002, Concordia, SC. **Anais...** Corumbá: Embrapa pantanal, 2002. p. 1-7.

ARGEL, P. J.; LASCANO, C. E. *Cratylia argentea* (Desvaux) O. Kuntze: Una nueva leguminosa arbustiva para suelos ácidos em zonas subhúmidas tropicales . Revision de literatura. **Pasturas tropicales**, v. 20, n.. 1, 1998.

FISHER, M. J.; RAO, I. M.; THOMAS, R. J. Nutrient cycling in tropical pasture, with special reference the neotropical savannas. In: INTERNATIONAL GRASSLAND CONGRESS, 18., Winnipeg/Saskatoo, 1997. **Proceedings...** Winnipeg/ Saskatoo: Association management centre, 1997. p.371-382.

# Avaliação da produtividade em plantio adensado e da qualidade da forragem de *Moringa oleifera*

Erick Yanomami Barros Souza<sup>1</sup>, Evandro Neves Muniz<sup>2</sup>, Acir José dos Santos Sobral<sup>3</sup>, David Lopes Fernandes<sup>4</sup>, José Henrique de Albuquerque Rangel<sup>5</sup>, Brisa Marina da Silva Andrade<sup>6</sup>, Ubiratan Piovezan<sup>7</sup>, Rafael Dantas dos Santos<sup>8</sup>, Samuel Figueirêdo de Souza<sup>9</sup>, Daniel Oliveira Santos<sup>10</sup>, Cosme Washington Santos de Jesus<sup>11</sup>, Ana Veruska Cruz da Silva<sup>12</sup>

**Resumo** - A *Moringa oleifera* pertence a família moringácea, sendo originária da Índia. É considerada uma planta versátil, pois possui inúmeras finalidades, sendo bastante utilizada na alimentação humana, na indústria de cosméticos, farmacêutica e como recurso forrageiro. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a composição bromatológica da coleção de *M. oleifera* da Embrapa Tabuleiros Costeiros e a qualidade da biomassa de moringa cultivada em plantio em diferentes densidades. Para determinação da composição bromatológica da coleção, foram coletadas folhas de 19 acessos introduzidos no Campo Experimental Jorge do Prado Sobral, em Nossa Senhora da Dores, Sergipe. As análises realizadas foram matéria seca, matéria mineral, extrato etéreo e proteína bruta. Para qualidade e produção da biomassa, foi implantando um experimento em blocos ao acaso com quatro densidades de plantio e cinco repetições, com parcelas de 5 m x 5 m. As densidades foram 10.000 (1 m x 1 m), 20.000 (1 m x 0,5 m), 30.000 (1 m x 0,33 m) e 40.000 (1 m x 0,25 m) plantas/ha. Foram realizados três cortes, no período de crescimento entre 10 de fevereiro de 2017 e 26 de julho de 2017, nos quais foram coletados folhas e caules tenros. As amostras coletadas foram analisadas e processadas pelo Laboratório de Nutrição da Embrapa Tabuleiros Costeiros. As variáveis avaliadas foram produção de matéria verde e seca e os teores de matéria seca e proteína bruta da forragem.

**Termos para indexação:** adensamento, biomassa forrageira.

## Introdução

A produção de forragem no semiárido Nordeste tem como principal fator limitante a restrição hídrica. O crescente estudo por espécies forrageiras que se adaptem as condições climáticas e possuam bom valor nutricional é de extrema importância para manutenção dos sistemas de produção da região e nesse aspecto tem se destacado algumas espécies, citando-se a leucena, gliricídia, guandu, palma forrageira e a moringa.

*Moringa oleifera* Lam. é uma espécie perene originária da Índia, pertencente à família Moringaceae, amplamente cultivada em países tropicais e sub-tropicais, sendo que no Brasil, a moringa foi introduzida como planta ornamental por volta de 1950 e desde então, tem sido amplamente cultivada por ser considerada uma das árvores mais úteis principalmente pelo seu valor alimentar, medicinal, melífero, na indústria de cosmético, fabricação de combustíveis e no tratamento da água (Bezerra et al., 2004). O alto conteúdo de proteína bruta em suas folhas, a presença de níveis adequados de aminoácidos essenciais e os baixos níveis de fatores antinutricionais, aliados a capacidade de rebrota e adaptabilidade a várias condições climáticas, fazem dessa espécie uma promissora opção a ser avaliada na região. (Farias et al., 2008).

O objetivo deste trabalho foi avaliar composição bromatológica dos diferentes acessos de moringa e a produtividade de biomassa de moringa em plantios adensados.

<sup>1</sup>Graduando em Medicina Veterinária, bolsista PIBIC/CNPq, Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

<sup>2</sup>Engenheiro-agrônomo, doutor em Zootecnia, pesquisador da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

<sup>3</sup>Zootecnista, Aracaju, SE.

<sup>4</sup>Médico Veterinário, Aracaju, SE.

<sup>5</sup>Engenheiro-agrônomo, doutor em Agricultura Tropical, pesquisador da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

<sup>6</sup>Graduanda em Zootecnia da UFS, bolsista PIBIC/CNPq, Embrapa Tabuleiros Costeiros, SE.

<sup>7</sup>Zootecnista, doutor em Ecologia, pesquisador da Embrapa Tabuleiros Costeiros.

<sup>8</sup>Médico Veterinário, doutor em Zootecnia, pesquisador da Embrapa Semiárido.

<sup>9</sup>Médico Veterinário, doutor em Zootecnia, analista da Embrapa Tabuleiros Costeiros, SE.

<sup>10</sup>Químico, analista da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

<sup>11</sup>Graduando em Medicina Veterinária, bolsista PIBIC/Fapitec, Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

<sup>12</sup>Engenheira-agrônoma, doutora em Produção Vegetal, pesquisadora da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

## Material e Métodos

Os experimentos foram realizados no Campo Experimental Jorge do Prado Sobral, situado no município de Nossa Senhora das Dores, SE. Foram realizados dois ensaios experimentais, sendo o primeiro a avaliação bromatológica de 19 acessos de moringa e o segundo a avaliação da produtividade e da qualidade da parte aérea de *M. oleifera* cultivada em plantio adensado. Para determinação da composição bromatológica da coleção, foram coletadas folhas e caules tenros de 19 acessos introduzidos no Campo Experimental Jorge do Prado Sobral, em Nossa Senhora das Dores, Sergipe. As análises realizadas foram matéria seca, matéria mineral, extrato etéreo e proteína bruta segundo as recomendações de Silva e Queiroz (2002). Para qualidade e produção da biomassa, foi implantando um experimento em blocos ao acaso com quatro densidades de plantio e cinco repetições, com parcelas de 5 m X 5 m. As densidades foram 10.000 (1 m x 1 m), 20.000 (1 m x 0,5 m), 30.000 (1 m x 0,33 m) e 40.000 (1 m x 0,25 m) plantas/ha. Foi realizada análise e preparo do solo que revelou necessidade de adubação de 60 kg de uréia/ha, 60 kg de super simples e 48 kg de cloreto de potássio. A cada corte a adubação nitrogenada e a potássica foi repetida. Já a adubação fosfatada foi realizada a cada dois cortes. Após corte de uniformização, a moringa foi cortada toda vez que atingiu 1,5 m de altura, deixando-se uma altura de 0,2 m. Foram realizados três cortes, no período de crescimento entre 2 de fevereiro de 2017 e 26 de julho de 2017, nos quais foram coletadas toda parte aérea que foi dividida em folhas e caules tenros. As amostras coletadas foram enviadas ao Laboratório de Nutrição Animal da Embrapa Tabuleiros Costeiros, onde foram beneficiadas através do processo de pré-secagem a 60 °C por 72 horas e moídas em moinho de facas do tipo Willey com peneira com crivos de 1 mm. Avaliou-se o teor de matéria seca, proteína bruta, cinzas e extrato etéreo seguindo a metodologia descrita por Silva e Queiroz (2002). Foram avaliados os seguintes parâmetros: produtividade de matéria verde e seca da parte aérea, relação porcentual de caule/folha e porcentual de PB e MS das folhas e caules. Os dados foram submetidos a análise de variância e quando o modelo mostrou diferença significativa a 5%, foi aplicado teste de Tukey para comparação das médias utilizando o pacote estatístico SAS®.

## Resultados e Discussão

A Tabela 1 contém os dados descritivos da composição química-bromatológica da coleção de *Moringa oleifera* da Embrapa Tabuleiros Costeiros. Os dados referentes a matéria seca variaram de 17,12% (acesso 9) a 23,92% (acesso 14) com média de 21,22%. Quanto aos teores de proteína bruta, os valores variaram de 17,02% (acesso 1) a 22,78% (acesso 11) e média de 19,78%. Os resultados encontrados para extrato etéreo variaram de 4,55% (acesso 15) a 6,37% (acesso 6), com média de 5,45%. Para os teores de cinza os resultados obtidos variaram de 5,40% (acesso 14) a 8,31% (acesso 20), com média de 7,32%. Os dados obtidos mostram variação entre os acessos estudados. O conjunto destes dados, aliados a dados de morfologia destes acessos, pode ajudar a selecionar plantas mais aptas a serem utilizadas em trabalho de melhoramento para obtenção de indivíduos com características superiores em relação a qualidade de forragem. Ainda existem variações que podem ocorrer devido a características do meio ambiente. Em estudos anterior com plantas dessa mesma área, Leão et al. (2014) encontraram valores médios de 19,21% de MS, 23,69% de PB, 7,29% de extrato etéreo e 10,04 de matéria mineral. Esses valores médios são menores para o parâmetro MS e maiores para PB, EE e MM em relação o presente estudo, demonstrando variação entre os diferentes anos de estudo.

**Tabela 1.** Matéria Seca (MS). Proteína bruta (PB), extrato etéreo (EE) e matéria mineral (MM) de acessos pertencentes a Coleção de *Moringa oleifera* da Embrapa Tabuleiros Costeiros, município de Nossa Senhora das Dores, Sergipe.

	MS	PB	EE	MM
	%			
Coleção de moringa-acesso 1	18,17	17,02	4,70	6,24
Coleção de moringa-acesso 2	21,27	20,76	5,47	7,63
Coleção de moringa-acesso 3	21,33	20,20	5,75	6,96
Coleção de moringa-acesso 4	21,28	21,10	5,57	7,18
Coleção de moringa-acesso 5	21,06	21,26	5,24	7,51
Coleção de moringa-acesso 6	22,55	17,13	6,37	8,04
Coleção de moringa-acesso 7	21,48	19,17	5,11	8,00
Coleção de moringa-acesso 8	22,23	19,43	5,20	6,85
Coleção de moringa-acesso 9	17,12	21,86	6,03	7,91
Coleção de moringa-acesso 10	19,88	22,33	4,33	6,49
Coleção de moringa-acesso 11	22,65	22,78	5,64	7,62
Coleção de moringa-acesso 12	20,42	20,65	5,22	7,81
Coleção de moringa-acesso 13	21,75	18,44	4,97	7,58
Coleção de moringa-acesso 14	23,92	21,63	5,35	5,40
Coleção de moringa-acesso 15	20,70	16,12	4,55	7,38
Coleção de moringa-acesso 16	20,97	17,60	6,65	8,29
Coleção de moringa-acesso 17	22,63	17,98	5,20	6,68
Coleção de moringa-acesso 19	21,94	22,39	6,01	7,25
Coleção de moringa-acesso 20	21,74	18,01	6,14	8,31
Médias	21,22	19,78	5,45	7,32

Acesso 18 todos morreram todas as plantas na seca de 2016.

A tabela 2 contém os dados referentes a produtividade em matéria verde e seca em toneladas por corte/hectare, porcentagem de folha e caule na matéria verde, porcentagem de matéria seca na folhas e caules e porcentagem de proteína bruta nas folhas e caule em função das diferentes densidades de cultivo. Para produção de matéria verde e seca da parte aérea foi observada diferença estatística ( $P > 0,05$ ) entre as diferentes densidades, sendo que a densidade de 10.000 plantas/hectare apresentou uma menor produtividade que as densidades de 30.000 plantas/ha e 40.000 plantas/ha e foi semelhante a de 20.000 plantas/ha. Em relação aos parâmetros proteína bruta e relação caule/folha não houve diferenças estatísticas ( $P > 0,05$ ). Em estudo com densidades iguais a deste ensaio, Castro Filho et al. (2016) trabalhando com *Gliricidia sepium* recomendaram a utilização de densidade de 30.000 plantas/ha. Por apresentar maior produção por áreas sem detrimento da qualidade do material produzido. Possivelmente, com a realização de mais corte neste ensaio, seria possível determinar com maior precisão qual a melhor densidade a ser utilizada entre as estudadas.

**Tabela 2.** Médias de produção e características da forragem de Moringa oleífera cultivadas em diferentes adensamentos no município de Nossa Senhora de das Dores, Embrapa Tabuleiros Costeiros, Sergipe.

Tratamentos	Densidades plantas/há				CV%	P
	10000	20000	30000	40000		
Produção MV ton/ha/corte	14,34b	16,98ab	18,28a	17,84a	16,34	0,0012
Produção MS ha/corte	2,71b	3,15ab	3,34a	3,23a	16,69	0,0104
Porcentagem de folha MV	42,84	44,83	44,25	43,78	10,78	0,7013
Porcentagem de caule MV	57,16	55,16	55,74	56,21	8,44	0,7013
% MS Folhas	21,62a	20,16b	19,68b	20,22b	6,67	0,0020
% MS Caules	17,70	17,53	17,23	16,88	7,14	0,2957
% PB folhas	26,67	26,28	27,02	26,50	7,28	0,7604
% PB caules	5,84	5,40	5,41	5,38	10,15	0,0852

Médias nas linhas seguidas de letras diferentes apresentam diferença estatística pelo teste de Tukey a 5% de significância.

## Conclusões

A coleção apresenta variação nos dados bromatológicos, com acessos apresentando valores mais elevados de proteína e extrato etéreo que poderão servir para serem utilizados em processos de seleção de indivíduos com características superiores.

O tratamento com 10.000 plantas por hectare apresenta menor produtividade que os tratamentos com 30.000 e 40.000, com parâmetros de qualidade semelhantes. O tratamento com 20.000 plantas mostrou produtividade semelhante aos demais.

## Agradecimentos

Ao CNPq pela concessão da bolsa e à Embrapa pelo suporte à pesquisa.

## Referências

- BEZERRA A. M. E.; MOMENTÉ, V. G.; MEDEIROS FILHO, S. Germinação de sementes e desenvolvimento de plântulas de moringa (*Moringa oleifera* Lam.) em função do peso da semente e do tipo de substrato. **Horticultura Brasileira**, v. 22, p. 295-299, 2004.
- CASTRO FILHO, E. S.; MUNIZ, E. N.; RANGEL, J. H. A.; SANTOS, G. R. A.; SANTANA NETO, J. A.; ARAUJO, H. R. Dry matter yield and bromatological composition of gliricidia in different crop densities. **Ciência Rural**, v. 46, p. 1038-1043, 2016.
- FARIAS, S. G. G.; FREIRE, A. L. O.; SANTOS, D. R. et al. Respostas de plantas de moringa (*Moringa oleifera* Lam.) inoculadas com fungos micorrízicos e submetidas ao estresse hídrico. **Engenharia Ambiental**, v. 5, n. 3, p. 36-46, 2008.

LEAO, T. D. S.; VIANA, M. D.; NASCIMENTO, A. L. S.; SANTOS, D. O.; MUNIZ, E. N.; SILVA, A. V. C. Características bromatológicas de acessos de moringa. In: IV SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E PÓS-GRADUAÇÃO DA EMBRAPA TABULEIROS COSTEIROS, 4., 2014, Aracaju. **Anais...** Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2014. p. 416-420.

SILVA, D. J.; QUEIROZ, A. C. **Análise de Alimentos** (métodos químicos e biológicos). 3. ed. Viçosa, MG: UFV, 2002. p. 2.



# Emissões de gases de efeito estufa em áreas de cana-de-açúcar colhida crua e queimada

Jeferson Azevedo das Neves<sup>1</sup>, Crislâny Canuto dos Santos<sup>2</sup>, André Felipe Câmara Amaral<sup>3</sup>, Selenobaldo Alexnaldo Cabral de Sant'Anna<sup>4</sup>, Paulo Albuquerque Silva<sup>5</sup>, Walane Maria Pereira de Mello Ivo<sup>6</sup>

**Resumo** - Compromissos do Brasil para redução das emissões de gases de efeito estufa (GEE) pela utilização de práticas mitigadoras na agropecuária nacional fazem com que a geração de informações sobre emissões e fatores de emissão para todas as regiões do país seja de grande importância para subsidiar o Inventário Nacional de Remoções Antrópicas de Gases de Efeito Estufa, bem como alimentar modelos para prospecção de cenários futuros. Para a região Nordeste, poucos dados foram gerados, sendo necessária a intensificação destas medições visando a geração de informações mais completas para o país. Neste sentido, a cultura da cana-de-açúcar tem uma importante representatividade no cenário da agricultura da região, além de fazer parte da RenovaBio, reforçando a necessidade de se conhecer as emissões de GEE vinculadas à cultura. O objetivo do presente trabalho é quantificar fluxos e emissões acumuladas de gases de efeito estufa sob diferentes sistemas de colheita da palhada da cana-de-açúcar e sob sistemas de adubação nitrogenada (adubo verde e fertilizante), em solos de Tabuleiros Costeiros. O trabalho foi conduzido em duas áreas experimentais. Uma das áreas é localizada no município de Rio Largo, Alagoas, onde os tratamentos estudados foram: (1) solo descoberto, (2) solo com cana-de-açúcar cultivada e 0% da palhada deixada em superfície, (3) 50% da palhada e (4) 100% da palhada deixada em superfície. No ano de 2018 foi conduzido o estudo adicional de avaliação das emissões com uso de fertilizante nitrogenado, nesta área experimental, com aplicação de doses de 100 Kg de N/ha, nas parcelas 0% e 100%. A outra área experimental fica no município de Coruripe, e os tratamentos avaliados foram 0% e 100% da palhada deixada em superfície (0 Mg/ha e 15 Mg/ha de palhada), com e sem adubação verde com crotalária espectabilis. As avaliações das emissões foram realizadas com câmaras estáticas e as amostras de ar foram analisadas por cromatografia, em um cromatógrafo equipado com um detector com captura de elétrons ECD (Electron Capture Detection) e um detector de ionização de chama (FID), para quantificar a concentração de CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>O e CH<sub>4</sub> nas amostras de ar. A manutenção da palhada da cana-de-açúcar sobre a superfície do solo favorece maiores emissões de CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>O e CH<sub>4</sub>. Para os anos avaliados, os fluxos de N<sub>2</sub>O são menores que aqueles dos solos cultivados com cana-de-açúcar na região Sudeste. Os estudos envolvendo a adição de fontes de N ao sistema de produção da cana indicam que a utilização de fontes de rápida liberação do N, como a uréia, leva ao aumento dos fluxos de N<sub>2</sub>O no sistema de produção da cana, e que este aumento ocorre de forma mais acentuada com a presença da palhada em superfície. Já na presença de fontes de N de liberação mais lenta (Crotalária), o aumento do fluxo de N<sub>2</sub>O é reduzido na presença da palhada, quando comparado aquele da área sem palha.

**Termos para indexação:** gás carbônico, metano, óxido nitroso, Tabuleiros Costeiros, adubos verdes, crotalária.

## Introdução

No Brasil, no ano de 2015, foram emitidos 1.368 Tg CO<sub>2</sub>eq, sendo a mudança de uso da terra, juntamente com as atividades agropecuárias e florestais responsáveis por 55% do total dessas emissões (Brasil 2017). De acordo com o terceiro Inventário Nacional de Gases de Efeito Estufa (GEE), a agropecuária brasileira é responsável por 74,4% das emissões nacionais de CH<sub>4</sub>, sendo a principal emissão em razão da fermentação entérica dos ruminantes, e por 84,2% das emissões de N<sub>2</sub>O, as quais se devem em sua maioria (80,7%) aos solos agrícolas, em decorrência da deposição de excretas de animais, pela utilização de fertilizantes nitrogenados, adubos orgânicos, decomposição de resíduos culturais, e da mineralização da matéria orgânica. O inventário mostra que houve uma redução significativa das emissões nacionais de CO<sub>2</sub> pelo setor de mudança de uso do solo. Em 2005 esta categoria representava 83,4%, passando a 42%, em 2010.

Compromissos do Brasil para redução das emissões de GEE pela utilização de práticas mitigadoras na agropecuária nacional fazem com que a geração de informações sobre emissões e fatores de emissão para todas as regiões do país seja de grande importância para

<sup>1</sup> Graduando em Agronomia, bolsista CNPq, Embrapa Tabuleiros Costeiros, Unidade de Execução de Pesquisa de Rio Largo (UEP-Rio Largo), Rio Largo, AL.

<sup>2</sup> Engenheira-agrônoma, graduada em Agronomia, Rio Largo, AL.

<sup>3</sup> Químico, mestre em Química, analista da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Unidade de Execução de Pesquisa de Rio Largo (UEP-Rio Largo), Rio Largo, AL.

<sup>4</sup> Biólogo, doutor em Agronomia - Ciência do Solo, bolsista da Embrapa Agrobiologia, Seropédica, RJ.

<sup>5</sup> Engenheiro-agrônomo, doutor em Fitotecnia e Solos, pesquisador da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Unidade de Execução de Pesquisa de Rio Largo (UEP-Rio Largo), Rio Largo, AL.

<sup>6</sup> Engenheira-agrônoma, doutora em Fitotecnia e Solos, pesquisadora da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Unidade de Execução de Pesquisa de Rio Largo (UEP-Rio Largo), Rio Largo, AL.

subsidiar o Inventário Nacional de Remoções Antrópicas de Gases de Efeito Estufa, bem como alimentar modelos para prospecção de cenários futuros. Tais informações sobre as emissões de GEE e sobre os efeitos das práticas com potencial de mitigação das emissões na agropecuária brasileira foram obtidas, principalmente, nas regiões Sul, Sudeste e Centro Oeste (Bayer et al., 2011). Para a região Nordeste, poucos dados foram gerados, sendo necessária a intensificação destas medições para a geração de informações mais completas para o país. Neste sentido, a cultura da cana-de-açúcar tem uma importante representatividade no cenário da agricultura da região, além de apresentar balanço de emissões promissor, principalmente por emissões evitadas. Estas são as emissões que ocorreriam se, na ausência do etanol e do bagaço excedente, a demanda de combustíveis fosse satisfeita por gasolina e óleo combustível. Porém, esses valores podem ainda ser melhorados se o sistema de produção da cana-de-açúcar for trabalhado no sentido de reduzir as emissões reais. Neste caso, preparo do solo e sistema de cultura devem ser implementados visando aumentar o estoque de carbono do solo, já que essas são as duas principais práticas agrícolas que causam impacto nos estoques de carbono (Bayer et al., 2011). Além disto, devem ser reduzidas as emissões relacionadas às fontes de emissão agrícolas como àquelas provenientes de uso de fertilizantes nitrogenados, uso de diesel em operações de máquinas, queima da cana, resíduos (vinhaça, torta de filtro) e calagem. Recentemente, a importância de se conhecer as emissões em cada prática agrícola nas áreas de cana foi reforçada pelo lançamento do RenovaBio, que é uma política de Estado que objetiva traçar uma estratégia conjunta para reconhecer o papel de todos os tipos de biocombustíveis na matriz energética brasileira, tanto para a segurança energética quanto para mitigação de redução de emissões de gases causadores do efeito estufa.

O objetivo do presente trabalho é quantificar fluxos e emissões acumuladas de gases de efeito estufa sob diferentes sistemas de colheita da palhada da cana-de-açúcar e sob sistemas de adubação nitrogenada (adubo verde e fertilizante) em solos de Tabuleiros Costeiros.

## Material e Métodos

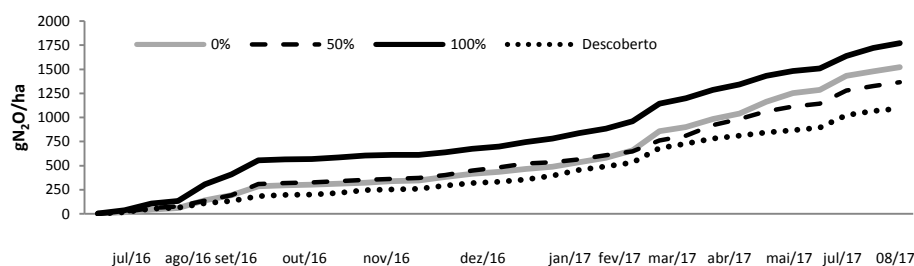
O trabalho foi conduzido em duas áreas experimentais. Uma área experimental localiza-se na Universidade Federal de Alagoas, no município de Rio Largo. O clima da região é tropical litorâneo úmido (As). O solo é classificado como Argissolo Amarelo e a declividade da área é de 8%. A cana-de-açúcar, variedade RB 92579, foi plantada em abril de 2014 e as coletas do experimento de GEE ocorreram para as socarias, nos anos de 2016 e 2017. Os tratamentos estudados foram: parcela descoberta, parcela com cana-de-açúcar cultivada e 0% da palhada deixada em superfície, 50% da palhada em superfície e 100% da palhada em superfície, o que equivaliu a: 0 Mg/ha, 7,5 Mg/ha e 15 Mg/ha de palhada em superfície, no ano da instalação. As 11 parcelas foram distribuídas no campo em blocos ao acaso, com 3 repetições para T0%, T50% e T100%, e 2 repetições para TDESC. No ano de 2018 foi conduzido o estudo adicional de avaliação das emissões com uso de fertilizante nitrogenado, nesta área experimental, com aplicação de doses de 100 Kg de N/ha, nas parcelas 0% e 100 %. A outra área experimental pertence à Usina Coruripe e localiza-se no município de Coruripe, Alagoas. A temperatura média anual é de 27 °C, com média das máximas de 32 °C e das mínimas de 21 °C. A precipitação pluvial média anual é de 1500 mm. A área de estudo vem sendo cultivada com cana-de-açúcar colhida crua, e permanência de diferentes proporções de palhada sobre o solo, desde o ano de 2009. O solo desta área é classificado como Argissolo Amarelo distrocoeso fragipânico e a variedade cultivada foi a RB 92 579. A instalação do segundo ciclo do experimento, com renovação do canavial, ocorreu no ano de 2016. O experimento em blocos ao acaso é composto por 4 blocos, com parcelas de 12 linhas de cana, com 10 metros de comprimento. Estas parcelas foram subdivididas em parcelas menores com 4 linhas de 10 metros de comprimento, nas quais se estabeleceram os seguintes tratamentos: 0% e 100% da palhada deixada em superfície do solo (0 Mg/ha e 15 Mg/ha), com e sem adubação verde com crotalaria espectabilis. A leguminosa foi plantada no dia 14 de junho de 2016 e o sulcamento da área para plantio da cana e acamamento da crotalaria na superfície do solo se deu em 21 de setembro de 2016, em seguida realizou-se o plantio da cana (3 de outubro de 2016). A adubação de fundação foi com 600 kg/ha da fórmula 9-25-20 e a adubação em cobertura com a aplicação de 90 kg de K<sub>2</sub>O, na forma de KCl. Houve suplementação hídrica com duas lâminas de 60 mm, aplicadas por ocasião do plantio e da adubação em cobertura. O corte da cana foi manual e o carregamento mecanizado.

Foram instaladas câmaras estáticas em cada parcela experimental para a amostragem das emissões de GEE, sendo posicionadas na entrelinha de plantio da cana-de-açúcar. Cada câmara era composta por uma base retangular de 55 cm x 35 cm de metal, inserida no solo até 5 cm de profundidade e tampa de plástico/metal, que foram vedadas lateralmente com água, durante as amostragens. As amostras foram coletadas com auxílio de seringas de polipropileno de 60 mL sendo os gases diretamente transferidos para tubo labco de 12 mL com tampa rosqueável de duplo septo, previamente submetidos a vácuo. Para as medições dos fluxos de CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub> e N<sub>2</sub>O foram coletadas amostras de ar em quatro tempos: 0, 15, 30 e 45 minutos, para a área de Rio Largo e 0, 20 e 40 minutos, para a área de Coruripe. Os frascos com as amostras de ar foram enviados para análise no Laboratório da Embrapa Tabuleiros Costeiros, UEP-Rio Largo, AL, sendo analisadas por cromatografia, em um cromatógrafo equipado com um detector com captura de elétrons ECD (Electron Capture Detection) e um detector de ionização de chama (FID), para quantificar a concentração de CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>O e CH<sub>4</sub>. A precipitação pluvial, temperatura e a umidade do solo foram aferidas por ocasião das amostragens. Os fluxos dos gases foram calculados pela equação:  $N_2O = \delta C / \delta t \times V / A \times M / V_m$  em que: o fluxo do gás é expresso em  $\mu g / m^2 / h$ ;  $\delta C / \delta t$  é a variação da concentração do gás, entre  $t_0$  e  $t_1$  (hora); V é o volume da câmara ( $m^3$ ); A é a área da câmara ( $m^2$ ); M é a massa atômica de N/C na molécula de N<sub>2</sub>O, CO<sub>2</sub> ou CH<sub>4</sub> (mg); e  $V_m$  é o volume molecular na temperatura de amostragem ( $dm^3$ ). Análises descritivas (média ± erro padrão da média) foram empregadas nos fluxos diários e totais dos gases.

## Resultados e Discussão

### Emissão de GEE x Manejo da palhada da cana-de-açúcar

Os fluxos de C-CO<sub>2</sub> variaram de valores negativos, em raras ocasiões, até 117.728,02 ug de C-CO<sub>2</sub>/m<sup>2</sup>/h. Tais valores foram semelhantes ao encontrados por Oliveira et al. (2013), para a região Sudeste (Piracicaba), porém ficaram abaixo que aqueles encontrados por Mello Ivo (2012), para solos de tabuleiro (50 mg e 300 mg de C-CO<sub>2</sub>/m<sup>2</sup>/h) e Carmo et al. (2012), na região de Piracicaba; indicando a necessidade de avaliação das condições ambientais e de manejo para melhor entendimento das diferenças encontradas. A partir destes fluxos, emissões acumuladas de CO<sub>2</sub> foram calculadas, indicando emissão de 13 Mg, 0 Mg; 20,6 Mg; 23,2 Mg e 25,5 Mg de CO<sub>2</sub>/ha para o solo DESCOBERTO, com 0%, 50% e 100% de palhada sobre a superfície, respectivamente, equivalendo à emissão de 3,5 Mg; 5,6 Mg; 6,2 Mg e 6,9 Mg de C-CO<sub>2</sub>/ha/ano, originárias da respiração autotrófica e heterotrófica do solo. Tais valores são semelhantes aos determinados por Carmo et al. (2012), indicando que mesmo com fluxos médios mais elevados, a frequência de ocorrência de fluxos mais ou menos intensos, poderá gerar em emissões acumuladas similares. Emissões cumulativas de N<sub>2</sub>O geralmente aumentam com a aplicação da palhada. Em estudo com avaliação de diferentes níveis de palhada sobre a superfície do solo, Carmo et al. (2012) encontraram fluxos de N-N<sub>2</sub>O muito mais elevados que os do presente trabalho. No referido estudo, os fluxos nas parcelas dos tratamentos só foram significativamente maiores do que os das parcelas controle quando havia 14 Mg de palhada/ha ou mais sobre a superfície do solo, o que equivalia a manutenção de 75% e 100% da palhada. De forma similar, no presente estudo, as emissões acumuladas da área com 50% estiveram mais próximas do controle (Figura 1) e o tratamento com 100% da palhada apresentou os maiores valores, com emissão acumulada de 1.769,8 g de N<sub>2</sub>O/ha; valor este aproximadamente duas vezes menor que o encontrado no estudo de Carmo (2012). Os fluxos de CH<sub>4</sub> apresentaram-se negativos durante quase todo o ciclo nas parcelas com solo descoberto e, das 30 datas medidas, em apenas cinco datas houve emissão de CH<sub>4</sub> do solo, com os fluxos variando de -26,44 a + 12,97 ug de C-CH<sub>4</sub>/m<sup>2</sup>/h.



**Figura 1.** Emissões acumuladas de N<sub>2</sub>O sob diferentes proporções de palhada de cana-de-açúcar deixadas na superfície do solo (0%, 50%, 100% e solo descoberto), em Rio, Largo, AL.

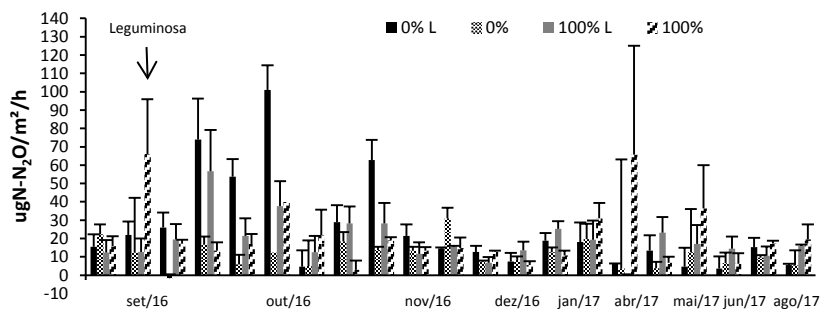
Da mesma forma, para o tratamento 0% de palhada, os fluxos foram negativos, havendo emissões sob este tratamento a partir do início das chuvas, no mês de março. Por outro lado, os fluxos nas parcelas com a presença da palhada em superfície apresentaram-se negativos em apenas cinco datas, tendo os mesmos variado de -12,79 a + 111,26 ug C-CH<sub>4</sub>/m<sup>2</sup>/h, com metade da palhada sobre a superfície e -8,42 a + 156,49 ug de C-CH<sub>4</sub>/m<sup>2</sup>/h, para os 100%. As maiores taxas de elevação das emissões acumuladas de metano aconteceram no período de maio a agosto, quando ocorreram elevados volumes de chuva na região dos Tabuleiros de Alagoas (1.839 mm), estabelecendo, possivelmente, condições de anaerobiose no solo, indicada pelos maiores níveis de umidade detectados sob estes tratamentos. Diferentemente da falta de padrão na emissão de metano, para os diferentes níveis de palhada sobre o solo, encontrado por Carmo et al. (2012), o presente estudo mostrou que em anos muito chuvosos, os solos de Tabuleiros podem se apresentar como emissores de CH<sub>4</sub>, chegando a valores variando de 1.958,0 g a 15.110,9 g CH<sub>4</sub>/ha/ano.

### Emissão de GEE X adubo verde e fertilização nitrogenada

Como a produção de N<sub>2</sub>O pela nitrificação ou desnitrificação depende do N disponível no solo, a aplicação de fertilizante e resíduos é um controlador importante das emissões de N<sub>2</sub>O. De acordo com Alves et al. (2012), as emissões de N<sub>2</sub>O também tem forte relação com a umidade do solo ou o seu grau de saturação de água e com a temperatura, uma vez que para muitos processos biológicos observam-se valores de Q<sub>10</sub> da ordem de 2 a 3. Ainda segundo estes autores, quando a disponibilidade de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> e NO<sub>2</sub><sup>-</sup> é alta, o carbono orgânico é o fator limitante às reações de desnitrificação. Assim, a prática de utilização de adubos verdes em rotação com a cana-de-açúcar deverá aumentar as emissões de GEE. Porém, de acordo com Bayer et al. (2011), uma forma de reduzir emissões de N<sub>2</sub>O para a atmosfera pode ser a substituição parcial da adubação nitrogenada pela utilização de leguminosas, uma vez que a liberação mais lenta do N contido no resíduo vegetal, comparativamente com o N inorgânico, provavelmente permite que o N mineral seja gradativamente absorvido pelas plantas em desenvolvimento, reduzindo, assim, o potencial de emissão de N<sub>2</sub>O.

Imediatamente após o acamamento da crotalaria, usada em rotação com a cana, no município de Coruripe, o fluxo de C-CO<sub>2</sub> aumentou nas parcelas com 0% e 100%, por um período de até 16 dias após esta operação. Da mesma forma, o fluxo de N-N<sub>2</sub>O elevou-se, mas esta elevação só iniciou no sexto dia após a incorporação da leguminosa ao sistema de produção, tempo este necessário para que o início do processo de mineralização e disponibilização do nitrogênio na forma de NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup> ocorresse,

estendendo-se a ocorrência de fluxos mais elevados por um período de 45 dias. Em estudo sobre quantificação de emissões de óxido nitroso em áreas de rotação com culturas de cobertura, Gomes et al. (2009) também observaram maiores emissões em um curto período de 45 dias após o manejo das plantas de cobertura. Os valores dos fluxos determinados por estes autores variaram 10 a 120  $\mu\text{g N-N}_2\text{O}/\text{m}^2/\text{h}$ , na presença de ervilhaca, e até 165  $\mu\text{g N-N}_2\text{O}/\text{m}^2/\text{h}$  sob guandu, situando-se próximo aos determinados no presente estudo. Após a adição do adubo verde, os fluxos nas parcelas com a manutenção dos resíduos em superfície foram menores que aqueles das parcelas sem a presença da palhada, indicando que pode ter havido imobilização temporária do nitrogênio nas áreas com 100% dos resíduos, diminuindo, assim, a intensidade dos fluxos iniciais sob esta condição. O que reforça a idéia da ocorrência de liberação mais lenta do N contido no resíduo vegetal sob este tratamento. Os fluxos de C-CH<sub>4</sub> nesta área apresentaram-se bastante variáveis, não possibilitando visualização de nenhuma tendência. No ano de 2018 foi conduzido o estudo de avaliação das emissões com uso de fertilizante nitrogenado, na área de Rio Largo. Dados iniciais mostram que uso de fertilizante nitrogenado, aliado à cobertura dos resíduos culturais, resultou em maiores emissões de N<sub>2</sub>O do solo para a atmosfera, como constatado por outros estudos (Lopes et al., 2017; Carmo et al., 2012).



**Figura 2.** Fluxos de N<sub>2</sub>O após o acamamento de crotalária espectabilis, utilizada em rotação com cana-de-açúcar, em parcelas com 0% e 100% de palhada deixada na superfície de um Argissolo Amarelo, em Coruripe (AL). As barras representam o erro padrão da média.

De acordo com estes autores, estudos comprovam que as maiores emissões de N<sub>2</sub>O do solo se concentram após a fertilização nitrogenada, nos períodos de maior precipitação; e, quando os solos não apresentam condições limitantes de disponibilidade de N e o espaço poroso saturado por água é maior que 60%, ocorre o predomínio do processo de desnitrificação. No presente estudo, aplicação de fertilizante nitrogenado na forma de uréia, em um Argissolo Amarelo, alterou os fluxos de N-N<sub>2</sub>O, elevando os mesmos, os quais variaram de -8,37 a 52,39  $\mu\text{g N-N}_2\text{O}/\text{m}^2/\text{h}$  sob o tratamento 0% e de -8,37 a 143,60  $\mu\text{g N-N}_2\text{O}/\text{m}^2/\text{h}$  em 0% + uréia. Nas parcelas com a palhada em superfície, a variação foi de 11,04 a 43,19  $\mu\text{g N-N}_2\text{O}/\text{m}^2/\text{h}$  em 100% e 10,91 a 573,0  $\mu\text{g N-N}_2\text{O}/\text{m}^2/\text{h}$  em 100% + uréia.

## Conclusões

- A manutenção da palhada da cana-de-açúcar sobre a superfície do solo favorece maiores emissões de CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>O e CH<sub>4</sub>.
- Para os anos avaliados, os fluxos de N<sub>2</sub>O são menores que aqueles dos solos cultivados com cana-de-açúcar na região Sudeste.
- Os estudos envolvendo a adição de fontes de N ao sistema de produção da cana indicam que a utilização de fontes de rápida liberação do N, como a uréia, leva ao aumento dos fluxos de N<sub>2</sub>O no sistema de produção da cana, e que este aumento ocorre de forma mais acentuada com a presença da palhada em superfície. Já na presença de fontes de N de liberação mais lenta (Crotalária), o aumento do fluxo de N<sub>2</sub>O é reduzido na presença da palhada, quando comparado aquele da área sem palha.

## Referências

ALVES, B. J. R., CARVALHO, A. M. de; JANTALIA, C. P.; MADARI, E. E.; URQUIAGA, S.; SANTOS, J. C. F. dos; SANTOS, H. P. dos; CARVALHO, C. J. R. de. Emissões de óxido nitroso e óxido nítrico dos solos em sistemas agrícolas. In: LIMA, M. A. BODDEY, R. M.; ALVES, B. J. R.; MACHADO, P. L. O. de A.; URQUIAGA, S. (Ed.). **Estoques de carbono e emissões de gases de efeito estufa na agropecuária brasileira**. Brasília, DF: Embrapa, 2012. p. 159-192, 2012.

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. Estimativas anuais de emissão de gases de efeito estufa no Brasil. 4ª ed. **Ministério da ciência e inovação**, 2017.

BAYER, C. AMADO, T. J. C.; TORNQUIST, C. G.; CERRI, C. E. P.; DIECKOW, J.; ZANATTA, J. A.; NICOLOSO, R. da S.; CARVALHO, P. C. de F. Estabilização do carbono no solo e mitigação das emissões de gases de efeito estufa na agricultura conservacionista. In. FILHO, O. K.; MAFRA, A. L.; GATIBONI, L. C. **Tópicos em ciência do solo**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, v.7, p.55-118, 2011.

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

GOMES, J.; BAYER, C.; COSTA, F. de S.; PICCOLO, M. de C.; ZANATTA, J. A.; VIEIRA, F. C. B.; SIX, J. Soil nitrous oxide emissions in long-term cover crops-based rotations under subtropical climate. **Soil & Tillage Research**, v. 106, n. 1, p. 36-44, Dec. 2009.

LOPES, I. M.; PINHEIRO, E. F. M.; LIMA, E.; CEDDIA, M. B.; CAMPOS, D. V. B. de; ALVES, B. J. R. Emissões de N<sub>2</sub>O em solos sob cultivo de cana-de-açúcar no Bioma Mata Atlântica: efeito dos sistemas de colheita e da adubação com vinhaça. **Revista Virtual de Química**, v. 9, n. 5, p. 1930-1943, set./out. 2017.

OLIVEIRA, B. G.; CARVALHO, J. L. N.; CERRI, C. E. P.; CERRI, C. C.; FEIGL, B.J. Soil greenhouse gas fluxes from vinasse application in Brazilian sugarcane areas. **Geoderma**, v. 200-201, p.77-84, 2013.

# Estudo prospectivo de mercado e identificação de tendências da agroindústria na comercialização de produtos e subprodutos do coqueiro

Bruna Grazielly de J. Silva<sup>1</sup>, Maria Geovania L. Manos<sup>2</sup>

**Resumo** - No período de 2012 a 2016, a produção mundial de cocos manteve-se estável, na ordem de 61, 87 a 59,01 milhões de toneladas, ocupando cerca de 12,03 a 12,17 milhões de hectares plantados (FAO, 2018)<sup>3</sup>. A Ásia destaca-se como principal região produtora (78,97%), seguida da América do Sul (5,10%) e do Caribe (1,25%), segundo dados de 2016. Nesse mesmo ano, o Brasil ocupou a sexta posição mundial em área plantada (1,92% ou 234,02 mil hectares) e a quarta em produção (4,49% ou 2,65 milhões de toneladas). No país, o valor da produção alcançou R\$ 1,13 milhão em 2016, o equivalente a 2,03% do total produzido pelas lavouras permanentes (IBGE/PAM, 2018). Além disso, a produção de coco é considerada de grande importância econômica e social em virtude da ampla variabilidade de produtos e coprodutos que podem ser obtidos a partir dos frutos e de outras partes da planta. Todavia, até o ano de 2017 os dados sobre exportações e importações brasileiras desses produtos não eram de fácil acesso e, ainda atualmente, são escassas as informações sobre a diversidade e a dinâmica com a qual são disponibilizados pela indústria alimentícia no mercado nacional. Consultas a entidades de representação da cadeia de frutas e processados, bem como a uma consultora internacional, demonstraram que não há dados formais gratuitos disponíveis sobre consumo e preço dos produtos e coprodutos do coqueiro no Brasil. Ao mesmo tempo, estão em curso pesquisas sobre melhoramento genético, sistemas de produção do coqueiro e outros temas associados à produção em campo. Assim, observou-se a necessidade de sistematizar informações que colaborem para que analistas e pesquisadores possam direcionar essas pesquisas a partir do conhecimento mais amplo das características desse mercado, especialmente no que refere à diversidade de produtos, marcas e empresas que atuam no setor alimentício. Com esse intuito, o presente trabalho buscou sistematizar informações atuais sobre produção, exportação, importação e tendências de mercado. Para isso, baseou-se em buscas em bases de dados secundários, associando-as a outros estudos (em curso) que envolvem consultas a especialistas. Assim, além da evolução das exportações e importações brasileiras no período de 2012 a 2016, foi possível identificar 54 produtos alimentícios obtidos a partir do coco (também chamados de formas de apresentação) e 68 marcas atuantes no mercado brasileiro. Ao associar produtos e marcas, foi possível conhecer quantas marcas comercializam determinado produto. Vinte e quatro delas, por exemplo, comercializam água de coco. Essa informação fortalece a ideia de que a agroindústria tem um potencial de determinação sobre a demanda dos consumidores internos e, portanto, assim como no mercado internacional, influenciam os demais elos da cadeia produtiva. Logo, as pesquisas em melhoramento genético e em sistemas de produção do coqueiro no Brasil podem levar em conta esses elementos para aprimorar sua participação no processo de alinhamento entre os interesses dos produtores no campo e as demandas da indústria processadora de alimentos.

**Termos para indexação:** Brasil, coco, coprodutos, exportações e importações, marcas, mercado.

## Introdução

Segundo dados da FAO (2018), em 2016 o coco foi cultivado em 12,20 milhões de hectares, em 95 países, com destaque para Filipinas (29,30%), Indonésia (25,52%), Índia (17,72%), Tanzânia (6,02%), Sri Lanka (3,36%) e Brasil (1,92%). No mesmo ano, a produção mundial registrada foi de 59,3 milhões de toneladas e o Brasil (quarto produtor mundial) alcançou 2,56 mil toneladas (4,49%), antecedido por Indonésia (30,03%), Filipinas (23,43%) e Índia (18,86%).

Todavia, o Sindicato Nacional dos Produtores de Coco do Brasil utiliza dados oficiais do IBGE para chamar atenção quanto à redução recente do total de área plantada (9%, na comparação de dados dos anos 2012 e 2016) e de produção (10%) nas regiões

<sup>1</sup>Graduanda em Engenharia de Produção, bolsista da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

<sup>2</sup>Economista, Doutora em Ciências Sociais em Desenvolvimento, Agricultura e Sociedade (Análise de Políticas Públicas), analista da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

<sup>3</sup>Os dados da *Food and Agriculture Organization* (FAO) não fazem distinção entre as espécies de coco. No Brasil, os dados são disponibilizados especificamente para 'coco-da-baía' e os valores correspondem aos publicados pela FAO quanto à área, mas divergem quanto à produção, pois esta seria da ordem de 1,67 milhões de toneladas (IBGE/PAM, 2018).

do país. O documento também caracteriza a preocupação dos produtores com o crescimento das importações brasileiras<sup>4</sup> de água de coco<sup>5</sup> e de coco ralado (SINDCOCO, 2017).

Dados referentes a 2017 demonstram que Filipinas (90,5% da água de coco) e Indonésia (70,49% do coco ralado) são as principais origens de importação desses alimentos pelo Brasil (Comex Stat/MDIC, 2018) e, portanto, concorrem diretamente pelo mercado consumidor nacional. Todavia, esses países, assim com a Índia, costumam destinar sua produção principalmente para produção da copra (polpa branca comestível) e óleo. Por outro lado, consultas a especialistas indicam que o principal destino dos frutos brasileiros é a agroindústria nacional, com destaque para os produtos tradicionais como coco ralado e leite de coco (obtidos a partir do coco seco, maduro), e água in natura ou envasada, obtida a partir do coco verde (imaturo).

Apesar de os dados disponíveis sobre a água de coco não dimensionarem o mercado interno, mas apenas as importações e exportações, autores como Martins e Jesus Júnior (2014) e Cavalcante (2015), bem como por especialistas desse mercado consultados, consideram que a água de coco tem apresentado crescimento do consumo nos mercados interno e externo – fato associado à popularização e internacionalização de seu consumo e ao aumento da demanda por bebidas naturais e saudáveis em geral. Pode-se acrescentar a isso a diversificação de produtos que o setor agroindustrial tem promovido a partir de *blends* com sucos de frutas e as novas embalagens que multiplicam as formas de disponibilizar o produto e estimulam o consumo da água e de outros produtos do coco no mercado interno.

Nesse contexto, o coco é visto com um produto com alta valorização econômica e, de fato, no Brasil o cultivo do coqueiro tem se expandido para regiões não tradicionais. Desde a sua introdução, pelo estado da Bahia, expansão pelo litoral nordestino – onde os maiores produtores (Bahia, Ceará e Sergipe) concentraram 58,6% da produção em 2016 (IBGE/PAM, 2018) – a produção disseminou-se pelos demais estados, com exceção de Amapá, Rio Grande do Sul, Paraná e Distrito Federal.

Conforme discute Cavalcante (2015), a cocoicultura brasileira tem passado por uma reestruturação produtiva, caracterizada, além dos pontos já destacados, pelo uso de novas tecnologias de cultivo, inclusive a utilização em grandes áreas de cultivares obtidas por melhoramento genético convencional, e pelo importante papel da agroindústria sobre a oferta de novos produtos.

Nesse cenário, o mercado interno ganha relevância e a indústria alimentícia torna-se protagonista por meio do desenvolvimento de novos produtos (também chamados de formas de apresentação), embalagens, usos e formas de consumo do coco, da água de coco e seus coprodutos, conforme sistematizado na Figura 3.

Nesse contexto, o presente estudo tem por objetivo sistematizar informações atuais sobre produção, exportação, importação e tendências de mercado. Este trabalho pretendia ainda dimensionar o consumo interno de produtos da água de coco e de derivados do fruto. Todavia, os esforços de consultas a associações de representação desse mercado<sup>6</sup>, bem como a uma consultoria internacional, indicaram que não há dados públicos disponíveis.

Ao mesmo tempo, estão em curso pesquisas sobre melhoramento genético, sistemas de produção do coqueiro e outros temas associados à produção em campo e espera-se que as informações disponibilizadas no presente estudo, bem como os debates que a equipe tem promovido em torno dos temas e resultados, colaborem para que analistas e pesquisadores possam direcionar aquelas pesquisas considerando também características desse mercado, especialmente no que refere à diversidade de produtos, marcas e empresas que atuam no Brasil – utilizando-se, portanto, de elementos que vão além das tradicionais sistematizações relativas à produção agrícola da cultura no país e a consultas a especialistas que atuam apenas nesse segmento.

<sup>4</sup>Conforme Martins e Jesus Júnior (2014), há um extenso debate promovido por produtores e agroindústria a respeito das salvaguardas, extintas em agosto de 2012, e de intervenções por meio de aumento de impostos de importação que visam constranger a entrada do produto estrangeiro.

<sup>5</sup>Até o final do ano de 2017, as análises sobre água de coco importada pelo Brasil utilizavam o termo 'suposta água de coco', pois não havia um código específico na Nomenclatura Comum do Mercosul (NCM). Em 2017 foram criadas as NCMs 'água de coco', 'água de coco não concentrada' e 'água de coco concentrada'. Esta última é a forma registrada de importação e exportação e, para ser consumida, deve ser diluída na proporção de um kg para dez kg de água (SINDCOCO, 2017). Em 2017 esses dados eram ainda subdivididos de acordo com o *brix* (superior ou não superior a 7,4), mas a partir de 2018 todos os dados referentes às exportações brasileiras de água de coco estão na categoria '*brix* não superior a 7,4'.

<sup>6</sup>Foram realizadas consultas ao Instituto Brasileiro da Fruta (IBRAF), Associação Brasileira das Indústrias de Refrigerantes e de Bebidas não Alcoólicas (ABIR), Associação Brasileira de Embalagem (ABRE) e Associação Brasileira das Indústrias de Alimentação (ABIA).

## Material e Métodos

O levantamento atualizado de dados sobre área plantada, quantidade produzida e valor da produção mundial e por países foi realizado na base FAO Stat. Já os dados nacionais foram obtidos nas bases do IBGE, consultando-se a Pesquisa Agrícola Municipal (PAM), atualizada anualmente, utilizando-se o Sistema de Recuperação Automática (SIDRA).

No que se refere aos dados sobre exportação e importação de produtos de cocos, foram realizadas consultas na então base de dados Análise das Informações de Comércio Exterior (ALICEWeb), disponibilizado pela Secretaria de Comércio Exterior, do Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio (MDIC). O AliceWeb, com base na Nomenclatura Comum do Mercosul (NCM) de oito dígitos, disponibilizava 14 categorias referentes ao coco<sup>7</sup>.

O intervalo da consulta abrangeu inicialmente o período de 1997 a 2017 para os principais países importadores de coco e coprodutos e, uma vez que o sistema não disponibilizava dados agrupados de forma a facilitar análises e comparações, foram montadas tabelas com esse intuito. Todavia, em maio de 2018, o MDIC lançou o Comex Stat<sup>8</sup>, substituindo o ALICEWeb<sup>9</sup>, porém mantendo as categorias e produtos e, desde então, disponibilizando diretamente consultas e tabelas coesas.

No que se refere à análise de tendências de produtos no mercado nacional do coco, foi realizado o mapeamento de produtos, coprodutos, marcas e empresas utilizando-se de buscas em bases de dados secundários, pesquisas por palavras-chaves na internet e visitas a lojas especializadas em ‘produtos naturais’ localizadas na cidade de Aracaju. Essas informações foram ainda associadas a outras, obtidas por meio de consultas a especialistas realizadas no âmbito de um projeto, em curso, coordenado pela Embrapa<sup>10</sup>.

Assim, alimentou-se uma planilha contendo ‘nome da empresa’, ‘descrição’, ‘localização da sede’ e o endereço eletrônico dessas fontes (geralmente, o *site* principal da empresa). Em seguida, utilizando o recorte para o setor alimentício, foi possível associar quais produtos e quais marcas estão ligadas a cada empresa, bem como demonstrar a variedade de produtos ofertados atualmente no Brasil por meio de diagramas (figuras) elaboradas com o uso dos softwares livres online (aplicativo de diagramação plataforma que disponibiliza ferramentas como mapas mentais e fluxogramas).

## Resultados e Discussão

Segundo dados da FAO (2018), em 2016 o coco foi cultivado em 12,20 milhões de hectares, em 95 países, com destaque para Filipinas (29,30%), Indonésia (25,52%), Índia (17,72%), Tanzânia (6,02%), Sri Lanka (3,36%) e Brasil (1,92%). No mesmo ano, a produção mundial registrada foi de 59,3 milhões de toneladas e o Brasil (quarto produtor mundial) alcançou 2,56 mil toneladas (4,49%), antecedido por Indonésia (30,03%), Filipinas (23,43%) e Índia (18,86%).

Considerando o recorte temporal dos últimos dez anos (2007 a 2016), observa-se que a área plantada e a produção mundial mantêm-se praticamente constantes, em torno de 60 milhões de hectares e 59 milhões de toneladas (FAO STAT, 2018). Porém, no Brasil, essa dinâmica tem se mostrado diferente, especialmente nos últimos cinco anos. Comparando-se os dados do IBGE/PAM (ano-base 2012), observa-se que em 2016 houve retração na área destinada à colheita na ordem de 10%, refletindo as reduções nas regiões Centro-Oeste (29%), Norte (11%), Sudeste (11%) e Nordeste (7%), com crescimento de apenas 0,4% no Sul. Movimento semelhante, porém mais acentuado, ocorre em relação à quantidade produzida, conforme Tabela 1, a seguir.

A exceção é o Nordeste, indicando que a região pode estar aumentando sua produtividade.

<sup>7</sup>Cocos, frescos ou secos, dessecados; Cocos secos, sem casca, mesmo ralados; Outros cocos secos; Cocos frescos; Cocos na casca interna (endocarpo); Óleo de coco (óleo de copra); Outros óleos de coco (óleos de copra); Água de coco (*Cocos nucifera*) com valor Brix não superior a 7,4; Água de coco (*Cocos nucifera*) com valor Brix superior a 7,4; Tortas e outros resíduos sólidos, de coco ou de copra; Cairo (fibras de coco) em bruto; Cairo (fibras de coco) trabalhado, não fiado, estopas, desperdícios; Fios de cairo (fios de fibras de coco); Revestimentos para pisos (pavimentos), de cairo.

<sup>8</sup><http://comexstat.mdic.gov.br/pt/geral>

<sup>9</sup><http://aliceweb.desenvolvimento.gov.br/>.

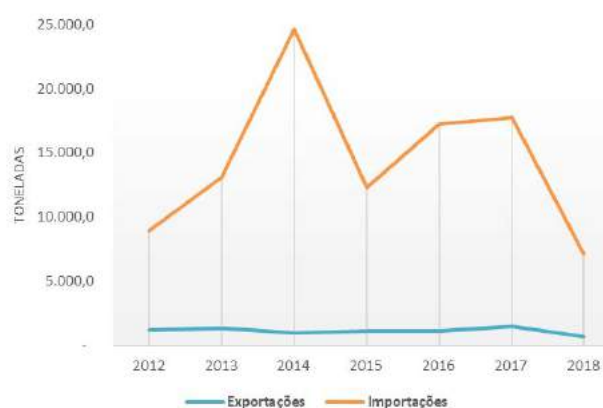
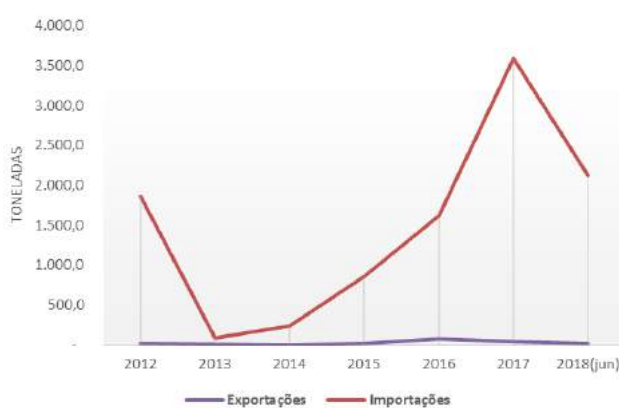
<sup>10</sup>A pesquisa em curso coordenada pela equipe do Setor de Prospecção e Avaliação de Tecnologias (SPAT), da Embrapa Tabuleiros Costeiros, iniciada em setembro de 2016 sob o título resumido ‘Projeto Coco Driver’, tem realizado prospecções de demandas com alguns atores da cadeia produtiva do coco, especialmente produtores, no Nordeste brasileiro. Um dos elementos consultados refere-se às tendências de mercado percebidas por esses atores.



**Tabela 1.** Brasil: quantidade produzida de Coco (toneladas) por regiões (2012 – 2016)

País e Grande Região	2012	2013	2014	2015	2016	Comparação 2016/2012
Brasil	1.954.354	1.926.857	194.6073	178.5805	1.766.164	0,90
Norte	252.406	233.960	231.242	223.728	195.378	0,77
Nordeste	1.345.962	1.348.238	1375.672	1.290.934	1.355.267	1,01
Sudeste	315.714	311.815	307.927	240.316	189.678	0,60
Sul	3.082	2.459	2.714	2.921	1.363	0,44
Centro-Oeste	37.190	30.385	28.518	27.906	24.478	0,66

Associadas a esses dados, as informações sobre importações brasileiras de cocos ralados e óleos de coco (geralmente obtidos a partir do coco maduro ou seco) indicam elevação da entrada de produtos estrangeiros em alguns períodos, conforme demonstram as Figuras 1 e 2, a seguir.

**Figura 1.** Brasil: Importações e Exportações de cocos secos, sem casca mesmo ralados; frescos; na casca interna; outros cocos secos/cocos frescos (2012 – jun.2018).**Figura 2.** Brasil: Importações e Exportações de óleos de coco (2012 – jun.2018)

Fonte: Comex Stat. Elaboração Própria

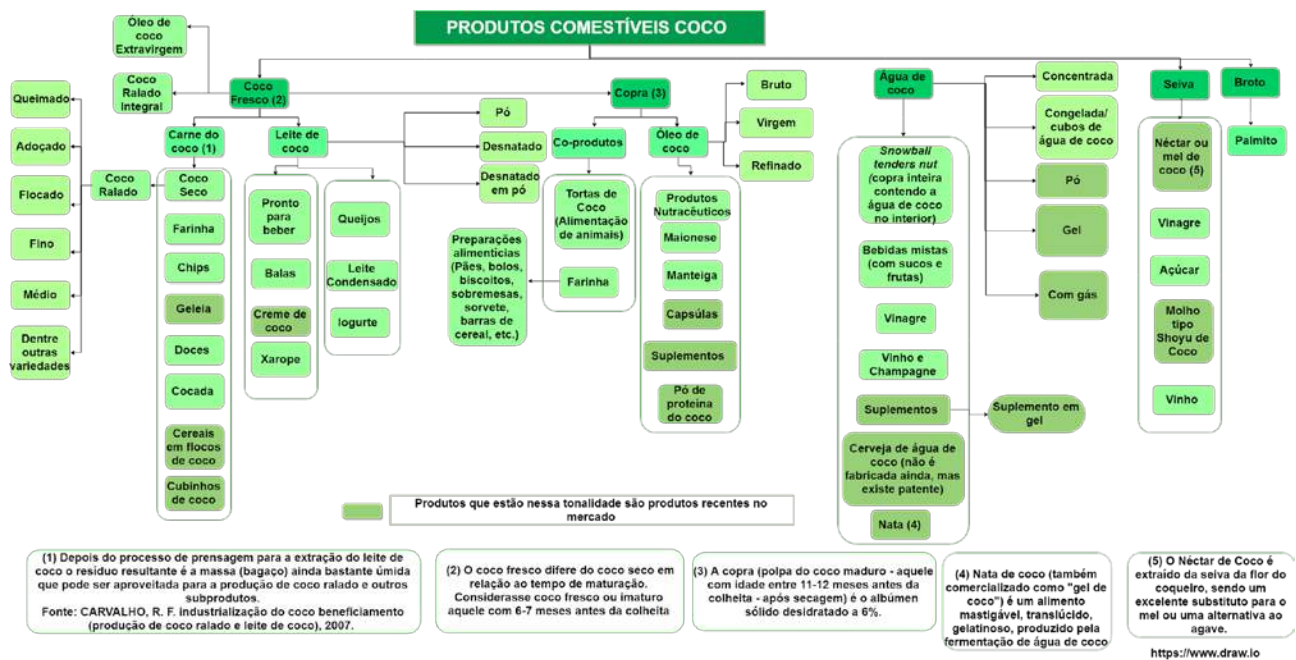
Por outro lado, a água de coco (obtida a partir do coco imaturo, também chamado de verde), embora os dados disponíveis se limitem ao período de janeiro de 2017 a junho de 2018, demonstram movimento inverso. Ou seja, crescimento nas exportações brasileiras, conforme Tabela 2.

**Tabela 2.** Brasil: importações e exportações de água de coco (2017 - jun/2018)

Período	Importações		Exportações	
	US\$ FOB (milhões)	Peso Líquido (Ton)	US\$ FOB (milhões)	Peso Líquido (Ton)
2017	4,91	1.196,3	8,10	6.723,7
2018 (jan-jun)	3,73	1.599,4	21,98	18.962,8

Fonte: Comex Stat. Elaboração Própria

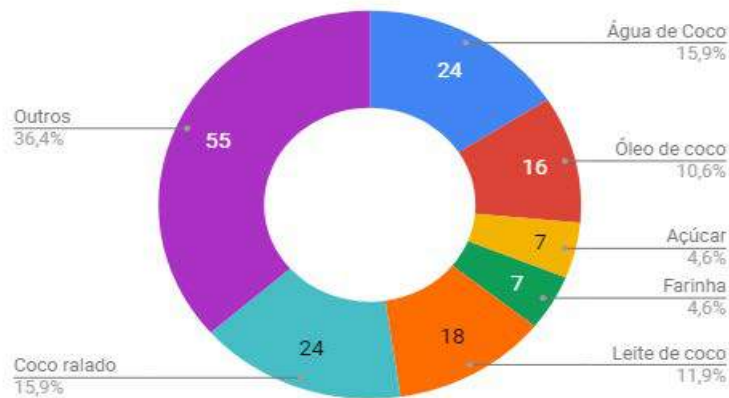
Todavia, é preciso considerar que esses são apenas alguns dos produtos alimentícios obtidos a partir do fruto do coqueiro. A partir dos trabalhos de Sangamithra (2013) e Embrapa (2016), consultas a especialistas, visitas a lojas de 'produtos naturais', na cidade de Aracaju, e a sites de empresas (identificados a partir de consulta na internet com termos relacionados ao coco e seus produtos) demonstram que existe uma diversidade de ao menos 54 usos ou formas de apresentação de alimentos processados. Tal consulta permite observar, inclusive, novas tendências do mercado, como o molho tipo Shoyu de coco, farinhas e a água de coco adicionada a sucos de frutas, e outros - conforme sistematizados na Figura 3.



**Figura 3.** Apresentações de produtos alimentícios obtidos a partir do coco (seco, ou maduro, e verde, ou imaturo)  
Fontes: Diversas. Elaboração própria

O mapeamento das marcas e empresas, por meio de pesquisas por palavras-chaves na internet e visitas a lojas especializadas em ‘produtos naturais’ localizadas na cidade de Aracaju, foi possível identificar os *sites* das empresas que atuam no mercado de alimentos disponibilizando produtos obtidos com o uso do coco. A partir da análise do catálogo de produtos, foi possível associar o produto com a marca, de modo identificar a quantidade de empresas que comercializam determinado produto.

Entre os produtos mais populares como água de coco, óleo de coco, açúcar, farinha, leite de coco e coco ralado, pode-se observar a quantidade de marcas que comercializam estes produtos, conforme figura 4.



**Figura 4.** Relação dos produtos associados ao coco com a quantidade de empresas  
**Fonte:** Diversas. Elaboração própria

No caso de produtos mais recentes no mercado, como Aminos (molho tipo shoyu), leite de coco pronto para beber e leite de coco em pó, o número de empresas que comercializam é reduzido, porém com potencial de crescimento, pois a associação desses produtos à alimentação saudável, além da possibilidade da substituição de alimentos com lactose, permite que outras empresas invistam nas novas tendências.

**Tabela 3.** Quantidade de marcas por novos produtos de/com coco

<b>Água de Coco</b> (mix com frutas, chocolate, gás)	5	<b>Caldas</b>	1	<b>Leite de coco em pó</b>	5	<b>Suco verde e matchá com água de coco</b>	1
<b>Pó de água de Coco</b>	1	<b>Manteiga</b>	3	<b>Iogurte</b>	1	<b>Gordura de coco</b>	1
<b>Doce de coco</b>	2	<b>Néctar</b>	2	<b>Suplemento energético em gel</b>	1	<b>Balas de coco</b>	1
<b>Cápsulas</b>	2	<b>Chips</b>	5	<b>Coco Inteiro Cru</b> (em forma de pasta, pode ser usado como suplemento)	1	<b>Pirulitos de coco</b>	1
<b>Aminos</b>	4	<b>Leite de coco pronto para beber</b>	6	<b>Vinagre</b>	1	<b>Cereais e granolas com coco</b>	3

Fonte: Diversas. Elaboração própria

## Conclusões

Sexto produtor mundial, em 2016, o valor da produção brasileira de coco alcançou R\$ 1,13 milhão, ou o equivalente a 2,03% do total produzido pelas lavouras permanentes (IBGE/PAM, 2018). Além disso, a cadeia produtiva do coco é considerada de grande importância econômica e social em virtude da ampla variabilidade de produtos e coprodutos que podem ser obtidos a partir dos frutos e de outras partes da planta.

Apesar da recente retração na área destinada à colheita, na ordem de 10% (comparando-se dados de 2016 com 2012), as importações brasileiras de coco seco e fresco dá indícios de estabilização. Por outro lado, as exportações de água de coco – embora tenha mercado concentrado em Estados Unidos (82,7%), Canadá (10,2%) e Reino Unido (3,1%) – praticamente triplicaram durante o primeiro semestre de 2018, em comparação com todo o ano de 2017.

Apesar da falta de dados oficiais ou gratuitos sobre o mercado nacional e das dificuldades para identificar suas tendências, este trabalho identificou 54 produtos, também chamados de formas de apresentação (que possuem diferentes usos), e 68 marcas, com destaque para a presença de ao menos três grandes empresas internacionais de bebidas não alcoólicas. Observa-se, portanto, que a indústria processadora de alimentos tem desenvolvido uma série de novos produtos, usos e embalagens para o coco e seus coprodutos, como os *blends* de água de coco com sucos de frutas, molho tipo shoyu (em concorrência com a soja), suplementos, óleos, manteiga e alimentos derivados da seiva (como o néctar) e do broto da planta (palmito).

Portanto, a agroindústria, no setor alimentício, oferece novas condições de concorrência para os produtos nacionais e isso pode indicar que estão postos à pesquisa agrícola novos desafios no que se refere ao alinhamento entre os interesses dos produtores e da atual agroindústria de produtos alimentícios derivados do coco.

Destaque-se que, além do risco de os dados oficiais não incluírem as consideradas muito pequenas áreas produtoras de coco, o presente estudo encontrou ainda limitações relacionadas à falta de informações sistematizadas e disponibilizadas sobre a quantidade produzida e o consumo interno de produtos como a água de coco (na casca ou engarrafada artesanalmente) – sabidamente vendida em grandes volumes e nos mais diversos pontos das cidades e praias brasileiras. Isso se aplica também aos produtos fabricados em pequenas agroindústrias locais ou àqueles comercializados localmente, como óleos obtidos artesanalmente, cocos ralados na hora, farinhas e outros. O mesmo ocorre para os usos não industriais de partes da planta do coqueiro ou da casca de coco, a exemplo da aplicação em artesanatos ou como insumo orgânico (in natura ou processado) na produção agrícola.

Todavia, espera-se que as informações disponibilizadas no presente trabalho, bem como os debates que a equipe tem promovido em torno dos temas e resultados, colaborem para que analistas e pesquisadores possam levar em conta características desse mercado (especialmente no que refere à diversidade de produtos, marcas e empresas que atuam no Brasil) e assim direcionar suas pesquisas sobre melhoramento genético, sistemas de produção do coqueiro e outros temas associados à produção em campo – utilizando-se, portanto, de elementos que vão além das tradicionais sistematizações relativas à produção agrícola da cultura no país e a consultas a especialistas que atuam apenas nesse segmento.

## Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Sergipe (Fapese); à equipe do Setor de Prospecção e Avaliação de Impactos de Tecnologias (SPAT) da Embrapa Tabuleiros Costeiros; ao analista Andrés Vilafuerte e ao bolsistas Luciano Costa Moraes e Raí Thales da Silva Gomes que colaboraram conosco em outras etapas do projeto que deu origem a esse estudo. Agradecemos ainda ao analista Bruno Trindade Cardoso que atua em laboratórios com ênfase em Ecofisiologia Vegetal e à pesquisadora Semíramis Ramos, pelos esclarecimentos técnicos.

## Referências

ALICEWEB/MDIC. **Sistema de Análise das Informações de Comércio Exterior**. Brasília, DF: Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio, 2018. Disponível em: <<http://aliceweb.mdic.gov.br/>> Acesso em: 10 maio.2018.

CAVALCANTE, L. V.. **A nova Geografia do coco**: Reestruturação produtiva, territorialização do capital e dinâmicas socioespaciais, 2015. 298 f. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Geografia) - Universidade Estadual do Ceará, 2015. Disponível em:<<http://www.reformaagrariaemdados.org.br/sites/default/files/2015%20Disserta%C3%A7%C3%A3o%20LEANDRO%20CAVALCANTE.pdf>>. Acesso em: 20 set. 2017.

COMEXSTAT/MDIC. **Plataforma de Consultas e Extrações de Dados Estatísticos do Comércio Exterior Brasileiro**. Brasília, DF: Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio. Disponível em: <<http://comexstat.mdic.gov.br/pt/geral>>. Acesso em: 20 jul. 2018.

EMBRAPA. Relatório Prospectivo I. **Drivers de mercado no melhoramento genético do coqueiro**. Acesso restrito.

FAO/FAOSTAT. **Food and Agriculture Data**. 2018. Disponível em: <[http://www.fao.org/faostat/es/#rankings/countries\\_by\\_commodity\\_exports](http://www.fao.org/faostat/es/#rankings/countries_by_commodity_exports)>. Acesso em: 02 abr.2018.

IBGE.PAM. **Produção Agrícola Municipal 2018**. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/pesquisa/pam/tabelas>> Acesso em: 19 abri. 2018.

MARTINS, C. R.; JESUS JUNIOR, L. A. de. **Produção e comercialização de coco no Brasil frente ao comércio internacional**: panorama 2014. Aracaju, SE: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2014. (Embrapa Tabuleiros Costeiros. Documentos, 184). Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/122994/1/Producao-e-comercializacao-Doc-184.pdf>>. Acesso em: 20 mar. 2017.

SANGAMITHRA, A.; SAWMY G. J.; SORNA P. R.; CHANDRASEKAR, V.; SAIKALA, S.; HAKER, E. Coconut: na extensive review on value added products. **Indian Food Industry Mag.** v. 32, n. 6, nov./dec. 2013. Disponível em: [https://www.researchgate.net/publication/262740332\\_Coconut\\_Value\\_Added\\_Products](https://www.researchgate.net/publication/262740332_Coconut_Value_Added_Products). Acesso em: 20 dez.2017.

SINDCOCO. Sindicato Nacional dos Produtores de Coco do Brasil. **Boletim conjuntural**: Importações de coco ralado e de suposta água de coco. Período: janeiro de 2012 a dezembro de 2017. Recife, janeiro de 2018. Disponível em: <<http://www.sindcoco.com.br/imgs/pdf/informativos/55.pdf>> Acesso em: 20 mar.2018.



---

***Tabuleiros Costeiros***



MINISTÉRIO DA  
AGRICULTURA, PECUÁRIA  
E ABASTECIMENTO