

***Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Gado de Leite
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento***

DOCUMENTOS 262

Coletânea de Iniciação Científica da Embrapa Gado de Leite - PIBIC CNPq 2020-2021

Leônidas Paixão Passos

Editor Técnico

Embrapa Gado de Leite
Juiz de Fora, MG
2021

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Gado de Leite
Rua Eugênio do Nascimento, 610 – Dom
Bosco
CEP: 36038-330 – Juiz de Fora/MG
Telefone: (32)3311-7400
Fax: (32)3311-7424
<http://www.embrapa.br>
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

Comitê Local de Publicações da Unidade
Responsável

Presidente
Pedro Braga Arcuri

Secretária-Executiva
Inês Maria Rodrigues

Membros
Jackson Silva e Oliveira, Fernando Cesár Ferraz Lopes, Inácio de Barros, Francisco José da Silva Léo, Fábio Homero Diniz, Deise Ferreira Xavier, Julieta de Jesus da Silveira N. Lanes, Manuela Sampaio Lana, Cláudio Antônio Versiani Paiva, Leticia Sayuri Suzuki, Emili Barcellos M. Santos, Frank Ângelo Tomita Bruneli, Fausto de Souza Sobrinho, Vilmar Gonçalves, Jucélia da Silva Filgueiras

Supervisão editorial
Leônidas Paixão Passos

Normalização bibliográfica
Inês Maria Rodrigues

Tratamento das ilustrações e editoração
eletrônica
Leonardo Fonseca

Projeto gráfico da coleção
Carlos Eduardo Felice Barbeiro

1ª edição
1ª impressão (2021): 40 unidades

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 Gado de Leite

Workshop de Iniciação Científica da Embrapa Gado de Leite (262. : 2021 : Juiz de Fora, MG).

Coletânea de Iniciação Científica da Embrapa Gado de Leite - PIBIC CNPq 2020-2021 / Editor técnico, Leônidas Paixão Passos. – Juiz de Fora : Embrapa Gado de Leite, 2021.

86 p. (Embrapa Gado de Leite. Documentos, 262).

ISSN 1516-7453

1. Agropecuária. 2. Pesquisa. 3. Resultados. I. Passos, Leônidas Paixão. II. Título. III. Série.

CDD 630.72

Autor

Leônidas Paixão Passos

Engenheiro-agrônomo, pós-doutorado em Molecular Biology, University of Arizona, USA, pesquisador da Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG

Apresentação

Anualmente, a Embrapa Gado de Leite conduz o Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC) do Conselho Nacional do Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Para tanto, contamos com a coordenação da Equipe de Apoio aos Estudantes e Bolsistas da Gerência de Gestão de Pessoas (GGP) da Embrapa.

Desta feita, a atual pandemia de Covid-19, pelas restrições para a realização de evento presencial, acrescida das numerosas limitações operacionais que inviabilizam na prática a condução de um evento on-line, fruto das própria realidade sociológica brasileira, forçaram a Embrapa Gado de Leite a buscar um caminho alternativo para a consecução dos objetivos do programa.

Em lugar de uma oficina de trabalho promovendo discussões objetivas e avaliando as ações em curso, condição esta que seria a ideal, construímos uma Coletânea dos trabalhos realizados durante a vigência do PIBIC CNPq 2020-2021. Estão registrados 16 trabalhos, cobrindo, conforme ocorre tradicionalmente, áreas básicas e aplicadas. Ressalte-se a manutenção da qualidade científica das capacitações realizadas, a qual já se torna um marco de qualidade do PIBIC ao longo dos anos.

Registramos nosso reconhecimento ao CNPq por sua preciosa política de formação de futuros cientistas para o engrandecimento da agropecuária brasileira. De nossa parte, termos – porque não dizer? – o orgulho de mantermos, frente ao triste cenário mundial, a observância do objetivo-mor do PIBIC CNPq, de incentivar o pensamento científico e a iniciação à pesquisa de estudantes de graduação do ensino superior.

Assinalamos nossa esperança pelo advento de novos e melhores tempos, e reafirmamos o compromisso da Embrapa em lutar pela persistente melhoria do segmento técnico-científico de nossa pátria.

Paulo do Carmo Martins
Chefe-geral da Embrapa Gado de Leite

Avaliação de genótipos de capim-elefante com potencial para produção de bioenergia quanto a tolerância às ninfas e adultos de *Mahanarva spectabilis* (Hemiptera: Cercopidae)¹

Peterson William Barbosa Alves Junior², Alexander Machado Auad^{3, 5}, Tiago Teixeira de Resende⁴, Juarez Campolina Machado³.

¹O presente trabalho foi realizado com o apoio do CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Brasil. Parte do projeto 20.18.01.016.00.00, liderado por Juarez Campolina Machado e Alexander Machado Auad, pesquisadores da Embrapa.

²Graduando em Biologia – CES/Juiz de Fora. e-mail: peteronjuniorjf@gmail.com

³Pesquisadores da Embrapa Gado de Leite, e-mail: alexander.auad@embrapa.br; juarez.machado@embrapa.br.

⁴Técnico da Embrapa Gado de Leite, e-mail: tiago.resende@embrapa.br.

⁵Orientador

Resumo: A cigarrinha das pastagens *Mahanarva spectabilis* afeta a produção e a qualidade do capim-elefante. Assim, objetivou-se identificar a tolerância às ninfas e adultos de *M. spectabilis* de genótipos de capim elefante com potencial para produção de bioenergia. O delineamento experimental foi em blocos inteiramente casualizados em esquema fatorial, envolvendo 2 genótipos e duas densidades para ninfas (0 e 40 ninfas) ou adultos (0 e 9 adultos). Após 8 dias as ninfas e adultos foram retirados e avaliou-se o teor de clorofila, nota de dano e porcentagem de matéria seca. Constatou-se que, o teor de clorofila foi significativamente maior no capim-elefante genótipo Energia17 comparado ao genótipo Energia18. Redução significativa no teor de clorofila, foi observada para as plantas submetidas ao ataque de ninfas e adultos do inseto-praga. O ataque de adultos aumentou significativamente a nota de dano em ambas cultivares, comparada aquelas atacadas por ninfas do inseto-praga e aquelas não infestadas, as quais não diferiram significativamente. O ataque de ninfas e adultos de *M. spectabilis* não promoveu a redução significativa na matéria seca dos genótipos analisados. Assim, os genótipos de capim-elefante avaliados foram suscetíveis ao ataque de ninfas e adultos de *M. spectabilis* pelo mecanismo de tolerância.

Palavras-chave: capim-elefante, cigarrinhas das pastagens, inseto-praga

Evaluation of two *Pennisetum purpureum* genotypes for tolerance to *Mahanarva spectabilis* (Hemiptera: Cercopidae) nymphs and adults

Abstract: The *Mahanarva spectabilis* affects the production and quality of elephant grass. Thus, the objective was to identify the tolerance to *M. spectabilis* nymphs and adults against elephant grass genotypes with potential for energy production. The experimental design was in entirely randomized blocks in a factorial scheme, involving 2 genotypes and two densities for nymphs (0 and 40 nymphs) or adults (0 and 9 adults). After 8 days the nymphs and adults were removed and the chlorophyll content, damage score and dry matter percentage were evaluated. It was found that, the chlorophyll content was significantly higher in elephant grass Energia17 genotype compared to Energia18. Significant reduction in chlorophyll content was observed for plants subjected to nymph and adult attack of the pest insect. The adult attack significantly increased the damage score in both cultivars, compared to plants attacked by nymphs and those not infested, which did not differ significantly. The attack of *M. spectabilis* nymphs and adults did not promote a significant reduction in the dry matter of the genotypes analyzed. Thus, the elephant grass genotypes evaluated were susceptible to the attack of *M. spectabilis* nymphs and adults by the tolerance mechanism.

Keywords: elephant grass, spittlebug, pest insect

Introdução

A cigarrinha das pastagens, *Mahanarva spectabilis* (Hemiptera: Cercopidae) são capazes de reduzir drasticamente a produção e a qualidade do capim-elefante (*Pennisetum purpureum*). A principal alternativa de controle desse inseto-praga tem sido a utilização de gramíneas resistentes (Auad et al. 2018; Visconde et al. 2020). Desta forma, um grande esforço tem sido dedicado a encontrar gramíneas resistentes às cigarrinhas das pastagens, na tentativa de definir genótipos com mecanismo de antibiose, tolerância ou antixenose, contra esse inseto-praga, com intuito de utilizar esses como genitores em programas de melhoramento.

A Embrapa Gado de Leite pesquisa genótipos de capim-elefante selecionados para produção de bioenergia com diferentes teores de lignina. Essa característica é de grande importância quanto a avaliação da interação das respostas das plantas com maior teor de lignina e o ataque das cigarrinhas das pastagens.

Assim, objetivou-se identificar a tolerância de dois genótipos de *P. purpureum*, com potencial para energia e com diferentes teores de lignina, oriundos do programa de melhoramento das forrageiras da Embrapa Gado de Leite às ninfas e adultos de *M. spectabilis*.

Material e Métodos

Avaliou-se dois genótipos de *Pennisetum purpureum*, Energia 17 e Energia 18, provenientes do Programa de Melhoramento de Capim-elefante da Embrapa. Esses foram selecionados em função dos resultados de avaliação de genótipos com potencial para produção de bioenergia, quanto ao mecanismo de antibiose por Visconde et al. (2020). As plantas com um ano de idade, foram transplantadas para vasos de 1 kg, e em seguida podadas para corte de uniformização do ensaio experimental. Estas foram mantidas em casa de vegetação e irrigadas diariamente até o seu uso nos experimentos.

Adultos de *M. spectabilis*, oriundos do campo Experimental da Embrapa Gado de Leite, foram mantidas em gaiolas de acrílico contendo uma gaze na base, como substrato de postura. Os ovos coletados foram triados e mantidos em câmaras climatizadas (Fitotron) até atingirem a fase S4 de desenvolvimento (próxima à eclosão). Na sequência, 50 ovos foram acondicionados no solo de cada vaso com uma planta de capim elefante cv. Capiáçu, as quais foram individualizadas com tecido "voil", para evitar a fuga das ninfas eclodidas. Após 40 dias, adultos e ninfas presentes nessas plantas foram utilizados no experimento.

O delineamento experimental consistiu em blocos inteiramente casualizados em esquema fatorial, envolvendo 2 genótipos de capim elefante (Energia 17 e Energia 18) e duas densidades para ninfas (0 e 40 ninfas) ou adultos (0 e 9 adultos), em um total de 10 blocos. As plantas infestadas foram cobertas com tecido tipo "voil" na parte inferior ou superior para evitar a fuga das ninfas ou adultos, respectivamente. As demais plantas foram submetidas às mesmas condições; porém, não foram infestadas. Após 8 dias as ninfas e adultos foram retirados e avaliou-se o teor de clorofila, nota de dano e porcentagem de matéria seca, seguindo metodologia proposta por Alvarenga et al. (2019):

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott ($P < 0,05$).

Resultados e Discussão

Não houve efeito significativo na interação dos genótipos e a submissão das plantas ao ataque de ninfas e adultos de *M. spectabilis*, para modificar o teor de clorofila,

a nota de dano e matéria seca. Desta forma, optou-se por analisar os fatores isoladamente.

Constatou-se que, o teor de clorofila foi significativamente maior ($P=0,02$; $F=5,46$) no genótipo Energia17 comparado ao Energia18. Nas plantas isentas do ataque de inseto o teor de clorofila foi significativamente superior ($P = 0,007$ e $F = 5,66$), quando comparado às plantas submetidas, por 8 dias, ao ataque de ninfas ou adultos de *M. spectabilis* (Figura 1 A). Essa redução irá refletir nas características de produção dos genótipos, considerando que o aumento do conteúdo relativo de clorofila em gramíneas forrageiras é positivamente correlacionado com a produção de matéria seca (Lima, 2016). Esta redução no teor de clorofila devido ao ataque de *M. spectabilis* foi denotada por Resende et al. (2014). Isto indica que, sob altas e/ou um longo período de infestações estes genótipos podem apresentar perdas consideráveis na biomassa.

Redução significativa ($P=0,05$ e $F=0,81$) no teor de clorofila, também, foi observada para as plantas submetidas por 8 dias ao ataque de ninfas e adultos do inseto-praga, comparada aquela avaliação anterior ao ataque do inseto-praga (Figura 1B). Auad et al. (2010) constataram que o teor de clorofila das folhas de capim-elefante, após sete dias do início do experimento, foi superior naquelas plantas infestadas com trinta ninfas de *M. spectabilis*, e justificaram tal fato como uma estratégia de compensação adotada pela planta após o ataque do inseto. Esse aumento não foi verificado no presente trabalho, durante a permanência das ninfas e adultos.

A nota de dano não variou significativamente ($P = 0,64$ e $F = 0,22$) entre os genótipos de capim-elefante. No entanto, o ataque de adultos aumentou significativamente ($P=0,003$ e $F = 8.086$) as injúrias ocasionadas pelos insetos em ambos os genótipos, com nota média de 3,45 (representa, em média, 40% da planta com injúrias), comparada aquelas atacadas por ninfas do inseto-praga e aquelas não infestadas, as quais não diferiram significativamente (Figura 1C). Alvarenga et al. (2019), também registraram aumento da nota de dano em *P. purpureum*, quando infetados com adultos de *M. spectabilis*. Resultado diferente foi relatado por Alvarenga et al. (2019), ao demonstrarem que, as ninfas também ocasionam aumento significativos nas notas de danos em capim-elefante.

O ataque de ninfas e adultos de *M. spectabilis*, não promoveu a redução significativa ($P= 0,733$; $F=0,316$) na matéria seca dos genótipos analisados (Figura 1D). Segundo Resende et al. (2012) a alimentação de *M. spectabilis* causa senescência precoce em plantas, o que reduz seu peso fresco e, conseqüentemente, leva a um aumento percentual da matéria seca. No presente trabalho apesar de ter detectado a referida senescência, essa não foi suficiente para redução matéria seca dos genótipos de capim-elefante.

Ressalta-se que os genótipos de capim-elefante, com potencial para energia e com diferentes níveis de lignina, foram suscetíveis ao ataque de ninfas de *M. spectabilis* pelo mecanismo de antibiose (Visconde et al., 2020) e no presente trabalho ficou evidente essa suscetibilidade, também, pelo mecanismo de tolerância. Desta forma, indica-se estabelecer novas investigações que visem avaliar o desempenho destes genótipos frente ataque das cigarrinhas das pastagens, proporcionando condições desfavoráveis ao inseto praga, como por exemplo, o controle cultural com uma adubação adequada, entre outras táticas. Essa recomendação está de acordo com a de Alvarenga et al. (2019) que indicaram a fertilização adequada do solo para aumentar a habilidade das plantas forrageiras em minimizar os efeitos dos danos provocados por *M. spectabilis*.

Conclusões

Os genótipos de capim-elefante Energia17 e Energia18, com potencial para uso energético e com diferentes teores de lignina, foram suscetíveis ao ataque de ninfas de *M. spectabilis* pelo mecanismo de tolerância; portanto, recomenda-se que outras táticas de controle sejam adotadas em locais com histórico de ocorrência desse inseto.

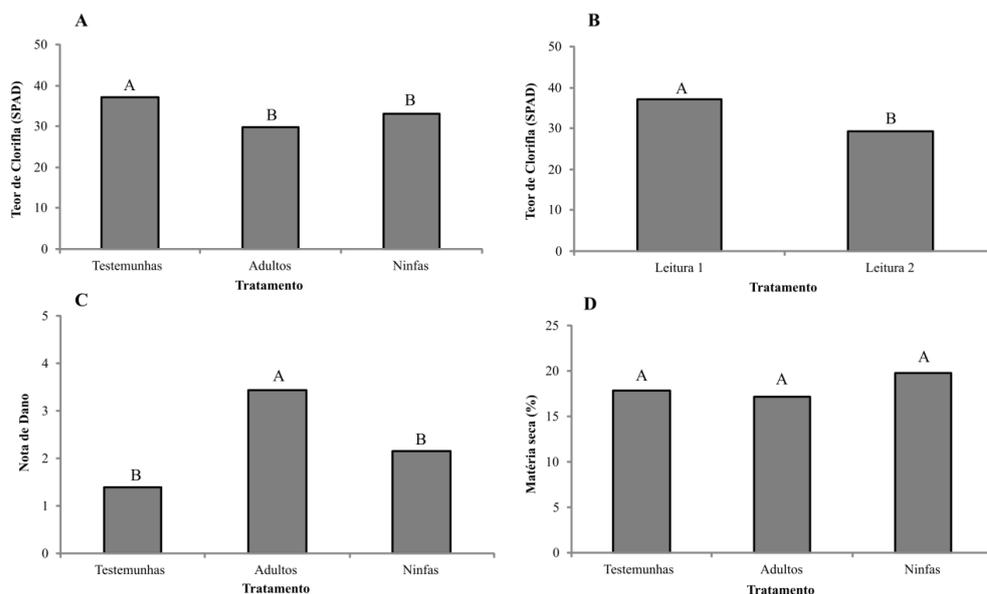


Figura 1 - Teor de clorofila (SPAD) (A), (B), nota de dano (C) e porcentagem de matéria seca (D) de dois genótipos de capim-elefante após o ataque de ninfas de adultos do inseto-praga.

Referências

- ALVARENGA, R.; AUAD, A.M.; MORAES, J.C.; SILVA, S.E. Do silicon and nitric oxide induce resistance to *Mahanarva spectabilis* (Hemiptera: Cercopidae) in forage grasses? **Pest Management Science**. v.75, p.3282–3292, 2019.
- AUAD, A. M., RESENDE, T. T.; MONTEIRO, P. H.; SANTOS, D. R.; MADDALENA, I. S. C. P. Avaliação da tolerância de capim elefante a ninfas de *Deois schach* (Fabricius, 1787) e *Mahanarva spectabilis* (Distant, 1909) (Hemiptera: Cercopidae). In: ANAIS DA XVI MOSTRA CIENTÍFICA, XXXIII SEMANA DE BIOLOGIA DA UFJF, Juiz de Fora, 2010. **Anais**. Juiz de Fora, 2010. p.1-3
- AUAD, A.M.; RESENDE, T.T. Use of chemical inducers as a resistance trigger in grasses and sugarcane. **Florida Entomologist**. v.101, p.119-124, 2018.
- LIMA, J.E.S.; NASCENTE, A.S.; LEANDRO, W.M.; SILVEIRA, P.M. *Urochloa ruziziensis* responses to sources and doses of urea. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**. v.20, p.401-407, 2016.
- RESENDE, T.T.; AUAD, A.M.; FONSECA, M.D.G.; DOS SANTOS, T.H.; VIEIRA, T.M. Impact of the spittlebug *Mahanarva spectabilis* on signal grass. **The Scientific World Journal**, v.2012, p.1-6, 2012.
- RESENDE, T. T.; AUAD, A.M.; FONSECA, M.G. How many adults of *Mahanarva spectabilis* (Hemiptera: Cercopidae) should be used for screening *Brachiaria ruziziensis* (Poales: Poaceae) resistance? **Journal of Economic Entomology**. v.107, p.396-402, 2014.
- VISCONDE, A.J.M.; AUAD, A.M.; RESENDE, T.T.; Nascimento, V.F.; MACHADO, J.C. Seleção de genótipos de capim-elefante com potencial energético e diferentes teores de lignina para antibiose à cigarrinha-das-pastagens. In: XXV Workshop de Iniciação Científica da Embrapa Gado de Leite Juiz de Fora, MG, 2020, Juiz de Fora. XXV **Anais**. Juiz de Fora, 2020. p.1-4.

Produtividade de forragem verde de clones melhorados de *Brachiaria ruziziensis*¹

Rafaella Ferreira Pinto², Flávio Rodrigo Gandolfi Benites³, Alexander Machado Auad³, Fausto Souza Sobrinho³

¹O presente trabalho foi realizado com o apoio do CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Brasil. Parte do projeto de melhoramento genético vegetal liderado por Fausto Souza Sobrinho. Bolsista Embrapa.

²Graduanda em Ciências Biológicas – Centro de Ensino Superior de Juiz de Fora (CES/JF) /Juiz de Fora.

³Pesquisador da Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG; e-mail: fausto.souza@embrapa.br

Resumo: O objetivo do presente trabalho foi avaliar a produtividade de forragem verde de clones melhorados de *B. ruziziensis*. Foram avaliados 430 clones de *B. ruziziensis*, juntamente com duas testemunhas, cv. Marandu (*B. brizantha*) e cv. Basilisk (*B. decumbens*), em experimentos conduzidos no delineamento de blocos aumentados. Foram realizados 3 cortes de avaliação, com intervalo médio de rebrota de 70 dias. Em cada um desses cortes foram mensuradas a altura e o vigor das plantas e o peso de forragem verde (PV). Os resultados das análises de variância indicaram diferenças significativas entre os genótipos para todas as características avaliadas evidenciando a existência de variabilidade genética entre os clones melhorados de *B. ruziziensis*. Constata-se, portanto, que é possível selecionar clones de *B. ruziziensis* superiores as melhores cultivares de braquiária utilizadas no Brasil para a produtividade de forragem verde, altura e vigor de plantas.

Palavras-chave: melhoramento genético, variabilidade genética, *Urochloa ruziziensis*

Forage productivity of improved clones of *Brachiaria ruziziensis*

Abstract: The aim of the present work was to evaluate the green forage productivity of *B. ruziziensis* improved clones. In experiments conducted in augmented block design, 430 clones were evaluated, together with two controls, cv. Marandu (*B. brizantha*) and cv. Basilisk (*B. decumbens*). Three evaluation cuts were performed, with an average regrowth interval of 70 days. In each of these cuts, the height and vigor of the plants and the weight of green forage (PV) were measured. The results of the analysis of variance indicated significant differences between the genotypes for all traits evaluated, evidencing the existence of genetic variability among *B. ruziziensis* improved clones. It is verified, therefore, that it is possible to select clones of *B. ruziziensis* superior to the best *Brachiaria* cultivars used in Brazil for green forage yield, plant height and vigor.

Keywords: genetic improvement, genetic variability, *Urochloa ruziziensis*

Introdução

As plantas forrageiras são de grande importância para o Brasil, pois são a base para a bovinocultura de corte e de leite, bem como para ovinocultura e equideocultura. A criação de animais em pastos cultivados promoveu um diferencial qualitativo para a carne brasileira e permitiu que o país se tornasse o maior exportador mundial desse produto (Resende et al, 2008).

A disponibilidade de forragem de qualidade durante todo o ano é de fundamental importância para possibilitar que os animais possam expressar todo o seu potencial produtivo (Souza Sobrinho et al., 2009) na forma de carne, leite, couro ou pele.

As pastagens cultivadas no Brasil cobrem extensas áreas, estimadas em cerca de 120 milhões de hectares e mais de 85% delas ocupadas com capins do gênero *Brachiaria* (sinonímia *Urochloa*) (Macedo, 2006). Dentro desse gênero destacam-se as espécies *Brachiaria brizantha*, *B. decumbens*, *B. humidicola* e *B. ruziziensis*. Esta última é a única espécie do gênero que apresenta reprodução totalmente sexual, o que permite a geração e aproveitamento da variabilidade genética por meio da seleção e recombinação de materiais superiores (Souza Sobrinho et al, 2009). Além disso, a *Brachiaria ruziziensis* é a espécie mais utilizada nos sistemas integrados de cultivo, como a integração lavoura, pecuária e floresta (ILPF) (Souza Sobrinho e Benites, 2016).

Para explorar a variabilidade genética presente nessa espécie a Embrapa Gado de Leite conduz um programa de melhoramento genético de *Brachiaria ruziziensis* visando identificar e selecionar materiais que apresentem, entre outras características, produtividade de forragem superior às cultivares atualmente disponíveis no mercado. Resultados iniciais evidenciaram a possibilidade de sucesso com a seleção para várias características de importância forrageira (Souza Sobrinho e Benites, 2016).

O presente trabalho teve por objetivo avaliar a produtividade de forragem verde de clones melhorados de *Brachiaria ruziziensis*.

Material e Métodos

O experimento foi realizado no campo experimental da Embrapa Gado de Leite, localizado no município de Coronel Pacheco, MG. Foram avaliados 430 clones obtidos pelo programa de melhoramento genético de *B. ruziziensis*, juntamente com as cultivares Basilisk (*B. decumbens*) e Marandu (*B. brizantha*) utilizadas como testemunhas, empregando-se o delineamento de blocos aumentados. Esses clones foram previamente selecionados como resistentes às cigarrinhas das pastagens. Após as avaliações para o inseto, as plantas selecionadas foram mantidas em casa de vegetação para recuperação do vigor e posteriormente levadas para o campo.

O experimento foi implantado em novembro de 2020 e em dezembro do mesmo ano procedeu-se o corte de uniformização das plantas. A partir de então foram realizados três cortes de avaliação, com intervalo médio de rebrota de 70 dias. Em cada uma das avaliações foram mensuradas a altura (cm) e o vigor (escala de notas variando de 1, ruim, a 5, ótimo) das plantas, além do peso da forragem verde.

Foram realizadas análises estatísticas para as informações de cada corte individualmente e também de todos eles de forma conjunta (análises conjuntas), com o auxílio do software Sisvar (Ferreira, 2011).

Resultados e Discussão

Os resultados das análises de variância foram significativos para todas as características avaliadas, em todos os cortes e também na análise conjunta, evidenciando a existência de variabilidade genética entre os clones melhorados de *Brachiaria ruziziensis*. Resultados semelhantes foram relatados por Souza Sobrinho e Benites (2016).

Para a produtividade de forragem verde, as médias dos clones avaliados foram separadas em quatro grupos pelo teste de Scott-Knott. Quarenta e cinco clones melhorados apresentaram produtividade de forragem verde estatisticamente superior à melhor testemunha (cultivar Basilisk), evidenciando o sucesso do programa de melhoramento em andamento (Figura 1). Esses materiais, em média, produziram 59,7% mais forragem que a cultivar Basilisk. Considerando-se a cultivar Marandu, que é genótipo forrageiro mais plantado no Brasil (Souza Sobrinho et al.; 2009), ocupando mais de 20 milhões de hectares, a superioridade dos 45 melhores clones foi de 117,2%. Os clones 694, 4, 51, 1068, 1154 e 1071 se destacaram para a produtividade de forragem verde, constituindo o grupamento superior entre todos os genótipos avaliados. Em média esses seis clones apresentaram produtividade de forragem verde 212,8% superior à cultivar Basilisk (Figura 1).

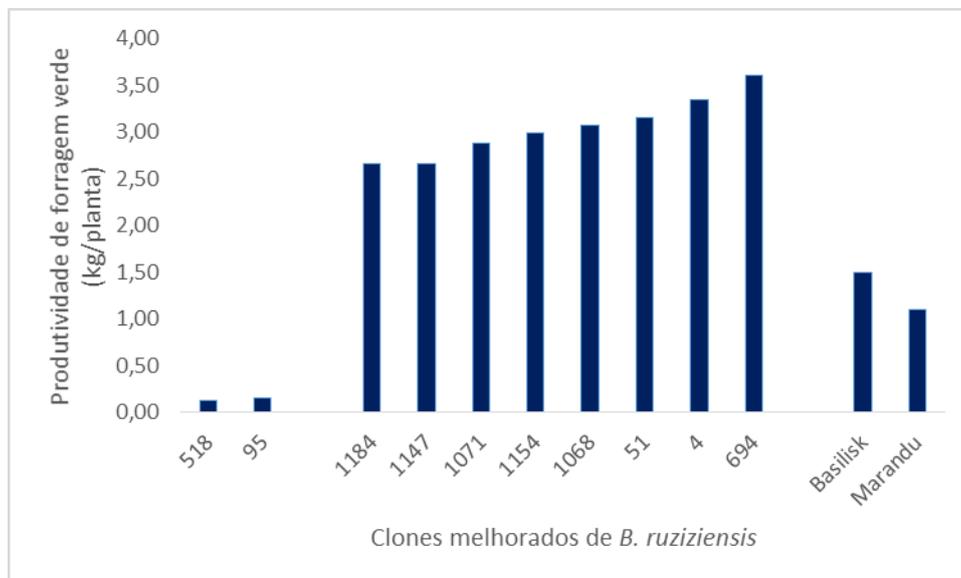


Figura 1. Médias da produtividade de forragem verde (kg/planta) de clones melhorados de *B. ruziziensis* (dois piores, oito melhores e duas testemunhas – cvs. Basilisk, *B. decumbens*; e Marandu, *B. brizantha*) avaliados no CECP. Resultados das análises conjuntas de três cortes de avaliação.

A amplitude de variação para a altura das plantas foi de 71,63 cm (Figura 2), e as médias dos clones melhorados de *B. ruziziensis* foram separadas em quatro grupos pelo teste de Scott Knott, confirmando a variabilidade genética entre esses materiais detectada pela análise de variância. A cultivar Basilisk apresentou altura média de 51,88 cm, sendo classificada no grupo de clones mais altos, juntamente com 240 clones melhorados.

Para o vigor das plantas houve a separação das médias dos clones em cinco grupos distintos pelo teste de Scott e Knott. O grupo com as melhores médias foi composto por 71 clones, além da cultivar Basilisk. Em média, esse grupo foi 27,5% superior à média de todos os clones avaliados no experimento (Figura 3).

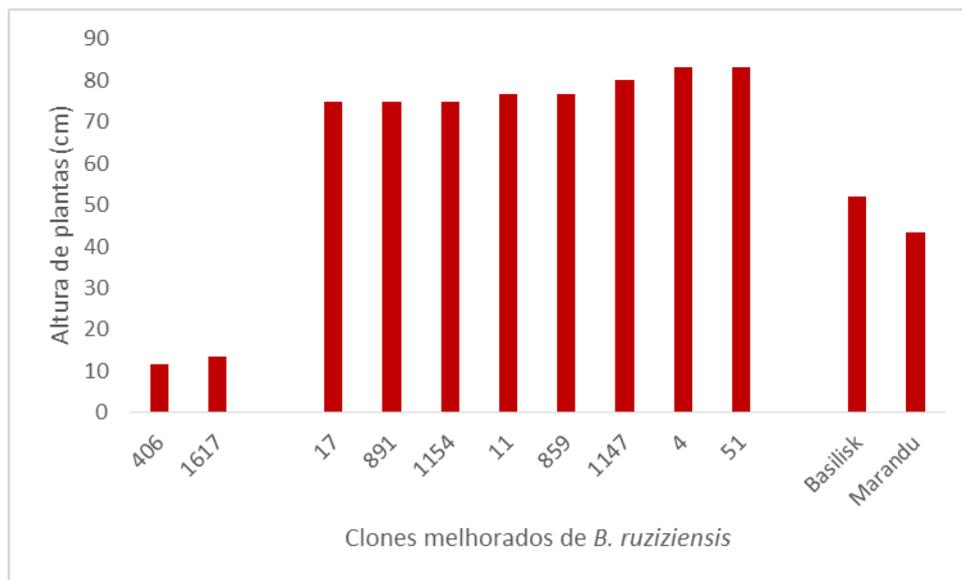


Figura 2. Médias da altura das plantas (cm) de clones melhorados de *B. ruziziensis* (dois piores, oito melhores e duas testemunhas – cvs. Basilisk, *B. decumbens*; e Marandu, *B. brizantha*) avaliados no CECF. Resultados das análises conjuntas de três cortes de avaliação.

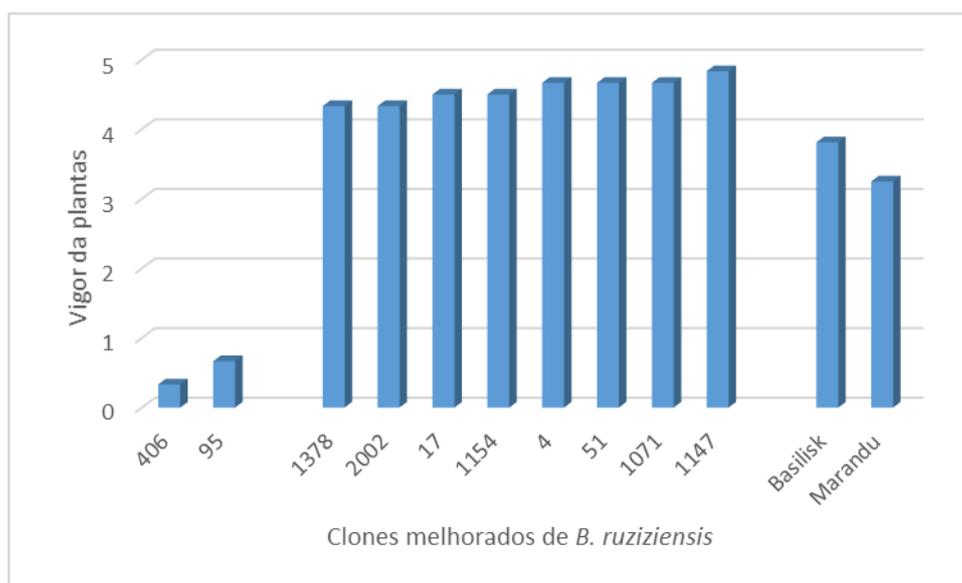


Figura 3. Médias do vigor das plantas (escala de notas variando de 1 – ruim; a 5 – ótimo) de clones melhorados de *B. ruziziensis* (dois piores, oito melhores e duas testemunhas – cvs. Basilisk, *B. decumbens*; e Marandu, *B. brizantha*) avaliados no CECF. Resultados das análises conjuntas de três cortes de avaliação.

Conclusões

Existe variabilidade genética entre os clones melhorados de *Brachiaria ruziziensis* para produtividade verde de forragem, altura e vigor das plantas.

É possível selecionar clones de *Brachiaria ruziziensis* superiores às melhores cultivares comerciais de *Brachiaria* para a produtividade de forragem verde, altura e vigor de plantas.

Referências

- FERREIRA, D F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, p. 1039-1042, 2011.
- MACEDO, M. C. M. Aspectos edáficos relacionados com a produção de *Brachiaria brizantha* cultivar Marandu. In: BARBOSA, R. A. Ed **Morte de pastos de braquiárias**. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2006. p.35-65.
- RESENDE, R. M. S.; VALLE, C. B.; JANK, L. **Melhoramento de forrageiras tropicais**. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2008.
- SOUZA SOBRINHO, F.; CARNEIRO, H.; LÉDO, F.J.S.; SOUZA, F.F. **Produtividade e qualidade da forragem de Brachiaria na Região Norte Fluminense**, 2009.
- SOUZA SOBRINHO, F.; KOOP, M. M.; LÉDO, F. J. S.; CAMPOS, F. P.; CASTRO, B. B. A.; OLIVEIRA, L. P. Estimativas de correlação entre características de produção de forragem em *B. ruziziensis*. In: Congresso brasileiro de melhoramento de plantas, 2009, Guarapari. **Anais**. Guarapari: SBMP, 2009.
- SOUZA SOBRINHO, F.; LÉDO, F.J.S.; KOPP, M.M.; PEREIRA, A.V.; SOUZA, F.F. **Melhoramento de gramíneas forrageiras na Embrapa Gado de Leite**. In: EVANGELISTA, A. R.; SOUZA, F. F. Eds. **Forragicultura e Pastagem**. Lavras: UFLA, 2009. p 98-111.
- SOUZA SOBRINHO, F; Benites, F.R.G. **Melhoramento genético de Brachiaria ruziziensis**: histórico e estratégias In: Tópicos especiais em Ciência Animal IV.1 Alegre: CAUFES, 2016, v.1, p. 309-329.

Efeito de aditivo microbiano sobre o aproveitamento ruminal de volumosos à base de cana-de-açúcar¹

Vanessa Cominato², Marciana Aparecida de Carvalho Nogueira³, Heloisa Carneiro⁴, João Batista Ribeiro⁴, André Moraes Moura⁵, Gildo Almeida da Silva⁶, Fernanda Samarini Machado⁴, Luiz Gustavo Ribeiro Pereira⁴, Mariana Magalhães Campos⁴, Thierry Ribeiro Tomich^{4,7}

¹O presente trabalho foi realizado com o apoio do CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. Parte da dissertação de mestrado do segundo autor, financiada pela Embrapa.

²Graduanda em Medicina Veterinária – UFJF, Juiz de Fora – MG. Bolsista PIBIC do CNPq. e-mail: vanessacominato@hotmail.com

³Mestranda do Mestrado Profissional em Nutrição e Produção Animal do IF Sudeste de Minas, Rio Pomba – MG. e-mail: marciana_nogueira@yahoo.com.br

⁴Pesquisador(a) da Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora – MG. e-mail:

heloisa.carneiro@embrapa.br, joao-batista.ribeiro@embrapa.br, fernanda.machado@embrapa.br, luiz.gustavo@embrapa.br, mariana.campos@embrapa.br, thierry.tomich@embrapa.br

⁵Professor da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica – RJ. e-mail:

amoraismoura@yahoo.com.br

⁶Pesquisador da Embrapa Uva e Vinho, Bento Gonçalves – RS. e-mail:

gildo.almeida@embrapa.br

⁷Orientador

Resumo: Tem sido apontada a possibilidade de se ampliar a digestão ruminal de volumosos, especialmente dos mais fibrosos, com a inclusão de aditivo microbiano nas dietas. Neste trabalho, dois experimentos *in vitro* foram executados para: 1º) avaliar o potencial de adições individuais de microrganismos isolados do trato digestivo de bovinos em dieta à base de silagem de milho + silagem de cana-de-açúcar sobre a degradação ruminal da matéria seca (DMS) e o rendimento de metano (CH₄) e o 2º) avaliar o potencial da adição de um dos microrganismos que se destacou positivamente no 1º experimento para melhorar parâmetros cinéticos de aproveitamento ruminal da matéria seca (MS) das forragens de quatro variedades de cana-de-açúcar. Significância estatística foi considerada quando $P \leq 0,05$ e significância marginal quando $0,05 < P \leq 0,10$. As adições de seis dos 25 microrganismos testados no 1º experimento resultaram em aumentos de 10,1% até 24,1% na DMS em relação ao tratamento sem uso de aditivo. Os usos de quatro desses seis aditivos na incubação promoveram reduções de aproximadamente 45% no rendimento de CH₄ em relação ao valor mais elevado. No 2º experimento foram notadas significâncias marginais para o efeito de utilização de aditivo microbiano sobre a DMS e a degradabilidade efetiva da MS das forragens na taxa de passagem de 2%/h, sendo notados aumentos de cerca de 2,5% quando o aditivo foi utilizado. As taxas de produção de gases foram sempre inferiores quando se utilizou o aditivo microbiano, mas a inclusão do aditivo promoveu redução superior a 50% no tempo de colonização das amostras e afetou positivamente o potencial de produção de gases. Adicionalmente, os rendimentos de CH₄ em função da MS incubada ou degradada foram reduzidos em cerca de 12% e 14% pelo uso do aditivo, respectivamente. Os atuais resultados indicam o potencial do uso de aditivo microbiano isolado do trato digestivo de bovinos para melhorar o aproveitamento ruminal de volumosos à base de cana-de-açúcar.

Palavras-chave: bactérias lácticas, digestibilidade, *in vitro*, leveduras, metano entérico

Effect of microbial additive on ruminal use of sugarcane-based roughages

Abstract: The inclusion of a microbial additive in the diets can increase the ruminal digestion of roughage, especially the more fibrous ones. In this work, two *in vitro* experiments were carried out to: 1st) evaluate the potential of individual additions of microorganisms isolated from the digestive tract of cattle fed diet based on corn silage + sugarcane silage on ruminal dry matter degradation (DMD) and methane (CH₄) yield and 2nd) evaluate the potential of adding only one of the microbial additives that showed positive results in the 1st experiment to improve kinetic of ruminal use of dry matter (DM) of forages produced with sugarcane varieties. Statistical significance was considered when $P \leq 0.05$ and marginal significance when $0.05 < P \leq 0.10$. Individual additions of six of 25 microorganisms tested in the 1st experiment resulted in increases of 10.1% to 24.1% in DMD compared to the treatment without additive. Six of the 25 microorganisms tested as additive in the 1st experiment led to increases of 10.1% to 24.1% in DMD compared to treatment without additive. The use of four of these six additives promoted reductions of approximately 45% in CH₄ yield *in vitro* compared to the highest yield observed. In the 2nd experiment, the use of microbial additive resulted in marginal significances on DMD and the effective degradability of DM of forages at outflow rate of 0.02 h, with increases of about 2.5% being noted when the additive was used. Gas production rates were always lower when the microbial additive was used, but the additive reduced the sample colonization time by more than 50% and positively affected the potential for gas production. Additionally, CH₄ yields as function of incubated or degraded DM were reduced by about 12% and 14% by using the additive, respectively. These results indicate the potential of using microbial additive isolated from the digestive tract of cattle to improve the ruminal use of sugarcane-based roughages.

Keywords: digestibility, enteric methane, *in vitro*, lactic acid bacteria, yeast

Introdução

A cana-de-açúcar é uma alternativa viável para maximizar a produção de alimentos volumosos para ruminantes, devido à alta produtividade de forragem, ao relativo baixo custo por unidade de MS produzida e por manter o valor nutritivo estável em estádios avançados do ciclo de produção, permanecendo disponível durante o período seco do ano, quando frequentemente é empregada a suplementação de volumosos. Contudo, conforme Peixoto (1986), a cana-de-açúcar apresenta baixa degradação ruminal da fração fibrosa, o que pode restringir sua aplicação para as categorias animais mais exigentes. Já segundo Mona et al. (2015), aditivos microbianos incluídos na dieta podem compor uma estratégia para melhorar a utilização de volumosos de baixa qualidade por ruminantes, por poder contribuir para a melhoria do ecossistema ruminal.

Neste estudo, dois experimentos *in vitro* foram conduzidos com os objetivos de: 1^o) avaliar o potencial de adições individuais de microrganismos isolados do trato digestivo de bovinos em dieta à base de silagem de milho + silagem de cana-de-açúcar sobre a DMS e o rendimento de CH₄ e 2^o) avaliar o potencial da adição de um dos microrganismos que se destacou positivamente no 1^o experimento para melhorar parâmetros cinéticos de aproveitamento ruminal da MS das forragens de quatro variedades de cana-de-açúcar.

Material e Métodos

Todos os procedimentos envolvendo animais neste estudo foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Embrapa Gado de Leite, protocolo CEUA nº 1999260418. As coletas dos conteúdos de trato digestivo de onde foram isolados os microrganismos utilizados nos aditivos microbianos no 1^o e 2^o experimentos do atual estudo foram conduzidas em seis novilhas da raça Holandês mantidas em dieta

composta apenas por alimentos volumosos pela mistura de 50% de silagem de cana-de-açúcar e 50% de silagem de milho.

Para as incubações empregou-se como base a técnica de produção de gases *in vitro* descrita por Maurício et al. (1999). No 1º experimento foi feita incubação de amostras de 0,5 g da dieta fornecida para as vacas doadoras de inóculo de rúmen para comparar o uso de 25 aditivos microbianos ao tratamento sem uso de aditivo (controle) quanto aos efeitos sobre a DMS e rendimento de CH₄ em função da MS degradada. Os aditivos foram compostos por isolados contendo 1 g dos microrganismos selecionados e liofilizados, que foram diluídos em 2 mL de solução de 0,1% de água peptonada e adicionados nos frascos de incubação. No 2º experimento utilizou-se apenas o aditivo microbiano #63 que foi inserido nos frascos de incubação conforme já descrito e foram utilizados como substratos 0,5 g de amostras de forragem coletadas em sete parcelas de campo distintas para as variedades de cana-de-açúcar RB58046, RB98022, RB867515 e RB969017. As concentrações de CH₄ nas amostras de gases foram determinadas em cromatógrafo a gás modelo 7820A (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Para determinação da DMS, os resíduos nos frascos de incubação foram recuperados utilizando-se filtros F57 (Ankom Technology, Fairport, NY, USA) e secos em estufa a 105°C. No 2º experimento, os dados das produções acumuladas de gases até 96-h foram utilizados para as determinações do tempo de colonização (TC), da taxa de produção de gases (“μ”) e do máximo potencial de produção de gases (“A”) e degradabilidades efetivas da MS para as taxas de passagem de 2% e 5%/h (DE2 e DE5, respectivamente).

No 1º experimento os dados foram analisados considerando o efeito fixo do tipo de aditivo e efeito aleatório de inóculo empregado na incubação. Já no 2º experimento, os dados foram analisados considerando os efeitos fixos de variedade de cana-de-açúcar, uso ou não uso de aditivo microbiano e a interação entre esses dois fatores e efeito aleatório da parcela utilizada para colheita das forragens. Significância estatística foi considerada quando $P \leq 0,05$ e a significância marginal foi considerada quando $0,05 < P \leq 0,10$. Quando se verificou $P \leq 0,05$, o teste de Fisher ($P < 0,05$) foi empregado para a comparação das médias.

Resultados e Discussão

No primeiro experimento, considerando a média observada para o tratamento controle (sem uso de ativo), os usos dos aditivos microbianos #9, #29, #30, #52, #63 e #65 na incubação *in vitro* efetuada para simular a degradação ruminal do volumoso por 24-h resultaram em aumentos ($P < 0,05$) de 10,1% até 24,1% da degradação da matéria seca (DMS), enquanto os empregos dos aditivos microbianos #31 e #42 resultaram em reduções ($P < 0,05$) de 20,9% e 25,7% nas médias de DMS do volumoso, respectivamente. Já as demais adições não alteraram ($P > 0,05$) os valores de DMS em comparação à média observada sem uso de aditivo. As comparações feitas para as médias de DMS dos tratamentos com os aditivos que promoveram aumentos de DMS em relação ao controle não diferiam ($P > 0,05$) entre si. As comparações para rendimento CH₄ em função da MS degradada, efetuadas apenas para os tratamentos cujas adições de microrganismos resultaram em aumentos de DMS em relação ao tratamento sem uso de aditivo, mostraram que a adição da levedura #30 resultou em redução ($P < 0,05$) de cerca de 50% nesse rendimento em relação à média observada para os tratamentos com as adições das leveduras #9 e #65. Já as adições das leveduras # 29, #52 e #63 promoveram, em média, redução ($P < 0,05$) de aproximadamente 45% no rendimento de CH₄ em relação ao valor notado para a adição da levedura #65. As adições das leveduras #29, #30, #52 e #63 não diferiram entre si ($P > 0,05$) quanto potencial para alterar o rendimento de CH₄ *in vitro*, sendo obtida a média de 2,99 mL/g para esses tratamentos. Foram verificadas significâncias marginais ($P \leq 0,10$) para o efeito de utilização de aditivo microbiano sobre a DMS e DE2, sendo notados aumentos de cerca de 2,5% quando o aditivo foi utilizado (**Tabela 1**).

Tabela 1. Degradação da matéria seca (DMS), degradabilidades efetivas da matéria seca nas taxas de passagem de 2%/h (DE2) e 5%/h (DE5), tempo de colonização (TC), taxa de produção de gases (“ μ ”), máximo potencial de produção de gases (“A”) e rendimentos de metano em função de matéria seca incubada (CH₄MSI) ou degradada (CH₄MSD) observados para incubações *in vitro* de forragens das variedades de cana-de-açúcar RB58046, RB98022, RB867515 e RB969017 sem ou com o uso de aditivo microbiano.

Variável	Sem aditivo microbiano				Com aditivo microbiano				EPM	P-Valor		
	RB58046	RB98022	RB867515	RB969017	RB58046	RB98022	RB867515	RB969017		VC	AM	VC*AM
DMS 96-h (g/Kg)	657,5AB	692,4A	651,8B	594,6C	697,0AB	711,1A	669,9B	583,5C	13,50	<0,00001	0,09180	0,36543
DE2 (g/Kg)	646,8AB	680,8A	640,7B	584,6C	684,8AB	698,7A	658,0B	573,3C	13,27	<0,00001	0,10175	0,37281
DE5 (g/Kg)	630,6AB	663,4A	624,0B	569,7C	666,5AB	680,1A	640,1B	558,1C	12,92	<0,00001	0,11913	0,38455
TC (h:min:seg)	00:00:07	00:00:09	00:00:05	00:00:09	00:00:03	00:00:04	00:00:05	00:00:02	00:02:43	>0,50000	0,00189	0,31306
μ (mL/h)	0,145Aa	0,130Ba	0,122Ca	0,129Ba	0,106Bb	0,109ABb	0,098Cb	0,114ABb	0,0028	0,00002	<0,00001	0,00123
A (mL/g de MS)	196,8Cb	226,8Bb	221,8Bb	242,0Aa	221,1Ca	237,7Ba	235,0Ba	245,5Aa	2,996	<0,00001	<0,00001	0,01201
CH ₄ MSI (mL/g)	11,9C	15,9B	14,5B	17,3A	9,5C	13,1B	12,5B	17,6A	0,971	<0,00001	0,02897	>0,50000
CH ₄ MSD (mL/g)	42,3C	51,9B	50,9B	68,5A	30,8C	43,0B	42,7B	67,4A	3,716	<0,00001	0,01394	>0,50000

EPM = erro padrão da média; VC = variedade de cana-de-açúcar; AM = sem ou com uso de aditivo microbiano; VC*AM = interação entre os efeitos variedade de cana-de-açúcar e sem ou com uso de aditivo microbiano. Médias na linha seguidas por letras maiúsculas comparam variedades de cana-de-açúcar em um mesmo tratamento de adição de levedura na incubação pelo teste de Fisher ($P < 0,05$).

O uso do aditivo microbiano resultou em redução ($P=0,002$) superior a 50% no tempo médio de colonização das amostras. A taxa de produção de gases (“ μ ”) foi influenciada pelas variedades testadas ($P < 0,0001$) e pelo emprego ou não do aditivo microbiano na incubação ($P < 0,0001$). As médias de “ μ ” foram sempre inferiores quando se utilizou o aditivo microbiano, mas o ranqueamento das variedades de cana-de-açúcar para os resultados de “ μ ” dependeu do uso ou não desse aditivo (interação com $P=0,001$). Com exceção das médias obtidas para a variedade RB969017, que se equivaleram independentemente do uso ou não do aditivo microbiano, o potencial de produção de gases (“A”) foi positivamente afetado pelo uso do aditivo na incubação, mas o ranqueamento das variedades foi análogo com ou sem o uso do aditivo. Já os valores médios de rendimentos de metano em função de matéria seca incubada (CH₄MSI) ou degradada (CH₄MSD) foram reduzidos ($P \leq 0,03$) em cerca de 12% e 14% pelo uso do aditivo microbiano, respectivamente. Considerando os atuais resultados sobre os parâmetros de cinética ruminal de volumosos baseados em cana-de-açúcar e, conforme Czerkawski (1969), que a produção de CH₄ entérico representa perda significativa de energia da dieta, os resultados positivos observados neste estudo apontam para a necessidade de execução de experimentos com animais (*in vivo*) para avaliar o efeito dos aditivos microbianos testados sobre o desempenho animal.

Conclusões

Os resultados indicam o potencial para melhorar o aproveitamento ruminal de volumosos à base de cana-de-açúcar pelo uso de aditivo microbiano composto por microrganismo isolado do trato digestivo de bovinos alimentados com dieta contendo silagem de cana-de-açúcar.

Agradecimentos

À Embrapa Gado de Leite pela oportunidade, ao CNPq pela concessão da bolsa de Iniciação Científica e à Universidade Federal de Juiz de Fora pela formação.

Referências

- CZERKAWSKI, J. W. Methane production in ruminants and its significance. **World Review of Nutrition and Dietetics**, v.11, p.240-282, 1969.
- MAURICIO, R. M., MOULD, F. L., DHANOA, M. S., OWEN, E., CHANNA, K. S, e THEODOROU, M. K. A semi-automated *in vitro* gas production technique for ruminant feedstuff evaluation. **Animal Feed Science and Technology**, v.79, n.4, p.321-330, 1999.
- MONA, E. M. Y.; SALEM, A. Z. M.; CASTAÑEDA, J. S. M.; CAMACHO, L. M.; KHOLIF, A. E.; CHAGOYÁN, J. C. V. Direct-fed microbes: A tool for improving the utilization

of low quality roughages in ruminants. **Journal of Integrative Agriculture**, v.14, n.3, p.526–533, 2015.

PEIXOTO, A.M. A cana de açúcar como recurso forrageiro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PASTAGENS, 1986, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: FEALQ, 1986. p.17-47.

Otimização de metodologia para isolamento de leucócitos a partir de sangue total periférico de bovinos¹

Isabela Karoline de Aguiar Soares^{2,3}, Jair Alves da Cunha Filho^{2,3}, Gabrielle Oliveira Soares^{2,3}, Tamires Rodrigues de Lima^{2,4}, Victor Hugo Halfeld Kelmer Maluf^{2,5}, Rosiana Angélica Campos^{2,6}, Carla de Oliveira Loures^{2,7}, Robert Domingues⁸, Emanuelle Baldo Gaspar⁹, Daniele Ribeiro de Lima Reis Faza¹⁰, Mariana Magalhães Campos¹¹, Hyago Passe Pereira¹², Marco Antonio Machado^{11,13}, Marta Fonseca Martins^{11,13,14}, Wanessa Araújo Carvalho¹¹

¹O presente trabalho foi realizado com o apoio do CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Brasil. Parte do projeto SEG 10.19.03.054.00.00, liderado por Wanessa A. Carvalho.

²Bolsista do Programa de Bolsa de Iniciação Científica do CNPq/ Embrapa

³Graduando(a) em Medicina Veterinária - Universidade Federal de Juiz de Fora. E-mail: isabelakas1@gmail.com, jaircunhafilho@hotmail.com, gosoares96@gmail.com

⁴Graduanda em Farmácia - Universidade Federal de Juiz de Fora. E-mail: thalima18@hotmail.com

⁵Graduando em Ciências Biológicas - Centro de Ensino Superior de Juiz de Fora. E-mail: victorhmaluf@hotmail.com

⁶Graduanda em Farmácia - Suprema. E-mail: rosianacampos@hotmail.com

⁷Graduanda Medicina Veterinária- Universidade Federal de Viçosa. E-mail: carla.loures@ufv.br

⁸Analista, Embrapa Pecuária Sul. E-mail: robert.domingues@embrapa.br

⁹Pesquisadora, Embrapa Pecuária Sul. E-mail: emanuelle.gaspar@embrapa.br

¹⁰Analista, Embrapa Gado de Leite. E-mail: daniele.reis@embrapa.br

¹¹Pesquisador(a), Embrapa Gado de Leite. E-mail: mariana.campos@embrapa.br, marco.machado@embrapa.br, marta.martins@embrapa.br, wanessa.carvalho@embrapa.br

¹²Doutorando do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Universidade Federal de Juiz de Fora, Bolsista Capes. E-mail: hyago9295@gmail.com

¹³Bolsista de Produtividade CNPq.

¹⁴Orientadora

Resumo: O desenvolvimento de uma resposta imune efetiva depende da ação orquestrada de diversos subtipos celulares que atuam tanto na resposta imune inata quanto adaptativa. Desse modo, é de grande importância a realização de estudos sobre o comportamento dessas células em diferentes raças de bovinos com propósito de desenvolver soluções para animais menos resistentes a agentes infecciosos. Para o isolamento destas células, é preciso estabelecer protocolos padronizados de coleta de *buffy coat* e células mononucleares de sangue periférico (PBMCs), os quais possam ser utilizados para diferentes raças de bovinos buscando reduzir possíveis interferentes. Durante a condução dos experimentos, foram feitas otimizações de protocolo como a substituição de reagentes e adição de etapas para que os mesmos fossem padronizados. Por fim, obteve-se dois protocolos que possibilitaram o isolamento tanto de *buffy coat* quanto de PBMCs, as quais serão utilizadas em análises genômicas e imunológicas.

Palavras-chave: bovinos, *buffy coat*, protocolos, PBMCs, sequenciamento de RNA

Optimization of methodology for isolation of leukocytes from bovine peripheral whole blood

Abstract: The development of an effective immune response depends on several cell subtypes that act on both the innate and adaptive immune responses. It is of great importance to carry out studies on the behavior of these cells in different breeds of cattle with the aim of developing solutions for animals that are less resistant to infectious agents. For the isolation of these cells, it is necessary to establish standardized protocols for collecting buffy coat and peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), which could be useful for different breeds of cattle. While conducting the

experiments, protocol optimizations were made, such as replacing reagents and adding steps to standardize them. Finally, two protocols were obtained that allowed the isolation of both white cells and PBMCs, which can be used in genomic and immunological analysis.

Keywords: cattle, buffy coat, tick, protocols, PBMCs, RNA sequencing

Introdução

O sangue é composto por soro, hemácias, plaquetas e leucócitos. Este último grupo é composto por dois grandes grupos, os polimorfonucleares (neutrófilos, eosinófilos, basófilos) e os mononucleares (linfócitos e monócitos), os quais têm diferentes funções relacionadas à proteção do organismo frente a patógenos ou mesmo à remoção de células inviáveis (Tizard, 2014). Os monócitos são fagócitos mononucleares que participam de processos como resistência microbiana, apoptose, vigilância tumoral e manutenção de tecidos, mas a sua principal função é se diferenciar em macrófagos teciduais, os quais junto com os monócitos são capazes de interligar a resposta imune inata e a adaptativa pela apresentação de antígenos (Sampath et al., 2018).

Visto as funções dos monócitos no combate aos patógenos, são necessários estudos que avaliem o comportamento dessas células em bovinos de raças zebuínas e europeias infestados por ecto e endoparasitas. Dessa forma, será possível obter uma solução biomolecular para os animais que têm respostas menos efetivas frente a esses agentes, como é o caso das raças europeias. Além disso, por meio do isolamento de macrófagos, estudos sobre padrões de resposta imunológica de bovinos de uma forma geral poderão ser compreendidos mais profundamente.

Sendo assim é de suma importância estabelecer e otimizar protocolos para isolamentos dos grupos celulares envolvidos nos processos de defesa. Segundo Turner et al. (2020), a qualidade das células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) é influenciada por vários fatores e devido a isso, antes de as utilizar é preciso validar os métodos de processamento das amostras. Dessa forma, para que as PBMCs sejam utilizadas em ensaios comparando diferentes grupos genéticos, é preciso evitar possíveis interferentes que prejudiquem a acurácia das análises. Assim, o objetivo desse estudo foi a otimização e padronização de protocolos de isolamento celular por meio de técnicas de coleta de *buffy coat* (células brancas) e de PBMCs de duas raças de bovinos distintas, as quais serão utilizadas para análises genômicas e imunológicas.

Material e Métodos

Como protocolo inicial foi utilizado o método empregado por Daibert et al. (2020), entretanto algumas etapas precisaram ser otimizadas ao longo do desenvolvimento do projeto. Amostras de sangue periférico foram coletadas por punção de veia jugular utilizando tubos a vácuo com EDTA de vacas e bezerros das raças Gir e Holandesa criados no Campo Experimental José Henrique Bruschi da Embrapa Gado de Leite (CEUA 8798030820). Para as análises laboratoriais dessas amostras os procedimentos otimizados foram: a coleta de *buffy coat* e a coleta de PBMCs para extração de RNA e congelamento de células para futuras análises.

Uma etapa inicial foi realizada em comum para os dois procedimentos, a qual promovia a lise de hemácias. Nesta etapa, as amostras foram centrifugadas a 2.1230 x g por 10 min para que ocorresse a separação das células. Dentro da capela de fluxo laminar, coletou-se a camada de *buffy coat* de todos os tubos e essas células foram transferidas para um tubo do tipo Falcon de 50 mL. Nas primeiras amostras acrescentou-se às células 15 mL de tampão de lise de hemácias (Cloreto de Amônio 0,144 M, Bicarbonato de Amônio 0,01 M), entretanto posteriormente esse reagente foi substituído pelo tampão de hemólise (bicarbonato de sódio 0,1 M, cloreto de amônio

0,15 M e EDTA 0,0001 M, pH 7,2) até completar 15 mL. Em seguida, o tubo foi agitado por inversão durante 30 seg, aguardou-se 3 min em repouso, depois o tubo foi agitado novamente por mais 30 seg e deixado em repouso por mais 1 min. Posteriormente completou-se o volume para 50 mL com PBS 1X (Cloreto de Sódio 0,137 M, Cloreto de Potássio 0,0027, Fosfato de Sódio 0,01 M e Fosfato de Potássio 0,0018 M, pH 7,4) e as amostras foram novamente centrifugadas a 2.440 rpm por 10 min. Inicialmente o PBS utilizado era suplementado com 1% de SFB (soro fetal bovino).

Em relação à coleta de *buffy coat*, o pelete obtido foi ressuscitado em 1 mL de PBS. Logo após, 10 µL dessa solução foi homogeneizada com 490 µL de solução de Azul de Tripán. Para a contagem do título celular, aplicou-se 10 µL desta diluição em uma câmara de Neubauer, onde a contagem foi realizada nos dois quadrantes das extremidades para que a média do número de células fosse obtida. Após a contagem, foi realizado o cálculo com o objetivo de obter alíquotas com concentrações de células de 5×10^6 /mL. As amostras foram então centrifugadas a 400 x g por 10 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o pelete foi ressuscitado em 300 µL de RNAlater (Ambion, Carlsbad, EUA). As amostras foram mantidas a 4°C por 24 h e, posteriormente, armazenadas à -20°C até o uso.

Por outro lado, para a coleta de PBMCs, o pelete obtido a partir da etapa inicial foi ressuscitado em 3 mL de PBS. Em um tubo de 15 mL, primeiramente foram adicionados 4 mL de Ficoll® Paque Plus (Merck, Darmstadt, Alemanha) e, em seguida, 3 mL das células preparadas foram adicionadas lentamente para evitar a mistura das soluções. As amostras foram então centrifugadas a 400xg por 40 min com ajuste de aceleração e desaceleração lentas. Um anel intermediário contendo os PBMCs foi observado e transferido para outro tubo já com 7 mL de PBS. Completou-se o volume com PBS até 15 mL. As amostras foram centrifugadas a 440 x g por 10 min. Por fim, o sobrenadante foi descartado e o pelete foi ressuscitado em 1 mL de PBS. A contagem das células foi realizada em câmara de Neubauer seguindo a mesma metodologia adotada para a contagem e armazenamento do *buffy coat*. A avaliação da qualidade das amostras será realizada em etapas posteriores ao presente trabalho e será baseada no rendimento de células bem como na viabilidade destas sob microscopia óptica.

Resultados e Discussão

Durante a otimização/ padronização foi preciso realizar algumas alterações, as quais foram fundamentais para o isolamento de células viáveis e em estado ideal para serem utilizadas em análises futuras. Segundo Daibert et al. (2020), o SFB evita que componentes bioquímicos individuais do soro autólogo interfiram na diferenciação celular. Entretanto, no presente trabalho foi observado que algumas amostras apresentaram coagulação, o que provavelmente era resultado de reações com a albumina presente em altas concentrações no SFB. Portanto, o PBS passou a ser utilizado puro, o que não prejudicou a preservação das células.

Para a lise celular inicialmente foi utilizada a solução de ACK, entretanto foi preciso substituí-la pelo tampão de hemólise o qual continuou garantindo a lise das hemácias sem comprometer a integridade dos leucócitos. O primeiro protocolo de coleta de PBMCs era iniciado com o *buffy coat* diluído em PBS, o que funcionou muito bem para as vacas (Figura 2A). Contudo, observou-se que no caso dos bezerros o gradiente com o Ficoll Paque era prejudicado provavelmente devido a diferenças de volume celular (Figura 2B). Dessa forma, a solução encontrada foi a utilização da solução de hemólise, seguindo dessa forma a mesma etapa inicial de coleta de *buffy coat*, o que permitiu com que o gradiente adequado fosse formado (Figura 2C). Portanto o protocolo já anteriormente trabalhado foi sendo otimizado à medida que problemas foram surgindo, o que resultou em amostras íntegras e adequadas para a utilização em futuras análises.

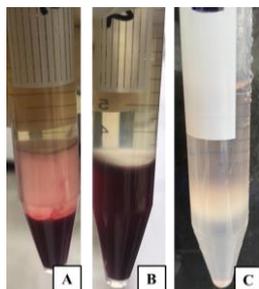


Figura 1. Gradiente de Ficoll Paque: **1A** - vacas, **1B** (bezerros sem hemólise de hemácias) e **1C** (bezerros após hemólise de hemácias).

Conclusões

Na literatura há diversos protocolos descritos, entretanto, cada estudo contém particularidades que precisam ser consideradas, as quais exigem aperfeiçoamentos constantes com o objetivo de se obter procedimentos bem estabelecidos para a população estudada. Portanto, foi possível destacar a importância do estabelecimento de protocolos universais para duas raças de bovinos e em diferentes idades. Dessa forma, o trabalho obteve protocolos com a uniformidade necessária ao reduzir o máximo de interferentes, o que possibilitará confiabilidade em futuras análises para o sequenciamento de RNA.

Agradecimentos

À toda equipe envolvida no trabalho, em especial aos técnicos de campo Jonas Campos do Amaral, José Roberto Nogueira (Betinho), Glória Veronica e Luis Lopes pelos cuidados e dedicação com os animais experimentais, essenciais para os resultados obtidos.

Referências

- DAIBERT, R. M. P.; JUNIOR, C. A. O. B.; VIEIRA, F. O.; DA SILVA, M. V. G. B; HOTTZ, E. D.; PINHEIRO, M. B. M.; FAZA, D. R. L. R.; PEREIRA, H. P.; MARTINS, M. F.; BRANDÃO, H. M.; MACHADO, M. A.; CARVALHO, W. A. Lipopolysaccharide triggers different transcriptional signatures in taurine and indicine cattle macrophages: Reactive oxygen species and potential outcomes to the development of immune response to infections. **PLoS ONE**. 2020. doi: [10.1371/journal.pone.0241861](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0241861)
- SAMPATH, P.; MOIDEEN, K.; RANGANATHAN, U. D.; BETHUNAICKAN, R. Monocyte Subsets: Phenotypes and Function in Tuberculosis Infection. **Frontiers in Immunology**. v.9, p. 1726, 2018. doi: [0.3389/fimmu.2018.01726](https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01726)
- TIZARD, I. R. **Imunologia Veterinária**. 9ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014.
- TURNER, R.J.; GERAGHTY, N.J.; WILLIAMS, J.G.; LY, D.; BRUNGS, D; CAROLAN, M. G.; GUY, T. V.; WATSON, D.; LEON, J. F. de; SLUYTER, R. Comparison of

peripheral blood mononuclear cell isolation techniques and the impact of cryopreservation on human lymphocytes expressing CD39 and CD73. **Purinergic Signalling**. 16, p. 389–401, 2020. doi: [10.1007/s11302-020-09714-1](https://doi.org/10.1007/s11302-020-09714-1)

Validação de marcadores moleculares para identificação de cultivares forrageiras¹

Rosiana Angélica Campos², Daniele Ribeiro de Lima Reis Faza³, Ana Luisa Sousa Azevedo^{4,5}

¹O presente trabalho foi realizado com o apoio do CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Brasil.

²Graduando em Farmácia – Suprema/Juiz de Fora. e-mail: rosiana.angelica@gmail.com

³Analista - Embrapa Gado de Leite/Juiz de Fora: daniele.reis@embrapa.br

⁴Pesquisadora - Embrapa Gado de Leite/Juiz de Fora: ana.azevedo@embrapa.br

⁵Orientadora

Resumo: Atualmente, existem muitas técnicas para desenvolvimentos de perfis de DNA para a diferenciação de cultivares, tais como os microssatélites. Apesar de ainda não serem utilizados para registro e proteção, as técnicas moleculares vêm sendo utilizadas como ferramentas auxiliares nas análises dos processos, no sentido de comprovação da origem genética da cultivar (teste de paternidade), na identificação de cultivares em casos de uso indevido e em atividades de fiscalização. Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi desenvolver perfis de DNA (DNA fingerprinting) para diferenciação das cultivares forrageiras protegidas pela Embrapa. Foram avaliadas as quatro cultivares de capim elefante lançadas pela Embrapa (Pioneiro, BRS Capiáçu, BRS Kurumi e BRS Canará) comparadas com acessos do Banco Ativo de Germoplasma de capim-elefante da Embrapa Gado de Leite. Foram testados 21 conjuntos de *primers* de microssatélite e aqueles que apresentaram maior poder de identificação de uma ou mais cultivares foi avaliado em um conjunto maior de amostras. Foi possível identificar um padrão específico para cada uma das cultivares avaliadas e os resultados obtidos serão utilizados para comprovação de identidade e avaliação de comercialização ilegal das cultivares.

Palavras-chave: capim-elefante, cenchrus, microssatélite, ssr

Validation of molecular markers for cultivar identification

Abstract: Currently, there are many techniques for developing DNA profiles for cultivar differentiation, such as microsatellites. Although not yet used for registration and protection, molecular techniques have been used as auxiliary tools in the analysis of processes, in the sense of proving the genetic origin of the cultivar (paternity test), in the identification of cultivars in cases of misuse and in inspection activities. Thus, the objective of this work was to develop DNA profiles (DNA fingerprinting) for differentiation of forage cultivars protected by Embrapa. The four elephant grass cultivars launched by Embrapa (Pioneiro, BRS Capiáçu, BRS Kurumi and BRS Canará) were evaluated and compared with accessions from the Elephant grass Germoplasma Bank of Embrapa Gado de Leite. Twenty-one primers were tested and those that showed greater identification power of one or more cultivars were evaluated in a larger set of samples. It was possible to identify a specific pattern for each of the cultivars evaluated and the results obtained will be used for proof of identity and assessment of illegal commercialization of the cultivars.

Keywords: elephant grass, cenchrus, microsatellite, ssr

Introdução

No Brasil, a atividade leiteira é praticada por mais de um milhão de produtores, em sua maioria pequenos, que têm nas pastagens e nas capineiras as mais importantes fontes de alimentação para o rebanho. Fatores como a integração do Brasil aos mercados internacionais, expansão da agricultura, preservação ambiental e inclusão social, dentre outros, têm provocado mudanças nos sistemas de produção animal no sentido da intensificação (VALENTIM, 2004). Tecnologias que promovem a intensificação têm sido desenvolvidas, como a integração lavoura-pecuária, pastejo rotativo e plantio direto, as quais exigem forrageiras adaptadas. Nesse contexto, existe forte demanda por forrageiras de elevado potencial produtivo e qualidade nutricional visando manter elevada a produtividade animal durante o ano todo (PEREIRA et al., 2010). Por esse motivo uma das principais demandas dos produtores refere-se a cultivares forrageiras melhoradas para corte e pastejo que possam atender as necessidades nutricionais dos rebanhos durante todo o ano (VALENTIM, 2004; PEREIRA et al., 2010).

A obtenção de novas cultivares pode ter grande contribuição para solucionar dois problemas principais dos sistemas de produção animal. O primeiro seria a demanda por cultivares adaptadas para sistemas intensificados de produção animal e o segundo por cultivares que possam suprir a deficiência de alimento nas épocas de menor disponibilidade.

O mercado brasileiro de sementes de forrageiras tropicais movimenta aproximadamente R\$ 1 bilhão por ano, o que representa cerca de 20% do mercado formal de sementes no Brasil (JOSÉ, 2013). A demanda por sementes certificadas de espécies forrageiras tropicais chega a 50 mil toneladas, onde 75% destinam-se ao mercado interno e 25% para exportação (CHIARI, 2015). Esses números demonstram a importância da atividade para o agronegócio brasileiro e dá uma ideia do prejuízo que o mercado ilegal (“pirataria”) de sementes de forrageiras tropicais traz para toda a cadeia produtiva. A produção e comercialização de sementes “piratas” de forrageiras tropicais, segundo levantamentos da Associação para o Fomento à Pesquisa de Melhoramento de Forrageiras (Unipasto), alcançam 30% do mercado desse tipo de sementes (JOSÉ, 2013).

O mercado ilegal traz prejuízo para toda a cadeia produtiva. O pecuarista perde, pois as sementes “piratas” têm qualidade duvidosa (baixa qualidade e pureza), o que compromete a formação e a qualidade de suas pastagens. Os produtores de sementes perdem devido à competição desleal pelo preço. Os obtentores das cultivares perdem porque deixam de receber os royalties, o que compromete o retorno dos investimentos às pesquisas de novas cultivares. Por fim, o governo perde porque deixa de arrecadar impostos, o que se traduz em prejuízo a toda sociedade brasileira.

A identificação de cultivares tem sido tradicionalmente realizada por meio de descritores morfológicos, aceitos para registro e proteção de cultivares pela UPOV (União Internacional para a Proteção de Novas Variedades de Plantas), da qual o Brasil é signatário (IPGRI, 1997). Entretanto, esses descritores têm muitas desvantagens, como o baixo número e o fato de sofrerem a influência do ambiente na sua expressão, além de interações epistáticas, efeitos pleiotrópicos, etc. Ademais, a perícia desses descritores é, geralmente, difícil e restrita a especialistas.

Atualmente, existem muitas técnicas para desenvolvimentos de perfis de DNA (DNA fingerprinting) para a diferenciação de cultivares, tais como os microssatélites. Apesar de ainda não serem utilizados para registro e proteção, as técnicas moleculares vêm sendo utilizadas como ferramentas auxiliares nas análises dos processos, no sentido de comprovação da origem genética da cultivar (teste de paternidade), na identificação de cultivares em casos de uso indevido e em atividades de fiscalização (AVIANI & SANTOS, 2011). Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi desenvolver perfis de DNA (DNA fingerprinting) para diferenciação das cultivares forrageiras protegidas pela EMBRAPA.

Material e Métodos

Foram coletadas folhas jovens de todas as cultivares lançadas pela Embrapa nos últimos 10 anos. O DNA foi extraído utilizando o método de Bonato et al. (2002), que obtém DNA de alta qualidade. O DNA extraído foi quantificado em espectrofotômetro Nanodrop 2000 (Thermo Scientific®) e sua integridade verificada em gel de agarose corado com GelRed (Biotium).

Para a amplificação com os marcadores microsatélites foram sintetizados *primers* simples para avaliação em gel de poliácridamida e *primers* marcados com diferentes fluoróforos (6FAM™, VIC®, NED™ e PET®) para eletroforese capilar. A reação em cadeia de polimerase foi realizada em um volume final de 20 µL como descrito: 1X GoTaq reaction buffer (Promega, Wisconsin, Estados Unidos), 0,5 µM de cada *primer*, 3 mM MgCl₂, 0,4mM dNTP, 1 unidade de GoTaq Flexi DNA Polimerase (Promega, Wisconsin, Estados Unidos) e 45 ng de DNA genômico. As reações em cadeia da polimerase foram realizadas em termociclador Veriti (Life Technologies, Califórnia, Estados Unidos) com o seguinte perfil: desnaturação inicial a 95°C (15 minutos), seguido de 5 ciclos a 94°C (30 segundos), temperatura de ligação específica de cada *primer* (90 segundos) e 57°C (1 minuto), com decréscimo de 1°C na temperatura de ligação por ciclo; 25 ciclos a 94°C (30 segundos), temperatura de ligação específica de cada *primer* (90 segundos) e 52°C (1 minuto); e um ciclo final de extensão de 60 minutos a 60°C. Em seguida, os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de poliácridamida a 8% por 5 horas a uma voltagem de 500 V.

Com base no poder discriminatório dos alelos, foram desenvolvidos os perfis de DNA, baseados em SSR, para cada cultivar.

Resultados e Discussão

A partir dos resultados dos testes de amplificação dos *primers* desenhados, os 21 mais promissores foram avaliados para a identificação de polimorfismos entre 20 cultivares/acessos do Banco Ativo de Germoplasma de capim-elefante (BAGCE) da Embrapa.

O *primer* RNA-CE 05 mostrou um padrão de bandas que diferenciaram as cultivares BRS Kurumi e Mott (um dos parentais do Kurumi) dos demais acessos analisados. Como pode ser observado na Figura 1, ambas as amostras apresentaram bandas exclusivas próximas a 290 pb.

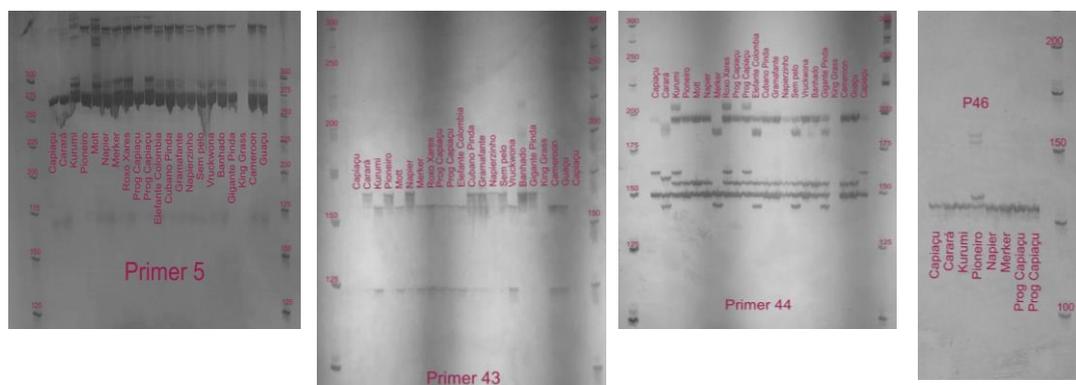


Figura 1. Gel de acrilamida com os *primers* 5, 43, 44 e 46 avaliados em amostras de DNA de cultivares e acessos pertencentes ao BAGCE.

O *primer* RNA-CE 44 permitiu a identificação de um padrão de bandas único para BRS Canará, como visto na Figura 1. Para esta cultivar, foi identificado um perfil de bandas com tamanhos de 145, 150 e 158 pb.

A identificação de um padrão único da cultivar Pioneiro pode ser observada no *primer* RNA-CE 46. A partir da avaliação de amplificação de BRS Capiáçu, BRS Canará, BRS Kurumi, Pioneiro, Napier, Merker e Prog Capiáçu foi possível visualizar que a cultivar Pioneiro apresentou bandas nas regiões de 130 e 133pb (Figura 1).

Três *primers* foram informativos para a identificação da cultivar BRS Capiáçu. Assim como pode ser visto na Figura 1, RNA-CE 5 apresentou uma única banda na região de 270 pb. Já RNA-CE 43 se diferencia por não ser amplificado na cultivar aqui em destaque. O *primer* RNA-CE 44 pode ser considerado um forte identificador de Capiáçu por apresentar um padrão de banda único, com bandas encontradas somente nas regiões 150 e 162 pb (Figura 1).

Conclusões

Com os marcadores microssatélites avaliados é possível identificar as seguintes cultivares de capim-elefante: BRS Capiáçu, BRS Kurumi, BRS Canará e Pioneiro.

Referências

- AVIANI, D. M.; SANTOS, F. S. Uso de marcadores moleculares em proteção de cultivares. In: BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Proteção de Cultivares no Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Desenvolvimento Agropecuário e Cooperativismo, Brasília: Mapa/ACS, 2011. p.155-158.
- BONATO, A. L. V.; VERZIGNASSI, J. R.; RESENDE, R. M. S.; FERNANDES, C. D.; LEGUIZAMON, G. O. de C. **Extração de DNA genômico de *Stylosanthes* spp.** Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2002. 4 p. (Embrapa Gado de Corte. Comunicado Técnico, 78)
- JOSÉ, M. R., Forrageiras: uma grande parceira para o agronegócio. Associação Brasileira de Sementes e Mudanças Anuário, 2012.
- PEREIRA, A. V.; AUAD, A. M., LÉDO, F. J. S.; BARBOSA, S. Pennisetum purpureum. In: FONSECA, D. M., MARTUSCELLO, J. A. Eds. **Plantas Forrageiras**. Viçosa: UFV, 2010. p. 198-220.
- VALENTIM, J. F. Pecuária na Amazônia: mudanças macroeconômicas, políticas, tecnológicas e conexões entre o seminário de Porto Velho e o workshop de Belém. In: WORKSHOP INTERNACIONAL PARA DESENVOLVIMENTO DA PECUÁRIA NA AMAZÔNIA: BASES PARA A PRODUÇÃO E SUSTENTABILIDADE DAS PASTAGENS, 2004, Belém, PA. Anais... Belém: Embrapa/Iniciativa Amazônica/ Procitrópicos/IICA, 2004. 1 CD.

Produção in vitro de embriões bovinos, clonagem animal e apoptose¹

Eduardo Rocha², Luiz Sergio de Almeida Camargo^{3,4}

¹O presente trabalho foi realizado com o apoio do CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Brasil. Parte do projeto edição genômica em embriões bovinos via sistema CRISPR/Cas9 conjugado com nanopartículas de carbono, liderado por Luiz Sergio de Almeida Camargo.

²Graduando em Farmácia – UNICSUM/JUIZ DE FORA. e-mail: dudujf98@gmail.com

³Pesquisador Embrapa Gado de Leite. e-mail: luiz.camargo@embrapa.br

⁴Orientador

Resumo: O presente trabalho relaciona a produção in vitro de embriões (PIVE) com a clonagem, também conhecida como transferência nuclear com células somáticas (TNCS), onde etapas da PIVE são de importância para o sucesso da clonagem animal, e mostra que o sucesso de ambas as técnicas pode ser afetado pela ocorrência de apoptose. Portanto, o sucesso dessas técnicas está relacionado a qualidade dessas etapas e a eliminação de fatores estressantes que podem levar a apoptose.

Palavras-chave: Apoptose Celular, Clonagem Animal e Produção in Vitro de Embriões

In vitro embryo production, animal cloning and apoptosis

Abstract: The present work connects the in vitro embryo production (IVP) with cloning, also known as somatic cell nuclear transfer (SCNT), where steps of the IVP are of importance for the success of animal cloning, and shows that the success of both techniques can be affected by apoptosis. Therefore, the success of both techniques is related to the quality of these steps and the elimination of stressors that can lead to apoptosis.

Keywords: Cell Apoptosis, Animal Cloning and In Vitro Embryo Production (IVP).

Introdução

A tecnologia de produção in vitro de embriões (PIVE) surgiu na década de 80 e se desenvolveu nas últimas décadas, tornando-se a técnica de escolha para reprodução assistida em bovinos. A produção in vitro de embriões é conduzida em três etapas: a maturação oocitária, a fecundação dos oócitos *in vitro* e o cultivo embrionário até chegar ao estágio de blastocisto (Camargo *et al*, 2006). Neste momento os embriões estão prontos para a transferência para receptoras ou para serem criopreservados. A TNCS surgiu em 1996, com o relato do nascimento da ovelha clone Dolly (Wilmut *et al*, 1997), sendo essa técnica dependente das mesmas etapas da PIVE, com exceção da fecundação in vitro. O processo de apoptose, também conhecido como morte celular programada, ocorre regularmente para garantir um equilíbrio homeostático entre formação e a morte celular sendo, portanto, considerada crucial no desenvolvimento de um embrião ao longo do crescimento de um organismo. No entanto, um desequilíbrio dessa função pode contribuir para um crescimento/proliferação celular anormal e afetar o desenvolvimento celular e embrionário (Obeng, 2021).

O objetivo deste trabalho e revisão bibliográfica é relacionar a PIVE, a TNCS e a apoptose celular proporcionando um entendimento de como cada uma dessas se inter-relacionam e são afetadas pela apoptose na produção do embrião.

Material e Métodos

O presente trabalho trata-se de uma pesquisa bibliográfica. Ressalta-se que não houve pesquisa laboratorial, por conta do estado de pandemia no Brasil, desde março de 2020, e da suspensão temporária das atividades laboratoriais. Sendo assim, esta revisão tem como base artigos retirados de plataformas como: Google Acadêmico, Periódicos Capes, Scielo e PubMed, além de livros da área

Resultados e Discussão

Produção *in vitro* de embriões (PIVE)

A PIVE é a técnica de reprodução assistida atualmente mais utilizada na produção de embriões bovinos. A maturação ocorre diretamente após a remoção do oócito do ambiente folicular, e ela ocorre tanto à nível citoplasmático como nuclear. As alterações nucleares ocorrem em torno de 24 horas, fazendo o oócito passar do estágio de diplóteno da prófase I até o estágio de Metáfase II (Gonçalves *et al.*, 2007). É necessário utilizar um meio adequado para que ocorra essa maturação. O meio de escolha geralmente é o *tissue culture medium* (TCM199), adicionado de nutrientes e de hormônios, como FSH e LH, além da suplementação com soro bovino e/ou albumina sérica bovina (Camargo *et al.*, 2006). Deve-se atentar que qualquer alteração morfológica no processo de aspiração folicular pode causar impacto na maturação.

Após a maturação o oócito está pronto para a fecundação. Nesta fase, é necessário utilizar um meio de cultivo apropriado, suplementado com heparina, importante na capacitação do espermatozoide, dentre outros componentes. Para a descongelamento do sêmen, geralmente se utiliza banho maria a 35°- 37°C por 30 segundos seguido de centrifugação em solução com diferentes gradientes de Percoll, para que ocorra uma separação dos espermatozoides viáveis. O período de co-incubação dos espermatozoides com os oócitos para a fertilização *in vitro* pode variar de 12 a 20 horas, quando então os presumíveis zigotos podem ser transferidos para o meio de cultivo (3ª etapa do processo)

No período de cultivo embrionário o embrião permanece de sete a oito dias em estufa incubadora, quando então atinge o estágio de blastocisto e estará pronto para a transferência para o útero de uma receptora ou para criopreservação. Para o cultivo embrionário está disponível diferentes meios de cultivo, sendo o mais comum o meio fluido sintético do oviduto (SOF), suplementado com soro ou albumina. O ambiente atmosférico ideal para a maturação, fecundação e desenvolvimento embrionário deve conter 5-6% de CO₂, podendo ser em baixa tensão de O₂ (5-7%) ou em ar atmosférico (Gonçalves *et al.*, 2007).

Transferência nuclear de célula somática,

A técnica de transferência nuclear de célula somática (TNCS), também conhecida por clonagem animal, apesar de ter alguns avanços, ainda apresenta eficiência limitada e tem se desenvolvido lentamente (Ogura *et al.*, 2012), pois há diversas barreiras a serem vencidas, tanto biológicas quanto éticas. Resumidamente, a técnica consiste nas seguintes etapas: enucleação de um oócito, maturado de forma semelhante a PIVE; seleção de uma célula somática doadora do núcleo; injeção dessa célula doadora no espaço perivitelínico do oócito enucleado; indução da fusão entre as membranas da célula doadora e do oócito, através de um equipamento chamado eletrofusor, e finalmente na ativação do oócito reconstruído com a célula doadora (Ibtisham *et al.*, 2017).

O embrião reconstruído é cultivado *in vitro* para seu desenvolvimento até estágio de blastocisto, como ocorre na PIVE. O sucesso da TNCS depende de diversas

modificações na cromatina, replicação do DNA, ativação do genoma embrionário, reprogramação celular, modificação das histonas, reprogramação da metilação do DNA e por fim a reprogramação do transcriptoma (Rodrigues-Osorio *et al.*, 2012).

Apoptose Celular

A apoptose, também conhecida como morte celular programada pode ser induzida por algum efeito extrínseco ou intrínseco (Obeng, 2021), porém, diferentemente da necrose, na apoptose não ocorre extravasamento de conteúdo citoplasmático, não ocorrendo nenhum tipo de dano as células vizinhas. As células em apoptose podem apresentar agregação e condensação da cromatina, fragmentação nuclear, perda do volume celular, formação de protuberâncias na membrana plasmática e a formação de corpos apoptóticos (Ziegler & Groscurth, 2004).

A taxa de incidência desta alteração nas células, gametas e embriões influencia diretamente o sucesso das técnicas de reprodução assistida.

Exposição dos oócitos e embriões aos meios de cultivo sub-ótimos, estresses oxidativo ou térmico, decorrentes do próprio processo de manipulação e ambiente de cultivo *in vitro*, elevam as taxas de apoptose e reduzem as chances de se obter embriões saudáveis, sejam esses produzidos pela fecundação *in vitro* ou pela clonagem animal (Khurama & Niemann, 2000).

Portanto, deve-se procurar minimizar as de estresse e controlar os fatores desencadeantes da apoptose ara o incremento das taxas e na qualidade de embriões produzidos por PIVE ou TNCS.

Conclusão

A PIVE e a TNCS compartilham de algumas técnicas de cultivo para maturação do oócito e para o desenvolvimento embrionário e que são influenciados por fatores indutores de apoptose. O sucesso de ambas está relacionado a qualidade desses cultivos e a eliminação de fatores estressantes que podem levar a apoptose, a qual reduz a qualidade embrionária.

Agradecimentos

Agradeço a meu orientador por toda a paciência e cuidado, durante minha jornada acadêmica.

Referências

- CAMARGO, L. S. A.; VIANA, J. H. M.; SÁ, W. F.; FERREIRA, A. M.; RAMOS, A. A.; VALE FILHO, V. R. Factors influencing *in vitro* embryo production. **Anim. Reprod**, v. 3, n. 1, p. 19-28, 2006.
- GONÇALVES, P. B. D.; BARRETA, H. M.; SANDRI, L. R.; FERREIRA, R.; ANTONIAZZI, A. Q. Produção *in vitro* de embriões: O estado da Arte. **Bras Reprod Anim**, v. 31, n. 2, p. 212-217, 2007.
- IBTISHAM, F.; FAHD QADIR, M. M.; XIAO, M.; AN, L. Animal cloning applications and issues. **Russ J Genet**, v. 53, p. 965–971, 2017. doi: <https://doi.org/10.1134/S102279541709006X>
- KHURANA, N. K.; NIEMAN, H. Effects of oocyte quality, oxygen tension, embryo density, cumulus cells and energy substrates on cleavage and morula blastocyst formation of bovine embryos. **Theriogenology**, v. 54, n. 5, p. 741-756, 2000. doi: [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(00\)00387-3](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(00)00387-3)

- MATOBA. S.; ZHANG, I. Somatic Cell Nuclear Transfer Reprogramming: Mechanisms and Applications. **Cell Stem Cell**, v. 23, p. 1-15, 2018. doi: <https://doi.org/10.1016/j.stem.2018.06.018>
- OBENG, E. Apoptosis (programmed cell death) and its signals - A review. **Braz. J. Biol**, São Carlos, v. 81, n. 4, p. 1133-1143, 2021. doi: <https://doi.org/10.1590/1519-6984.228437>
- OGURA. A.; INOUE, K.; WAKAYAMA, T. Recent advancements in cloning by somatic cell nuclear transfer. **Phil. Trans. R. Soc**, v. 368, n. 1609. 2012. doi: <https://doi.org/10.1098/rstb.2011.0329>
- RODRIGUEZ-OSORIO N., URREGO R., CIBELLI JB., EILERTSEN K., MEMILI E. Reprogramming mammalian somatic cells. **Theriogenology**, v. 78, p. 1869–1886, 2012. doi: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.05.030>
- SILVA, R.R., VULCANI, V.A.S., CAMARGOS, A.S., COSTA, U.R., DUTRA, M.M., CHIARI, J.R. Produção in Vitro de Embriões Bovinos: Estado da Arte. **Colloquium Agrarie**. v. 13, p. 402-415, 2017. doi: [10.5747/ca.2017.v13.nesp.000244](https://doi.org/10.5747/ca.2017.v13.nesp.000244)
- WILMUT, I., SCHNIEKE, A., MCWHIR, J. ET AL. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. **Nature**, v. 385, p. 810–813, 1997. doi: <https://doi.org/10.1038/385810a0>
- ZIEGLER, U., GROSCURTH, P. Morphological features of cell death. **News Physiol Sci**. v. 19, p. 124-28, 2004. doi: <https://doi.org/10.1152/nips.01519.2004>

Proteínas de ação inseticida com potencial de uso no controle da cigarrinha-das-pastagens: uma revisão¹

Thiago Andrei de Sá², Alexander Machado Auad³, Jorge Fernando Pereira^{3,4}

¹O presente trabalho foi realizado com o apoio do CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - Brasil.

²Graduando em Ciências Biológicas - UFJF. Bolsista CNPq. e-mail: thiago.andrei@icb.ifjf.com

³Pesquisadores da Embrapa Gado de Leite - Juiz de Fora, MG. E-mail: alexander.auad@embrapa.br; jorge.pereira@embrapa.br

⁴Orientador

Resumo: As cigarrinhas-das-pastagens (Hemiptera: Cercopidae) impactam a produção de forragens no Brasil, causando perdas significativas na produção de leite e carne. Por não haver forrageira altamente resistente a todas as espécies de cigarrinhas, uma alternativa para o controle destes insetos é a obtenção de forrageiras geneticamente modificadas (GM) que expressam proteínas de ação inseticida. Portanto, a escolha dos genes mais eficazes para obtenção das forrageiras GM é uma etapa essencial. Assim, este trabalho objetivou listar as proteínas de ação inseticida que têm sido utilizadas para o controle de insetos hemípteros e identificar aquelas com maior potencial de uso para o controle das cigarrinhas-das-pastagens. Para tanto, foi feita uma revisão bibliográfica no repositório NCBI/PubMed com as palavras-chave “insecticidal proteins” e “hemiptera” limitada a artigos publicados nos últimos 20 anos (2001 a 2020). Foram listados 663 artigos científicos e, após análise, foram identificados 57 que descreviam o uso de proteínas de ação inseticidas contra hemípteros. Foram extraídos dados dos 57 artigos, sendo identificadas as proteínas utilizadas, seus modos de ação, os insetos hemípteros que foram estudados e a taxa de mortalidade obtida. Baseado nos dados levantados, foram definidas três proteínas de ação inseticida que potencialmente podem ser utilizadas para o controle das cigarrinhas-das-pastagens via obtenção de forrageiras geneticamente modificadas.

Palavras-chave: cigarrinha-das-pastagens, forrageiras geneticamente modificadas, insetos hemípteros, pastagens, proteínas de ação inseticida, transgênicos

Insecticidal proteins with potential use in spittlebug control: a review

Abstract: The attack of spittlebugs (Hemiptera: Cercopidae) impacts the forage production in Brazil, causing significant losses in milk and meat production. Since there are no forages that are highly resistant to all species of spittlebugs, an alternative to control these insects is to obtain genetically modified (GM) forages that express insecticidal proteins. Therefore, choosing the most effective genes for obtaining GM forages is an essential step. Thus, this work aimed to list the insecticidal proteins that have been used to control hemipteran insects and to identify those with the greatest potential for use in the control of spittlebugs. Therefore, a bibliographic review was carried out in the NCBI/PubMed repository with the keywords “insecticidal proteins” and “hemiptera”, limited to articles published in the last 20 years (2001 to 2020). A total of 663 scientific articles were listed and, after analysis, 57 were found to describe the use of insecticidal proteins against hemipteran insects. Data were extracted from the 57 articles as: the insecticidal proteins used, their modes of action, the hemipteran insects that were studied and the mortality rate obtained. Based on the published data, we have listed three insecticidal proteins that could potentially be used to control spittlebugs by obtaining genetically modified forages.

Keywords: genetically modified forages, hemipteran insects, insecticidal proteins, pasture, spittlebugs, transgenic

Introdução

A ordem Hemiptera apresenta mais de 25 mil espécies, sendo que várias destas espécies causam prejuízo aos produtores brasileiros (Grazia et al., 2012). Dentre as que causam problemas à agropecuária nacional encontra-se a cigarrinha-das-pastagens (Hemiptera: Cercopidae) (Aquad et al., 2007). Este nome genérico refere-se a diferentes espécies que atacam plantas forrageiras. Tanto as ninfas como os adultos deste inseto praga se alimentam da seiva das plantas, o que restringe seu crescimento, levando à queda de produção de matéria verde. O ataque das cigarrinhas-das-pastagens também leva ao amarelecimento das folhas, o que é possivelmente ocasionado pelo impacto na síntese de clorofila por alguma enzima (toxina) encontrada na saliva do inseto. O amarelecimento das folhas reduz a qualidade nutricional da forrageira e altera sua palatabilidade, o que reduz a capacidade de suporte (Souza et al., 2008).

Existe baixa variabilidade genética quanto ao desempenho das forrageiras em relação ao ataque das cigarrinhas-das-pastagens (Alvarenga et al., 2017). De forma geral, grande parte das espécies de forrageiras utilizadas no Brasil permite algum nível de sobrevivência de ninfas das cigarrinhas, o que é utilizado para definir a susceptibilidade das espécies. Baseado em estudos com a espécie *Mahanarva spectabilis*, de grande abrangência no território brasileiro, a resistência das diferentes espécies de forrageiras cultivadas no Brasil respeita, de uma forma geral, a seguinte ordem crescente de resistência: *Urochloa ruziziensis* = *U. decumbens* < capim-elefante (cv Roxo de Botucatu < cv Pioneiro) = *Panicum maximum* < *Cynodon dactylon* < *U. brizantha* cv Marandú. Por mais que algumas espécies de forrageiras tenham desenvolvido estratégias que permitam melhor desempenho contra a cigarrinha-das-pastagens, deve-se considerar a obtenção de plantas geneticamente modificadas (GM) expressando proteínas de ação inseticida, uma vez que nenhuma espécie de forrageira é naturalmente altamente resistente às várias espécies de cigarrinhas observadas no Brasil.

Proteínas de ação inseticida vêm sendo utilizadas para controles de insetos, sendo a proteína *cry* a mais conhecida. Esta proteína foi isolada da bactéria *Bacillus thuringiensis* e é amplamente utilizada na agricultura para controle de insetos mastigadores (lepidópteros e coleópteros) (Campanini et al., 2012). Entretanto, há pouca informação sobre o uso de proteínas *cry* no controle eficaz de hemípteros. Assim, faz-se necessário identificar possíveis proteínas de ação inseticida que possam ser utilizadas para controle de hemípteros e possivelmente das cigarrinhas-das-pastagens.

A presente revisão tem como objetivos listar proteínas de ação inseticida que vêm sendo estudadas para controle de diferentes espécies de hemípteros e identificar aquelas proteínas com maior potencial de uso para o controle das cigarrinhas-das-pastagens.

Material e Métodos

Foram feitas buscas no repositório de artigos científicos PubMed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>) com as palavras-chave “insecticidal proteins” e “hemiptera” e considerando o ano de publicação entre 2001 e 2020. Os 663 artigos resultantes desta busca foram revisados e 57 deles descreviam o uso de proteínas de ação inseticidas contra hemípteros.

Após a leitura e análise, as informações dos 57 artigos científicos foram organizadas de forma a listar as proteínas de ação inseticida utilizadas, a espécie de hemíptero foi estudada, o modo de ação das proteínas (seu efeito no inseto), e o índice de mortalidade. Estas informações e as referências dos 54 artigos podem ser encontradas no Anexo I. A análise também se baseou nas espécies que produzem a proteína, que foram separadas em quatro grupos (plantas, animais, bactérias ou fungos).

Resultados e Discussão

Foram encontrados 57 artigos científicos descrevendo proteínas de ação inseticida contra hemípteros. Para otimizar, os resultados foram divididos em quatro grupos (plantas, animais, bactérias ou fungos) baseados na espécie que produz a proteína de ação inseticida. O grupo das plantas foi o de maior número com 42 estudos, sendo as espécies mais comuns alho-comum (*Allium sativum*) e a leguminosa *Canavalia ensiformis*, com 9 e 8 estudos respectivamente. Para o grupo de animais, foram encontrados sete estudos e, dentre estes, dois utilizaram proteínas originárias de *Segestria florentina* e dois de *Manica rubica*. O grupo de bactérias abrangeu seis pesquisas, todas fazendo uso de diferentes tipos de bactérias. Para o grupo de fungos foram feitos 14 estudos, sendo cinco destes a partir de proteínas de *Xerocomus chrysenteron*.

Em relação aos anos de publicação, 18 estudos foram publicados nos últimos cinco anos, variando de 1 a 7 publicações por ano. Dentre estes artigos, as proteínas mais utilizadas foram lectinas e aglutininas e dentre elas houve um foco maior em aglutinina de *Galanthus nivalis* e de *Allium sativum*, contabilizando um total de 13 usos em pesquisas (aqui podendo ser contada mais de uma vez por artigo). Para observar a ação das proteínas, foram utilizadas 29 espécies de insetos hemípteros, sendo que *Myzus persicae* e *Acyrtosiphon pisum* foram os mais recorrentes, aparecendo 17 e 11 vezes, respectivamente.

Um ponto importante dos estudos foi o índice de mortalidade reportado com as proteínas utilizadas. Dentre os 57 artigos, nove pesquisas obtiveram mortalidade menor ou igual a 40%, nove entre 40 e 70% e 42 reportaram mortalidade maior que 70%. Dez trabalhos não disponibilizaram informações acerca do índice de mortalidade. Dentre os 42 com mortalidade acima de 70%, 15 obtiveram mortalidade de 100%. Em relação a essas 15 proteínas, sete se enquadraram na categoria de causar toxicidade para o inseto e não apenas impactos na fertilidade.

Para sugerir as melhores proteínas dentre aquelas com 100% de mortalidade, considerou-se o menor tempo necessário para a morte de toda a população de hemípteros estudada. As proteínas de ação inseticida que levaram selecionadas foram a quitinase de *Pseudomonas fluorescens* (72 horas) (Suganthi et al., 2017), a avidina recombinante de *Gallus gallus* (quatro dias) (Hinchliffe et al., 2010), e a proteína SFI1 de *Segestria florentina* associada a GNA (sete dias) (Down et al., 2006).

Conclusões

Com as informações levantadas neste trabalho de revisão foi possível concluir que algumas proteínas de ação inseticida têm potencial de serem avaliadas para o controle da cigarrinha-das-pastagens. Ressalta-se que outros repositórios, além do PubMed, devem ser buscados para englobar o maior número possível de proteínas. Dentre as proteínas encontradas, deve-se levar em consideração aquelas que resultaram em 100% de mortalidade dos hemípteros no menor tempo possível como as identificadas por Down et al. (2006), Hinchliffe et al. (2010) e Suganthi et al. (2017). Uma vez que

essas proteínas forem utilizadas em projetos de pesquisa na Embrapa, será possível avaliar o impacto das forrageiras geneticamente modificadas expressando tais proteínas no controle das cigarrinhas-das-pastagens.

Referências

- AUAD, A.M.; SIMÕES, A.D.; PEREIRA, A.V.; BRAGA, A.L.F.; SOUZA-SOBRINHO, F.; LÉDO, F.J.da S., PAULA-MORAES, S.V.; OLIVEIRA, S.A.; FERREIRA, R.B. Seleção de genótipos de capim-elefante quanto à resistência à cigarrinha-das-pastagens. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.42, p.1077-1081, 2007.
- ALVARENGA, R., AUAD, A.M., MORAES, J.C., SILVA, S.E.B., RODRIGUES, B.S., SILVA, G.B. Spittlebugs (Hemiptera: Cercopidae) and their plant hosts: strategy for pasture diversification. **Applied Entomology and Zoology**, v.52, p.653-660, 2017. doi: [10.1007/s13355-017-0521-0](https://doi.org/10.1007/s13355-017-0521-0)
- CAMPANINI, E.B.; DAVOLOS, C.C.; ALVES, E.C.C.; LEMOS, M.V.F. Isolation of *Bacillus thuringiensis* strains that contain Dipteran-specific *cry* genes from Ilabela (São Paulo, Brazil) soil samples. **Brazilian Journal of Biology**, v.72, p.1-5, 2012.
- DOWN R.E., FITCHES E.C., WILES D.P., CORTI P., BELL H.A., GATEHOUSE J.A., EDWARDS J.P. Insecticidal spider venom toxin fused to snowdrop lectin is toxic to the peach-potato aphid, *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae) and the rice brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Hemiptera: Delphacidae). **Pest Management Science**, v.62, p.77-85, 2006. doi: [10.1002/ps.1119](https://doi.org/10.1002/ps.1119). PMID: 16206236
- GRAZIA, J.; CAVICHIOLI, R. R.; WOLF, R. R. S.; FERNANDES, J. A. M.; TAKIYA, D. M. Hemiptera. Linnaeus, 1758. In: RAFAEL, J. A.; MELO, G. A. R.; CARVALHO, C. J. B. de; CASARI, S. A.; CONSTANTINO, R. (Ed.). **Insetos do Brasil: diversidade e taxonomia**. Ribeirão Preto: Holos Editora, 2012. p. 347-405.
- HINCHLIFFE G., BOWN D.P., GATEHOUSE J.A., FITCHES E. Insecticidal activity of recombinant avidin produced in yeast. **Journal of Insect Physiology**, v.56, p.629-39, 2010. doi: [10.1016/j.jinsphys.2010.01.007](https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2010.01.007). Epub 2010 Feb 9. PMID: 20132821.
- SOUZA, J.C., SILVA, R.A., REIS, P.R., QUEIROZ, D.S., SILVA, D.B. Cigarrinhas-das-pastagens: histórico, bioecologia, prejuízos, monitoramento e medidas de controle. **Circular Técnica 42**, ISSN 0103-4413, Belo Horizonte: EPAMIG, 2008.
- SUGANTHI, M.; SENTHILKUMAR, P.; ARVINATH, S.; CHANDRASHEKARA, K. N. Chitinase from *Pseudomonas fluorescens* and its insecticidal activity against *Helopeltis theivora*. **Journal of General and Applied Microbiology**, v.63, p.222-227, 2017. doi: [10.2323/jgam.2016.11.001](https://doi.org/10.2323/jgam.2016.11.001). Epub 2017 Jul 6. PMID: 28680004.

Anexo I

Resumo “Proteínas de ação inseticida com potencial de uso no controle da cigarrinha-das-pastagens: uma revisão”

Thiago Andrei de Sá, Alexander Machado Auad, Jorge Fernando Pereira

Informações sobre proteínas de ação inseticida utilizadas para controle de hemípteros.

Proteína	Espécie que produz a proteína	Espécie de hemíptero que foi estudada	Impacto da proteína no inseto	Índice de mortalidade	Referência
Aalt/GNA	<i>Galanthus nivalis</i>	<i>Bemisia tabaci</i>	morte e reduz fecundidade	~ 50%	Liu et al., 2015
Aglutinina AAA	<i>Allium altaicum</i>	<i>Aphis gossypii</i>	hemaglutinação	~ 40%	Upadhyay et al., 2011
Aglutinina ASAL	<i>Allium sativum</i>	<i>Lipaphis erysimi</i>	toxicidade e morte	31,25 - 87,5%	Bandyopadhyay et al., 2001
Aglutinina ASAL	<i>Allium sativum</i>	<i>Dysdercus cingulatus</i>	toxicidade e morte	50 - 100%	Bandyopadhyay et al., 2001
Aglutinina CEA	<i>Colocasia esculenta</i>	<i>Bemisia tabaci</i>	morte e reduz fecundidade	não disponível	Roy et al., 2014
Aglutinina CEA	<i>Colocasia esculenta</i>	<i>Lipaphis erysimi</i>	morte e reduz fecundidade	não disponível	Roy et al., 2014
Aglutinina CEA	<i>Colocasia esculenta</i>	<i>Lipaphis erysimi</i>	morte e reduz fecundidade	70 - 81.67%	Das et al., 2018
Aglutinina PTA	<i>Pinellia ternata</i>	<i>Myzus persicae</i>	informação não disponível	> 90%	Yao et al., 2003
Aglutinina PTA	<i>Pinellia ternata</i>	<i>Myzus persicae</i>	reduz fecundidade	> 80%	Jin et al., 2011
Aglutinina PTA	<i>Pinellia ternata</i>	<i>Myzus persicae</i>	morte e reduz fecundidade	61%	Qi et al., 2011
Aglutinina RSA	<i>Rhizoctonia solani</i>	<i>Acyrtosiphon pisum</i>	destruição do tecido intestinal e morte	não disponível	Hamshou et al., 2013
Aglutinina SNA-I	<i>Sambucus nigra</i>	<i>Acyrtosiphon pisum</i>	morte e reduz fecundidade	100%	Shahidi-Noghabi et al., 2008
Aglutinina SNA-I	<i>Sambucus nigra</i>	<i>Myzus persicae</i>	morte e reduz fecundidade	não disponível	Shahidi-Noghabi et al., 2008
Aglutinina SSA	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	<i>Acyrtosiphon pisum</i>	toxicidade e morte	100%	Hamshou et al., 2010
Aglutinina ZGA	<i>Zephyranthes grandiflora</i>	<i>Myzus nicotianae</i>	morte e reduz fecundidade	não disponível	Ye et al., 2008
AprA	<i>Pseudomonas entomophila</i>	<i>Riptortus pedestris</i>	citotoxicidade a hemócitos	~ 80%	Lee et al., 2018

Informações sobre proteínas de ação inseticida utilizadas para controle de hemípteros -
Continuação.

Proteína	Espécie que produz a proteína	Espécie de hemíptero que foi estudada	Impacto da proteína no inseto	Índice de mortalidade	Referência
Avidina recombinante	<i>Gallus gallus</i>	<i>Acyrtosiphon pisum</i>	toxicidade aguda e morte	100%	Hinchliffe et al., 2010
Asparaginase	<i>Zea mays</i>	<i>Bemisia tabaci</i>	neurotoxicidade	95%	Gul et al., 2020
Canatoxina (CNTX)	<i>Canavalia ensiformis</i>	<i>Dysdercus peruvianus</i>	morte e reduz desenvolvimento	> 90%	Stanisçuaski et al., 2005
Concanavalina A	<i>Canavalia ensiformis</i>	<i>Rhopalosiphum padi</i>	morte e reduz fecundidade	~ 75%	Sprawka et al., 2014
Concanavalina A	<i>Canavalia ensiformis</i>	<i>Acyrtosiphon pisum</i>	toxicidade e morte	não disponível	Sauvion et al., 2004
crisantemol sintase (CHS)	<i>Tanacetum cinerariifolium</i>	<i>Aphis gossypii</i>	reduz a fecundidade	não disponível	Hu et al., 2018
Cry1Ac:ASAL	<i>Bacillus thuringiensis</i>	<i>Nilaparvata lugens</i>	reduz fertilidade	70 - 80%	Boddupally et al., 2018
D-galactose:XCL	<i>Xerocomus chrysenteron</i>	<i>Myzus persicae</i>	morte e reduz fecundidade	100%	Jaber et al., 2008
D-glicose:XCL	<i>Xerocomus chrysenteron</i>	<i>Myzus persicae</i>	morte e reduz fecundidade	100%	Jaber et al., 2008
D-manose:XCL	<i>Xerocomus chrysenteron</i>	<i>Myzus persicae</i>	morte e reduz fecundidade	100%	Jaber et al., 2008
defensina BrD1	<i>Brassica rapa</i>	<i>Nilaparvata lugens</i>	informação não disponível	100%	Choi et al., 2009
fitohemaglutinina (PHA)	<i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>Sitobion avenae</i>	reduz fecundidade	não disponível	Sprawka et al., 2012
GalNAc:XCL	<i>Xerocomus chrysenteron</i>	<i>Myzus persicae</i>	morte e reduz fecundidade	100%	Jaber et al., 2008
GNA	<i>Galanthus nivalis</i>	<i>Rhopalosiphum maidis</i>	morte de ninfas	36%	Wang et al., 2005
GNA:CaMV 35S	<i>Galanthus nivalis</i>	<i>Myzus persicae</i>	reduz a fertilidade	20-50%	Mi et al., 2017
GNA:ST-LS1	<i>Galanthus nivalis</i>	<i>Myzus persicae</i>	reduz a fertilidade	45-55%	Mi et al., 2017
Hv1a/GNA	<i>Hadronyche versuta</i>	<i>Myzus persicae</i>	toxicidade oral e morte	100%	Yang et al., 2014
IF8	<i>Isaria fumosorosea</i>	<i>Diaphorina citri</i>	toxicidade e morte	> 80%	Keppanan et al., 2019
Jaburetox	<i>Canavalia ensiformis</i>	<i>Rhodnius prolixus</i>	morte e impacto fisiológico	não disponível	Fruttero et al., 2016
Lectina ASA-I	<i>Allium sativum</i>	<i>Dysdercus koenigii</i>	morte e impacto fisiológico	> 70%	Roy et al., 2002
Lectina ASA-I	<i>Allium sativum</i>	<i>Acyrtosiphon pisum</i>	toxicidade aguda e crônica	100%	Fitches et al., 2008
Lectina ASA-II	<i>Allium sativum</i>	<i>Acyrtosiphon pisum</i>	toxicidade aguda e crônica	100%	Fitches et al., 2008
Lectina ASAL	<i>Allium sativum</i>	<i>Nilaparvata lugens</i>	morte e impacto fisiológico	36%	Saha et al., 2006
Lectina ASAL	<i>Allium sativum</i>	<i>Nephotettix virescens</i>	morte e impacto fisiológico	32%	Saha et al., 2006

Lectina ASAL	<i>Allium sativum</i>	<i>Aphis craccivora</i>	morte e reduz fecundidade	66 - 83%	Chakraborti et al., 2009
--------------	-----------------------	-------------------------	---------------------------	----------	--------------------------

Informações sobre proteínas de ação inseticida utilizadas para controle de hemípteros -
Continuação.

Proteína	Espécie que produz a proteína	Espécie de hemíptero que foi estudada	Impacto da proteína no inseto	Índice de mortalidade	Referência
Lectina ATL	<i>Arum maculatum</i>	<i>Aphis craccivora</i>	toxicidade e morte	7,5 - 55%	Majumder et al., 2005
Lectina ATL	<i>Arum maculatum</i>	<i>Lipaphis erysimi</i>	toxicidade e morte	12,5 - 50%	Majumder et al., 2005
Lectina CEA	<i>Colocasia esculenta</i>	<i>Dysdercus koenigii</i>	morte e impacto fisiológico	50%	Roy et al., 2002
Lectina DEA	<i>Dieffenbachia sequina</i>	<i>Dysdercus koenigii</i>	morte e impacto fisiológico	~ 40%	Roy et al., 2002
Lectina PeCL	<i>Penicillium chrysogenum</i>	<i>Myzus persicae</i>	toxicidade e morte	> 60%	Francis et al., 2011
Lectina XCL	<i>Penicillium chrysogenum</i>	<i>Myzus persicae</i>	morte e reduz fecundidade	100%	Jaber et al., 2007
Lectina WsMBP1	<i>Withania somnifera</i>	<i>Probergrothius sanguinolens</i>	morte de ninfas	96,7%	George et al., 2018
MDUStBa15	<i>Xenorhabdus nematophilus</i>	<i>Ferrisia virgata</i>	toxicidade e morte	82,5 - 87,5%	Hemalatha et al., 2018
Orysata	<i>Oryza sativa</i>	<i>Myzus persicae</i>	toxicidade e morte	50 - 63%	Al Atalah et al., 2014
Orysata	<i>Oryza sativa</i>	<i>Acyrtosiphon pisum</i>	morte de ninfas	~ 90%	Al Atalah et al., 2014
PI1a/GNA	<i>Pireneitega luctuosus</i>	<i>Myzus persicae</i>	paralisa e morte	100%	Yang et al., 2014
proteína CytCo	<i>Conidiobolus obscurus</i>	<i>Takecallis taiwanus</i>	informação não disponível	não disponível	Wang et al., 2020
proteína derivada	<i>Lecanicillium lecanii</i>	<i>Myzus persicae</i>	morte e reduz fecundidade	41 - 54%	Hanan et al., 2019
proteína do micélio	<i>Lecanicillium lecanii</i>	<i>Diaphorina citri</i>	sem sintomas	> 80%	Keppanan et al., 2019
proteína sobrenatante	<i>Beauveria bassiana</i>	<i>Aphis gossypii</i>	toxicidade e morte	> 80%	Kim et al., 2010
quitinase	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Helopeltis theivora</i>	destruição do tecido intestinal e morte	100%	Suganthi et al., 2017
quitinase termotolerante	<i>Beauveria bassiana</i>	<i>Aphis gossypii</i>	toxicidade e morte	não disponível	Kim et al., 2010
SFI1/GNA	<i>Segestria florentina</i>	<i>Nilaparvata lugens</i>	morte	100%	Down et al., 2005
SFI1/GNA	<i>Segestria florentina</i>	<i>Myzus persicae</i>	reduz fertilidade	84%	Down et al., 2005
SLP1	<i>Streptomyces laindensis</i>	<i>Lipaphis erysimi</i>	informação não disponível	100%	Xu et al., 2016

Tma12	<i>Tectaria macrodonta</i>	<i>Bemisia tabaci</i>	reduz fertilidade	> 90%	Shukla et al., 2016
U-MYRTX-MANr1	<i>Manica rubida</i>	<i>Acyrtosiphon pisum</i>	morte e reduz fecundidade	93%	Heep et al., 2019
Urease	<i>Canavalia ensiformis</i>	<i>Dysdercus peruvianus</i>	toxicidade e morte	> 80%	Real-Guerra et al., 2013
Urease	<i>Canavalia ensiformis</i>	<i>Oncopeltus fasciatus</i>	toxicidade e morte	> 80%	Defferrari et al., 2011

Informações sobre proteínas de ação inseticida utilizadas para controle de hemípteros -
Continuação.

Proteína	Espécie que produz a proteína	Espécie de hemíptero que foi estudada	Impacto da proteína no inseto	Índice de mortalidade	Referência
Urease	<i>Canavalia ensiformis</i>	<i>Dysdercus peruvianus</i>	toxicidade e morte	80%	Follmer et al., 2005
Urease	<i>Canavalia ensiformis</i>	<i>Rhodnius prolixus</i>	toxicidade e morte	~ 100%	Defferrari et al., 2014
Veneno bruto	<i>Manica rubida</i>	<i>Acyrtosiphon pisum</i>	morte e reduz fecundidade	100%	Heep et al., 2019
Xbpi-1	<i>Xenorhabdus bovienii</i>	<i>Acyrtosiphon pisum</i>	toxicidade e morte	80%	Jin et al., 2014

Referências

- AL ATALAH, B., SMAGGLE, G., VAN DAMME, E. J. Oryzata, a jacalin-related lectin from rice, could protect plants against biting-chewing and piercing-sucking insects. **Plant Sci.** 2014 May;221-222:21-8. doi: 10.1016/j.plantsci.2014.01.010. Epub 2014 Jan 31. PMID: 24656332.
- BANDYOPADHYAY, S., ROY, A., DAS, S. Binding of garlic (*Allium sativum*) leaf lectin to the gut receptors of homopteran pests is correlated to its insecticidal activity. **Plant Science.** 2001 161(5), 1025–1033. doi:10.1016/s0168-9452(01)00507-6.
- BLACKBURN, M. B., DOMEK, J. M., GELMAN, D. B., HU, J. S. The broadly insecticidal *Photorhabdus luminescens* toxin complex a (Tca): activity against the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*, and sweet potato whitefly, *Bemisia tabaci*. **J Insect Sci.** 2005 Nov 11;5:32. doi: 10.1093/jis/5.1.32. PMID: 17119614; PMCID: PMC1615239.
- BODDUPALLY, D., TAMIRISA, S., GUNDRU, S.R., VUDEM, D. R., KHAREEDU, V. R. Expression of hybrid fusion protein (Cry1Ac::ASAL) in transgenic rice plants imparts resistance against multiple insect pests. **Sci Rep.** 2018 May 31;8(1):8458. doi: 10.1038/s41598-018-26881-9. PMID: 29855556; PMCID: PMC5981619.
- CAMPANINI, E. B., DAVOLOS, S. S., ALVES, E. C., LEMOS, M. V. Isolation of *Bacillus thuringiensis* strains that contain Dipteran-specific cry genes from Ilha Bela (São Paulo, Brazil) soil samples. **Brazilian Journal of Biology, Jaboticabal**, v. 72, p. 243-247, 2012.
- CHAKRABORTI, D., SARKAR, A., MONDAL, H. A., DAS, S. Tissue specific expression of potent insecticidal, *Allium sativum* leaf agglutinin (ASAL) in important pulse crop, chickpea (*Cicer arietinum* L.) to resist the phloem feeding *Aphis craccivora*. **Transgenic Res.** 2009 Aug;18(4):529-44. doi: 10.1007/s11248-009-9242-7. Epub 2009 Jan 29. PMID: 19184504.

- CHOI, M. S., KIM, Y. H., PARK, H. M., SEO, B. Y., JUNG, J. K., KIM, S. T., KIM, M. C., SHIN, D. B., YUN, H. T., CHOI, I. S., KIM, C. K., LEE, J. Y. Expression of *BrD1*, a plant defensin from *Brassica rapa*, confers resistance against brown planthopper (*Nilaparvata lugens*) in transgenic rices. **Mol Cells**. 2009 Aug 31;28(2):131-7. doi: 10.1007/s10059-009-0117-9. Epub 2009 Aug 20. PMID: 19714315.
- DASs, A., GHOSH, P., DAS, S. Expression of Colocasia esculenta tuber agglutinin in Indian mustard provides resistance against *Lipaphis erysimi* and the expressed protein is non-allergenic. **Plant Cell Rep**. 2018 Jun;37(6):849-863. doi: 10.1007/s00299-018-2273-x. Epub 2018 Mar 8. PMID: 29520589.
- DEFFERRARI, M. S., DEMARTINI, D. R., MARCELINO, T. B., PINTO, P. M., CARLINI, C. R. Insecticidal effect of *Canavalia ensiformis* major urease on nymphs of the milkweed bug *Oncopeltus fasciatus* and characterization of digestive peptidases. **Insect Biochem Mol Biol**. 2011 Jun;41(6):388-99. doi: 10.1016/j.ibmb.2011.02.008. Epub 2011 Mar 4. PMID: 21377528.
- DEFFERRARI, M. S., DA SILVA, R., ORCHARD, I., CARLINI, C. R. Jack bean (*Canavalia ensiformis*) urease induces eicosanoid-modulated hemocyte aggregation in the Chagas' disease vector *Rhodnius prolixus*. **Toxicon**. 2014 May;82:18-25. doi: 10.1016/j.toxicon.2014.02.006. Epub 2014 Feb 18. PMID: 24561121.
- DOWN, R. E., FITCHES, E. C., WILES, D. P., CORTI, P., BELL, H. A., GATEHOUSE, J. A., EDWARDS, J. P. Insecticidal spider venom toxin fused to snowdrop lectin is toxic to the peach-potato aphid, *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae) and the rice brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Hemiptera: Delphacidae). **Pest Manag Sci**. 2006 Jan;62(1):77-85. doi: 10.1002/ps.1119. PMID: 16206236.
- FOLLMER, C., CARLINI, C. R. Effect of chemical modification of histidines on the copper-induced oligomerization of jack bean urease (EC 3.5.1.5). **Arch Biochem Biophys**. 2005 Mar 1;435(1):15-20. doi: 10.1016/j.abb.2004.12.001. PMID: 15680902.
- FRANCIS, F., JABER, K., COLINET, F., PORTETELLE, D., HAUBRUGE, E. Purification of a new fungal mannose-specific lectin from *Penicillium chrysogenum* and its aphicidal properties. **Fungal Biol**. 2011 Nov;115(11):1093-9. doi: 10.1016/j.funbio.2011.06.010. Epub 2011 Jul 6. PMID: 22036288.
- FRUTTERO, L. L., MOYETTA, N. R., UBERTI, A. F., GRAHL, M. V., LOPES, F. C, BROLL, V., FEDER, D., CARLINI, C.R. Humoral and cellular immune responses induced by the urease-derived peptide Jaburetox in the model organism *Rhodnius prolixus*. **Parasit Vectors**. 2016 Jul 25;9(1):412. doi: 10.1186/s13071-016-1710-3. PMID: 27455853; PMCID: PMC4960889.
- GEORGE, B. S., SILAMBARASAN, S., SENTHIL, K., JACOB, J. P., GHOSH, DASGUPTA, M. Characterization of an insecticidal protein from *Withania somnifera* against lepidopteran and hemipteran pest. **Mol Biotechnol**. 2018 Apr;60(4):290-301. doi: 10.1007/s12033-018-0070-y. PMID: 29492788.
- GUL, A., HUSSAIN, G., IQBAL, A., RAO, A. Q., DIN, S. U., YASMEEN, A., SHAHID, N., AHAD, A., LATIF, A., AZAM, S., SAMIULLAH, T. R., HASSAN, S., SHAHID, A. A., HUSNAIN, T. Constitutive expression of Asparaginase in *Gossypium hirsutum* triggers insecticidal activity against *Bemisia tabaci*. **Sci Rep**. 2020 Jun 2;10(1):8958. doi: 10.1038/s41598-020-65249-w. PMID: 32488033; PMCID: PMC7265412.
- HAMSHOU, M., SMAGGHE, G., SHAHIDI-NOGHABI, S., DE GEYTER, E., LANNON, N., VAN DAMME, E. J. Insecticidal properties of *Sclerotinia sclerotiorum* agglutinin and its

- interaction with insect tissues and cells. **Insect Biochem Mol Biol**. 2010 Dec;40(12):883-90. doi: 10.1016/j.ibmb.2010.08.008. Epub 2010 Sep 6. PMID: 20826211.
- HAMSHOU, M., VAN DAMME, E. J., CACCIA, S., CAPPELLE, K., VANDERBORRE, G., GHESQUIÈRE, B., GEVAERT, K., SMAGGHE, G. High entomotoxicity and mechanism of the fungal GalNAc/Gal-specific *Rhizoctonia solani* lectin in pest insects. **J Insect Physiol**. 2013 Mar;59(3):295-305. doi: 10.1016/j.jinsphys.2012.12.003. Epub 2013 Jan 2. PMID: 23291362.
- HANAN, A., BASIT, A., NAZIR, T., MAJEED, M. Z., QIU, D. Anti-insect activity of a partially purified protein derived from the entomopathogenic fungus *Lecanicillium lecanii* (Zimmermann) and its putative role in a tomato defense mechanism against green peach aphid. **J Invertebr Pathol**. 2020 Feb;170:107282. doi: 10.1016/j.jip.2019.107282. Epub 2019 Nov 21. PMID: 31759949.
- HEEP, J., SKALJAC, M., GROTMANN, J., KESSEL, T., SEIP, M., SCHIMDTBERG, H., VILCINSKAS, A. Identification and Functional Characterization of a Novel Insecticidal Decapeptide from the Myrmicine Ant *Manica rubida*. **Toxins (Basel)**. 2019 Sep 25;11(10):562. doi: 10.3390/toxins11100562. PMID: 31557881; PMCID: PMC6832575.
- HEMALATHA, D., PRABHU, S., RANII, W. B., ANANDHAM, R. Isolation and characterization of toxins from *Xenorhabdus nematophilus* against *Ferrisia virgata* (Ckll.) on tuberose, *Polianthes tuberosa*. **Toxicon**. 2018 May;146:42-49. doi: 10.1016/j.toxicon.2018.03.012. Epub 2018 Mar 27. PMID: 29596848.
- HINCHLIFFE, G., BOWN, D. P., GATEHOUSE, J. A., FITCHES, E. Insecticidal activity of recombinant avidin produced in yeast. **J Insect Physiol**. 2010 Jun;56(6):629-39. doi: 10.1016/j.jinsphys.2010.01.007. Epub 2010 Feb 9. PMID: 20132821.
- HOGERVORST, P. A., FERRY, N., GATEHOUSE, A. M., WÄCKERS, F. L., ROMEIS, J. Direct effects of snowdrop lectin (GNA) on larvae of three aphid predators and fate of GNA after ingestion. **J Insect Physiol**. 2006 Jun;52(6):614-24. doi: 10.1016/j.jinsphys.2006.02.011. Epub 2006 Mar 6. PMID: 16620868.
- HU, H., LI, J., DELATTE, T., VERVOORT, J., GAO, L., VERSTAPPEN, F., XIONG, W., GAN, J., JONGSMA, M. A., WANG, C. Modification of chrysanthemum odour and taste with chrysanthemol synthase induces strong dual resistance against cotton aphids. **Plant Biotechnol J**. 2018 Aug;16(8):1434-1445. doi: 10.1111/pbi.12885. Epub 2018 Feb 9. PMID: 29331089; PMCID: PMC6041446.
- JABER, K., FRANCIS, F., PAQUEREAU, L., FOURNIER, D., HAUBRUGE, E. Effect of a fungal lectin from *Xerocomus chrysenteron* (XCL) on the biological parameters of aphids. **Commun Agric Appl Biol Sci**. 2007;72(3):629-38. PMID: 18399496.
- JABER, K., CUARTERO Diaz, G., HAUBRUGE, E., FRANCIS, F. Investigation of carbohydrate binding property of a fungal lectin from *Xerocomus chrysenteron* and potential use on *Myzus persicae* aphid. **Commun Agric Appl Biol Sci**. 2008;73(3):629-38. PMID: 19226804.
- JIN, S., ZHANG, X., DANIELL, H. *Pinellia ternata* agglutinin expression in chloroplasts confers broad spectrum resistance against aphid, whitefly, Lepidopteran insects, bacterial and viral pathogens. **Plant Biotechnol J**. 2012 Apr;10(3):313-27. doi: 10.1111/j.1467-7652.2011.00663.x. Epub 2011 Nov 13. PMID: 22077160; PMCID: PMC3468414.
- JIN, D., ZENG, F., DONG, S., ZHANG, H. Effects of a protease inhibitor protein from *Xenorhabdus bovienii* on physiology of pea aphid (*Acyrtosiphon pisum*). **Pestic Biochem**

- Physiol.** 2014 Jan;108:86-91. doi: 10.1016/j.pestbp.2013.12.010. Epub 2014 Jan 9. PMID: 24485320.
- KEPPANAN, R., KRUTMUANG, P., SIVAPERUMAL, S., HUSSAIN, M., BAMISILE, B. S., AGUILA, L. C. R., DASH, C. K., WANG, L. Synthesis of mycotoxin protein IF8 by the entomopathogenic fungus *Isaria fumosorosea* and its toxic effect against adult *Diaphorina citri*. **Int J Biol Macromol.** 2019 Mar 15;125:1203-1211. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.09.093. Epub 2018 Sep 15. PMID: 30227211.
- KEPPANAN, R., SIVAPERUMAL, S., HUSSAIN, M., BAMISILE, B. S., AGUILA, L. C. R., QASIM, M., MEKCHAY, S., Wang, L., KRUTMUANG, P. Molecular characterization of pathogenesis involving the GAS 1 gene from entomopathogenic fungus *Lecanicillium lecanii* and its virulence against the insect host *Diaphorina citri*. **Pestic Biochem Physiol.** 2019 Jun;157:99-107. doi: 10.1016/j.pestbp.2019.03.012. Epub 2019 Mar 18. PMID: 31153482.
- KIM, J. S., ROH, J. Y., CHOI, J. Y., WANG, Y., SHIM, H. J., JE, Y. H. Correlation of the aphicidal activity of *Beauveria bassiana* SFB-205 supernatant with enzymes. **Fungal Biol.** 2010 Jan;114(1):120-8. doi: 10.1016/j.mycres.2009.10.011. Epub 2009 Nov 24. PMID: 20965068.
- KIM, J. S., JE, Y. H. A novel biopesticide production: attagel-mediated precipitation of chitinase from *Beauveria bassiana* SFB-205 supernatant for thermotolerance. **Appl Microbiol Biotechnol.** 2010 Aug;87(5):1639-48. doi: 10.1007/s00253-010-2543-1. Epub 2010 May 6. PMID: 20445976.
- LEE, S. A., JANG, S. H., KIM, B. H., SHIBATA, T., YOO, J., JUNG, Y., KAWABATA, S. I., LEE, B. L. Insecticidal activity of the metalloprotease *AprA* occurs through suppression of host cellular and humoral immunity. **Dev Comp Immunol.** 2018 Apr;81:116-126. doi: 10.1016/j.dci.2017.11.014. Epub 2017 Nov 23. PMID: 29174605.
- LIU, S. M., LI, J., ZHU, J. Q., WANG, X. W., WANG, C. S., LIU, S. S., CHEN, X. X., LI, S. Transgenic plants expressing the AaIT/GNA fusion protein show increased resistance and toxicity to both chewing and sucking pests. **Insect Sci.** 2016 Apr;23(2):265-76. doi: 10.1111/1744-7917.12203. Epub 2015 Mar 17. PMID: 25641865.
- MAJUMDER, P., MONDAL, H. A., DAS, S. Insecticidal activity of *Arum maculatum* tuber lectin and its binding to the glycosylated insect gut receptors. **J Agric Food Chem.** 2005 Aug 24;53(17):6725-9. doi: 10.1021/jf051155z. PMID: 16104791.
- MI, X., LIU, X., YAN, H., LIANG, L., ZHOU, X., YANG, J., SI, H., ZHANG, N. Expression of the *Galanthus nivalis* agglutinin (GNA) gene in transgenic potato plants confers resistance to aphids. **C R Biol.** 2017 Jan;340(1):7-12. doi: 10.1016/j.crv.2016.10.003. Epub 2016 Dec 7. PMID: 27938939.
- QI, G., LAN, N., MA, X., YU, Z., ZHAO, X. Controlling *Myzus persicae* with recombinant endophytic fungi *Chaetomium globosum* expressing *Pinellia ternata* agglutinin: using recombinant endophytic fungi to control aphids. **J Appl Microbiol.** 2011 May;110(5):1314-22. doi: 10.1111/j.1365-2672.2011.04985.x. Epub 2011 Mar 17. PMID: 21414115.
- REAL-GUERRA, R., CARLINI, C. R., STANISÇUASKI, F. Role of lysine and acidic amino acid residues on the insecticidal activity of Jackbean urease. **Toxicon.** 2013 Sep;71:76-83. doi: 10.1016/j.toxicon.2013.05.008. Epub 2013 May 30. PMID: 23726854.
- ROY, A., BANERJEE, S., MAJUMDER, P., DAS, S. Efficiency of mannose-binding plant lectins in controlling a homopteran insect, the red cotton bug. **J Agric Food Chem.** 2002 Nov 6;50(23):6775-9. doi: 10.1021/jf025660x. PMID: 12405774.

- ROY, A., GUPTA, S., HESS, D., DAS, K. P., DAS, S. Binding of insecticidal lectin *Colocasia esculenta* tuber agglutinin (CEA) to midgut receptors of *Bemisia tabaci* and *Lipaphis erysimi* provides clues to its insecticidal potential. **Proteomics**. 2014 Jul;14(13-14):1646-59. doi: 10.1002/pmic.201300408. Epub 2014 May 30. PMID: 24753494.
- SAHA, P., MAJUMDER, P., DUTTA, I., RAY, T., ROY, S. C., DAS, S. Transgenic rice expressing *Allium sativum* leaf lectin with enhanced resistance against sap-sucking insect pests. **Planta**. 2006 May;223(6):1329-43. doi: 10.1007/s00425-005-0182-z. Epub 2006 Jan 11. PMID: 16404581.
- SAUVION, N., NARDON, C., FEBVAY, G., GATEHOUSE, A. M., RAHBÉ, Y. Binding of the insecticidal lectin Concanavalin A in pea aphid, *Acyrtosiphon pisum* (Harris) and induced effects on the structure of midgut epithelial cells. **J Insect Physiol**. 2004 Dec;50(12):1137-50. doi: 10.1016/j.jinsphys.2004.10.006. PMID: 15670861.
- SHAHIDI-NOGHABI, S., VAN DAMME, E. J., SMAGGHE, G. Carbohydrate-binding activity of the type-2 ribosome-inactivating protein SNA-I from elderberry (*Sambucus nigra*) is a determining factor for its insecticidal activity. **Phytochemistry**. 2008 Dec;69(17):2972-8. doi: 10.1016/j.phytochem.2008.09.012. Epub 2008 Oct 23. PMID: 18951590.
- SHUKLA, A. K., UPADHYAY, S. K., MISHRA, M., SAURABH, S., SINGH, R., SINGH, H., THANKUR, N., RAI, P., PANDEY, P., HANS, A. L., SRIVASTAVA, S., RAJAPURE, V., YADAV, S. K., SINGH, M. K., KUMAR, J., CHANDRASHEKAR, K., VERMA, P. C., SINGH, A. P., NAIR, K. N., BHADOURIA, S., WAHAJUDDIN, M., SINGH, S., SHARMA, S., OMKAR, UPADHYAY, R. S., RANADE, S. A., TULI, R., SINGH, P. K. Expression of an insecticidal fern protein in cotton protects against whitefly. **Nat Biotechnol**. 2016 Oct;34(10):1046-1051. doi: 10.1038/nbt.3665. Epub 2016 Sep 5. PMID: 27598229.
- SPRAWKA, I., GOLAWSKA, S., GOLAWSKI, A., CZERNIEWICZ, P., SYTYKIEWICZ, H. Antimetabolic effect of phytohemagglutinin to the grain aphid *Sitobion avenae* fabricius. **Acta Biol Hung**. 2012 Sep;63(3):342-53. doi: 10.1556/ABiol.63.2012.3.4. PMID: 22963915.
- SPRAWKA, I., GOLAWSKA, S., PARZYCH, T., GOLAWSKI, A., CZERNIEWICZ, P., SYTYKIEWICZ, H. Mechanism of entomotoxicity of the Concanavalin A in *Rhopalosiphum padi* (Hemiptera: Aphididae). **J Insect Sci**. 2014 Jan 1;14:232. doi: 10.1093/jisesa/ieu094. PMID: 25525100; PMCID: PMC5634058.
- STANISQUASKI, F., FERREIRA-DASILVA, C. T., MULINARI, F., PIRES-ALVES, M., CARLINI, C. R. Insecticidal effects of canatoxin on the cotton stainer bug *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera: Pyrrhocoridae). **Toxicon**. 2005 May;45(6):753-60. doi: 10.1016/j.toxicon.2005.01.014. PMID: 15804524.
- SUGANTHI, M., SENTHILKUMAR, P., ARVINTH, S., CHANDRASHEKARA, K. N. Chitinase from *Pseudomonas fluorescens* and its insecticidal activity against *Helopeltis theivora*. **J Gen Appl Microbiol**. 2017 Sep 5;63(4):222-227. doi: 10.2323/jgam.2016.11.001. Epub 2017 Jul 6. PMID: 28680004.
- UPADHYAY, S. K., MISHRA, M., SINGH, H., RANJAN, A., CHANDRASHEKAR, K., VERMA, P. C., SINGH, P. K., TULI, R. Interaction of *Allium sativum* leaf agglutinin with midgut brush border membrane vesicles proteins and its stability in *Helicoverpa armigera*. **Proteomics**. 2010 Dec;10(24):4431-40. doi: 10.1002/pmic.201000152. Epub 2010 Nov 17. PMID: 21136596.
- UPADHYAY, S. K., SAURABH, S., SINGH, R., RAI, P., DUBEY, N. K., CHANDRASHEKAR, K., NEGI, K. S., TULI, R., SINGH, P. K. Purification and characterization of a lectin with

- high hemagglutination property isolated from *Allium altaicum*. **Protein J**. 2011 Aug;30(6):374-83. doi: 10.1007/s10930-011-9342-0. PMID: 21732172.
- WANG, Y., CHEN, S., WANG, J., ZHOU, X. Characterization of a cytolytic-like gene from the aphid-obligate fungal pathogen *Conidiobolus obscurus*. **J Invertebr Pathol**. 2020 Jun;173:107366. doi: 10.1016/j.jip.2020.107366. Epub 2020 Mar 26. PMID: 32224143.
- WANG, Z., ZHANG, K., SUN, X., TANG, K., ZHANG, J. Enhancement of resistance to aphids by introducing the snowdrop lectin gene *gna* into maize plants. **J Biosci**. 2005 Dec;30(5):627-38. doi: 10.1007/BF02703563. PMID: 16388137.
- XU, L., LIANG, K., DUAN, B., YU, M., MENG, W., WANG, Q., YU, Q. A Novel insecticidal peptide *SLP1* produced by *Streptomyces laindensis* H008 against *Lipaphis erysimi*. **Molecules**. 2016 Aug 22;21(8):1101. doi: 10.3390/molecules21081101. PMID: 27556442; PMCID: PMC6273262.
- YADAV, S. K., ARCHANA, SINGH, R., SINGH, P. K., VASUDEV, P. G. Insecticidal fern protein *Tma12* is possibly a lytic polysaccharide monoxygenase. **Planta**. 2019 Jun;249(6):1987-1996. doi: 10.1007/s00425-019-03135-0. Epub 2019 Mar 22. PMID: 30903269.
- YANG, S., FITCHES, E., PYATI, P., GATEHOUSE, J. A. Effect of insecticidal fusion proteins containing spider toxins targeting sodium and calcium ion channels on pyrethroid-resistant strains of peach-potato aphid (*Myzus persicae*). **Pest Manag Sci**. 2015 Jul;71(7):951-6. doi: 10.1002/ps.3872. Epub 2014 Aug 28. PMID: 25077959.
- YAO, J., PANG, Y., QI, H., WAN, B., ZHAO, X., KONG, W., SUN, X., TANG, K. Transgenic tobacco expressing *Pinellia ternata* agglutinin confers enhanced resistance to aphids. **Transgenic Res**. 2003 Dec;12(6):715-22. doi: 10.1023/b:trag.0000005146.05655.7d. PMID: 14713200.
- YE, S. H., CHEN, S., ZHANG, F., WANG, W., TIAN, Q., LIU, J. Z., CHEN, F., BAO, J. K. Transgenic tobacco expressing *Zephyranthes grandiflora* agglutinin confers enhanced resistance to aphids. **Appl Biochem Biotechnol**. 2009 Sep;158(3):615-30. doi: 10.1007/s12010-008-8418-6. Epub 2008 Dec 9. PMID: 19067248. 57

¹Elaboração de procedimentos metodológicos para monitoramento das condições das pastagens por métricas em sensoriamento remoto¹

Pedro Cosme de Araújo², Marcos Cicarini Hott^{3,8}, Ricardo Guimarães Andrade⁴, Walter Coelho Pereira de Magalhães Junior⁵, Davi de Oliveira Custodio⁶, Pedro Romildo da Costa⁷

¹O presente trabalho foi realizado com o apoio do CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Brasil. Parte do projeto Sistema de monitoramento de pastagens para produção de inteligência territorial para regiões leiteiras do Centro-Oeste, Sudeste e Sul do País, liderado por Marcos Cicarini Hott, financiado pela Embrapa

²Graduando em Geografia – UFJF/Juiz de Fora. e-mail: pedrocosme.geo@gmail.com

³Pesquisador, Embrapa Gado de Leite – Juiz de Fora. E-mail: marcos.hott@embrapa.br

⁴Pesquisador, Embrapa Gado de Leite – Juiz de Fora. E-mail: ricardo.andrade@embrapa.br

⁵Analista, Embrapa Gado de Leite – Juiz de Fora. E-mail: walter.magalhaes@embrapa.br

⁶Analista, Embrapa Territorial – Juiz de Fora. E-mail: davi.custodio@embrapa.br

⁷Analista, Embrapa Territorial – Juiz de Fora. E-mail: pedro.costa@embrapa.br

⁸Orientador

Resumo: O mapeamento das condições das pastagens brasileiras é de grande interesse atualmente. As bases de dados em sensoriamento remoto podem auxiliar sobremaneira no monitoramento dessas feições, e, a partir das soluções geográficas para internet, os primeiros resultados puderam ser apresentados em página da Infraestrutura de Dados Espaciais (INDE) da Embrapa, GeoInfo, e em WebGIS, o qual se encontra em desenvolvimento, mas já apresenta experimentalmente alguns mapas produzidos. Diversos procedimentos de aquisição, processamento e estruturação de base de dados MODIS foram realizados. O objetivo deste trabalho foi reunir série de dados NDVI/MODIS, produto MOD13Q1, e desenvolver metodologias que possam estimar métricas de longo e curto-prazo para derivação das condições das pastagens de mesorregião na Região Sudeste, especificamente, na Zona da Mata Mineira. Parte desses resultados estão publicados em base de dados na, e em WebGIS em desenvolvimento. No decorrer do trabalho uma série de dados NDVI/MODIS está sendo construída para o monitoramento das pastagens nas principais regiões produtoras de leite no Brasil.

Palavras-chave: Gado de leite, geoprocessamento, MODIS, NDVI, WebGIS

Development of methodological procedures for monitoring of pasture conditions through remote sensing metrics

Abstract: Mapping the conditions of Brazilian pastures is currently a concern. Remote sensing databases can greatly assist in monitoring these features, and, based on geographic solutions for the internet, the first results could be found on Embrapa's Spatial Data Infrastructure (INDE) page, named GeoInfo, and on WebGIS, which is under development, but already experimentally presents some produced maps. Several procedures for acquisition, processing and structuring of MODIS databases were carried out. The objective of this work was to gather NDVI / MODIS data series, MOD13Q1 product, and to develop methodologies that estimate long and short-term metrics to derive the conditions of the mesoregion pastures. Part of these results are published in a database. During the work, a series of NDVI / MODIS data is being built to monitor pastures in the main milk producing regions in Brazil.

Keywords: Dairy cattle, GIS, MODIS, NDVI, WebGIS

Introdução

As pastagens cobrem uma extensa área de cultivo no Brasil, com destaque para o Estado de Minas Gerais, no qual as áreas são destinadas, principalmente, à bovinocultura de leite. A produção leiteira no Estado é bastante heterogênea, correspondendo a, aproximadamente, 9,4 bilhões de litros de leite (27,11%) dos 34,84 bilhões de litros da produção nacional em 2019, cuja representatividade em levantamentos de campo acerca da produção e condições das forragens perpassa por observar áreas dedicadas ao leite (Figura 1). O NDVI (Índice de Vegetação da Diferença Normalizada, na sigla em inglês) serve para analisar a condição da vegetação natural ou agrícola nas imagens geradas por sensores remotos. Este índice é bastante utilizado para análises de uso do solo, análises de degradação ambiental e análises de qualidade e produtividade de culturas (POVH et al., 2008; ZANZARINI et al., 2013). Inúmeros cientistas da área de sensoriamento remoto têm estudado a relação entre dados de campo sobre a vegetação e sua relação com a reflectância obtida a partir de vários sensores de satélites (LIU, 2006; PONZONI; SHIMABUKURO, 2010). Maior reflectância da vegetação no infravermelho próximo, onde o comprimento de onda é particularmente próximo ao vermelho, pode indicar condições mais saudáveis das plantas. A partir disto, constroem-se índices, tal como o NDVI o qual denota o vigor de uma vegetação, principalmente de características herbácea e herbáceo-arbustiva, como é o caso de pastagens, computando a diferença entre o infravermelho e o vermelho. Todas as informações geradas em pesquisas com base em sensoriamento remoto para análise da paisagem possuem grande demanda na divulgação e uso pelos usuários interessados. Os bancos de dados geográficos se popularizaram na década de 90 (BRETERNITZ, 2001), período em que surgiu o software da Xerox, Map Viewer, desenvolvido para fornecer dados geoespaciais por meio da internet. Trabalho foi apresentado na First International World Wide Web Conference, realizada em Genebra, Suíça em 1994, sobre Map Viewer, sendo talvez o primeiro sistema servidores de mapas estruturados na Web (CARVALHO et al., 2004).

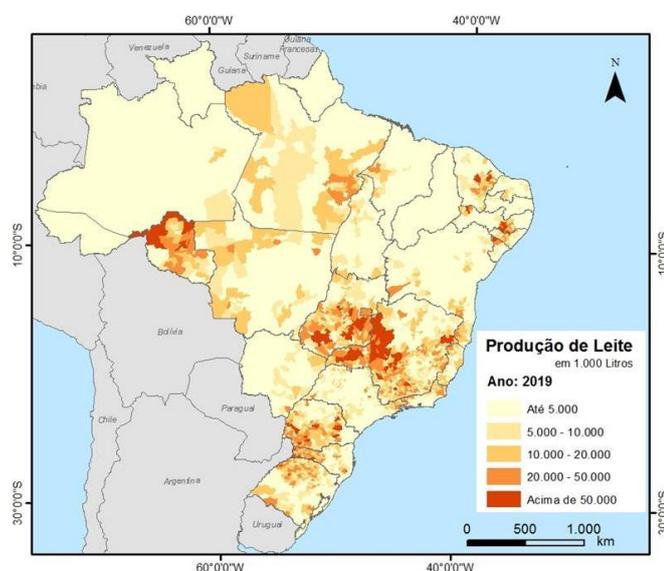


Figura 1 – Distribuição da produção leiteira em 2019.

Assim, os quadrantes de imagens NDVI/MODIS do satélite Terra, produto MOD13Q1, processado para 16 dias de levantamento, foram baixados para a série de 13 anos, durante a primeira fase de desenvolvimento metodológico, para métricas de longo-prazo, cujos resultados foram consistidos por levantamentos de campo e reunidos recentemente para divulgação nos sistemas geográficos para internet, GeoInfo, o qual é parte da Infraestrutura de Dados Espaciais (INDE). Atualmente,

centenas de quadrantes de imagens NDVI/MODIS estão sendo processadas para a derivação de nova metodologia a qual objetivará o desenvolvimento de metodologia de curto-prazo, visando o efetivo monitoramento de pastagens, as quais são de fundamental importância na produção leiteira, oferecendo suporte aos rebanhos de gado de leite.

Material e Métodos

Foram utilizadas imagens de satélites disponibilizadas pelo LP DAAC (*Land Processes Distributed Active Archive Center*), vinculado à NASA e ao Serviço Geológico dos Estados Unidos (USGS). Estas imagens são disponibilizadas online com datas com intervalos de 16 dias entre si, tamanho de pixel de aproximadamente 250 metros, em folhas que cobrem uma área de tamanho limitado e em formato de arquivo *Hierarchical Data Format* (hdf). Para cada data disponível na série de mais de 20 anos, iniciando-se em 18 de fevereiro de 2000, foram baixadas 19 quadrantes de imagens que correspondem a todo o território brasileiro, sendo estas identificadas pelos códigos h10v08; h10v09; h10v10; h11v08; h11v09; h11v10; h12v08; h12v09; h12v10; h12v11; h13v08; h13v09; h13v10; h13v11; h13v12; h14v09; h14v10; h14v11 e h15v11. Posteriormente, as imagens foram processadas pelo software MRT (*Modis Reprojection Tools*), onde foi gerado um mosaico, com os 19 arquivos .HDF, em um único arquivo de formato GeoTIFF para cada data disponível. Para o processamento das imagens no MRT foi selecionada apenas a banda de NDVI com projeção geográfica no Datum WGS84. Os parâmetros utilizados no processamento das imagens estão representados na Figura 2.

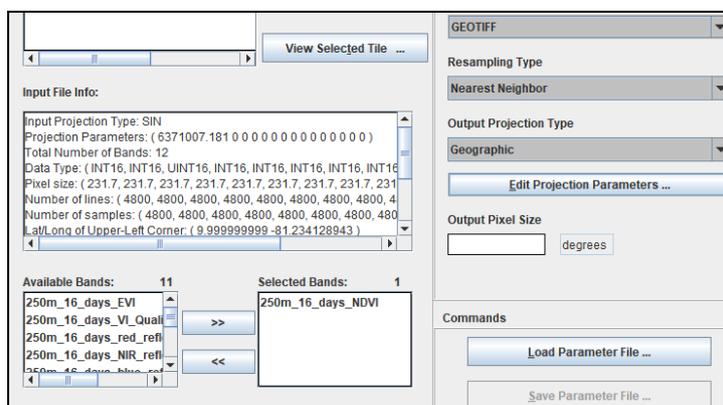
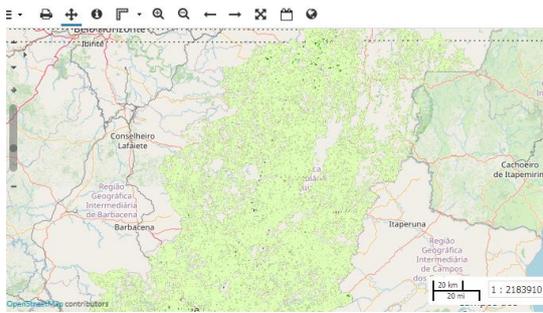


Figura 2 – Parâmetros do processamento no software MRT.

Resultados e Discussão

Foram gerados resultados preliminares para a série NDVI/MODIS na mesorregião da Zona da Mata, cujas camadas geográficas foram divulgadas na plataforma GeoInfo (Figura 3A) e no sistema WegGIS em desenvolvimento (Figura 3B), denotando em torno de 60% de áreas de pastagens com níveis indesejáveis em termos de degradação. Posteriores resultados de análises metodológicas com a série NDVI/MODIS de curto-prazo serão divulgados na plataforma GeoInfo e WebGIS, oportunamente. Por enquanto, a extensa base de dados acerca das imagens para o Brasil está sendo baixada, processada e estruturada. Parte da base para os anos de 2000 a 2010 foi baixada e processada, além dos anos de 2015 a 2021, os quais passam por processo de consistência e processamento no software MRT. Notadamente, a série dos anos recentes será tratada para análises com a abordagem de curto-prazo.



(A)



(B)

Figura 3 – Sistemas geográficos para internet, com publicação de resultados preliminares, na plataforma GeolInfo (A), e no WebGIS em desenvolvimento (B).

Conclusões

Por meio da metodologia inicialmente desenvolvida, com séries de longo-prazo, grande tempo de processamento foi consumido, e demonstrando que por volta de 60% das pastagens da mesorregião estudada, nessa primeira abordagem apresenta algum grau de degradação. A série de dados NDVI/MODIS está em processo de aquisição, processamento e estruturação de sua base de dados, o que tem demandado muito esforço e horas de trabalho, tendo em vista que exige que verificação de consistência seja continuamente adotada. Portanto, os resultados preliminares, em termos da primeira metodologia, foram exitosamente divulgados na plataforma GeolInfo e em versão prototípica do WebGIS, o que permitirá consultas e análise dos dados, além de serem objetos de publicação de mapeamento das pastagens e de monitoramento por parte dos atores da cadeia produtiva relacionada ao gado de leite.

Referências

- BRETERNITZ, V. J. Sistemas de informações geográficas: uma visão para administradores e profissionais de TI. Análise, Jundiaí, v. 4, p. 41-55, 2001.
- CARVALHO, C. A. DE; PIEROZZI JUNIOR, I.; OSHIRO, O. T.; ALENCAR, M. DE C. F. WebGis na Embrapa Monitoramento por Satélite: integração da Arquitetura e Tecnologia da Informação para disseminação de geoinformação na Internet. Campinas: Embrapa Monitoramento por Satélite, 2004. 26 p., il. (Documentos, 36).
- LIU, W. T. H. Aplicações de sensoriamento remoto. Campo Grande: Ed. UNIDERP, 2006.
- PONZONI, F. J.; SHIMABUKURO, Y. E. Sensoriamento remoto no estudo da vegetação. São José dos Campos: Parêntese, 2010. 127 p.
- POVH, F. P.; MOLIN, J. P.; GIMENES, L. M.; PAULETTI, V.; MOLIN, R.; SALVI J. V. Comportamento do NDVI obtido por sensor ótico ativo em cereais. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v. 43, n. 8, p. 1075-1083, ago. 2008. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/pab/a/fxPqbgqrmFN9GjF8R497NSj/?lang=pt&format=pdf>. Acesso em: 3 ago. 2021.
- ZANZARINI, F. V.; PISARRA, T. C. T.; BRANDÃO, F. J. C.; TEIXEIRA, D. D. B. Correlação espacial do índice de vegetação (NDVI) de imagem Landsat/ETM+ com atributos do solo. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 17, n. 6, p. 608-614, abril. 2013.

Comparação de parâmetros bioquímicos e celulares de bezerros taurinos e zebuínos ao nascimento: implicações clínicas e associação com fenótipos de resistência contra carrapatos¹

Carla Loures^{2,3}, Gabrielle Soares^{2,4}, Isabela Karoline de Aguiar Soares^{2,4}, Jair Alves da Cunha Filho^{2,4}, Robert Domingues⁵, Emanuelle Baldo Gaspar⁵, Daniele Ribeiro de Lima Reis Faza⁶, Mariana Magalhães Campos⁶, Marta Fonseca Martins⁶, Marcia Prata⁶, Marco Antônio Machado⁶, Wanessa Araújo Carvalho^{6,7}

¹O presente trabalho foi realizado com o apoio do CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Brasil. Parte do projeto SEG 10.19.03.054.00.00, liderado por Wanessa A. Carvalho.

²Bolsista do Programa de Bolsa de Iniciação Científica do CNPq/ Embrapa e

³Graduanda Medicina Veterinária- Universidade Federal de Viçosa. E-mail: carla.loures@ufv.br

⁴Graduanda(a) em Medicina Veterinária - Universidade Federal de Juiz de Fora. E-mail:

isabelakas1@gmail.com, jaircunhafilho@hotmail.com

⁵ Embrapa Pecuária Sul. E-mail: robert.domingues@embrapa.br; emanuelle.gaspar@embrapa.br

⁶ Embrapa Gado de Leite. E-mail: marco.machado@embrapa.br, wanessa.carvalho@embrapa.br, marta.martins@embrapa.br, mariana.campos@embrapa.br

⁷ Orientadora: wanessa.carvalho@embrapa.br

Resumo: Bovinos taurinos e zebuínos apresentam respostas fenotípicas contrastantes de resistência à endo e ectoparasitas, como o carrapato *Rhipicephalus microplus*. Para caracterização da resposta imune que medeia esses fenótipos antes da exposição ao carrapato bovino foram feitas análises dos parâmetros celulares e bioquímicos em neonatos holandeses (taurino) e Gir (zebuíno), antes do recebimento de colostro. O hematócrito, volume globular, hemoglobina e leucometria global apresentaram-se significativamente diminuídos em animais holandeses. Esses mesmos bezerros também apresentaram número maior de picos febris, indicativo de inflamação sistêmica, quando comparados aos animais Gir, sugerindo que a rusticidade de animais zebuínos pode ser inata e estar associada com mecanismos de transporte de ferro e oxigênio, além da resposta imune celular mediada por leucócitos.

Palavras chave: Gir, Holandês, resposta imune, bezerros, parâmetros bioquímicos, *Rhipicephalus microplus*, resposta imune

Comparison of biochemical and cellular parameters of taurine and zebu calves at birth: clinical implications and association with tick resistance phenotypes

Abstract: Taurine and indicine cattle show contrasting phenotypic responses to endo- and ectoparasites, such as the tick *Rhipicephalus microplus*. To characterize the immune response that mediates these phenotypes before exposure to bovine ticks, analyzes of cellular and biochemical parameters were performed in Dutch (taurine) and Gir (indicine) bovine neonates before receiving colostrum. The hematocrit, globular volume, hemoglobin and global leukometry were significantly decreased in Dutch animals. These same calves also present higher number of febrile peaks, indicative of systemic inflammation, when compared to Gir animals, suggesting that the rusticity of indicine animals may be innate and associated with iron and oxygen transport mechanisms, in addition to the cellular mediated immune response by leukocytes.

Keywords: Gir cattle, Dutch cattle, immune response, calves, biochemical parameters, *Rhipicephalus microplus*, immune response

Introdução

Em países tropicais a infestação de carrapatos em bovinos causa grandes perdas econômicas devido à diminuição da produção de leite e de carne, transmissão de patógenos e gastos com controle, atualmente feito com carrapaticidas, que são tóxicos e produzem resíduos em alimentos e contaminação ambiental (Almazan et al., 2018). Sabe-se que animais taurinos são mais susceptíveis ao carrapato *R. microplus* do que animais zebuínos, no entanto os mecanismos celulares e bioquímicos que medeiam esses fenótipos são pouco explorados (Tabor et al., 2017), especialmente em neonatos. Nesse sentido, a presente proposta visa analisar parâmetros bioquímicos e celulares em bezerros taurinos (Holandês; HPB) e zebuínos (Gir) associando esses dados com tabelas de referência universal (VR), parâmetros de saúde, como oscilação de temperatura e incidência de diarreia e dados de literatura acerca da relação parasito-hospedeiro.

Materiais e métodos

Os procedimentos realizados no presente estudo foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA, processo número 8798030820) da Embrapa Gado de Leite. O experimento foi conduzido no Campo Experimental José Henrique Bruschi, da Embrapa Gado de Leite (Coronel Pacheco-MG). Foram utilizados bezerros taurinos (HPB; n=11) e zebuínos (Gir; n=11), machos e fêmeas, submetidos à coleta de sangue periférico por sistema de vacutainer imediatamente antes da colostragem, feita via sonda com colostro artificial (Saskatoon Colostrum Company Ltd, Canadá) para evitar interferência da imunidade passiva materna entre animais. As amostras de sangue foram submetidas à análises bioquímicas para dosagem de ureia, creatinina, hemoglobina, aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), Gama GT, tempo de protrombina (TTP), tempo de tromboplastina (TTPA) e fibrinogênio. Também foi feito o hemograma completo com contagem global de hemácias e leucócitos totais, todos realizados no laboratório CellLab (Juiz de Fora –MG). Todos os animais foram mantidos até os 4 meses de idade em uma estrutura isolada e telada, previamente desinfecionada com carrapaticida e hipoclorito de sódio 0,5%, para evitar contato com ectoparasitas. Diariamente, foram realizadas a aferição da temperatura retal e avaliação do escore das fezes, que foi classificada de 1 a 4, sendo 1 (um) firme e 4 (quatro) líquida. Os dados de parâmetros bioquímicos e celulares foram comparados com valores de referência (VR) de exames laboratoriais para bovinos (Roland et al., 2014) e associados com a incidência de picos febris e diarreia em ambas as raças. Para análise estatística foram feitas análises de variância e Teste T comparando os valores médios de cada parâmetro encontrados para animais Gir e HPB considerando diferenças significativas com nível de significância de 5% ($P < 0,05$).

Resultados e discussão

As médias dos parâmetros de hemograma dos bezerros foram comparados com os valores de referência (VR) visando encontrar diferenças que possam justificar estudos para elaboração de tabelas para bezerros taurinos e zebuínos. Foram encontradas discrepâncias ($p < 0,05$) nos valores da leucometria global (Gir = $13491 \pm 2721,9$; HPB = $8963,6 \pm 3129,3$; VR = 8000 ± 4000), nos percentuais de eosinófilos (Gir = $0,5455 \pm 0,6876\%$; HPB = $1,1818 \pm 1,4709\%$; VR = $11 \pm 9\%$), de linfócitos (Gir = $27,636 \pm 11,369\%$;

HPB= 25, 636 ± 13,063%; VR= 60±15%) e de neutrófilos segmentados (Gir = 67,909 ± 12,243%; HPB= 70, 545 ± 12, 259%; VR= 30±15%). Esses resultados podem estar associados com a imaturidade do sistema imunológico de neonatos, tendo em vista que parte dessas células compõem o sistema imune adaptativo, o qual se desenvolve com o envelhecimento do animal, tendo uma significância clínica relevante para fins de diagnóstico de doenças em bezerros sugerindo-se um estudo mais amplo para uma revisão das tabelas de referência. Os resultados dos parâmetros hematológicos da série vermelha sugerem que animais Gir apresentam melhor eficiência no transporte de oxigênio e ferro, tendo em vista que possuem mais hemácias e hemoglobina (P<0.01; Figura 1), as quais carregam essas moléculas (Gell, 2018).

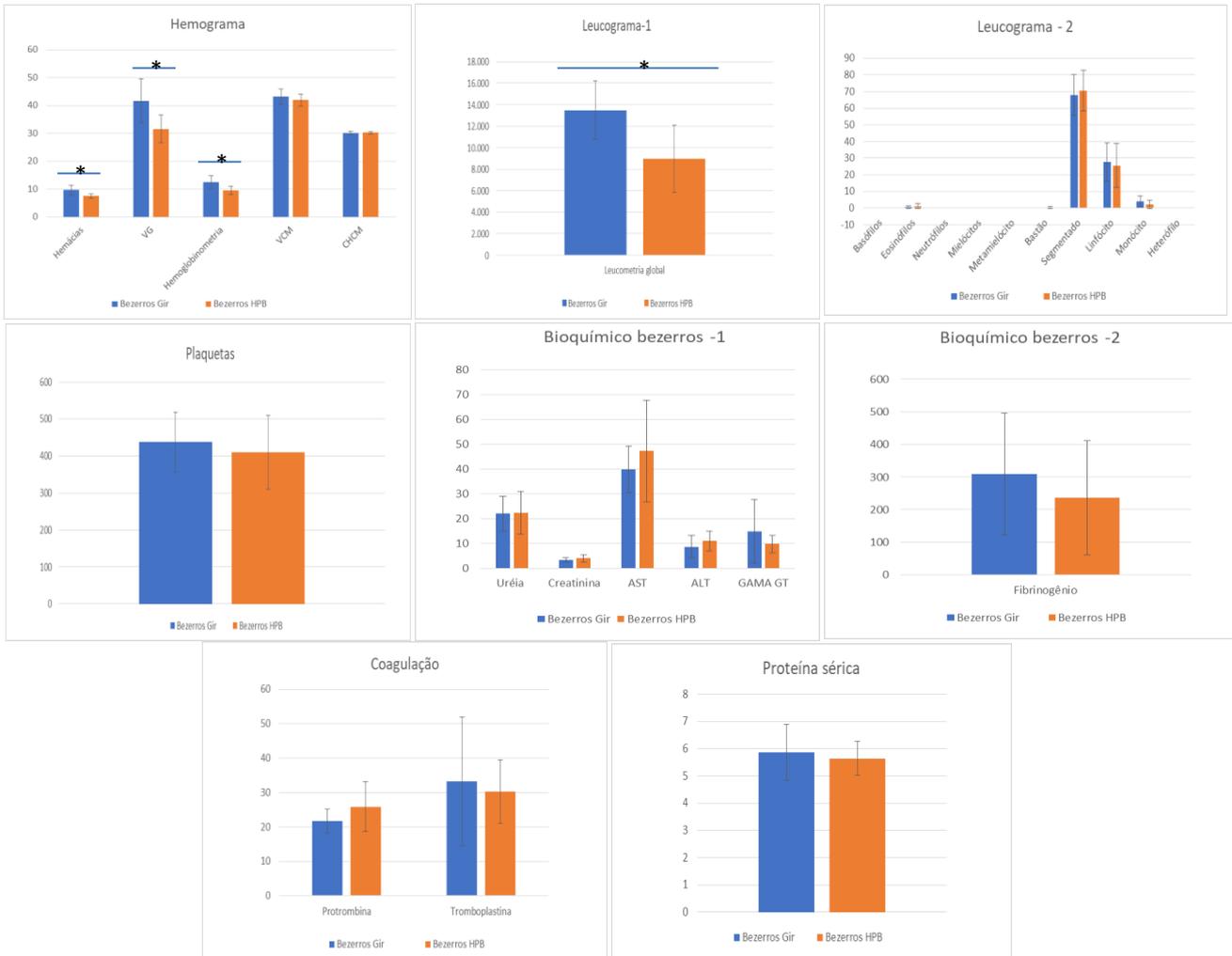


Figura 1. Parâmetros celulares e bioquímicos de bezerros neonatos antes do recebimento de colostro. * P<0.001 (análise de variância seguido de Teste T).

O ferro é vital para a sobrevivência de micro-organismos e eficiência reprodutiva dos carrapatos (Kopacek et al., 2010), de modo que o hospedeiro animal possui mecanismos de retenção desse íon como forma de imunidade inespecífica para conter infecções e parasitismos (Jurado, 1997). Todavia, esse sequestro de ferro está envolvido na patogênese da anemia de inflamação (AI), que é mediada pelo aumento da concentração plasmática de citocinas pró-inflamatórias em quadros infecciosos e neoplásicos, o que gera a diminuição da disponibilidade de ferro e disfunção de eritropoetina (EPO) que resulta na diminuição da produção de hemácias (Jurado, 1997).

Interessantemente, nossos resultados também demonstraram que bezerros GIR e HPB apresentaram maiores níveis de creatinina sérica quando comparado ao VR (Gir = $3,4182 \pm 0,8146$; HPB = $4,0636 \pm 1,5507$; VR = $1,2 \pm 0,6$), sugerindo uma alta correlação da imunidade com a atividade de EPO, desempenhada pelo rim nos estágios fetais e logo após o parto (Pesce et al., 2014). Como consequência do processo inflamatório, o animal apresenta sinais inespecíficos, como a febre. Vale ressaltar, também, que animais HPB apresentaram maior número de picos febris (temperatura igual ou superior a $39,3 \text{ }^\circ\text{C}$) que animais Gir (HPB = 59 e Gir = 20 picos de febre em 4 meses de avaliação diária), corroborando os achados sugestivos acerca dos níveis de hemácias e hemoglobina e sua influência sobre os fenótipos de resistência a carrapatos apresentado por animais taurinos e zebuínos. Animais Gir também apresentaram leucometria global maior que animais HPB ($P < 0.0001$), sugerindo uma maior predisposição ao desenvolvimento de respostas imunes mais rápidas e efetivas nos primeiros meses de vida, independente da colostragem materna, uma vez que todos os animais receberam colostro artificial.

Conclusões

Existem divergências nos valores de referência de parâmetros celulares apresentados por animais adultos que justifiquem estudos populacionais voltados para a padronização de dados de referência para bezerros. Ademais, foram evidenciadas diferenças bioquímicas e celulares entre neonatos GIR e HPB que sugerem maior adaptação e robustez de animais zebuínos contra infecções parasitárias associadas, principalmente, com parâmetros aumentados da série vermelha e leucometria global.

Agradecimentos

Agradeço a Embrapa Gado de Leite de Coronel Pacheco - MG, a todas as pessoas envolvidas no manejo dos animais e processamento das amostras e às pesquisadoras Wanessa Carvalho e Mariana Campos pela oportunidade e saberes compartilhados.

Referências

- ALMAZAN, C.; TPIPACAMU, G. A.; RODRIGUEZ, S.; MOSQUEDA, J.; PEREZ DE LEÓN, A. Immunological control of ticks and tick-borne diseases that impact cattle health and production. **Frontiers in Bioscience**, v.23, p.1535-1551, 2018.
- GELL, D. A. Structure and function of haemoglobins. **Blood Cells, Molecules & Diseases**, v. 70, p.13-42, 2018.
- JURADO, R. L. Iron, infections, and anemia of inflammation. **Clinical Infectious Diseases**, v. 25, p. 888-895, 1997.
- KOPACEK, O.; HAJDUSEK, O.; BURESOVA, V.; DAFFRE, S. Tick innate immunity. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v.708, p.137-162, 2010.
- PESCE, M.; FELACO, P.; FRANCESCHELLI, S.; SPERANZA, L.; GRILLI, A. DE LUTTIS, M. A.; FERRONE, A.; SIROLI, V.; BONOMINI, M.; FELACO, M.; PATRUNO, A. Effect of erythropoietin on primed leucocyte expression profile. **Open Biology**, v.4, 140026, 2014.
- ROLAND, L.; DRILLICH, M.; IWERSEN, M. Hematology as a diagnostic tool in bovine medicine. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.26, p.592-598, 2014.
- TABOR, A. E.; ALI, A.; REHMAN, G.; ROCHA GARCIA, G.; ZANGIROLAMO, A. F.; MALARDO, T.; JONSSON, N. N. Cattle tick *Rhipicephalus microplus*-host interface: A review of resistant and susceptible host responses. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v.7, p.506, 2017.

¹Estimativa e espacialização do Índice de Temperatura e Umidade (ITU) na Região Sudeste do Brasil¹

Lucas Cantarino Soares², Ricardo Guimarães Andrade^{3, 6}, Marcos Cicarini Hott⁴,
Walter Coelho Pereira de Magalhães Junior⁵

¹O presente trabalho foi realizado com o apoio do CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Brasil. Parte do projeto Zoneamento pecuário de risco climático para a produção de leite no Sudeste do Brasil, liderado por Ricardo Guimarães Andrade, financiado pela Embrapa.

²Graduando em Engenharia Elétrica – UFJF. E-mail: lucas.cantarino@engenharia.ufjf.br

³Pesquisador, Embrapa Gado de Leite – Juiz de Fora. E-mail: ricardo.andrade@embrapa.br

⁴Pesquisador, Embrapa Gado de Leite – Juiz de Fora. E-mail: marcos.hott@embrapa.br

⁵Analista, Embrapa Gado de Leite – Juiz de Fora. E-mail: walter.magalhaes@embrapa.br

⁶Orientador

Resumo: Atualmente, a região Sudeste é responsável por 34,1% da produção nacional de leite, no entanto, a produtividade média ainda é considerada baixa. Fatores como estresse calórico podem influenciar na eficiência produtiva e reprodutiva, com perdas de 30 a 40% na produção de leite. O Índice de Temperatura e Umidade (ITU) tem sido muito utilizado em pesquisas envolvendo a avaliação das condições de conforto térmico relacionadas ao desempenho animal. Nesse trabalho, objetivou organizar e disponibilizar dados meteorológicos e estimar e espacializar o ITU na Região Sudeste do Brasil. Dados meteorológicos foram analisados quanto a consistência e corrigidos possíveis falhas de registros observacionais. Posteriormente, estimou-se o ITU e aplicou técnicas de geoprocessamento para espacializar o ITU na escala mensal e anual. De acordo com os resultados preliminares evidenciam que principalmente no Triângulo Mineiro, Nordeste e Norte de Minas Gerais, Norte do Espírito Santo e Oeste de São Paulo foram observados os maiores valores de ITU nos anos de 2017, 2018 e 2019. Nesse caso, indica que pode haver condição ambiente de estresse.

Palavras-chave: Bem-estar animal, estresse calórico, ITU, bovinocultura leiteira.

Estimation and spatialization of the Temperature and Humidity Index (THI) in the Southeast Region of Brazil

Abstract: Currently, the Southeast region is responsible for 34.1% of the national milk production, however, the average productivity is still considered low. Factors such as heat stress can influence productive and reproductive efficiency, with losses of 30 to 40% in milk production. The Temperature and Humidity Index (ITU) has been widely used in research involving the evaluation of thermal comfort conditions related to animal performance. In this work, the objective was to organize and make available meteorological data and to estimate and spatialize the ITU in the Southeast Region of Brazil. Meteorological data were analyzed for consistency and possible flaws in observational records were corrected. Subsequently, the ITU was estimated and applied geoprocessing techniques to spatialize the ITU on a monthly and annual scale. According to the preliminary results show that mainly in the Triângulo Mineiro, Northeast and North of Minas Gerais, North of Espírito Santo and West of São Paulo, the highest values of THI were observed in 2017, 2018 and 2019. In this case, it indicates that there may be stressful ambient condition.

Keywords: Animal welfare, heat stress, UTI, dairy cattle.

Introdução

A região Sudeste é responsável atualmente por 11,44 bilhões de litros da produção de leite nacional, com 5,2 milhões de vacas ordenhadas (IBGE, 2019). O estado de Minas Gerais destaca-se como principal produtor na Região (77,8% do leite produzido), sendo também responsável por cerca de um quarto da produção nacional. Na sequência, têm-se os estados de São Paulo, Rio de Janeiro e Espírito Santo com, respectivamente, 14,8; 4,1 e 3,3% da produção regional. Apesar de o Sudeste ser responsável por 34,1% da produção nacional de leite e ocupar a segunda posição no ranking nacional por regiões, sua produtividade média continua baixa (2.209 litros/vaca/ano). A condição ambiental está entre os fatores com impacto direto na eficiência dos processos de perda de calor pelo animal, podendo resultar na intensificação de estresse calórico e influenciar na eficiência produtiva e reprodutiva, com perdas de 30 a 40% na produção de leite (Rensis e Scaramuzzi, 2003; West 2003; Nardone et al., 2010). O desconforto térmico pode modificar o consumo de energia do organismo com a finalidade de regular a temperatura corporal e manter as funções vitais do animal, cuja capacidade de resposta ao estresse calórico é raça-dependente, com prejuízos ao desempenho produtivo. Há inúmeros índices que podem ser utilizados para prever o conforto ou desconforto térmico dos animais e, entre esses, pode-se destacar o Índice de Temperatura e Umidade (ITU). O ITU possibilita avaliar a adequação do ambiente em relação a uma determinada atividade de produção animal, combinando os efeitos da temperatura do ar e da umidade relativa (Buffington, 1997). Diante do exposto, o presente trabalho objetivou organizar e disponibilizar dados meteorológicos e estimar e espacializar o ITU na Região Sudeste do Brasil.

Material e Métodos

Foram obtidos dados meteorológicos de série histórica com pelo menos 15 anos de observações realizadas a partir de estações automáticas provenientes do Instituto Nacional de Meteorologia (INMET). Após o download, os dados foram analisados quanto à consistência e corrigidos possíveis falhas de registros observacionais. Posteriormente, foram organizados e disponibilizados em planilhas em escala horária, diária, mensal e anual. Em seguida, estimou-se o ITU por meio da equação proposta por Bunffington (1977):

$$ITU = 0,8 T_{bs} + UR(T_{bs} - 14,3)/100 + 46,3$$

Em que: T_{bs} é a temperatura de bulbo seco, °C; UR é a umidade relativa do ar, %; ITU é o índice de temperatura e umidade (ITU), adimensional. De posse dos dados de ITU calculados pontualmente a partir das observações meteorológicas de cada estação, foi possível aplicar metodologias de espacialização/interpolação e assim gerar os mapas de ITU. O método de interpolação utilizado foi o relativo à quarta potência da distância entre as estações.

Resultados e Discussão

As Figuras 1A, 1B e 1C representam os mapas de interpolação/espacialização do Índice de Temperatura e Umidade (ITU) da Região Sudeste do Brasil para os anos de 2017, 2018 e 2019, respectivamente. Já na Figura 2 (2A a 2M) estão destacados os mapas mensais de ITU no ano de 2019. Conforme esperado, descartando-se os dados de estações com muitas falhas, os mapas ficaram semelhantes nos 3 anos amostrados, e a interpolação pela quarta potência da distância possibilitou minimizar a ocorrência de “ilhas” nos mapas. Vale ressaltar que a produção de leite pode ser prejudicada quando o ITU for ≥ 72 (Kemer et al., 2020), e pela legenda dos mapas

gerados, podemos ver que as áreas do mapa com tons escuros de laranja ou vermelho se enquadram nesse caso quando considerada a média mensal e anual. É importante ressaltar que o ITU pode variar bastante ao longo do dia e do ano, de modo que regiões com média elevada de ITU anual podem não oferecer estresse ao gado durante todo ano, assim como nas demais regiões o gado pode passar por estresse climático em determinados momentos ou estações. Pelos mapas, portanto, é possível observar que no Espírito Santo (litorânea e norte), Oeste de São Paulo, Triângulo Mineiro, Nordeste e Norte de Minas Gerais são áreas em que a produção de leite pode ser mais afetada por questões climáticas.

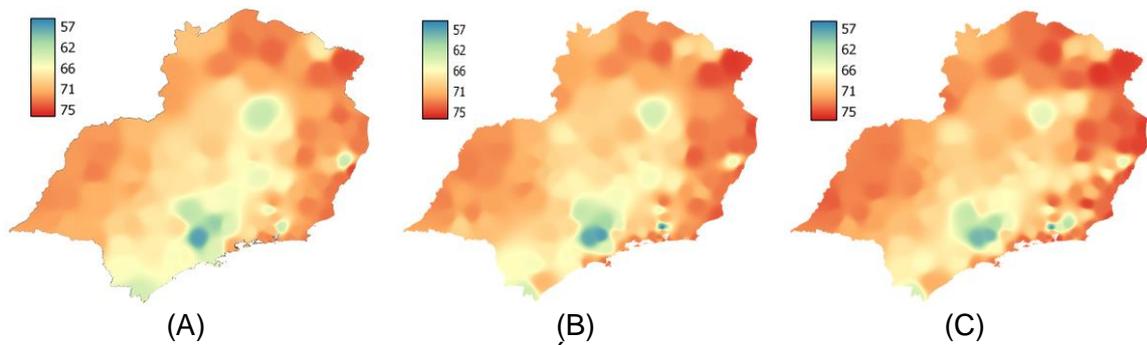
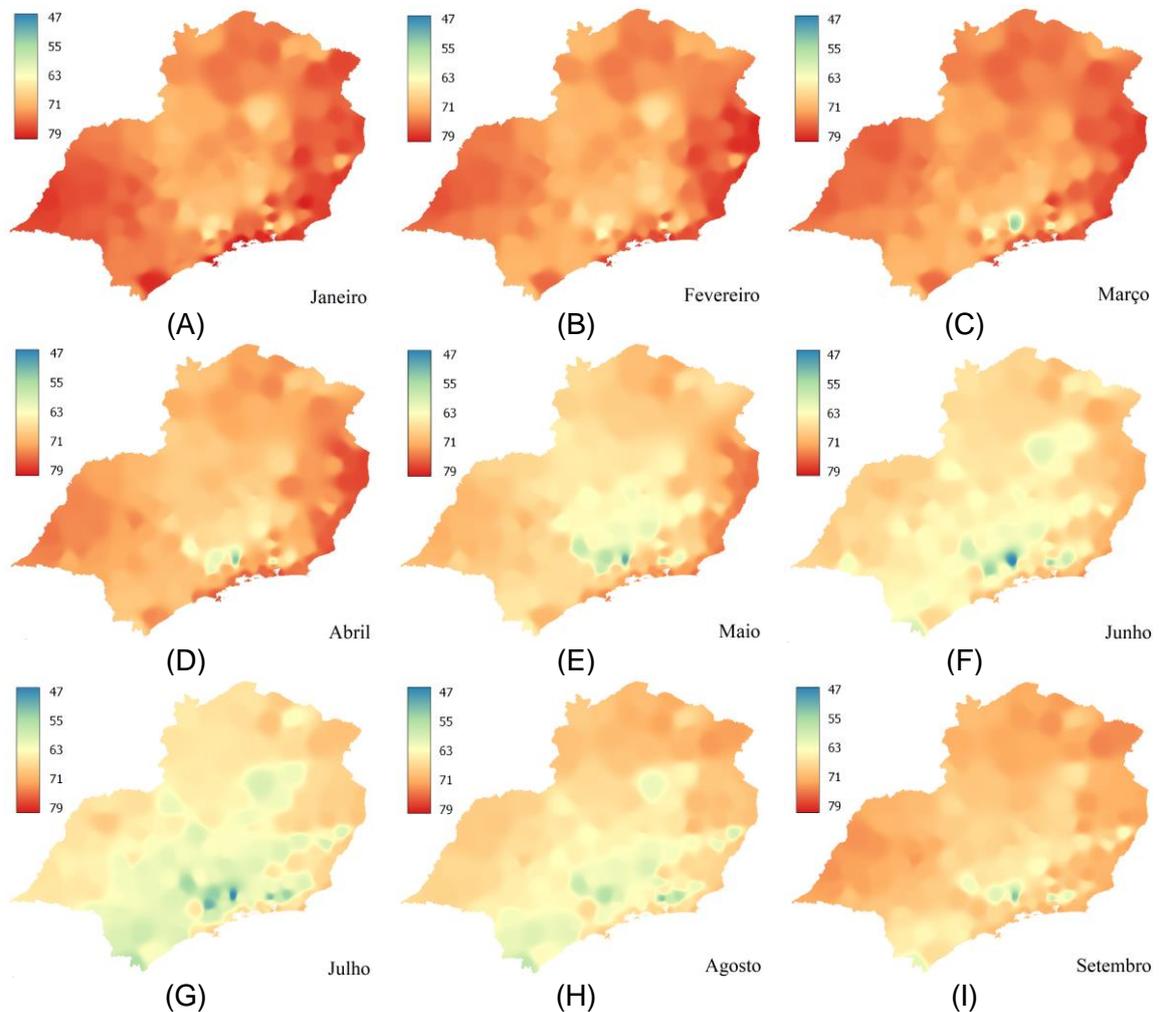


Figura 1 – Mapas de espacialização do Índice de Temperatura e Umidade (ITU) do Sudeste do Brasil para os anos de 2017 (A), 2018 (B) e 2019 (C).



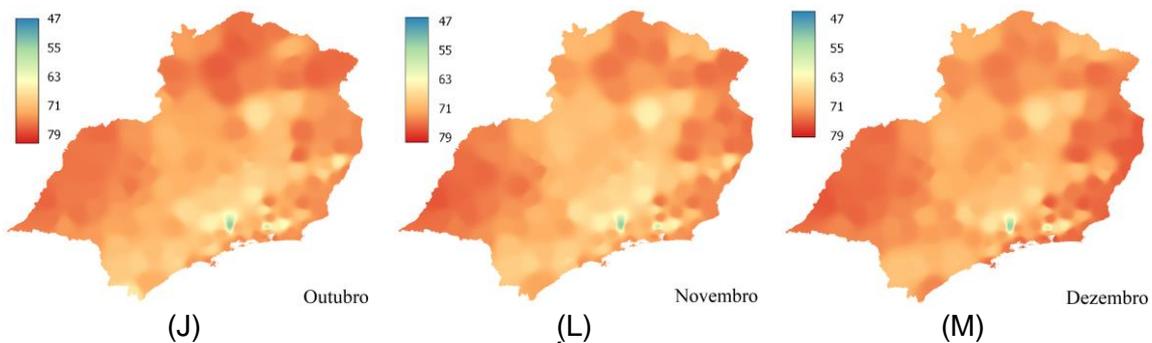


Figura 2 – Mapas de espacialização do Índice de Temperatura e Umidade (ITU) do Sudeste do Brasil para os meses de janeiro (A) a dezembro (M) de 2019.

Conclusões

Nos mapas de ITU do Sudeste evidenciam que principalmente no Triângulo Mineiro, Nordeste e Norte de Minas Gerais, Norte do Espírito Santo e Oeste de São Paulo foram observados os maiores valores de ITU nos anos de 2017, 2018 e 2019. Nesse caso, indica que pode haver condição ambiente de estresse para manutenção de boa produção e produtividade de vacas leiteiras.

Referências

- BUNFFINGTON, D. E.; COLLAZO-AROCHO, A.; CANTON, G. H.; PITT, D.; THATCHER, W. W.; COLLIER, R. J. Black globe-humidity confort index for dairy cows. St. Joseph: **American Society of Agricultural Engineers**, 1977. 19p. (paper 77-4517).
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Pesquisa da Pecuária Municipal**. PPM – 2017. Sistema IBGE de Recuperação Automática – SIDRA, 2019.
- KEMER, A.; GLIENKE, C. L.; BOSCO, L. C. Índices de conforto térmico para bovinos de leite em Santa Catarina Sul do Brasil. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 5, p. 29655-29672, 2020.
- NARDONE, A.; RONCHI, B.; LACETERA, N.; RANIERI, M. S.; BERNABUCCI, U. Effects of climate changes on animal production and sustainability of livestock systems. **Livestock Science**, v. 130, n. 1, p. 57-69, 2010.
- RENSIS, F.; SCARAMUZZI, R.J. Heat stress and seasonal effects on reproduction in the dairy cow: a review. **Theriogenology**, v. 60, p. 1139-1151, 2003.
- WEST, J.W. Effects of heat-stress on production in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v.86, p.2131-2144, 2003.

Comparação de parâmetros celulares e bioquímicos de sangue periférico de vacas taurinas (Holandês) e zebuínas (Gir) no pós-parto imediato¹

Gabrielle Soares^{2,3}, Carla Loures^{2,4}, Isabela Karoline de Aguiar Soares^{2,4}, Jair Alves da Cunha Filho^{2,4}, Robert Domingues⁵, Emanuelle Baldo Gaspar⁵, Daniele Ribeiro de Lima Reis Faza⁶, Marta Fonseca Martins⁶, Marcia Azevedo Prata⁶, Marco Antônio Machado⁶, Wanessa Araújo Carvalho⁶, Mariana Magalhães Campos^{6,7}

¹O presente trabalho foi realizado com o apoio financeiro do CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Brasil. Parte do projeto SEG 10.19.03.054.00.00, liderado por Wanessa A. Carvalho.

²Bolsista do Programa de Bolsa de Iniciação Científica do CNPq/ Embrapa

³ Graduando(a) em Medicina Veterinária - Universidade Federal de Juiz de Fora. E-mail: isabelakas1@gmail.com, jaircunhafilho@hotmail.com, gosoares96@gmail.com

⁴Graduanda Medicina Veterinária- Universidade Federal de Viçosa. E-mail: carla.loures@ufv.br

⁵ Embrapa Pecuária Sul. E-mail: robert.domingues@embrapa.br; emanuelle.gaspar@embrapa.br

⁶ Embrapa Gado de Leite. E-mail: marco.machado@embrapa.br, wanessa.carvalho@embrapa.br, marta.martins@embrapa.br, mariana.campos@embrapa.br

⁷ Orientadora: mariana.campos@embrapa.br

Resumo: Bovinos taurinos e zebuínos apresentam características de resistência a endo e ectoparasitas e estresse térmico distintas em cada raça, estando altamente correlacionado com a evolução das espécies em regiões europeias e tropicais, respectivamente. O desenvolvimento de resposta imune, com participação de células e fatores bioquímicos, medeia alterações metabólicas e fisiológicas que refletem nos fenótipos apresentados, sendo de extrema importância caracterizar esses fenômenos imunológicos. Nesse sentido, foram comparados parâmetros celulares e bioquímicos de sangue periférico de vacas taurinas (Holandês) e zebuínas (Gir) no pós-parto imediato. Foram detectadas diferenças significativas na concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), no número de eosinófilos e plaquetas, bem como nos níveis de creatinina, alanina aminotransferase e fibrinogênio entre vacas Gir e holandesas. Essas diferenças podem estar associadas com características intrínsecas das raças relacionadas com a infestação por carrapatos em animais holandeses, indicando parâmetros que merecem atenção e podem constituir alvo de modulação para controle de doenças e, conseqüentemente, do desempenho zootécnico de vacas no pós-parto imediato.

Palavras-chave: carrapato, raças taurinas, raças zebuínas, resposta imune.

Comparison of cellular and biochemical parameters of peripheral blood of taurine (Holstein) and indicine (Gyr) cows at the postpartum period

Abstract: Taurine and indicine cattle present phenotypes of resistance to endo and ectoparasites and heat stress characteristics unique to each breed, being highly correlated with the evolution of the species in European and tropical regions, respectively. The development of immune response mediates metabolic and physiological changes that reflect on its phenotypes, being extremely important to characterize these immunological phenomena. In this sense, this proposal aims to compare cellular and biochemical parameters of peripheral blood of taurine (Holstein) and indicine (Gyr) cows at the postpartum period. Significant differences were found in mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC), in the number of eosinophils and platelets, as well as in the levels of creatinine, alanine aminotransferase and fibrinogen between Gyr and Holstein cows. These differences might be associated with intrinsic characteristics of the breeds related to tick infestations in Holstein cattle, indicating parameters that may constitute a target for

modulation for disease control and, consequently, for the zootechnical performance of cows in the immediate postpartum period.

Keywords: immune response, Indicine, tick, Taurine.

Introdução

A saúde animal consiste em um obstáculo constante enfrentado para incrementar a produção de carne e leite cuja qualidade e quantidade são afetadas negativamente por doenças gerando grandes perdas econômicas. O rebanho bovino da atualidade é composto por animais taurinos, selecionados em continente europeu, e zebuínos, domesticados no sudoeste da Ásia e continente Africano, que apresentaram características distintas de resistência à doenças e estresse térmico (Hu et al., 2020; Saravanan et al., 2021; Tabor et al., 2017). Apesar disso, pouco se sabe sobre parâmetros celulares e bioquímicos que medeiam os fenótipos apresentados por raças taurinas e zebuínas, importantes para o desenvolvimento de resposta imune e controle metabólico em animais. Nesse sentido, a presente proposta visa comparar parâmetros celulares e bioquímicos entre taurinas (Holandês, HPB) e zebuínas (Gir) no pós-parto imediato que consiste no início do período crítico para desenvolvimento de doenças metabólicas e infectocontagiosas em vacas (Aleri et al., 2016; LeBlanc, 2010; Rupprechter et al., 2018). Essa estratégia visa identificar potenciais alvos de modulação de resposta imune e metabólica em vacas taurinas visando uma maior adaptabilidade aos desafios ambientais enfrentados em ambientes tropicais.

Material e Métodos

Todos os procedimentos realizados no presente estudo foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Embrapa Gado de Leite, sob o protocolo nº8798030820. O experimento foi conduzido no Campo Experimental José Henrique Bruschi, da Embrapa Gado de Leite, localizado em Coronel Pacheco-MG, Brasil. Vacas Gir e holandesas (n=11 por grupo), não aparentadas, foram submetidas ao processo de Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF) para obtenção de bezerros com nascimento contemporâneo. Essas vacas foram acompanhadas no pré-parto para evitar infestações por carrapato ou uso de medicamentos que poderiam alterar a resposta imune e metabólica no momento do parto. Foi coletado sangue do animal, através de punção na veia jugular imediatamente após o parto, sangue para análises de hemograma completo e parâmetros bioquímicos, como ureia, creatinina, aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), Gama GT, tempo de protrombina, tempo de tromboplastina e fibrinogênio. Para a comparação entre os dois grupos raciais foram feitas análises de variância e Teste T comparando os valores médios de cada parâmetro encontrados para animais Gir e Holandês considerando diferenças estatísticas significativas com nível de significância de 5% ($P < 0,05$).

Resultados e Discussão

Os valores encontrados pelo hemograma, leucograma, bioquímico e coagulograma não divergiram da literatura atual em relação aos parâmetros fisiológicos para a espécie bovina (Roland et al., 2014) entretanto, dentro da média dos grupos, houveram diferenças significativas ($P < 0,05$) entre as raças taurinas (Holandês) e zebuínas (Gir) quanto a concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), creatinina, ALT, eosinófilos, plaquetas e fibrinogênio (Figura 1). Durante a realização do experimento, ocorreu um surto de parasitismo por carrapatos na área na qual estavam alojados os animais holandeses, dessa forma, a eosinofilia e alterações em fatores de coagulação como número de plaquetas e quantidade de fibrinogênio sugerem participação ativa do

parasitismo pelo carrapato *Rhipicephalus microplus* que, sabidamente, modulam esses parâmetros em hospedeiros bovinos (Franzin et al., 2017; Tabor et al., 2017). Novos experimentos deverão ser feitos a fim de se verificar se há divergências em parâmetros celulares e bioquímicos entre vacas taurinas e zebuínas e como isso pode afetar a susceptibilidade desses animais à problemas metabólicos e infecções por endo e ectoparasitas no futuro.

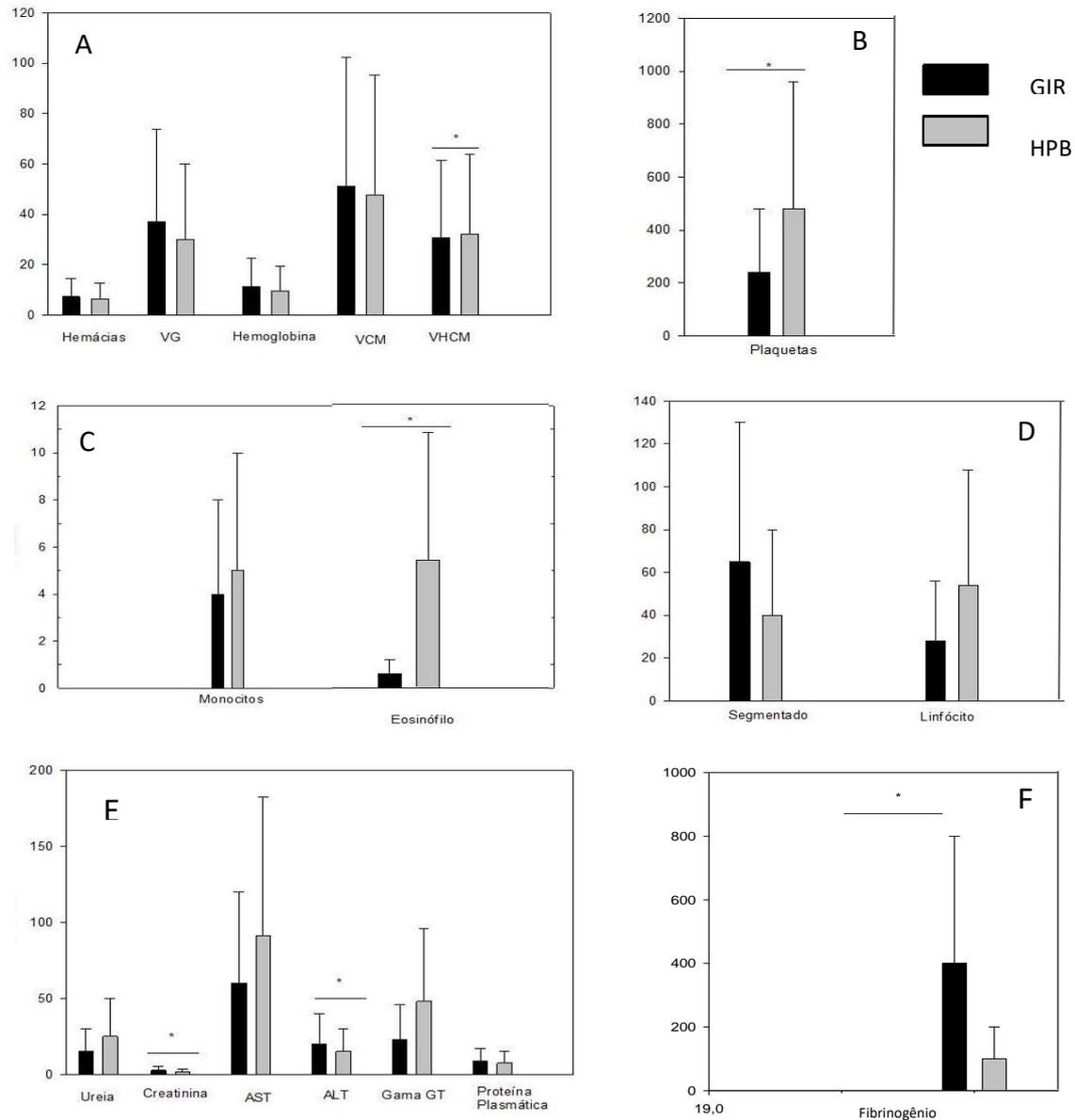


Figura 1: Parâmetros celulares e bioquímicos de vacas Holandesas (HPB) e Gir no pós-parto imediato. A – série vermelha; B – plaquetas; C – monócitos e eosinófilos; D – neutrófilos segmentados e linfócitos; E – série bioquímica; F – fibrinogênio. *P<0,05 (Teste T-student).

Conclusões

São necessários mais experimentos para definição de parâmetros celulares e bioquímicos que medeiam a susceptibilidade às doenças metabólicas e infectocontagiosas em animais taurinos e zebuínos. A infestação por carrapatos pode ter

induzido uma resposta imunológica que levou às alterações celulares em animais holandeses, inviabilizando os resultados esperados.

Agradecimentos

À toda equipe envolvida no trabalho, em especial aos técnicos de campo Jonas Campos do Amaral, José Roberto Nogueira (Betinho), Glória Verônica, Luís Lopes e José Mário pelos cuidados e dedicação com os animais experimentais, essenciais para os resultados obtidos.

Referências

- ALERI, J. W.; HINE, B. C.; PYMAN, M. F.; MANSELL, P. D.; WALES, W. J.; MALLARD, B.; FISHER, A. D. Periparturient immunosuppression and strategies to improve dairy cow health during the periparturient period. **Research in Veterinary Science**, v.108, p.8-17, 2016.
- FRANZIN, A. M.; MARUYAMA, S. S.; GRACIA, G. R.; OLIVEIRA, R. P.; RIBEIRO, J. M.; BISHOP, R.; MAIA, A. A.; MORE, D. D.; FERREIRA, B. R.; SANTOS, I. K. Immune and biochemical responses in skin differ between bovine hosts genetically susceptible and resistant to the cattle tick *Rhipicephalus microplus*. **Parasites & Vectors**, v.10, p.51, 2017.
- HU, Y.; XIA, H.; LI, M.; XU, C.; YE, X.; SU, R.; ZHANG, M.; NASH, O.; SONSTEGARD, T. S.; YANG, L.; LIU, G. E.; ZHOU, Y. Comparative analyses of copy number variations between *Bos taurus* and *Bos indicus*. **BMC Genomics**, v.21, p.682, 2020.
- LEBLANC, S. Monitoring metabolic health of dairy cattle in the transition period. **The Journal of Reproduction and Development**, v.56 Suppl, S29-35, 2010.
- ROLANS, L.; DRILLICH, M.; IWERSEN, M. Hematology as a diagnostic tool in bovine medicine. Journal of veterinary diagnostic investigation: official publication of the **American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc**, v.26, p.592-598, 2014.
- RUPRECHTER, G.; ADRIEN, M. L.; LARRIESTRA, A.; MEOTTI, O.; BATISTA, C.; MEIKLE, A.; NORO, M. Metabolic predictors of peri-partum diseases and their association with parity in dairy cows. **Research in Veterinary Science**, v.118, p.191-198, 2018.
- SARAVANAN, K.A.; PANIGRAHI, M.; KUMAR, H.; PARIDA, S.; BHUSHAN, B.; GAUR, G. K.; DUTT, T.; MISHRA, B. P.; SINGH, R. K. Genomic scans for selection signatures revealed candidate genes for adaptation and production traits in a variety of cattle breeds. **Genomics**, v.113, p.955-963, 2021.
- TABOR, A. E.; ALI, A.; REHMAN, G.; ROCHA GARCIA, G.; ZANGIROLAMO, A. F.; MALARDO, T.; JONSSON, N. N. Cattle tick *Rhipicephalus microplus*-host interface: A review of resistant and susceptible host responses. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v.7, p.506, 2017.

Integração Lavoura-Pecuária para sistemas de produção de leite (Sistema Santa Mônica)¹

Samara Rosa Ferreira Silva², Marcelo dia Muller³, Inácio de Barros⁴, Carlos Eugênio Martins⁵, Roberta Aparecida Carnevalli⁶

¹O presente trabalho foi realizado com o apoio do CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Brasil. Parte do projeto Sistemas de integração lavoura-pecuária-floresta em bovinocultura de leite na Mata Atlântica, liderado por Marcelo Dias Muller financiado pela Embrapa e Rede ILPF.

²Graduando em Zootecnia – UFRRJ; samararosafferreiras@gmail.com

³Pesquisador, Embrapa Gado de Leite marcelo.muller@embrapa.br

³Pesquisador, Embrapa Gado de Leite inacio.barros@embrapa.br

³Pesquisador, Embrapa Gado de Leite carlos.eugenio@embrapa.br

⁴Orientadora, Pesquisadora, Embrapa Gado de Leite roberta.carnevalli@embrapa.br

Resumo: A otimização e complementação de cultivos garante maior eficiência ao produtor e melhor qualidade ambiental na produção. Para tanto, o objetivo foi avaliar os níveis produtivos da pastagem e das plantas de cobertura nos consórcios após a colheita de milho para silagem. O experimento foi realizado no Campo Experimental Santa Mônica da Embrapa Gado De Leite, Valença – RJ. Foram implantadas parcelas somente com braquiária e com cobertura de crotalária, estilosantes, mucuna, feijão guandu e nabo forrageiro, após a colheita do milho para silagem. Foram avaliados a cada 30 dias a produção de massa total, massa das plantas de cobertura, massa da braquiária e massa de plantas espontâneas. A massa total no tratamento somente com braquiária teve um aumento considerável após a retirada do milho, houve uma redução na competição por luz e sem o efeito da sombra das plantas de milho, com aumento da luminosidade e, conseqüentemente, da massa. Nos tratamentos com crotalária, nabo forrageiro e feijão guandu, houve um aumento da produção da primeira para a segunda coleta e diminuiu na terceira. O tratamento com estilosantes não teve tanta diferenciação nas coletas e podendo-se observar uma produção de massa total constante. Já com mucuna, houve aumento de produção da primeira para a segunda coleta e após esta, estabilizou, não tendo aumento significativo. O tratamento somente com braquiária não havia plantas de cobertura. Já o tratamento com estilosantes, não houve germinação no tempo que ainda havia chuva, apesar do vigor das sementes estar normal. Os tratamentos com crotalária e com nabo forrageiro apresentaram aumento de massa significativo da primeira coleta para a segunda, seguido de um decréscimo da segunda para a terceira coleta. O guandu e a mucuna apresentaram aumento de massa significativos em todas as coletas. O nabo forrageiro, a crotalária, guandu e mucuna mostraram os melhores desempenhos produtivos nessa fase.

Palavras-chave: braquiária, crotalária, estilosantes, guandu, mucuna, nabo forrageiro

Crop-Livestock Integration for Milk Production Systems (Santa Mônica System)

Abstract: The optimization and complementation of crops ensures greater efficiency to the producer and better environmental quality in production. Therefore, the objective was to evaluate the productive levels of pasture and cover crops in the intercropping after harvesting corn for silage. The experiment was carried out at the Santa Mônica Experimental Field of Embrapa Gado De Leite, Valença – RJ. Plots only with brachiaria and covered with crotalaria, styling, velvet bean, pigeon pea and forage turnip were established after harvesting corn for silage. The total mass production, cover crops mass, brachiaria mass and weeds mass were evaluated every 30 days. The total mass in the treatment only with brachiaria had a considerable increase after the removal of corn, there was a reduction in competition for light and without the effect of shadow of

the corn plants, with an increase in luminosity and, consequently, in mass. In the treatments with crotalaria, forage turnip and pigeon pea, there was an increase in production from the first to the second collection and decreased in the third. The treatment with styling agents was not so different in the collections and it was possible to observe a constant total mass production. With mucuna, there was an increase in production from the first to the second collection and after this, it stabilized, with no significant increase. Treatment with only brachiaria had no cover crops. As for the treatment with styling agents, there was no germination when there was still rain, despite the seed vigor being normal. The treatments with crotalaria and radish showed a significant increase in mass from the first to the second collection, followed by a decrease from the second to the third collection. Pigeon pea and mucuna showed significant mass increase in all collections. The forage turnip, crotalaria, pigeon pea and mucuna showed the best productive performance in this phase.

Keywords: brachiaria, crotalaria, forage turnip, mucuna, pigeon pea, styling

Introdução

Culturas como milho e sorgo têm sido utilizadas há anos como fonte de alimentos para animais de produção. Como estratégia para o período da seca produtores realizam o plantio do milho ou do sorgo que servirão de fonte de sustento para os animais, quando a pastagem se encontra disponível em menor produtividade, necessário suplementar o animal com outras fontes de concentrados e volumosos.

O plantio do milho para silagem acontece geralmente nos meses de setembro/novembro na região sudeste do Brasil, conforme o início das chuvas, e é colhido até meados de fevereiro, até que o milho atinja um teor médio ideal de matéria seca. Essa matéria prima rica em energia é muito utilizada para a produção de silagem, onde o milho necessita ter um valor ideal de matéria seca em torno de 30 a 35%. Seu fornecimento aos animais pode ser feito no mínimo 30 dias após o fechamento do silo. A silagem é um alimento fermentado que pode durar até um ano se armazenado de forma correta, ou seja, serve como fonte de reserva de alimento (Carvalho et al., 2015). Frequentemente, os produtores realizam a primeira safra de milho, conhecida também como safra de verão e após a colheita realizam o segundo plantio do milho, chamado de “safrinha”, neste caso o solo não tem tanto tempo para poder se recuperar o que faz com que os nutrientes do solo se tornem cada vez mais escassos requerendo maior quantidade de tratamentos com adubos químicos, o que aumenta os custos de produção. Além disso, comumente o milho é cultivado consorciado somente com a forrageira, que não proporciona grandes benefícios ao solo, e a longo prazo se torna insustentável, visto que as características do solo são perdidas. Desta forma, uma estratégia que pode ser adotada é o uso do consórcio com leguminosas e crucíferas de fácil manejo, que não necessitam de maquinários específicos e que resultem na diminuição do uso de adubos químicos, contribuindo para a diminuição dos custos e melhore as propriedades químicas, físicas e biológicas do solo (Oliveira et al., 2013).

Este estudo tem como finalidade promover o cultivo do milho consorciado com a braquiária e com a rotação de leguminosas e/ou crucíferas de forma que promova melhorias na estrutura do solo. A expectativa é que a adição dessas plantas contribua para o enriquecimento do solo e, dessa forma, aumente a produção de milho e capim. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar os níveis produtivos da pastagem e das plantas de cobertura nos consórcios após a colheita de milho para silagem.

Material e Métodos

O experimento está sendo realizado no Campo Experimental Santa Mônica da Embrapa Gado De Leite, Barão de Juparanã, Valença – RJ. A área experimental era

de 1,2 ha subdividida em parcelas de 48x8 m. O desenho experimental foi baseado na consorciação e rotação de espécies leguminosas e crucífera, sendo elas: Nabo forrageiro (*Raphanus sativus L.*), Mucuna preta (*Mucuna pruriens*), Estilosantes campo grande (*Stylosanthes spp.*), Crotalária (*Crotalária oroleuca*), Feijão guandu (*Cajanus cajan*). Também fez parte do experimento o uso da braquiária, utilizada sozinha ou juntamente com as espécies de cobertura citadas. Estas espécies foram rotacionadas após colheita do milho para silagem para indicar sistema(s) que apresente(m) as melhores características de produção e sustentabilidade. Este projeto prevê as ações iniciais de consórcio das espécies.

Após a semeadura das plantas de cobertura, foi realizada a amostragem de acompanhamento a cada 30 dias, utilizando 3 quadrados 0,50 x 0,50m em cada parcela. O material coletado foi pesado, subamostrado, separado em componentes para determinação botânica e morfológica, além da produção de massa seca. Ao término do período chuvoso, uma última amostragem foi realizada para determinação do acúmulo final. Após a coleta, bovinos foram colocados na área para realização do pastejo (mob-grazing).

Os dados foram analisados utilizando o procedimento MIXED do SAS 9.2, sendo a comparação de médias realizada pelo teste PDIFF a 10% de significância, após a análise de variância.

Resultados e Discussão

A massa total no tratamento somente com braquiária teve um aumento considerável após a retirada do milho, houve uma redução na competição por luz e sem o efeito da sombra das plantas de milho, com aumento da luminosidade e, conseqüentemente, da massa. Nos tratamentos com crotalária, nabo forrageiro e feijão guandu houve um aumento da produção da coleta (C) 1 para a C2 e diminuiu na C3. O tratamento com estilosantes não teve tanta diferenciação nas coletas e podendo-se observar uma produção de massa total constante. O tratamento com mucuna aumentou a produção da C1 para a C2 e após esta, estabilizou, não tendo aumento significativo (Tabela 1).

Tabela 1. Produção de massa total presente após a colheita do milho nos tratamentos com coberturas vegetais.

Cobertura	Data de coleta			Média
	26/03/2021	30/04/2021	28/05/2021	
Braquiária	3.182 aA	3.609 aA	3.253 aA	3.348 A
Crotalária	3.182 abA	3.795 aA	2.584 bAB	3.221 AB
Estilosantes	2.924 aAB	3.156 aA	3.360 aA	3.147 B
Guandu	2.071 bC	3.733 aA	3.369 aA	3.058 B
Mucuna	2.347 bBc	3.093 aA	3.298 aA	2.913 BC
Nabo Forrageiro	2.729 abB	3.225 aA	2.382 bA	2.782 C
Média	2.739 c	3.437 a	3.058 b	

Letras maiúsculas comparam plantas de cobertura (linhas) e letras minúsculas comparam datas de coletas (coluna) ($p < 0,10$). Erro Padrão da média – EPM. $EPM_{coleta} = 121,7$; $EPM_{cobertura} = 172,2$; $EPM_{coleta \times cobertura} = 298,20$. $p_{coleta} = 0,012$; $p_{cobertura} = 0,2353$, $p_{coleta \times cobertura} = 0,0692$

A produção de braquiária na massa total no tratamento somente com braquiária apresentou um aumento bastante significativo da C1 para a C2 e depois estabilizou a sua quantidade, não tendo diferença significativa da C2 para a C3. No tratamento com a crotalária, a produção de braquiária foi pequena em todas as coletas. No tratamento com estilosantes, a massa de braquiária foi em baixa no início e teve aumento significativo na C3, contudo uma quantidade bastante pequena em relação ao

tratamento somente com braquiária. A produção de braquiária aumentou e depois teve um decréscimo na mucuna e teve um aumento considerável no tratamento com guandu, da C2 para a C3. No tratamento com nabo forrageiro, a braquiária teve pouca produção visto que o nabo forrageiro é uma planta que ocupa bem o solo, competindo com a forrageira. Na primeira coleta, a massa de braquiária foi bastante baixa em todos os tratamentos, destacando-se dos demais tratamentos apenas o tratamento somente com braquiária, com maior massa na C2 e, na C3, houve maior participação da massa de braquiária, no tratamento somente com braquiária, seguido do consórcio com estilosantes, e depois Nabo, guandu e crotalária, que se equipararam, seguido da mucuna que não diferiu do nabo forrageiro e da estilosantes (Tabela 2).

Tabela 2. Produção de braquiária presente após a colheita do milho nos tratamentos com coberturas vegetais.

Cobertura	Data de coleta			Média
	26/03/2021	30/04/2021	28/05/2021	
Braquiária	35,3 bA	951 aA	1.084 aA	690 A
Crotalária	0 aA	44,7 aB	97,7 aCD	47 C
Estilosantes	35,7 bA	142 bB	489 aB	222 B
Guandu	53,3 bA	44,7 bB	240 ac	113 C
Mucuna	17,7 aA	62,3 aB	26,7 aD	35 C
Nabo Forrageiro	0 bA	0b B	204 aCD	68 C
Média	23,7 c	207,6 b	357 a	

Letras maiúsculas comparam as plantas de cobertura (linhas) e letras minúsculas comparam as datas de coletas (coluna) ($p < 0,10$). Erro Padrão da média – EPM. $EPM_{coleta} = 31,07$; $EPM_{cobertura} = 43,94$; $EPM_{coleta \times cobertura} = 76,4$. $p_{coleta} = 0,0001$; $p_{cobertura} = 0,0001$, $p_{coleta \times cobertura} = 0,0001$.

A produção de plantas espontâneas teve seus maiores valores no tratamento com a estilosantes, visto que essa leguminosa não germinou, oportunizando maior espaço para o crescimento de plantas espontâneas. Seguido do tratamento somente com braquiária, que teve seu maior valor na C1, seguido de dois decréscimos nas coletas posteriores. No tratamento com crotalária, a produção também diminuiu a cada coleta, tendo valores maiores na C1 e na C2. Os tratamentos com guandu, mucuna e com nabo forrageiro apresentaram a mesma massa de plantas espontâneas da C1 para a C2, seguido de um decréscimo na C3 (Tabela 3).

Tabela 3. Produção de plantas espontâneas presente após a colheita do milho nos tratamentos com coberturas vegetais.

Cobertura	Data de coleta			Média
	26/03/2021	30/04/2021	28/05/2021	
Braquiária	3.147 aA	2.657 abAB	2.169 bAB	2.658 AB
Crotalária	2.818 aA	2.667 abAB	2.018 bB	2.501 B
Estilosantes	2.889 aA	3.013 aA	2.871 aA	2.924 B
Guandu	1.751 aB	1.813 aCD	880 bC	1.481 D
Mucuna	1.831 aB	2.249 aBC	1.473 aB	2.018 C
Nabo Forrageiro	880 aC	1.226 aD	560 aC	889 E
Média	2.219 a	2.271 a	1.745 b	

Letras maiúsculas comparam plantas de cobertura (linhas) e letras minúsculas comparam datas de coletas (coluna) ($p < 0,10$). Erro Padrão da média – EPM. $EPM_{coleta} = 171,4$; $EPM_{cobertura} = 121,2$; $EPM_{coleta \times cobertura} = 296,9$. $p_{coleta} = 0,0072$; $p_{cobertura} = 0,0001$, $p_{coleta \times cobertura} = 0,6347$.

O tratamento somente com braquiária não havia plantas de cobertura. Já o tratamento com estilosantes não houve germinação no tempo que ainda havia chuva, apesar do vigor das sementes estar normal. Os tratamentos com crotalária e com nabo forrageiro apresentaram aumento de massa significativo da C1 para a C2, seguido de um decréscimo da C2 para a C3. O guandu e a mucuna apresentaram aumento de massa significativos em todas as coletas. Resultados satisfatórios com feijão guandu também foram relatados por Oliveira et al. (2013) e com nabo forrageiro por Salton (1995).

Tabela 4. Produção de plantas de cobertura presente após a colheita do milho nos tratamentos com coberturas vegetais.

Cobertura	Data de coleta			Média
	26/03/2021	30/04/2021	28/05/2021	
Braquiária	0 Ba	0 Ca	0 Ca	0 C
Crotalária	364 Bb	1.084 Ba	569 Cb	673 B
Estilosantes	0 Ba	0 Ca	0 Ca	0 C
Guandu	267 Bb	1.875 Aa	2.249 Aa	1.464 A
Mucuna	448 Bb	782 Bab	1.298 Ba	859 B
Nabo Forrageiro	1.849 Aa	2.009 Aa	1.618 ABa	1.825 A
Média	496 b	958 a	955 a	

Letras maiúsculas comparam plantas de cobertura (linhas) e letras minúsculas comparam datas de coletas (coluna) ($p < 0,10$). Erro Padrão da média – EPM. $EPM_{coleta} = 116,6$; $EPM_{cobertura} = 164,9$; $EPM_{coleta \times cobertura} = 285,5$; $p_{coleta} = 0,0106$; $p_{cobertura} = 0,0001$, $p_{coleta \times cobertura} = 0,0219$

Após a retirada dos animais, os tratamentos com guandu e mucuna apresentaram as maiores massas totais e os tratamentos com nabo e estilosantes, as menores, contudo, apenas o guandu, nabo e mucuna ainda permaneceram e contribuíram com alguma participação na massa total sendo as demais compostas por uma grande fração de plantas espontâneas.

Conclusões

As plantas de cobertura crotalária, mucuna, nabo forrageiro e feijão guandu apresentaram desempenho produtivo satisfatório nesta fase primeira fase e o estilosantes não apresentou resultados promissores para prosseguir para a próxima fase do experimento.

Referências

- CARVALHO, D. O.; CHAVES, F. F.; MIRANDA, J. E. C.; OLIVEIRA, J. S.; BERNARDO, W. F.; MAGALHÃES, V. M. A. Sete passos para uma boa ensilagem de milho. Embrapa, Brasília, DF, 2015.
- OLIVEIRA, P.; FREITAS, R. J.; KLUTHCLOUSKI, J.; RIBEIRO, A. A.; CORDEIRO, L. A. M.; TEIXEIRA, L. P.; MELO, R. A. C.; VILELA, L.; BALBINO, L.C. Evolução de sistemas de Integração Lavoura-Pecuária-Floresta (iLPF): Estudo de caso da Fazenda Sistema Santa Brígida, Ipameri GO – Documentos 318, Embrapa Cerrados, Planaltina, 2013.
- SALTON, J.C.; PITOL, C.; SIEDE, P.K.; HERNANI, L.C.; ENDRES, V.C. Nabo Forrageiro: Sistemas De Manejo. Embrapa, CPAO, Dourados, MS, 1995.

Pesquisa do alelo B de beta-caseína em touros da raça Girolando por tetra-primer ARMS-PCR¹

Tamires Rodrigues de Lima^{2,3}, Victor Hugo Halfeld Kelmer Maluf⁴, Rosiana Angélica Campos^{2,5}, Isabela Karoline de Aguiar Soares^{2,6}, Hyago Passe Pereira⁷, Robert Domingues⁸, Daniele Ribeiro de Lima Reis Faza⁸, Marta Fonseca Martins^{9,10}, João Cláudio do Carmo Panetto^{9,10}, Marcos Vinicius Gualberto Barbosa da Silva⁹, Marco Antonio Machado^{9,10,11}

¹O presente trabalho foi realizado com o apoio do CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Brasil. Parte do projeto “Utilização de ferramentas genômicas e quantitativas para maximização dos ganhos genéticos nos programas de seleção em bovinos leiteiros”, liderado por Marcos Vinicius Gualberto Barbosa da Silva

²Bolsista PIBIC CNPq,

³Graduando em Farmácia - Universidade Federal de Juiz de Fora

⁴Graduando em Biologia - Centro de Ensino Superior de Juiz de Fora – UniAcademia CES/JF

⁵Graduando em Farmácia – Suprema/JF

⁶Graduando em Medicina Veterinária - Universidade Federal de Juiz de Fora

⁷Doutorando em Biologia - Universidade Federal de Juiz de Fora

⁸Analista da Embrapa Gado de Leite – Juiz de Fora/MG

⁹Pesquisador da Embrapa Gado de Leite.

¹⁰Bolsista de Produtividade do CNPq

¹¹Orientador – marco.machado@embrapa.br

Resumo: O leite consiste em um alimento fonte de micronutrientes essenciais e está comumente presente nos hábitos alimentares do brasileiro. Entretanto, a qualidade e as propriedades do leite estão associadas a fatores genéticos dos bovinos e as proteínas integrantes de sua composição. O leite é composto por várias proteínas, na qual a beta-caseína é a mais abundante. Existem várias variantes desta proteína, sendo a A1, A2 e B as mais encontradas. A digestão da beta-caseína A1 e B no trato gastrointestinal humano gera um peptídeo bioativo denominado beta casomorfina 7, que pode estar relacionado com algumas doenças humanas importantes. Este estudo objetivou analisar as frequências alélicas e genotípicas, da variante B da beta-caseína, em touros da raça Girolando. Foram genotipados 190 animais, utilizando a técnica de *tetra-primer* ARMS-PCR. As frequências alélicas e genotípicas encontradas foram, respectivamente: A (96,8 %); B (3,2%); AA (93,7%); AB (6,3%); BB (0%). Observou-se uma baixa prevalência do alelo B na raça Girolando, o que pode estar relacionada com a seleção para o alelo A2 que vem acontecendo nos últimos anos.

Palavras-chave: Alelo B, Beta-caseína, Frequência Alélica, Girolando, *tetra-primer* ARMS-PCR

Search for beta-casein B allele in Girolando bulls by tetra-primer ARMS-PCR

Abstract: Milk is a food source of essential micronutrients and is commonly present in Brazilian eating habits. However, the quality and properties of milk are associated with genetic factors in cattle and the proteins found in its composition. Milk is composed of various proteins and beta-casein is the most abundant one. There are several variants of this protein in which A1, A2 and B are the most commonly found. The digestion of beta-casein A1 and B in the human gastrointestinal tract generates a bioactive peptide called beta casomorphine 7 which may be related to some important human diseases. This study aimed to analyze the allelic and genotypic frequencies of beta-casein variant B in Girolando bulls. A total of 190 animals were genotyped using the tetra tetra-primer ARMS-PCR technique. The allelic and genotypic frequencies found were: A (96.8%); B

(3.2%); AA (93.7%); AB (6.3%); BB (0%). There was a low prevalence of the B allele in Girolando bulls which may be related to the intensive selection for the A2 allele that has been going on in recent years.

Keywords: B Allele, Beta-casein, Allele Frequency, Girolando, *tetra-primer* ARMS-PCR

Introdução

O leite e seus derivados possuem um papel expressivo no suprimento de alimentos, sendo composto principalmente de proteínas de alto valor biológico, responsáveis pelas atividades funcionais e estruturais dos organismos vivos (SHARMA et al., 2013). Sendo assim, o leite de vaca desempenha um papel importante na dieta humana. No leite, um dos principais grupos de proteínas é a caseína, ocorrendo em cerca de 80% (Hoffman e Falvo, 2004). As propriedades e a qualidade do leite e derivados são influenciadas diretamente pelo conteúdo de suas proteínas.

A beta-caseína é a segunda proteína mais abundante no leite de vaca, constituindo até 45% das caseínas totais e contém 209 aminoácidos e seu gene codificador está localizado no cromossomo 6 (Sulimova et al., 2007). Há 13 variantes genéticas descritas (A1, A2, A3, A4, B, C, D, E, F, H1, H2, I, G) (Rahimi et al., 2015). Nas raças de gado de leite, as variantes mais comuns são A1 (CSN2- A1) e A2 (CSN2-A2). A variante B é menos frequente e as variantes A3 e C são raras. As variantes da beta-caseína (em particular A1, A2 e B) têm recebido muita atenção da comunidade científica por causa de sua influência nas propriedades tecnológicas do leite e na saúde humana.

Sendo assim, as variantes A1 e B diferenciam da variante A2 na posição 67 onde uma histidina (códon CAT) substitui uma prolina (códon CCT). Além disso, a variante B difere da variante A1 em uma substituição de arginina por serina na posição 122. A digestão da beta-caseína A1 e B no trato gastrointestinal humano tem como um de seus produtos finais um peptídeo bioativo denominado beta-casomorfina 7 (BCM-7), que é um importante peptídeo bioativo com forte atividade opioide, que pode estar relacionado com algumas doenças humanas importantes (Lien et al., 1992).

Segundo o Sumário de Touros do Programa de Melhoramento Genético da Raça Girolando, a raça Girolando foi criada objetivando a formação de um grupamento étnico capaz de produzir leite de modo sustentável nas regiões tropicais e subtropicais. Desse modo, a raça Girolando, cada vez mais, ganha reconhecimento nacional e internacional, sendo a preferida para produção de leite nas regiões tropicais.

Uma técnica simples e econômica de genotipagem que utiliza apenas um único PCR é denominada de *tetra-primer* ARMS-PCR (Chiapparino et al., 2004). Dois conjuntos de *primers*, os externos e internos são usados na reação (Li et al., 2014). Cada primer interno se combina com um dos *primers* externos para gerar fragmentos específicos, de acordo com o alelo presente, que podem ser facilmente observados em gel de eletroforese, diferenciando homozigotos e heterozigotos (Li et al., 2014). Os *primers* externos amplificam um grande fragmento do gene alvo, independentemente de seu genótipo.

É importante investigar a presença do alelo B da beta-caseína na raça Girolando, para futuras aplicações em programas de melhoramento genético. Dessa maneira, o objetivo deste trabalho foi avaliar as frequências alélicas e genotípicas do Alelo B em 190 touros participantes do Programa de Melhoramento Genético da Raça Girolando, utilizando a técnica *tetra-primer* ARMS-PCR.

Material e Métodos

Foram utilizados 190 animais da raça Girolando, os quais integram o Banco de DNA de bovinos de Leite da Embrapa Gado de Leite. A genotipagem foi feita utilizando a técnica de *tetra-primers ARMS-PCR*. Em 25 µL de PCR, foram usados 90 ng de DNA, 0,6 µM de cada *primer* interno e 0,1 µM de cada *primer* externo, 0,2 M de dNTP, 3,5 mM de MgCl₂, 1X de tampão de PCR (Promega, Madison, EUA) e 0,5 U da enzima *Taq* DNA polimerase (Promega, Madison, EUA). As amostras foram submetidas a 94°C por 2 min, seguido de 30 ciclos de 30 s de desnaturação (94°C), 30 s de ligação e 45 s de extensão (66°C) em seguida de 5 min a 72°C para extensão final.

Tabela 1. Sequências dos *primers* utilizados para a genotipagem dos alelos da Beta-caseína (Rincon & Medrano, 2003).

Nome	Sequência 5'-3'
<i>Forward inner primer (C allele)</i>	AATATCCAGTTGAGCCCTTTACTGAATGC
<i>Reverse inner primer (T allele)</i>	CAACATCAGTGAGAGTCAGGCTCAGC
<i>Forward outer primer</i>	AACATCCCTCCTTACTCAAACCCCTG
<i>Reverse outer primer</i>	ATATCTCTCTGGGGATAGGGCACTGCTT

Os produtos resultantes da amplificação do DNA foram visualizados por eletroforese em gel de agarose 1,5 % corados com brometo de etídeo. A corrida foi realizada a 110 volts por 2,5 horas.

Resultados e Discussão

Dos 190 animais genotipados, 12 apresentaram o genótipo AB e 178 apresentaram o genótipo AA. As frequências alélicas e genotípicas foram calculadas conforme demonstrado nas Tabelas 2 e 3.

Tabela 2 - Resultado da frequência alélica **Tabela 3** - Resultado da frequência genotípica

Frequência Alélica	Touros Girolando (n = 190)
A	96,8%
B	3,2%

Frequência Genotípica	Touros Girolando (n = 190)
AA	93,7%
AB	6,3%
BB	0%

A banda de 338 pares de base (pb) foi sempre visualizada e utilizada como controle positivo da reação de PCR. A banda de 217 pb foi visualizada quando o alelo A estava presente e a banda de 177 pb, quando o alelo B estava presente.

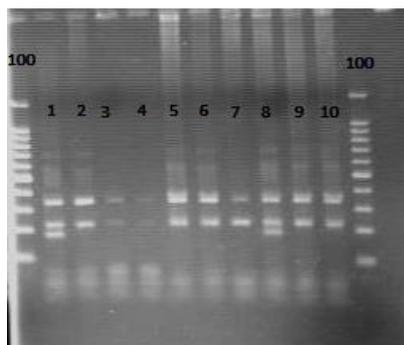


Figura 1. Foto do gel de agarose 1,5 % mostrando o padrão de bandas obtido pela técnica tetra-primer ARMS-PCR para o alelo B da Beta -caseína. As amostras 1 e 8 possuem o genótipo AB, enquanto as demais possuem o genótipo AA. Foi utilizado marcador de 100 pares de base nas extremidades.

A técnica de tetra-primer ARMS PCR foi eficaz para calcular a frequência do alelo B da beta-caseína. O tamanho das bandas amplificadas foi diferente o suficiente para serem distinguidas por eletroforese em gel de poliacrilamida 1,5 %.

A frequência do alelo B foi de 6% de acordo com o trabalho de Dai et al. (2016), que testou vacas chinesas da raça Holandês. Kaminsky et al (2007) reportou a frequência da variante B em vacas holandesas entre 1 e 10,7%, de diferentes regiões.

Conclusões

Observamos na raça Girolando uma baixa incidência do alelo B para beta-caseína. Isso demonstra que a maioria dos touros da raça Girolando não apresenta a variante alélica B da beta-caseína, a qual está correlacionada ao desenvolvimento de doenças em humanos. Isto pode estar relacionado com a seleção para o alelo A2 que vem sendo intensamente realizada nos últimos anos.

Referências

- CHIAPPARINO, E.; LEE, D.; DONINI, P. Genotyping single nucleotide polymorphisms in barley by tetra-primer ARMS-PCR. **Genome**, [S. l.], v.47, p. 414-20, 2004.
- EMBRAPA. Programa de Melhoramento Genético da Raça Girolando/Sumário de Touros. Disponível em https://ainfo.chptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/224459/1/DOC-255_Sumario-Touros_Girolanda-2021.pdf. Acesso em: 9 ago. 2021
- HOFFMAN, J.; FALVO, M. Protein-which is best? **Journal of Sports Science and Medicine**, v. 3, p. 118-130, 2004.
- KAMINSKI, S.; CIESLINSKA, A.; KOSTYRA, E. Polymorphism of bovine beta-casein and its potential effect on human health. **Journal of Applied Genetics**, v.48, p.189–198, 2007.
- LIEN, S.; ALESTROM, P.; KLUNGLAND, H.; ROGNE, S. Detection of multiple β -casein alleles by amplification created restriction sites (ACRS). **Animal Genetics**, v.23, 333–338, 1992. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.1992.tb00155.x>
- LI, M.; SUN, X.; JIANG, J.; SUN, Y.; LAN, X.; LEI, C.; ZHANG, C.; CHEN, H. Tetra-primer ARMS-PCR is an efficient SNP genotyping method: An example from SIRT2. **Analytical Methods**, v.6 p. 1835-1840, 2014.
- RAHIMI, Z.; GHOLAMI, M.; YARI, K. 2015. Evaluation of beta-casein locus for detection of A1 and A2 alleles frequency using allele specific PCR in native cattle of Kermanshah. **Biharean Biologist**, v.9, p.85-87, 2015.
- RINCON, G.; MEDRANO, J. F. Single nucleotide polymorphism genotyping of bovine milk protein genes using the tetra-primer ARMS-PCR. **Journal of Animal Breeding and Genetics**, v. 120, p. 331-337, 2003. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0388.2003.00405.x>
- SHARMA, V.; SHARMA, N.; JAWED, B.; NAUTIYAL, S. C.; SINGH, R. K. High resolution melt curve analysis for the detection of A1, A2 β -casein variants in Indian cows. **Journal of Microbiology and Biotechnology Research**, v.3, p.144-148, 2013.

SULIMOVA, G. E.; AZARI, M. A. RHOSTAMZADEH, J.; ABADI, M. R. M.; LAZEBNY, O. E. κ - casein gene (CSN3) allelic polymorphism in Russian cattle breeds and its information value as a genetic marker. **Russian. Journal of Genetics**, v.43, p.73-79, 2007.

Desenvolvimento de teste de genotipagem em bovinos para o SNP A1/A2 do gene da beta caseína, usando a técnica de tetra-primer ARMS-PCR¹

Victor Hugo Halfeld Kelmer Maluf^{2,3}, Tamires Rodrigues de Lima⁴, Rosiana Angélica Campos⁵, Isabela Karoline de Aguiar Soares⁶, Hyago Passe Pereira⁷, Robert Domingues⁸, Daniele Ribeiro de Lima Reis Faza⁸, Marta Fonseca Martins^{9, 10}, João Cláudio do Carmo Panetto^{9, 10}, Marcos Vinicius Gualberto Barbosa da Silva⁹, Marco Antonio Machado^{9,10,11}

1 O presente trabalho foi realizado com o apoio do CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Brasil. Parte do projeto “Utilização de ferramentas genômicas e quantitativas para maximização dos ganhos genéticos nos programas de seleção em bovinos leiteiros”, liderado por Marcos Vinicius Gualberto Barbosa da Silva

² Bolsista Embrapa

³ Graduando em Biologia - Centro de Ensino Superior de Juiz de Fora – UniAcademia CES/JF

⁴ Graduando em Farmácia - Universidade Federal de Juiz de Fora

⁵ Graduando em Farmácia – Suprema/JF

⁶ Graduando em Medicina Veterinária - Universidade Federal de Juiz de Fora

⁷ Doutorando em Biologia - Universidade Federal de Juiz de Fora

⁸ Analista da Embrapa Gado de Leite – Juiz de Fora/MG

⁹ Pesquisador da Embrapa Gado de Leite.

¹⁰ Bolsista de Produtividade do CNPq

¹¹ Orientador – marco.machado@embrapa.br

Resumo: O leite é um alimento rico em nutriente e proteínas, sendo um alimento muito importante na saúde humana. A beta caseína é uma das proteínas mais abundantes no leite bovino, e 12 variantes já foram descritas na literatura. As mais encontradas são as variantes A1 e A2, que diferem entre si por uma troca de nucleotídeo (SNP), que acarreta uma troca de aminoácido. A digestão da beta caseína A1 no trato gastrointestinal humano tem como um de seus produtos finais um peptídeo bioativo denominado beta casomorfina 7, que foi relacionado a várias doenças em humanos. Amostras de DNA de touros da raça Girolando, previamente genotipados para este SNP, foram usados para o desenvolvimento de uma metodologia de genotipagem por *tetra-primer* ARMS-PCR. Após várias padronizações, a metodologia foi desenvolvida com sucesso, possibilitando a diferenciação dos alelos A1 e A2 por meio de uma técnica simples e econômica, envolvendo apenas um único PCR seguido de eletroforese. A genotipagem para as variantes do gene da beta caseína tem tido uma grande procura por parte dos criadores e programas de melhoramento, que visam produzir animais com genótipos A2A2.

Palavras-chave: Beta-caseína, A1A2, Genotipagem, ARMS-PCR

Development of a bovine genotyping test for the A1/A2 SNP of the beta-casein gene, using the tetra-primer ARMS-PCR technique

Abstract: Milk is a rich food in nutrients and proteins and it is very important for the human health. Beta-casein is one of the most abundant proteins in bovine milk and a total of 12 variants have been described in the literature. The most common are the A1 and A2 variants that differ from each other by a nucleotide change (SNP) which promotes an amino acid change. The digestion of beta-casein A1 in the human gastrointestinal tract generates a bioactive peptide called beta Casomorphine 7 which has been linked to several diseases in humans. Beta-casein previously genotyped DNA samples from Girolando bulls were used to develop a tetra-primer ARMS-PCR genotyping protocol which was successfully achieved, enabling the differentiation of the A1 and A2 alleles through a simple and low-cost technique, involving only a single PCR followed by electrophoresis. The genotyping for this SNP is in great demand by dairy producers and breeding programs aiming to produce animals with A2A2 genotype.

Keywords: Beta-casein, A1A2, SNP genotyping, ARMS-PCR

Introdução

O leite é uma ótima fonte de nutrientes e tem papel importante na alimentação humana. Em mamíferos, a caseína representa cerca de 80% das proteínas presentes no leite, e os outros 20% são chamadas de proteínas do soro (alfa-lactalbumina e beta-lactoglobulina) (Eigel, *et al* 1984). O leite bovino contém quatro caseínas (alfa S1-CN, alfa S2-CN, beta-CN e kappa-CN) (Sulimova *et al.*, 2007; Jaiswal *et al.*, 2014) sendo que a beta-caseína corresponde a 25-35% do total.

A beta-caseína é codificada pelo gene CSN2, que é altamente polimórfico, possuindo 209 aminoácidos (Haq *et al.*, 2013). Existem 12 variantes desta proteína (A1; A2; A3; B; C; D; E; F; H1; H2; I; G) em raças bovinas (Kaminiski, *et al.* 2007; Haq *et al.*, 2013). As variantes mais comuns no leite de bovinos são as β -caseínas A1 e A2, que se diferenciam pela mudança de um nucleotídeo (SNP), troca de citosina por adenosina, gerando uma substituição do aminoácido na posição 67 da cadeia proteica, na qual a prolina no A2 é substituída por uma histidina no A1 (Reis Filho *et al.*, 2012). A digestão da beta-caseína A1, no trato gastrointestinal humano, tem como um de seus produtos finais um peptídeo bioativo denominado beta-casomorfina 7 (BCM-7), que foi relacionado a várias doenças em humanos, como diabetes, doenças cardiovasculares, autismo, esquizofrenia e doenças autoimunes (Woodford, 2008).

Portanto, empresas nacionais e internacionais buscam técnicas que possam identificar bovinos voltados à comercialização de leite A2, tendo em vista que há uma menor produção do BCM-7, visando o bem-estar humano. No Brasil, produtores tem realizado a genotipagem desse gene em bovinos, principalmente das raças Gir, Girolando e Holandês, a fim de manter seus rebanhos completamente homozigotos para o alelo A2 da CSN2 (Neiva, 2018).

Os marcadores moleculares do tipo SNP são considerados um dos mais importantes, porém, nos países em desenvolvimento, é difícil e caro genotipar um grande número de animais por métodos de PCR e pós-PCR (Ahlawat *et al.*, 2014). Uma metodologia simples e econômica de genotipagem de SNPs que envolve apenas um único PCR seguido de eletroforese em gel é chamado de *tetra-primer ARMS-PCR* (Chiapparino *et al.*, 2004). Essa técnica usa dois conjuntos de *primers*, os externos e internos, sendo que os externos amplificam um grande fragmento do gene alvo, sem diferenciar os genótipos, e cada primer interno se combina com um dos *primers* externos para gerar fragmentos menores e específicos, de acordo com o alelo presente. Esses fragmentos podem ser observados facilmente em gel de eletroforese, diferenciando homozigotos e heterozigotos (Li *et al.*, 2014).

O objetivo do estudo foi desenvolver uma metodologia de genotipagem simples e de baixo custo, para o SNP A1A2 localizado no gene da beta-caseína, utilizando a técnica *tetra-primer ARMS-PCR*.

Material e Métodos

Foram analisadas amostras de DNA genômico de touros da raça Girolando pertencentes ao Banco de DNA de Bovinos de Leite do Laboratório de Genética Molecular Dr. Mário Luiz Martinez. Essas amostras foram previamente genotipadas para o gene da beta-caseína pelos métodos PCR-RFLP e PCR alelo específico e os resultados foram utilizados como controle para validar os resultados da técnica *tetra-primer ARMS-PCR*.

Com a utilização do programa Primer 1 (<http://primer1.soton.ac.uk/primer1.html>) foram desenhados quatro *primers*, dois internos (*inner primers*), que se ligam na região específica da mutação, e dois externos (*outer primers*), que funcionam com controle positivo da reação de PCR.

Tabela 1. Sequências dos *primers* utilizados para a diferenciação dos alelos da beta-caseína A1 e A2.

Nome	Sequência 5'-3'
A1 Forward inner:	TAGTCTATCCCTTCCCTGGGCCCATTCA
A2 Reverse inner:	GAGGGATGTTTTGTGGGAGGCTGTCAG
Forward outer:	CAGGATGAACTCCAGGATAAAATCCACCCC
Reverse outer:	GCTTAGGAGCCATAGCCTCCTTCACTTTGG

Para obter a melhor condição de reação do PCR, foram testadas diferentes concentrações de *primers*, dNTP, Taq, MgCl₂, e temperaturas de termociclagem. Após a amplificação do DNA, os fragmentos foram visualizados por eletroforese em gel de poliacrilamida nativo 8% corado com nitrato de prata 12%. A corrida foi realizada a 400 volts por 2 horas.

Os padrões dos fragmentos digeridos observados no gel variaram de acordo com os alelos presentes em suas respectivas bandas. Alelos homozigotos A1A1 representado pelas bandas com 193 e 145 pares de base (pb) respectivamente, alelos heterozigotos A1A2 193,145 e 103 pares de base (pb) e alelos homozigotos para A2A2 nas bandas 193 e 103 pares de base (pb).

Resultados e Discussão

As reações de PCR foram padronizadas num volume total de 25µL, contendo 90ng de DNA, 0,6 µM de cada *primer* interno e 0,1 µM de cada *primer* externo, 200 µM de dNTP, 3,5 mM de MgCl₂, 1X de tampão de PCR (Promega, Madison, EUA) e 0,5 U da enzima *Taq* DNA polimerase (Promega, Madison, EUA). As amostras foram submetidas a 94°C por 2 min, seguido de 30 ciclos de 30 s de desnaturação (94°C), 30 s de ligação (63°C) e 30 s de extensão (72°C), e um passo final de 5 min a 72°C para extensão final. A Figura 1 mostra o perfil das bandas no gel, diferenciando claramente os genótipos A1A1, A1A2 e A2A2.

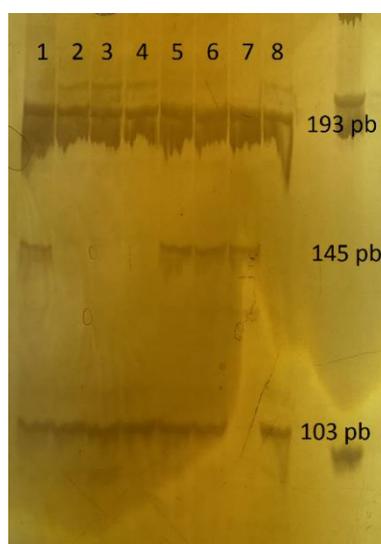


Figura 1. Foto do gel de poliacrilamida nativo de 8% mostrando o resultado do PCR pela técnica *tetra-primer ARMS-PCR* para o gene da beta-caseína. Amostras 1, 5 e 6 possuem o genótipo A1A2, a amostra 7 possui o genótipo A1A1 e as

amostras 2, 3, 4 e 8 possuem o genótipo A2A2, ao final, marcador de peso molecular de 100 pb.

A técnica de tetra-primer ARMS PCR foi eficiente para a perfeita diferenciação entre os alelos, visto que o tamanho das bandas amplificadas foi diferentemente suficiente para serem distinguidas por eletroforese em gel de poliacrilamida 8%. A melhor condição de PCR foi obtida com diferença de concentração de 6:1 entre os *primers* internos e externos. Os genótipos obtidos estavam em conformidade com os obtidos pelas outras técnicas já validadas.

Rincón & Medrano (2003) desenvolveram protocolos de genotipagem por *tetra-primer* ARMS-PCR de proteínas do leite bovino com sucesso, e Ali et al (2019) também desenvolveram com sucesso um protocolo para diferenciação dos alelos A1 e A2 para beta-caseína por *tetra-primer* ARMS-PCR, porém com outro conjunto de *primers* e eletroforese em gel de agarose. Todos confirmaram a eficiência do método, sendo este preciso, rápido, de fácil reprodução e de baixo custo.

Conclusões

Os genótipos dos animais, obtidos anteriormente com outras técnicas (PCR-RFLP e AS-PCR) foram confirmados com o desenvolvimento de um protocolo utilizando a técnica *tetra-primer ARMS-PCR*. Portanto, esse protocolo se mostrou eficiente, caracterizando-se como uma alternativa rápida e barata para a identificação dos alelos da beta-caseína A1 e A2, tão importantes atualmente para o melhoramento das raças leiteiras no Brasil e no mundo.

Agradecimentos

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA, Equipe do Laboratório de Genética Molecular, Orientador Marco Antonio Machado e Faculdade de Ciências Biológicas – UniAcademia.

Referências

- AHLAWAT, S.; SAXENA, P.; ALAM, P.; WAJID, S.; ABDIN, M. Z. Modulation of artemisinin biosynthesis by elicitors, inhibitor, and precursor in hairy root cultures of *Artemisia annua* L. **Journal of Plant Interactions**, v. 9, p. 811-824, 2014.
- ALI, W. R.; AMIN, I.; ASIF, M.; MANSOOR, S. Genotyping test development and genotyping survey of Pakistani population of Holstein Friesian imported from different origins for A1/A2 SNP in Beta-casein gene. *BioRxiv*, p.1-16, 2019. [doi: https://doi.org/10.1101/720045](https://doi.org/10.1101/720045)
- CHIAPPARINO, E.; LEE, D.; DONINI, P. Genotyping single nucleotide polymorphisms in barley by tetra-primer ARMS-PCR. **Genome**, [S. l.], v. 47, p. 414-20, 2004.
- EIGEL, W. N.; BUTLER, J. E.; ERNSTROM, C. A.; FARRELL, H. M.; HALWARKAR, V. R.; JENNESS, R. E.; WHITNEY, R. M. Nomenclature of proteins of cow's milk: fifth revision. **Journal of Dairy Science**, v.67, p.1599–1631, 1984.
- HAQ, M. R. U.; KAPILA, R.; SHARMA, R.; SALIGANTL, V.; KAPILA, S. Comparative evaluation of cow β -casein variants (A1/A2) consumption on Th2-mediated inflammatory response in mouse gut. **European Journal of Nutrition**, v.10, p.1-11, 2013.
- JAISWAL, K.; DE, S.; SARSAVAN, A. Detection of single nucleotide polymorphism by T-ARMS PCR of cross bred cattle Karan Fries for A1, A2 beta-casein types. **International Journal of Scientific Research in Biological Science**, v.1, p.18-20, 2014.

- KAMINSKI, S.; CIESLINSKA, A.; KOSTYRA, E. Polymorphism of bovine beta-casein and its potential effect on human health. **Journal of Applied Genetics**, v.48, p.189–198, 2007.
- LI, M.; SUN, X.; JIANG, J.; SUN, Y.; LAN, X.; LEI, C.; ZHANG, C.; CHEN, H. Tetra-primer ARMS-PCR is an efficient SNP genotyping method: An example from SIRT2. **Analytical Methods**, v.6 p. 1835-1840, 2014.
- NEIVA, R. Brazil develops first genomic assessment system for dairy cattle: Biotechnology and biosafety. **Embrapa Dairy Cattle**, 8 maio 2018.
- REIS FILHO, J.C.; TORAL, F. L. B.; VERNEQUE, R. S.; VERCESI FILHO, A. E.; TORRES, R. A.; EUCLYDES, R. F. Incorporation of lactations with non-conventional drying-off causes in genetic evaluation of Gyr dairy cattle. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.41, p.2018-2024, 2012. [doi: 10.1590/S1516-35982012000900008](https://doi.org/10.1590/S1516-35982012000900008)
- RINCÓN, G.; MEDRANO, J. F. Single nucleotide polymorphism genotyping of bovine milk protein genes using the tetra-primer ARMS-PCR. **Journal of Animal Breeding and Genetics**, v. 120, p. 331-337, 2003. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0388.2003.00405.x>
- SULIMOVA, G. E.; AZARI, M. A. RHOSTAMZADEH, J.; ABADI, M. R. M.; LAZEBNY, O. E. κ -casein gene (CSN3) allelic polymorphism in Russian cattle breeds and its information value as a genetic marker. **Russian Journal of Genetics**, v.43, p.73-79, 2007.
- WOODFORD, K. A1 Beta-casein, Type 1 diabetes and links to other modern illnesses. In: **International Diabetes Federation Western Pacific Congress**, 2008. Wellington: IDF, 2008. <https://onlybuyvegan.com/wp-content/uploads/2017/03/diabetesandmilk.pdf>

Análise de padrões de consumo de derivados lácteos na região Sudeste¹

Pedro Henrique Moura Siqueira², Glauco Rodrigues Carvalho³

¹O presente trabalho foi realizado com o apoio do CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Brasil. Parte do projeto – Modelo econométrico espacial para previsão da oferta de leite fundamentada no risco climático no Sudeste do Brasil, liderado por Glauco Rodrigues Carvalho. Parte da monografia do primeiro autor, financiada pela CNPq. Bolsista do CNPq, Embrapa.

²Graduando em Ciências Econômicas – UFJF. e-mail: pedrohms@outlook.com

³Orientador

Resumo: O Brasil é um dos maiores *players* do mercado de laticínios do mundo, sendo o quinto maior consumidor e o quarto maior produtor de leite, e em particular, a região Sudeste é responsável por cerca de 40% desta produção ao longo últimos anos. Esta pesquisa tem como objetivo analisar a evolução dos padrões de consumo de derivados lácteos, por meio das elasticidades-renda da demanda desagregadas entre produtos correspondentes à este grupo para a região Sudeste. Foram utilizados dados das edições de 2002-2003, 2008-2009 e 2017-2018 da Pesquisa Orçamentária Familiar (POF) realizada pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), desagregados em regiões e faixas de renda, utilizando o método de Mínimos Quadrados Ponderados e como fator de ponderação a população em cada faixa de renda. Na análise intertemporal das elasticidades, pôde-se observar que o agregado dos produtos de Leites e derivados apresentou crescimento das duas últimas pesquisas para a mais recente. Quanto ao desagregado dos produtos, apenas o grupo de Queijos apresentou crescimento médio entre os períodos, ultrapassando a elasticidade unitária na pesquisa de 2017-2018. Além da análise intertemporal, foi realizada também uma análise entre estratos de renda para a POF mais recente, e esta investigação apresentou que o estrato com as maiores elasticidades para os produtos foi o central, ilustrando o potencial de crescimento na aquisição de produtos lácteos entre a parcela da população que se enquadra na classe média.

Palavras-chave: consumo, dispêndio, elasticidades-renda, laticínios, sudeste

Analysis of dairy consumption patterns in the Southeast region

Abstract: Brazil is one of the biggest players in the dairy market in the world, among the fifth largest consumer and fourth largest producer of milk and, in particular, the Southeast region is responsible for 40% of this production in recent years. This research aims to analyze the evolution of dairy products consumption patterns, through the income elasticities of demand disaggregated between the products corresponding to this group for the Southeast region. Data from the 2002-2003, 2008-2009 and 2017-2018 editions of *Pesquisa Orçamentária Familiar* (POF) of *Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística* (IBGE) were used, disaggregated into regions and income groups, using the Weighted Least Squares method and population as the weighting factor into each income bracket. In the intertemporal analysis of elasticities, it can be seen that the aggregate of Milk and Derivatives grew from the last two surveys to the most recent. In the disaggregated analysis, only the Cheese group showed average growth between the periods, surpassing the unit elasticity of the 2017-2018 survey. In addition to the intertemporal analysis, an analysis was also carried out between income strata for the most recent POF, and this investigation shows that the stratum with the biggest elasticity for the products was the central one, exhibiting that there is growth potential in the purchase of dairy products by the population that fits into the middle class.

Keywords: consumption, dairy, expenditure, income-elasticities, southeast

Introdução

Segundo o *International Farm Comparison Network* (IFCN), no ano de 2017, o Brasil foi o quarto maior produtor de leite e o quinto maior consumidor no mundo (HEMME, T. et al., 2019). Entretanto, a renda média das famílias no Brasil é variável entre as regiões, e essa é uma das razões da variância do consumo brasileiro de bens e serviços (IBGE, 2019).

Uma das variáveis econômicas com maior impacto na quantidade consumida de alimentos e vital para o entendimento desse mercado é a renda que a população dessa região tem disponível (BLEIL, 1998). E, tendo em vista que existe uma instabilidade econômica natural, via ciclos de negócios, em que existe expansão e contração da economia em momentos alternados do tempo (MADHANI, 2010), como também instabilidades econômicas não naturais, como por exemplo de ordem política (JONG-A-PIN, 2009; AISEN E VEIGA, 2013), o conhecimento do impacto da renda na demanda de produtos poderia atenuar prejuízos em momentos de contração e aumentar lucros em momentos de crescimento econômico.

A região Sudeste foi responsável por mais de 50% do Produto Interno Bruto brasileiro entre os anos de 2010 e 2018, sendo que no último ano correspondeu a 53,1% (IBGE, 2020). Nos anos de 2017-2018, os gastos médios familiares com alimentação da região Sudeste corresponderam a 16% do total dos gastos médios por mês, além disso a região apresentou, para os mesmos anos, um dispêndio médio familiar em alimentos 5% maior que média nacional e gasto médio familiar com o grupo de Leites e derivados 11% maior que a média brasileira (IBGE, 2019). Devido a estes fatores, buscou-se investigar como se dá o padrão de consumo de produtos lácteos na região Sudeste.

Além disso, o tipo de informação que este estudo disponibilizará poderá vir a ser uma ferramenta para planejamento de projetos tanto governamentais quanto privados. Auxiliando tomadas de decisão do governo em relação à quais tipos de produtos precisariam de atitudes para que seu consumo seja expandido ou retraído, dado o impacto da renda em seu consumo, ao conhecer o perfil do produto perante a população é possível tomar decisões de forma mais eficiente. Já referente ao mercado privado, este mesmo perfil dos produtos pode ser utilizado em projetos que visem observar a viabilidade da produção e promoção do produto no mercado, desta forma reduzindo as incertezas em decisões de produção e investimentos.

O objetivo da pesquisa foi analisar como ocorreram mudanças nos padrões de consumo relacionados à derivados lácteos na região Sudeste durante as últimas duas décadas, por meio da obtenção das elasticidades-renda da demanda destes produtos.

Material e Métodos

A presente pesquisa utilizou dados de gastos médios familiares, segregados por 7 classes de renda, disponíveis nos dados abertos da Pesquisa de Orçamentária Familiar e divulgados pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) para os anos de 2002-2003, 2008-2009 e 2017-2018, para os produtos enquadrados no grupo Leites e derivados. Este grupo é composto por outros 5 grupos de alimentos, sendo eles: (1) Leite de vaca, (2) Leite em pó, (3) Queijos, (4) Leites e derivados Light e Digt, (5) Outros Leites e derivados.

Segundo Krugman et. al (2005), elasticidade é uma forma de medir como um evento impacta em variáveis econômicas e a definição destes eventos e variáveis determina o tipo de elasticidade a ser estudada; por exemplo, ao se estudar o impacto do aumento de preços (evento) na quantidade demandada (variável investigada) por leite, a investigação seria feita sobre a nomenclatura de “elasticidade-preço da demanda do leite”. A interpretação dessa estatística ocorre de forma relativa. Por exemplo, ao se encontrar uma elasticidade-renda da demanda para um produto de

0,59, a interpretação sobre esse resultado seria que a cada 1% na variação da renda ocorreria 0,59% de variação na demanda deste produto.

Para a estimação das elasticidades-renda da demanda foi empregada a metodologia proposta por Hoffman (2010), que consiste em utilizar uma função poligonal com três segmentos (dois vértices) e estimar por Mínimos Quadrados Ponderados, utilizando como fator de ponderação o número de famílias por classe de renda, a Equação 1 apresenta a composição sua composição.

$$\ln Y_i = \alpha + \beta \ln X_i + \sum_{h=1}^2 \delta_h Z_{hi} (\ln X_i - \ln \theta_h) + u_i \quad (1)$$

em que Y_i é a despesa per capita média na i -ésima classe e X_i RFPC correspondente. Cada uma das classes de renda será ponderada pelo número de pessoas da população que pertence à respectiva classe. θ_h no nível de renda familiar correspondente ao h -ésimo vértice da poligonal (com $\theta_1 < \theta_2$), Z_{hi} uma variável binária que assume valor igual a zero quando $X_i \leq \theta_h$ e igual a 1 quando $X_i > \theta_h$ e u_i o termo estocástico do modelo. Os segmentos da poligonal corresponderão aos três grandes estratos de renda, indicados por I, II e III e restritos por θ_1 e θ_2 . Sendo que no estrato I, em que $X_i \leq \theta_1$, a elasticidade-renda será igual a β ; no estrato II, com $\theta_1 < X_i \leq \theta_2$, a elasticidade-renda será igual a $\beta + \delta_1$; e no estrato III, com $X_i > \theta_2$ a elasticidade-renda será $\beta + \delta_1 + \delta_2$ (HOFFMAN, 2010).

Os valores de θ_1 e θ_2 são os limites entre as classes de renda, sendo que haverão $x-1$ limites para as x classes de renda criadas. E então será realizada a estimação por MQP utilizando o número de famílias por classe de renda como fator de ponderação. E, por fim, o cálculo das elasticidades médias dos estratos será feita por média ponderada das elasticidades de cada estrato com a participação de cada estrato no total consumido como ponderação.

Resultados e Discussão

A tabela 1 apresenta os resultados encontrados das estimações de elasticidades para os produtos lácteos para as edições de 2002-2003, 2008-2009 e 2017-2018 da POF. Pode-se observar através do R^2 que o modelo escolhido explica mais que 95% das variações da amostra para a maioria dos grupos; com exceção do grupo de Leite em pó, que apresentou R^2 de 0,904.

Observa-se também que a elasticidade média para o grupo de Leites e derivados foi crescente entre as pesquisas, chegando a 0,626 para a última edição. Ainda sobre esta edição, destaca-se o comportamento heterogêneo entre os estratos. Para o estrato III, composto pelas 8% famílias mais ricas, a elasticidade é aproximadamente zero (0,05), porém para a maior parte da amostra (75,4%), que se encontra no estrato II, a elasticidade foi de 0,73.

Leite de vaca apresentou redução das elasticidades conforme a renda das famílias aumentava, chegando a apresentar elasticidade negativa (-0,364) para o estrato III (3,3% famílias mais ricas), apontando que para essa amostra esse produto pode ser considerado como um bem inferior (tipo de bem em que ao se aumentar a renda tem seu consumo reduzido). Além de também apresentar redução das elasticidades média entre as edições da POF.

A categoria Queijos apresentou elasticidade média de 1,039 e elasticidade ainda maior (1,326) para o estrato II que é composto pela maior parcela da amostra nesse produto, cerca de 68%. Para os estratos I e III, o valor da elasticidade foi de 0,543 e 0,332, respectivamente. Em relação à evolução entre as POFs, apresentou estabilidade na elasticidade acima de 0,92.

Os Leites e derivados light e diet começaram a ser acompanhados na POF de 2008-2009 e percebe-se um comportamento de estabilidade entre as elasticidades médias entre as duas últimas edições da POF, se mantendo acima 1,9. Entre os estratos, observa-se que para duas faixas de renda menos ricas (estrato I) o valor da elasticidade encontrado foi de -0,202, indicando que conforme a renda aumente o

consumo desse bem seria reduzido. Porém para os demais estratos a elasticidade foi maior que um para as 65% famílias mais ricas da amostra.

Leite em pó apresentou crescimento na elasticidade média entre a primeira e a segunda POF e redução para a terceira. Sendo que para a última edição a maior parte da amostra se encontrou no estrato III (66%) com um resultado de 0,257 de elasticidade média, para este produto, os estratos I e II corresponderam a aproximadamente 17% da amostra, apresentando respectivamente 3,208 e -3,032.

Já o grupo de Outros Leites e derivados apresentou crescimento da elasticidade da primeira POF abordada para a segunda e estabilidade da segunda para a terceira, apontando valor de 0,709, com elasticidade negativa (-0,215) para o estrato com as 17% famílias mais pobres, 1,266 para o estrato II e 0,301 para as 32% famílias mais ricas.

Tabela 1. Elasticidades das POFs para a região Sudeste

	POF 2002-2003	POF 2008-2009	POF 2017-2018					
	Elasticidade média	Elasticidade média	Agrupamento dos estratos	R ²	Elasticidade no estrato			Elasticidade média
					I	II	III	
Leites e derivados	0.534	0.572	1-4-2	0.996	0.439	0.728	0.050	0.626
Leite de vaca	0.400	0.328	2-4-1	0.985	0.467	0.242	-0.364	0.299
Leite em pó	-0.017	0.474	1-1-5	0.904	3.208	-3.032	0.392	0.257
Queijos	0.994	0.927	1-3-3	0.995	0.543	1.326	0.332	1.039
Light e diet	-	1.256	2-1-4	0.992	-0.202	2.744	1.058	1.193
Outros	0.683	0.703	1-2-4	0.974	-0.215	1.266	0.301	0.709

Fonte: Elaboração própria

Conclusões

Ao investigar a evolução das elasticidades-renda da demanda de produtos lácteos na região Sudeste, observou-se que existem indícios de demanda latente entre os estratos e que houve redução da média para a região na maioria dos produtos, com exceção do grupo de Queijos.

Além disso, os resultados apontaram para um padrão de aumento na propensão a gastar conforme acréscimos de renda para o grupo agregado de Leites e derivados, Queijos e Outros Leites e derivados, e redução para os grupos de Leite de vaca, Leite em pó e Leite e derivados Light e diet. Resultado esse que ilustra a existência do potencial para expansão do consumo.

Referências

- AISEN, A.; VEIGA, F. J. How does political instability affect economic growth? **European Journal of Political Economy**, v. 29, p. 151-167, 2013.
- BLEIL, S. I. O padrão alimentar ocidental: considerações sobre a mudança de hábitos no Brasil. **Cadernos de Debate**, v. 6, p. 1-25, 1998.
- HEMME, T. et al. IFCN dairy report 2019. Braunschweig: IFCN, 2019. 24p.
- HOFFMANN, R. Estimativas das elasticidades-renda de várias categorias de despesa e de consumo, especialmente alimentos, no Brasil, com base na POF de 2008-2009. **Revista de Economia Agrícola**, v. 57, n. 2, p. 49-62, 2010.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE. Sistema de Contas Regionais: Brasil: 2017. [Internet]. Rio de Janeiro: IBGE; 2019. Disponível em: <<https://biblioteca.ibge.gov.br/index.php/biblioteca-catalogo?view=detalhesid=2101679>>.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE. Pesquisa de orçamentos familiares 2017- 2018: primeiros resultados. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, Coordenação de Trabalho e Rendimento. Rio de Janeiro: IBGE, 2019. Disponível em: <<https://biblioteca.ibge.gov.br/index.php/biblioteca-catalogo?view=detalhesid=2101679>>.

- JONG-A-PIN, Richard. On the measurement of political instability and its impact on economic growth. **European Journal of Political Economy**, v. 25, p. 15-29, 2009.
- KRUGMAN, P.; WELLS, R.; AU, I.; PARKINSON, J. **Microeconomics: Canadian Edition**. Nova York: Worth Publishers, 2005. 720p.
- MADHANI, P. M. Rebalancing fixed and variable pay in a sales organization: A business cycle perspective. **Compensation Benefits Review**, v. 42, p. 179-189, 2010.

Caracterização físico-química de nanopartículas de dióxido de titânio para produção de nanocompósitos¹

Davi Glanzmann^{2,3}, Leonara Fayer⁴, Rafaella S.S. Zanette⁵, Juliana C. Gern⁶, Luiz F.C. de Oliveira⁷, Michele Munk⁴, Humberto de Mello Brandão^{6,8}

¹O presente trabalho foi realizado com o apoio do CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Brasil (processo nº 405030/2015-0); da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais –FAPEMIG. Parte da tese de doutorado do segundo autor, bolsista da CAPES.

²Bolsista de Iniciação Científica com fomento do CNPq

³Graduando em Biologia – UFJF. e-mail: davi.glanz@gmail.com

⁴Departamento de Ciências Biológicas da UFJF: leonara.fayer@icb.ufjf.br; michele.munk@icb.ufjf.br

⁵Bolsista de Pós-doutorado CNPq: rafaellazanette@gmail.com

⁶Pesquisador, Embrapa Gado de Leite: juliana.gern@embrapa.br; humberto.brandao@embrapa.br

⁷Departamento de Química da UFJF: luiz.oliveira@uff.edu.br

⁸Orientador

Resumo: A percepção de que animais também sentem medo dor e angústia leva a necessidade de desenvolvimento de inúmeros métodos alternativos ao uso de animais em experimentação. Assim, métodos *in vitro* são uma alternativa para contornar este problema. Baseado em sua biocompatibilidade e sua baixa toxicidade, as nanopartículas de dióxido de titânio (TiO₂NPs) apresentam grande potencial para serem utilizadas na produção de desenvolvimento de matrizes 3D para a bioengenharia de tecidos. Dentro deste contexto, o presente trabalho tem por objetivo caracterizar físicoquimicamente TiO₂NPs para em um futuro utilizá-las para produção de nanocompósitos. Para tanto, TiO₂NPs (NM01001a, European Union reference material) foram caracterizadas por técnicas espectroscópica (Raman e Infravermelho), bem como por microscopia de força atômica e espalhamento dinâmico de luz. As TiO₂NPs apresentaram geometrias e tamanhos heterogêneos, contudo apresentando pelo menos um dos eixos cardinais com tamanho inferior a 100nm, elevado Índice de Dispersão (0,526 ± 0,05) e baixa estabilidade coloidal (potencial Zeta de -3,50 ± 0.40 mV). Por sua vez, o material apresentou indicativo de elevado grau de pureza, com bandas características de ligações de Ti-O e grupos OH na superfície da partícula, respectivamente em 542 e 686 cm⁻¹ 3427 cm⁻¹ na espectroscopia e infravermelho e 639, 517 e 395 cm⁻¹ espectroscopia Raman. Baseado nos resultados encontrados, pode-se concluir que as TiO₂NPs apresentam elevado grau de pureza e caráter nanométrico com formato heterogêneo. Baseado em dados de literatura que relatam toxicidade em função da forma de nanopartículas, recomenda-se a realização de mais estudos de toxicidade antes de seu uso em nanocompositos destinados a bioengenharia.

Palavras-chave: Nanopartícula; dióxido de titânio; caracterização; nanocompósito

Physicochemical characterization of titanium dioxide nanoparticles for nanocomposites production

Abstract: The perception that animals are also afraid of pain, suffering and distress in animal experiments leads to the need to develop alternative methods to animals use. Thus, *in vitro* methods are an alternative to get around this problem. Based on its biocompatibility and low toxicity, titanium dioxide nanoparticles (TiO₂NPs) have great

potential to be used in the development of 3D matrices for tissue bioengineering. In this context, the present work aims to do the physicochemical characterization of TiO₂NPs to use them in the future to produce nanocomposites. For this purpose, TiO₂NPs (NM01001a, European Union reference material) were characterized by spectroscopic techniques (Raman and Infra-Red), as well as by Atomic Force Microscopy and Dynamic Light Scattering. The TiO₂NPs have heterogeneous geometries and sizes, with at least one of the cardinal axes with a size less than 100nm, high Dispersion Index (0.526 ± 0.05), and low colloidal stability (Zeta potential of -3.50 ± 0.40 mV). In turn, the material presented is indicative of a high degree of chemical purity, with characteristic bands of Ti-O bonds and OH groups on the particle surface, respectively at 542 and 686 cm⁻¹ and 3427 cm⁻¹ in infrared spectroscopy and 639, 517 and 395 cm⁻¹ Raman spectroscopy. Based on the results, it can be concluded that the TiO₂NPs have a high degree of purity and heterogeneous shape/nanometric size. Based on literature data, that reported toxicity as a function of the form of nanoparticles, it is recommended to carry out further toxicity studies before their use in bioengineering nanocomposites.

Keywords: Nanoparticle; titanium dioxide; characterization; nanocomposite

Introdução

As novas legislações e a conscientização de que animais possuem sentimentos e que os estudos toxicológicos *in vivo* podem provocar dor, ansiedade, medo, angústia e pânico nos animais, estimulou nas últimas décadas o desenvolvimento de inúmeros métodos alternativos *in vitro* para a realização destes estudos.

Nesse contexto, o desenvolvimento de matrizes 3D aplicadas à cultura de células-tronco mesenquimais são importantes para futuras aplicações em bioengenharia tecidual e testes de segurança de novos medicamentos. Para esse fim, hidrogéis poliméricos (nanocompósitos) baseados em polissacarídeos surgiram como uma opção promissora para a bioengenharia de tecidos visto que contribuem como suporte 3D para o crescimento e diferenciação celular e para a liberação de moléculas moduladoras da matriz extracelular (MEC). Esses biomateriais possuem biocompatibilidade e similaridade física com as do tecido vivo e são capazes de absorver grande quantidade de água devido a presença de grupos hidrofílicos (DAVE & GOR, 2018). Além disso, os hidrogéis também podem ser modificados química e fisicamente para mimetizar os tecidos vivos, de modo que se tornem mais bioativos e melhorem seu desempenho *in vivo* (TAIRA et. al., 2018).

Contudo, hidrogéis produzidos apenas com polissacarídeos apresentam propriedades mecânicas fracas, reduzida taxa de difusão de nutrientes e ineficiente bioatividade para indução e formação da matriz inorgânica do tecido ósseo (DAVE & GOR, 2018). Para superar essas limitações, os hidrogéis de quitosana podem ser reforçados com nanomateriais (NM) gerando os nanoscaffolds, e dessa maneira promover o aumento da porosidade, estabilidade mecânica, capacidade de inchamento, encapsulação de biomoléculas, bem como facilitar a aderência celular (SOUNDARYA et al., 2018).

Dentro deste contexto, o presente trabalho tem por objetivo realizar a caracterização físico-química de nanopartículas de dióxido de titânio (TiO₂) para no futuro utilizá-lo como potencial indutor de diferenciação de células-tronco mesenquimais (MSCs) em scaffolds.

Material e Métodos

Para o experimento foram utilizadas nanopartículas dióxido de titânio (TiO_2NPs) fornecidas pelo NanoReg, as quais são materiais de referência (NM01001a, European Union). Para todas as análises, as TiO_2NPs ($1000 \mu\text{g} / \text{ml}$) foram dispersas em meio aquoso com auxílio de um sonificador marca Branson Sonifier S-450 (Branson Sonifier S-450, EUA) a 400Watts por 16 min, com base nas orientações de dispersão para ensaios de genotoxicidade de NANoREG.

A composição química do TiO_2NP foi avaliada usando o espectrômetro de infravermelho com transformada de Fourier Bomem (FTIR) MB-102 (Bomem, Canadá). A análise foi realizada na região de 4000 a 200 cm^{-1} usando pastilhas de KBr previamente secas a 500°C . As mensurações Raman foram realizadas em um espectrômetro Bruker RFS 100 (Bruker, EUA) excitado com um laser Nd+3/YAG a 1064 nm , equipado com detector InGaAs resfriado por nitrogênio líquido. Os espectros foram adquiridos com resolução de 4 cm^{-1} , e uma média de 512 varreduras foi coletada com uma potência do laser de 80 mW .

O raio hidrodinâmico e o potencial Zeta foram determinados pela técnica de espalhamento dinâmico de luz (DLS) com auxílio equipamento Malvern 3000 Zetasizer NanoZS (Malvern, Reino Unido).

Finalmente, a análise morfologia do nanomaterial foi avaliada usando Microscópio de Força Atômica (AFM) (Nanosurf EasyScan 2, Nanosurf Instruments, Suíça), com auxílio de uma ponta de prova em oscilação livre de 50 mV , e área de varredura da sonda de $5 \times 5 \mu\text{m}$.

Resultados e Discussão

Ao avaliar o espectro infravermelho do TiO_2NP , foram identificadas três bandas, uma em 542 e 686 cm^{-1} , associada à vibração das ligações Ti-O, o que indica que se trata de um dióxido de titânio; uma banda em 3427 cm^{-1} , que sugere superfícies hidroxiladas, a qual pode ser causadas pelas interações de hidrogênio entre grupos OH da superfície do dióxido de titânio com oxidação +2 e água molecular; interações, estas, corroboradas com vibrações localizadas em 1630 cm^{-1} (DAVE & GOR, 2018). As bandas observadas no espectro Raman obtido em 639 , 517 e 395 cm^{-1} podem ser atribuídas a B1g, A1g / B1g e Eg, todas associadas ao TiO_2 (DAVE & GOR, 2018).

As imagens obtidas pela técnica de AFM demonstram que as TiO_2NPs apresentam diversas geometrias e tamanhos, destacando-se nas formas cilíndrica, cúbica e piramidal (Fig. 2) o que pode impactar tanto no processo de diferenciação celular quanto em possíveis efeitos tóxicos (SOUNDARYA et al., 2018). Em adição todas as partículas apresentaram pelo menos uma das dimensões abaixo de 100nm .

As medidas de DLS demonstraram que o diâmetro hidrodinâmico da $\text{TiO}_2 \text{ NPs}$ variaram entre 500 e 1300 nm , quando dispersos de água desionizada, com índice de polidispersão (IPD) de $0,526 \pm 0,05$. Já o potencial Zeta foi determinado em $-3,50 \pm 0,40 \text{ mV}$. Ao se avaliar em conjunto as análises de DLS e AFM, pode se concluir que, quando dispersos em água, as TiO_2NPs formam pequenos agregados, que são identificados por um IPD superior a $0,3$, onde o processo de agregação é justificado pela baixa repulsão eletrostática decorrente do módulo do potencial Zeta ser inferior a 30 .

Conclusões

As nanopartículas de TiO_2 possuem elevado grau de pureza, apresentando escala nanométrica com formatos heterogêneos. Tal condição pode gerar tanto um

viés de favorecimento à diferenciação de células MSCs, quanto também um fenômeno de maior toxicidade. Dentro deste contexto, faz-se necessário, previamente ao seu uso na produção de Scaffold um profundo estudo de cito e genotoxicidade.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao CNPq, à FAPEMIG e à CAPES. Agradecem também o apoio das Redes de pesquisa AGRONANO, mantida pela Embrapa e da Rede de Pesquisa e Inovação para Bioengenharia de Nanossistemas (FAPEMIG-RED-00282-16).

Referências

- DAVE, P. N.; G OR, A. Natural Polysaccharide-Based Hydrogels and Nanomaterials: Recent Trends and Their Applications. In: **Handbook of Nanomaterials for Industrial Applications**. Elsevier, 2018. p. 36-66. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813351-4.00003-1>
- SAMIR, K. C.; LUTZ, W. The human core of the shared socioeconomic pathways: Population scenarios by age, sex and level of education for all countries to 2100. **Global Environmental Change**, v. 42, p.181-192, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.gloenvcha.2014.06.004>
- SOUNDARYA, S. P.; MENON, A. H.; CHANDRAN, S. V.; SELVAMURUGAN, N. Bone tissue engineering: Scaffold preparation using chitosan and other biomaterials with different design and fabrication techniques. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.119, p.1228–1239, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.08.056>
- TAIRA, N.; INO, K.; ROBERT, J.; SHIKU, H. Electrochemical printing of calcium alginate/gelatin hydrogel. **Electrochimica Acta**, v. 281, p. 429-436, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2018.05.124>
- VOS, T. et al. (Global Burden of Disease Study 2013 Collaborators). Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 301 acute and chronic diseases and injuries in 188 countries, 1990–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. **The Lancet**, v. 386, p. 743–800, 2015. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)60692-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)60692-4)