

Eventos Técnicos & Científicos

e-ISSN 2966-0858

005

Outubro, 2025

OBJETIVOS DE
DESENVOLVIMENTO
SUSTENTÁVEL



Anais

XXXI Workshop de Iniciação Científica da Embrapa Gado de Leite

19 de agosto de 2025
Juiz de Fora, MG



Embrapa

Gado de Leite

Eventos Técnicos & Científicos

5

Outubro, 2025

Anais

XXXI Workshop de Iniciação Científica da Embrapa Gado de Leite Pibic/CNPq

19 de agosto de 2025
Juiz de Fora, MG

Embrapa Gado de Leite

Rua Eugênio do Nascimento, 610 - Bairro Dom Bosco
36038-330 Juiz de Fora, MG
Fone: (32) 3311-7405
www.embrapa.br/gado-de-leite
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

Comitê Local de Publicações**Presidente**

Bruno Campos de Carvalho

Secretário-executivo

Carlos Renato Tavares de Castro

Membros

Cláudio Antônio Versiani Paiva

Deise Ferreira Xavier

Edna Froeder Arcuri

Fausto de Souza Sobrinho

Fernando César Ferraz Lopes

Francisco José da Silva Ledo

Frank Ângelo Tomita Bruneli

Heloisa Carneiro

Jackson Silva e Oliveira

Juarez Campolina Machado

Leovegildo Lopes de Matos

Luiz Ricardo da Costa

Márcia Cristina de Azevedo Prata

Marta Fonseca Martins

Pérsio Sandir D'Oliveira

Rui da Silva Verneque

Virgínia de Souza Columbiano

William Fernandes Bernardo

Edição executiva

Leônidas Paixão Passos, Carlos Renato Tavares de Castro, Rosângela Lacerda de Castro

Revisão de texto

Carlos Renato Tavares de Castro

Normalização bibliográfica

Rosângela Lacerda de Castro (CRB-6/2749)

Tratamento das ilustrações

Luiz Ricardo da Costa

Diagramação

Luiz Ricardo da Costa

Projeto gráfico

Luiz Ricardo da Costa

Publicação digital: PDF**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 –
Pibic/CNPq (31.: 2025 : Juiz de Fora, MG)

Anais XXXI Workshop de Iniciação Científica da Embrapa Gado de Leite – Pibic/CNPq, Juiz de Fora, MG, 19 de agosto de 2025. – Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2025

PDF (110 p.) : il. color. – (Eventos Técnicos e Científicos/ Embrapa Gado de Leite, e-ISSN 2966-0858 ; 5)

1. Iniciação científica. 2. Pesquisa científica. 3. Comunicação científica. 4. Evento. I. Passos, Leônidas Paixão. II. Título. III. Série.

CDD (21. ed.) 001.44

Rosângela Lacerda de Castro (CRB-6/2749)

© 2025 Embrapa

Comissão organizadora

Coordenação

Leônidas Paixão Passos

Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG

Membros

Bruno Campos de Carvalho

Carlos Renato Tavares de Castro

Cristiano Amancio Vieira Borges

Clara Slade Oliveira

Jorge Fernando Pereira

Nuriane Santos Montezano

Kennya Beatriz Siqueira

Letícia Caldas Mendonça

Wanessa Araújo Carvalho

Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG

Fabiano Freire Costa

Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG

Equipe de apoio

Alessandra Rocha Martins

Dulcinéa Aparecida Machado

Leonardo Mariano Gravina Fonseca

Pricila Estevão

Rubens Antônio Neiva

Warley Stefany Nunes

William Fernandes Bernardo

Yasmin Schaefer de Oliveira (menor aprendiz)

Tamyres Helena de Oliveira (menor aprendiz)

Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG

Comitê técnico-científico

Leônidas Paixão Passos - Editor científico
Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG

Avaliadores internos

Francisco José da Silva Léo
Karina Neoob de Carvalho Castro
Letícia Caldas Mendonça
Manuela Sampaio Lana
Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG

Avaliadores externos

Prof. Fabiano Freire Costa
Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG

Apresentação

O presente documento constitui o registro do XXXI Workshop de Iniciação Científica da Embrapa Gado de Leite, realizado em 19 de agosto de 2025 no âmbito do Pibic CNPq 2024-2025. Foram apresentados 22 trabalhos, cobrindo abordagens tanto na pesquisa básica quanto na aplicada, todas relevantes para o desenvolvimento do agronegócio do leite. O evento reuniu 93 participantes de 12 instituições parceiras, incluindo – de forma inédita - representantes da iniciativa privada. Ressalta-se o crescente interesse da comunidade de pesquisa dedicada direta ou indiretamente à bovinocultura leiteira na formação dos jovens cientistas. As apresentações tiveram alta qualidade, ocasionando debates produtivos e direcionamentos positivos.

A Embrapa Gado de Leite, sob a coordenação da Supervisão de Educação Corporativa (SEC) da Gerência Adjunta de Gestão de Pessoas (GGP) da Embrapa, conduz anualmente o Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (Pibic) do Conselho Nacional do Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). A presente oficina retrata o encerramento de mais uma edição anual desse programa, e congregou orientadores, bolsistas e membros da comunidade técnico-científica, com a apresentação das pesquisas conduzidas neste processo de capacitação dos bolsistas.

Somos gratos ao CNPq pela oportunidade de contribuir para o desenvolvimento de futuras gerações de profissionais em pesquisa e desenvolvimento, em benefício da atividade leiteira do Brasil.

Não poderíamos deixar de assinalar nosso reconhecimento à Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), pela participação em 15 dos trabalhos apresentados, e pelo auxílio nas comissões de organização e de avaliação do evento.

José Luiz Bellini Leite

Chefe-Geral da Embrapa Gado de Leite

Sumário

Qualidade, volume e preços do leite: uma análise estratificada por sistemas de produção	9
Determinantes da rentabilidade em fazendas de leite	14
Características produtivas de <i>Urochloa ruzizensis</i> cv. BRS Integra submetida à inoculação com bactérias diazotróficas	18
Desempenho agrônomo de genótipos do gênero <i>Urochloa</i>	23
Avaliação da citotoxicidade in vitro de filme nanocompósito à base de subprodutos industriais de laranja em células CHO para potenciais aplicações na cadeia produtiva do leite	28
Avaliação da relação entre índices climáticos para o monitoramento da seca na Bacia do Rio Paracatu	33
Plataforma Web para gestão e monitoramento de tecnologias voltadas à integração Lavoura-Pecuária-Floresta: uma ferramenta para o Núcleo de Intensificação Sustentável da Agropecuária	38
Efeitos da suplementação com diferentes concentrações de nitrato de cálcio na dieta de bovinos em recria sobre os parâmetros hematológicos e na meta-hemoglobina	43
Níveis de suplementação com nitrato de cálcio para mitigação do metano entérico e os efeitos no consumo e no desempenho de novilhos	47
Efeitos da suplementação com nitrato de cálcio sobre os parâmetros ruminais de novilhos em recria	51
Novo método de genotipagem de Deficiência de adesão leucocitária bovina (BLAD) por T-ARMS PCR	55
Identificação de touros portadores de doenças genéticas recessivas na raça Girolando	60
Sequenciamento do genoma de bacteriófagos que infectam <i>Staphylococcus aureus</i>	64
Métodos de plantio e taxas de semeadura de BRS Integra: produtividade do milho para silagem e desempenho da braquiária em sistema de integração	68
Produção de biomassa e atributos estruturais de genótipos de <i>Urochloa ruzizensis</i> para produção de silagem	73
Desenvolvimento de um protocolo para descontaminação de córneas bovinas provenientes de abatedouro	78
Eletroporação e biópsia embrionária: implicações para edição do gene da beta-lactoglobulina em embriões bovinos	83
Características neonatais de bovinos Angus submetidos à edição do gene PRLR	88
Efeitos da estação do ano na resposta a protocolos de superovulação com FSH recombinante em vacas Girolando	92

Caracterização funcional da enzima estearoil-CoA dessaturase 1 na competência oocitária em bovinos	96
Aplicação de biorreatores laboratoriais para simulação de cama de <i>Compost Barn</i>	101
Avaliação do crescimento de <i>Pseudomonas</i> sp. em permeado de soro de leite	106

Qualidade, volume e preços do leite: uma análise estratificada por sistemas de produção

Caio Prado Villar de Azevedo⁽¹⁾⁽⁷⁾, Glauco Rodrigues Carvalho⁽²⁾, André Luiz Ramos Takano⁽³⁾, Henrique Sales Terror⁽⁴⁾, Andreza de Fátima Martins⁽⁵⁾, William Heleno Mariano⁽⁵⁾ e Giovani da Costa Caetano⁽⁶⁾

⁽¹⁾Bolsista (Pibic/CNPq), Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG. ⁽²⁾Pesquisador, Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG. ⁽³⁾Bolsista (FAPED), Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG. ⁽⁴⁾Estagiário, Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG. ⁽⁵⁾Cientista de dados, Labor Rural, Viçosa, MG. ⁽⁶⁾Coordenador do Departamento de Inteligência de Dados, Labor Rural, Viçosa, MG. ⁽⁷⁾E-mail: caioprado.embrapa@gmail.com.

Resumo — A pesquisa buscou analisar o impacto do sistema de precificação do leite no Brasil, que prioriza bonificações por volume, sobre o preço ao produtor e a qualidade do leite. Utilizando regressão linear múltipla, identificou-se que o volume diário é o principal determinante do preço recebido, enquanto atributos de qualidade, como contagem de células somáticas (CCS), contagem padrão em placas (CPP), teor de gordura e proteína, têm menor influência. A análise por sistemas de produção (*compost barn*, *free stall*, confinado sem estrutura e pasto/semiconfinado) revelou que *compost barn* e *free stall* alcançam maior produtividade por vaca, volumes diários superiores e margens líquidas mais altas, apesar de apresentarem teores ligeiramente menores de sólidos totais devido ao efeito de diluição. Conclui-se que o modelo atual favorece economicamente sistemas mais intensivos, mas a valorização de atributos de qualidade poderia promover um equilíbrio maior entre eficiência produtiva e composição do leite.

Termos para indexação: pecuária de leite, qualidade do leite, sistemas de produção do leite, sólidos no leite.

Milk quality, volume, and prices: a stratified analysis by production systems

Abstract — The research aimed to analyze the impact of Brazil's milk pricing system, which prioritizes volume-based bonuses, on the price paid to producers and milk quality. Using multiple linear regression, it was found that daily volume is the primary determinant of the price received, while quality attributes such as somatic cell count (SCC), total bacterial count (TBC or CPP), fat content, and protein content have a lesser influence. When comparing different production systems (*compost barn*, *free stall*, non structured confinement, and pasture/semi confinement), the *compost barn* and *free stall* systems achieved higher per cow productivity, greater daily volumes, and higher net margins, despite slightly lower total solids levels due to dilution effects. The conclusion is that the current payment model economically favors more intensive systems, although placing greater value on quality attributes could foster a better balance between production efficiency and milk composition.

Index terms: dairy farming, milk quality, milk production systems, milk total solids.

Introdução

No Brasil, um fator determinante na precificação do leite ao produtor é a bonificação concedida pelas indústrias em função do volume total do produto. Em compensação, segundo Pedroso e Rodrigues (2025), historicamente, nosso país nunca valorizou devidamente a produção de leite com mais gordura e proteína. Esse modelo de precificação, embora tenha o intuito de aumentar a produção do produto, pode impactar negativamente sua composição, especialmente em relação aos teores de gordura e proteína.

Parâmetros como CCS (contagem de células somáticas) e CPP (contagem padrão em placas) são amplamente utilizados para avaliar a qualidade microbiológica. A CCS está associada à presença de células do sistema imunológico e do epitélio mamário, sendo influenciada pela ocorrência de mastite (CCS e CBT [...], 2023). Já a CPP está ligada à proliferação bacteriana resultante de contaminações externas, refletindo diretamente as práticas de higiene no manejo e armazenamento do leite.

Diante desse contexto, este estudo tem como objetivo, analisar de forma estratificada por sistema de produção (mais intensivos ou extensivos), os impactos dessas estratégias produtivas tanto sobre a qualidade do leite quanto sobre variáveis econômicas, como margem líquida, produtividade por vaca e preço do litro de leite. Como ressaltado pela Labor Rural (2022), o aumento da escala de produção é fundamental para as viabilidades econômica e financeira do empreendimento rural.

As informações geradas no presente estudo vão ao encontro dos Objetivos do Desenvolvimento Sustentável (ODS) contidos na Agenda 2030, proposta pela Organização das Nações Unidas, da qual o Brasil é signatário, sobretudo no ODS 8 - Empregos dignos e crescimento econômico: Promover o crescimento econômico sustentado, inclusivo e sustentável, emprego pleno e produtivo, e trabalho decente para todos (Nações Unidas, 2025).

Material e métodos

O presente estudo foi desenvolvido com base em um banco de dados fornecido pela empresa Labor Rural, abrangendo informações de 396 propriedades leiteiras localizadas no estado de Minas Gerais, monitoradas ao longo do período de janeiro a dezembro de 2023. A base de dados contempla diversos indicadores técnicos e econômicos acompanhados e que englobam questões quantitativas associadas à atividade leiteira, tais como produtividade, qualidade do leite, características dos sistemas de produção, entre outros.

O tratamento inicial dos dados incluiu a remoção de *outliers*, eliminando as observações correspondentes ao 1% superior e inferior nas distribuições de preço do leite (R\$/litro) e produção diária. Para identificar os fatores que influenciam o preço, empregou-se regressão linear múltipla no software RStudio. Além disso, as propriedades foram classificadas por sistema de produção e as variáveis foram analisadas com médias ponderadas pelo volume de leite, com o objetivo de identificar diferenças entre sistemas intensivos (*compost barn*, *free stall*) e menos intensivos (pasto/semiconfinado e confinado sem estrutura).

Resultados e discussão

A análise por meio da regressão linear múltipla (Tabela 1) permitiu investigar a relação entre as variáveis CCS (x1.000 células/ml), CPP (x1.000 UFC/ml – Unidades Formadoras de Colônias), teor de gordura (%), teor de proteína (%) e volume diário produzido de leite (litros/dia) com o preço do litro do produto das fazendas analisadas (R\$/litro). O modelo

apresentou uma estatística R^2 de 0,243; esse valor indica que 24,3% da variabilidade do preço pago aos produtores pode ser explicada em conjunto, pelas variáveis incluídas na análise. O restante é atribuível a outras variáveis não contempladas no modelo, reforçando a complexidade da formação dos preços, indicando que essas variáveis explicam parcialmente a variação no preço do leite.

Tabela 1. Resultados da regressão linear múltipla.

Variável	Estimador	Significância
Produção (L/dia)	$+2,362 \times 10^{-5}$	0,00
CCS (x1.000 células/ml)	$-2,309 \times 10^{-4}$	0,00
CPP (x1.000 UFC/ml)	$-3,096 \times 10^{-4}$	0,05
Teor de gordura (%)	$-5,855 \times 10^{-3}$	0,10
Teor de proteína (%)	$+2,180 \times 10^{-1}$	0,01

Fonte: Banco de dados da Labor Rural (2025).

O principal objetivo foi verificar quais dessas variáveis possuem efeitos estatisticamente significativos, tanto positivos quanto negativos, sobre o preço do leite. Os resultados evidenciam que as variáveis com maior significância estatística foram o volume produzido diariamente e a CCS, ambas com nível de significância inferior a 0,1%. Em seguida, destacam-se o teor de proteína (significativa a menos de 1%) e a CPP (significativa a menos de 5%).

A análise dos coeficientes estimados revela que o volume de leite produzido possui um efeito positivo sobre o preço, reforçando que o papel da bonificação por escala é o principal determinante do preço recebido pelo produtor.

Por outro lado, embora as variáveis relacionadas à qualidade do leite (proteína e gordura) apresentem algum grau de significância, seus efeitos sobre o preço foram relativamente menores. O coeficiente estimado para a gordura foi negativo, o que pode indicar uma baixa valorização desse sólido no atual sistema de precificação. Esse resultado sugere que apesar da grande importância da gordura para a parte nutricional e industrial do leite, o mercado não tem oferecido bonificações proporcionais ao seu teor no leite.

Os resultados apresentados na Tabela 2 mostraram que sistemas de produção intensivos (*compost barn* e *free stall*) tiveram, em média, volume produzido de leite e produtividade por vaca em lactação significativamente maior do que sistemas de produção semi-intensivos (confinado sem estrutura e a junção de pasto e semiconfinado). Já, devido ao fator diluição de sólidos no leite, ao observar as proporções médias de gordura e proteína no item, é possível perceber que os sistemas semi-intensivos têm resultados maiores em gordura, apesar da diferença na proteína ser pouco significativa.

A Tabela 2 apresenta os efeitos das diferenças nos sistemas de produção sobre os preços médios do litro de leite e sobre a margem líquida por litro de leite em cada unidade produtora. Ambas as propriedades corroboram com os resultados da regressão linear múltipla (Tabela 1), evidenciando que sistemas com maior volume de produção tendem a receber preços mais elevados pelo litro de leite, resultando em maiores margens de lucro. Esse comportamento é explicado principalmente pelo sistema de bonificação por volume, onde as indústrias pagam valores adicionais por litro de leite conforme o volume fornecido pelos produtores.

Tabela 2. Médias por sistema de produção.

Indicadores	Sistemas de produção				
	Indefinido	Confinado SE	<i>Free stall</i>	<i>Compost barn</i>	Semiconfinado + pasto
CCS (x1.000 células/ml)	445,28	441,60	262,44	261,65	472,71
CPP (x1.000 UFC/ml)	53,51	29,10	7,46	22,83	27,83
Teor de gordura (%)	3,84	3,76	3,66	3,68	3,87
Teor de proteína (%)	3,33	3,28	3,30	3,27	3,29
Produção (L/dia)	2.204	1.284	2.402	3.019	1.040
Preço Leite (R\$/L)	2,57	2,54	2,71	2,66	2,49
Margem Líquida (R\$/L)	0,20	0,24	0,44	0,46	0,25
Produtividade por vaca em lactação (litros/animal/dia)	23,40	19,96	30,00	28,63	17,74
Sólidos/Vaca (L/animais/dia)	1,62	1,35	2,00	1,95	1,22

Fonte: Banco de dados da Labor Rural (2025).

Ainda assim, observa-se que propriedades com sistemas menos intensivos apresentam, em média, maior concentração de sólidos no leite. No entanto, quando a análise é realizada com base na produção de sólidos por vaca em lactação por dia, os resultados são distintos: os sistemas mais intensivos como *compost barn* e *free stall*, apresentam produções médias 1,95 litros e 2 litros de sólidos por vaca em lactação/dia, respectivamente, enquanto sistemas baseados em pasto e semiconfinamento registram menores valores significativamente menores, em torno de 1,22 litros por vaca/dia.

Conclusões

Conclui-se que o volume de leite produzido exerce um impacto positivo sobre o preço médio recebido pelos produtores, resultado diretamente associado ao sistema de bonificação adotado pelas indústrias da cadeia produtiva do leite, que remuneram o produtor com base nos fatores de escala de produção. Entretanto, os resultados do modelo econométrico (Tabela 1) não evidenciaram a existência de um sistema consistente de diferenciação de preços com base na qualidade do leite, podendo desencadear efeitos indesejáveis sobre a composição do produto, caso da redução do teor de sólidos, resultado de um possível efeito de diluição associado ao volume produzido.

Para os diferentes sistemas de produção analisados, observa-se que suas características estruturais impactam diretamente tanto o preço recebido quanto a lucratividade das propriedades. Sistemas mais intensivos, como *compost barn* e *free stall*, apresentaram maior produtividade por vaca, o que resultou em preços médios mais elevados e margens líquidas superiores, conforme evidenciado na Tabela 2. Ainda que apresentem, proporcionalmente, menor concentração de sólidos no leite, a elevada produção diária por animal compensa essa limitação, conferindo aos sistemas intensivos um maior volume absoluto de sólidos por vaca em lactação.

Esses resultados sugerem que a intensificação da produção, quando bem manejada, pode ser uma estratégia eficaz para aumentar a rentabilidade, mesmo em um ambiente de precificação pouco sensível à qualidade do leite. No entanto, ressalta-se a necessidade

de políticas de bonificação que valorizem não apenas o volume, mas também a qualidade composicional do produto, promovendo um modelo mais equilibrado de remuneração e incentivando melhorias nos atributos nutricionais e industriais do leite.

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Brasil (CNPq), pela concessão da cota de bolsa dentro do programa Pibic da Embrapa Gado de Leite. À Embrapa Gado de Leite pela oportunidade de estágio e ao pesquisador Glauco Rodrigues Carvalho pelo acompanhamento, orientação e apoio.

Referências

CCS e CBT: por que esses parâmetros importam e quais seus limites? **MilkPoint**, 24 abr. 2023. Disponível em: <https://www.milkpoint.com.br/artigos/cruzadinha/ccs-e-cbt-porque-esses-parametros-importam-232164/>. Acesso em: 9 jul. 2025.

LABOR RURAL. **Consultoria técnica e gerencial para o agronegócio**. Disponível em: <https://laborrural.com/>. Acesso em: 5 ago. 2025.

LABOR RURAL. Eficiência nos sistemas de produção de leite. **Revista Leite Integral**, 12 maio 2022. Disponível em: https://www.revistaleiteintegral.com.br/noticia/eficiencia-nos-sistemas-de-producao-de-leite?utm_source=chatgpt.com. Acesso em: 17 jul. 2025.

NAÇÕES UNIDAS. **Objetivo de Desenvolvimento Sustentável 8: Trabalho decente e crescimento econômico**. Disponível em: <https://brasil.un.org/pt-br/sdgs/8>. Acesso em: 13 maio 2025.

PEDROSO, A. M.; RODRIGUES, R. O. Por que o leite produzido no Brasil tem pouca gordura? **MilkPoint**, 31 jul. 2025. Disponível em: <https://www.milkpoint.com.br/colunas/visao-de-consultor/por-que-o-leite-produzido-no-brasil-tem-pouca-gordura-239004/>. Acesso em: 5 ago. 2025.

Determinantes da rentabilidade em fazendas de leite

Henrique Salles Terror⁽¹⁾⁽⁶⁾, Glauco Rodrigues Carvalho⁽²⁾, André Luiz Ramos Takano⁽³⁾, Caio Prado Villar de Azevedo⁽³⁾, William Heleno Mariano⁽⁴⁾, Andreza de Fátima Martins⁽⁴⁾ e Giovani da Costa Caetano⁽⁵⁾

⁽¹⁾Bolsista (FAPED), Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG. ⁽²⁾Pesquisador, Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG. ⁽³⁾Estagiário, Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG. ⁽⁴⁾Cientista de dados, Labor Rural, Viçosa, MG, ⁽⁵⁾Coordenador do Departamento de Inteligência de Dados, Labor Rural, Viçosa, MG. ⁽⁶⁾E-mail: henriquesterror@gmail.com.

Resumo — Esse estudo analisa os determinantes econômicos da rentabilidade na produção leiteira em Minas Gerais, a partir de dados de 396 fazendas monitoradas ao longo de 2023. Observa-se uma heterogeneidade entre os produtores, sugerindo que os ganhos não são exógenos, mas resultado de fatores produtivos como produtividade, estrutura do rebanho e uso eficiente do capital. A margem líquida foi utilizada como proxy de rentabilidade, e os resultados demonstram que propriedades mais eficientes, com maior produtividade da terra, mão de obra e vacas, obtêm margens superiores. Além disso, o estudo evidencia que a economia de escala, medida pelo aumento da produção com custos médios decrescentes, está diretamente associada à lucratividade. Conclui-se que uma boa gestão com impacto em indicadores de produtividade dos fatores, estoque de capital e economia de escala, é o principal diferencial entre quem ganha e quem perde dinheiro na atividade leiteira.

Termos para indexação: rentabilidade, produção leiteira, economia de escala, produtividade, eficiência econômica.

Determinants of profitability on dairy farms

Abstract — This study analyzes the economic determinants of profitability in dairy farming in Minas Gerais, based on data from 396 farms monitored throughout 2023. A heterogeneity in outcomes among producers was observed, indicating that profits are not exogenous but the result of productive factors such as productivity, herd structure, and efficient use of capital. Net margin was used as a proxy for profitability, and results show that more efficient farms, with higher productivity of land, labor, and cows, achieve greater margins. Furthermore, the study demonstrates that economies of scale, defined as increased production at decreasing average costs, are directly linked to profitability. It is concluded that good management, with an impact on factor productivity indicators, capital stock and economies of scale, is the main difference between those who make and those who lose money in the dairy industry.

Index terms: profitability, dairy farming, economies of scale, productivity, economic efficiency.

Introdução

O número de fazendas leiteiras no estado de Minas Gerais vem apresentando tendência de queda ao longo das últimas décadas. Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2019), em 2017, ano do último censo agrícola, o país perdeu 174 mil produtores em relação ao censo anterior, em 2006. A fim de entender o movimento de êxodo da atividade, é relevante a análise de fatores econômicos que afetam lucratividade da produção de leite.

A renda líquida do produtor mede a remuneração por risco de administrar o estabelecimento, sendo utilizada para medir a viabilidade de continuar na atividade (Alves et al., 2001), mostrando que, dentre outros elementos, a decisão de permanecer na atividade não depende apenas de aspectos estruturais, mas também da percepção de retorno econômico.

Ao analisar dados primários sobre rentabilidade das fazendas no estado, observa-se uma heterogeneidade entre os produtores, mostrando que os resultados financeiros são fortemente condicionados por características específicas de capacidade produtiva. Sendo assim, pode-se afirmar que os ganhos na atividade não são algo exógeno à produção, mas sim resultados de diferentes combinações de fatores produtivos que possibilitam ganhos de escala e maior eficiência econômica.

Compreender quais fatores determinam a rentabilidade, bem como as estratégias adotadas pelos produtores para ampliar suas margens, constitui o objetivo central dessa pesquisa. Nesse contexto, a possibilidade de obtenção de economias de escala assume papel central na compreensão da relação entre produção, custo e lucratividade. Economias de escala ocorrem à medida que os custos médios de produção diminuem com o aumento da escala produtiva, sinalizando um uso mais eficiente dos fatores de produção (Amadeo, 2025).

As informações geradas no presente estudo vão ao encontro dos Objetivos do Desenvolvimento Sustentável (ODS) contidos na Agenda 2030, proposta pela Organização das Nações Unidas, da qual o Brasil é signatário, sobretudo no ODS 8 - Empregos dignos e crescimento econômico: Promover o crescimento econômico sustentado, inclusivo e sustentável, emprego pleno e produtivo, e trabalho decente para todos (Nações Unidas, 2025).

A produtividade total dos fatores é um clássico determinante de eficiência, permitindo maior produção com menores custos, se relacionando positivamente com a lucratividade (Bottazi et al., 2008).

Material e métodos

O trabalho foi elaborado utilizando um banco de dados gerenciado pela Labor Rural, de 396 fazendas do estado de Minas Gerais monitoradas de janeiro a dezembro de 2023. O banco contempla 210 variáveis, abrangendo aspectos quantitativos sobre a atividade leiteira dessas fazendas, com dados registrados em bases mensais e diárias, os quais foram consolidados por meio de médias ao longo do período de análise.

Os dados foram submetidos a processos de limpeza e tratamento com objetivo de embasar a análise econômica proposta. Para isso, foram excluídos 10% de *outliers* de acordo com a produção de litro de leite diária, visando eliminar valores extremos e pouco representativos da realidade observada no campo.

Ressalta-se que a abordagem adotada nesse trabalho é estritamente quantitativa, centrada na mensuração de indicadores econômicos e produtivos com intuito de subsidiar a identificação de padrões e relações relevantes para a pecuária leiteira.

Resultados e discussão

A Tabela 1, elaborada a partir dos dados da pesquisa, elenca um conjunto de variáveis que, segundo a teoria econômica, estão associadas à maior eficiência produtiva e, consequentemente, à geração de rentabilidade. As variáveis foram organizadas por meio da estratificação das propriedades com base na média de litros de leite produzidos diariamente, permitindo a comparação entre diferentes níveis de escala produtiva. Como proxy de rentabilidade, adotou-se a margem líquida.

Tabela 1. Indicadores de eficiência por estrato de produção.

Indicadores	Estrato de produção (L/dia)				
	Até 500 L	501 a 1.000 L	1.001 a 2.000 L	2.001 a 4.000 L	Acima 4.001 L
Margem líquida unitária (R\$/Litro)	0,14	0,24	0,26	0,39	0,45
Estoque de capital (com terra) por litro de leite (R\$/Litro/dia)	4.364	3.290	2.811	2.020	1.787
Vaca em lactação/Total de vacas (%)	76	81	82	84	85
Produtividade por vaca (litros/animal/dia)	15	18	21	25	28
Produtividade da terra (litros/hectare/ano)	6.343	8.169	10.158	14.943	17.556
Produtividade mão de obra (litros/trabalhador/dia)	206	309	422	517	591

Fonte: Banco de dados da Labor Rural (2025).

Observa-se inicialmente uma relação entre tamanho desses produtores e ganhos na atividade, devido ao aumento da margem a cada nível superior da estratificação. Tal afirmação está de acordo com a tendência de consolidação dos maiores produtores brasileiros nessa atividade (Acosta et al., 2018). Porém, vale ressaltar que o tamanho, apesar da influência, não é determinante da rentabilidade, tendo em vista a existência de grandes produtores incorrendo em margens negativas e pequenos obtendo resultados positivos.

Outros fatores produtivos contribuem para a explicação da margem líquida. A variável “Estoque de capital (com terra) por litro de leite”, por exemplo, apresentou uma relação negativa com a lucratividade, indicando que, o capital empregado de forma eficiente, ou seja, sem ociosidade e apresentando retorno produtivo, diminui a necessidade marginal do mesmo. Sendo assim, o produtor busca um nível de estoque de capital ajustado que aumente a capacidade produtiva, diluindo o estoque em uma produção maior, impactando positivamente nas margens.

A variável “Vacas em lactação/Total de vacas” pode ser analisada como a estrutura do rebanho; mostrando-se positivamente relacionada ao lucro, ela indica o percentual de vacas que estão produzindo leite em comparação com o total (em lactação e secas). A capacidade do produtor de organizar o rebanho e obter o maior percentual de vacas em lactação, respeitando as questões genéticas dos animais, possibilita a maior eficiência da atividade e a maior produção com menores custos.

A produtividade foi desagregada com base nos três fatores principais de produção: terra, animais e mão de obra. Em todos os casos, observou-se uma associação positiva entre a produtividade desses fatores e a margem líquida e o tamanho do produtor. A produtividade pode ser definida como a razão entre o volume produzido e a quantidade de cada fator. O que se observa em fazendas de alta produtividade, e por consequência maior rentabilidade, é que esses fatores têm sido bem empregados e gerado maior produção.

Nesse contexto, a noção de eficiência surge como central para a discussão sobre a lucratividade. A busca do produtor por elevar essa razão produtiva representa, na prática, a busca por maior retorno marginal por unidade adicional empregada, com a minimização dos custos. Por exemplo, quando há alta produtividade da mão de obra, o acréscimo de

um trabalhador resulta em ganho proporcionalmente superior na produção, o que permite atingir determinado nível produtivo com menor consumo relativo dos demais fatores.

Pode-se observar que as variáveis presentes na Tabela 1 apresentam, em grande medida, a eficiência na utilização dos fatores de produção, resultando em ganhos de escala. A lógica da economia de escala é caracterizada pelo aumento da produção e redução do custo médio, o que pode ser a síntese da busca por ajustar o nível de capital por litro de leite, estruturar adequadamente o rebanho e maximizar a produtividade dos fatores. Esses elementos em conjunto convergem para uma estratégia mais eficiente e economicamente sustentável.

Conclusões

Conclui-se que a rentabilidade das fazendas leiteiras está fortemente associada à adoção de uma gestão eficiente dos recursos produtivos, a qual possibilita a obtenção de ganhos de escala. Tal eficiência econômica do processo produtivo pode ser mensurada em termos quantitativos pelas variáveis de produtividade, estoque de capital com terra por litro de leite produzido e o percentual de vacas em lactação sobre o total de vacas.

O aumento da lucratividade observado nas propriedades decorre, sobretudo, da capacidade de ampliar a produção com redução dos custos médios unitários, caracterizando a presença de economia de escala. Verifica-se, assim, a questão central da economia de escala quando se busca maior rentabilidade na produção leiteira brasileira.

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Brasil (CNPq), pela concessão da cota de bolsa dentro do programa Pibic da Embrapa Gado de Leite. À Labor rural pela base de dados disponibilizada; ao orientador Glaucio Carvalho, à Embrapa Gado de leite e à FAPED, pelo apoio e suporte financeiro durante o curso do trabalho.

Referências

- ACOSTA, D. C.; SOUZA, J. P. de; BANKUTI, S. M. S. Tecnificação de produtores e estruturas de governança no sistema agroindustrial de leite. **Desenvolvimento em Questão**, v. 16, n. 45, p. 292-315, 2018. Disponível em: <https://www.redalyc.org/journal/752/75257033018/movill>. Acesso em: 24 jul. 2025.
- ALVES, E. R. de A.; SOUZA, G. da S. e; BRANDÃO, A. S. P. A situação do produtor com menos de 100 hectares. **Revista de Política Agrícola**, v. 10, n. 1, p. 27-36, 2001. Disponível em: <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/handle/doc/85808>. Acesso em: 6 ago. 2025.
- AMADEO, K. **What are economies of scale?** Disponível em: <https://www.thebalancemoney.com/economies-of-scale-3305926>. Acesso em: 24 jul. 2025.
- BOTTAZZI, G.; SECCHI, A.; TAMAGNI, F. Productivity, profitability and financial performance. *Industrial and Corporate Change*, v. 17, n. 4, p. 711-751, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1093/icc/dtn027>.
- IBGE. **Censo Agropecuário 2017**: resultados definitivos. Rio de Janeiro, 2019. Disponível em: <https://censoagro2017.ibge.gov.br>. Acesso em: 6 de ago. 2025.
- LIMA, A. L. R.; SARAIVA, F. H.; CARVALHO, F. M.; SANTOS, I. C.; LOPES, M.A.; REIS, R. P. Resultados econômicos de sistemas de produção de leite com diferentes níveis tecnológicos na região de Lavras, MG. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, n. 4, p. 487-493, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0102-09352005000400009>.
- NAÇÕES UNIDAS. **Objetivo de Desenvolvimento Sustentável 8**: Trabalho decente e crescimento e econômico. Disponível em: <https://brasil.un.org/pt-br/sdgs/8>. Acesso em: 13 maio 2025.

Características produtivas de *Urochloa ruziziensis* cv. BRS Integra submetida à inoculação com bactérias diazotróficas

Laura Eliza Fontes Paiva⁽¹⁾⁽⁵⁾, Ana Teresa da Silva Cruz⁽²⁾, Rafael Bolina da Silva⁽¹⁾, Pablo Gonçalves de Paula⁽²⁾, Bianca de Assis Mateus⁽¹⁾, Maria Lauane Gonçalves Miranda⁽²⁾, Julia Crespo dos Santos⁽³⁾, Carlos Renato Tavares de Castro⁽⁴⁾, Carlos Augusto de Miranda Gomide⁽⁴⁾ e Domingos Sávio Campos Paciullo⁽⁴⁾

⁽¹⁾Bolsista (Pibic/Fapemig), Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG. ⁽²⁾Bolsista (Pibic/CNPq), Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG. ⁽³⁾Estagiária, Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG. ⁽⁴⁾Pesquisador, Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG. ⁽⁵⁾E-mail: elisalaurapaiva@gmail.com.

Resumo — Objetivou-se avaliar o desempenho de inoculantes com diferentes estirpes de *Azospirillum brasilense*, associados ou não à adubação com nitrogênio (N), sobre as características produtivas de BRS Integra. Foi utilizado o delineamento em blocos casualizados, com três repetições. O experimento foi constituído por nove tratamentos, sendo: T1- controle (não inoculado e sem N); T2- não inoculado + 50 kg/ha de N; T3- não inoculado + 100 kg/ha de N; T4- inoculante comercial (*A. brasilense* estirpe Abv5-Abv6); T5- Mix CNPAB (*A. brasilense* estirpes NRB085 + NRB214); T6- inoculante comercial + 50 kg/ha de N; T7- inoculante comercial + 100 kg/ha de N; T8- MIX CNPAB + 50 kg/ha de N e T9- MIX CNPAB + 100 kg/ha de N. O tratamento controle apresentou os menores valores de SPAD, densidade de perfilhos, taxa de acúmulo e massa de forragem. O inoculante CNPAB, aplicado isoladamente, proporcionou desempenho semelhante aos tratamentos com N, para índice SPAD, taxa de acúmulo e massa de forragem. Os tratamentos com 50 e 100 kg/ha de N apresentaram os maiores valores médios, mas o aumento da dose não resultou em incrementos proporcionais. Conclui-se que a aplicação de *A. brasilense*, (inoculante CNPAB) isolado, promove desempenho semelhante à adubação nitrogenada na BRS Integra.

Termos para indexação: adubação nitrogenada, *Azospirillum brasilense*, bioinsumo, índice SPAD, densidade de perfilhos, massa de forragem.

Productive characteristics of *Urochloa ruziziensis* cv. BRS Integra subjected to inoculation with diazotrophic bacteria

Abstract — The objective of this study was to evaluate the performance of inoculants with different strains of *Azospirillum brasilense*, associated or not with nitrogen (N) fertilization, on the productive characteristics of the cultivar BRS Integra. The experimental design was randomized blocks, with three replications. The experiment consisted of nine treatments, as follows: T1- control (not inoculated and without N); T2- not inoculated + 50 kg/ha of N; T3- not inoculated + 100 kg/ha of N; T4- commercial inoculant (*A. brasilense* strain Abv5-Abv6); T5- CNPAB Mix (*A. brasilense* strains NRB085 + NRB214); T6- commercial inoculant + 50 kg/ha of N; T7- commercial inoculant + 100 kg/ha of N; T8- MIX CNPAB + 50 kg/ha of N and T9- MIX CNPAB + 100 kg/ha of N. The control treatment showed the lowest values for SPAD, tiller density, accumulation rate and forage mass. The CNPAB inoculant, when applied alone, provided performance similar to the treatments with N fertilization, for SPAD, accumulation rate and forage mass. The treatments with 50 and 100 kg/ha of N showed the highest values, but the increase in the dose did not result in proportional increments. It is concluded that the application of CNPAB inoculant isolated, promotes performance similar to N fertilization in BRS Integra.

Index terms: *Azospirillum brasilense*, bioinput, forage mass, nitrogen fertilization, SPAD index, tiller density.

Introdução

O nitrogênio (N) é um nutriente fundamental para a produção de forragem. No entanto, a adubação nitrogenada em pastagens ainda é pouco utilizada no Brasil devido aos altos preços dos fertilizantes, além do potencial desses para causar impactos ambientais negativos devido à lixiviação e volatilização (Nascimento et al., 2024). Uma das estratégias promissoras quando se busca a sustentabilidade em pastagens é a utilização de bioinsumos à base de microrganismos, como bactérias diazotróficas, que contribuem para a melhoria da fixação biológica de N e produção de fitormônios (Zeffa et al., 2019). Entretanto, existe uma especificidade nesta associação que faz com que a promoção de crescimento pela ação das bactérias seja variável, devendo ser comprovada para novas cultivares. A cultivar BRS Integra (*Urochloa ruziziensis*) foi lançada em 2022, sendo a mais promissora para o cultivo em sistemas de integração lavoura pecuária (Brighenti et al., 2023). Objetivou-se com esse trabalho avaliar o desempenho de inoculantes com diferentes estirpes de *Azospirillum brasilense*, associados ou não à adubação nitrogenada, sobre as características produtivas de *Urochloa ruziziensis* cultivar BRS Integra.

As informações geradas no presente estudo vão ao encontro dos Objetivos do Desenvolvimento Sustentável (ODS) contidos na Agenda 2030, proposta pela Organização das Nações Unidas, da qual o Brasil é signatário, sobretudo nos seguintes objetivos específicos: ODS 2 - Erradicação da fome: Acabar com a fome, alcançar a segurança alimentar e melhoria da nutrição e promover a agricultura sustentável; ODS 12 - Consumo Responsável: Assegurar padrões de produção e de consumo sustentáveis; ODS 15 - Vida Sobre a Terra: Proteger, recuperar e promover o uso sustentável dos ecossistemas terrestres, gerir de forma sustentável as florestas, combater a desertificação, deter e reverter a degradação da terra e deter a perda de biodiversidade (Nações Unidas, 2025).

Material e métodos

O trabalho foi realizado no Campo Experimental José Henrique Bruschi, pertencente à Embrapa Gado de Leite, localizado no município de Coronel Pacheco, MG, de novembro de 2024 a abril de 2025. Foi utilizado o delineamento experimental em blocos casualizados, com três repetições. O experimento foi constituído por nove tratamentos, sendo: T1 - controle (não inoculado e sem adubação nitrogenada); T2 - não inoculado + 50 kg/ha de N; T3 - não inoculado + 100 kg/ha de N; T4 - inoculante comercial (estirpe Abv5-Abv6); T5 - Mix CNPAB (A. *brasilense* estirpes NRB085 + NRB214); T6 - inoculante comercial + 50 kg/ha de N; T7 - inoculante comercial + 100 kg/ha de N; T8 - MIX CNPAB + 50 kg/ha de N e T9 - MIX CNPAB + 100 kg/ha de N. Para a inoculação, foram utilizadas 100 g de sementes de BRS Integra em sacos plásticos, sendo preparado o inoculante para cada grupo de sementes. Foram adicionados 1,33 mL de inoculante comercial diluído em 10 mL de solução salina. A mistura foi homogeneizada, de modo que todas as sementes fossem envolvidas com o inoculante, assegurando uma distribuição uniforme do produto. A BRS Integra foi semeada em parcelas de 2,5 x 3,0 m, em linhas espaçadas de 25 cm. No plantio, foi aplicado no fundo do sulco o correspondente a 80 kg/ha de P2O5. Após o estabelecimento, as plantas foram cortadas a 10 cm de altura da superfície do solo, sendo, em seguida, aplicadas em todas as parcelas cloreto de potássio na dose de 40 kg/ha. O adubo nitrogenado foi aplicado nas parcelas correspondentes aos tratamentos destinados a receber o N. As doses de 50 e 100 kg/ha de N foram divididas em duas parcelas iguais (25 ou 50 kg/ha/aplicação), após o primeiro e segundo cortes. Ao longo do período chuvoso, foram realizadas três coletas de amostras. Foram avaliadas as seguintes características: clorofila SPAD, altura das plantas, densidade populacional de perfilhos (DPP), massa (MF) e taxa de acúmulo de forragem

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

Resultados e discussão

Todas as características variaram ($P < 0,05$) com os tratamentos (Tabela 1). O tratamento controle apresentou os menores valores para as variáveis índice SPAD e densidade de perfilhos. Para a taxa de acúmulo e massa de forragem, os menores valores foram observados para o tratamento controle e para o inoculante comercial, que não diferenciaram entre si. De forma geral, os tratamentos com aplicação de N apresentaram as maiores médias. É interessante ressaltar que o inoculante CNPAB, aplicado de forma isolada (sem adição de N), apresentou efeito semelhante aos tratamentos que receberam adubação nitrogenada, para as variáveis índice SPAD, taxa de acúmulo e massa de forragem. O efeito mais pronunciado desse inoculante provavelmente está associado à sua maior capacidade de estimular a fixação de N e/ou processos fisiológicos que aumentam a atividade fotossintética. Resultados promissores com o uso desse inoculante também foram verificados por Cruz (2025), que concluiu que o inoculante CNPAB, constituído pelo mesmo MIX de bactérias avaliado nesse trabalho, apresentou potencial para melhorar o desempenho da BRS Integra. Os resultados indicaram que o efeito sinérgico da associação dos inoculantes bacterianos com a aplicação de N não se manifestou em nenhuma variável, ao contrário do que alguns trabalhos relatam (Duarte et al., 2020; Cruz, 2025). Este fato indica que a adubação nitrogenada, por si só, foi eficaz em aumentar os valores das características avaliadas. Além disso, se observou que o aumento da dose de N de 50 para 100 kg/ha não resultou em aumento proporcional nos valores das características avaliadas com exceção da densidade de perfilho, em que o aumento da dose de N repercutiu em maior densidade de perfilhos. Portanto, para as condições de solo e clima onde o ensaio foi conduzido, ficou evidente que o aumento da dose de N não representou vantagens significativas para a maioria das características estudadas. Dois aspectos podem estar relacionados à ausência de incremento das variáveis. O primeiro é que as plantas têm capacidade limitada para utilizar nitrogênio, podendo atingir o ponto de saturação de utilização de N, resultando na ausência de aumento de produção. Associado a este fato, tem-se que o teor de matéria orgânica do solo experimental pode ser considerado médio (2,7%), contribuindo para aumentar a disponibilização de N nativo para as plantas. Zamai et al. (2025) trabalhando com doses de N associadas à inoculação em diferentes cultivares de *Urochloa* observaram resultados semelhantes aos desse estudo para *U. ruziziensis* e atribuem tal comportamento à saturação da capacidade da planta em utilizar o nitrogênio. O segundo aspecto pode estar associado às perdas por lixiviação e/ou volatilização da dose de N mais elevada, o que pode ter reduzido a eficiência da fertilização e limitar os ganhos de produtividade da pastagem, conforme verificado por Meirelles et al. (2023).

Tabela 2. Médias por sistema de produção.

Tratamento	Característica				
	SPAD	Altura	DPP	TAF	MF
Controle	33,8 ^c	66,7 ^b	383 ^c	80,5 ^b	2.712 ^b
Inoculante comercial	37,7 ^b	68,7 ^b	534 ^b	96,3 ^b	3.246 ^b
Inoculante CNPAB ⁽¹⁾	41,1 ^a	69,0 ^b	578 ^b	116,4 ^a	3.924 ^a
Dose de 50 kg/ha de N	45,6 ^a	75,6 ^a	580 ^b	122,3 ^a	4.120 ^a
Dose de 100 kg/ha de N	44,8 ^a	74,6 ^a	680 ^a	116,7 ^a	3.934 ^a

Continua.

Continuação.

Tratamento	Característica				
	SPAD	Altura	DPP	TAF	MF
Inoculante comercial + 50 N	43,9 ^a	80,2 ^a	597 ^b	118,8 ^a	4.001 ^a
Inoculante comercial + 100 N	42,3 ^a	75,8 ^a	680 ^a	130,8 ^a	4.406 ^a
Inoculante CNPAB + 50 N	43,5 ^a	76,5 ^a	709 ^a	128,2 ^a	4.321 ^a
Inoculante CNPAB + 100 N	42,1 ^a	80,2 ^a	711 ^a	129,0 ^a	4.348 ^a

(1) Inoculante bacteriano em desenvolvimento na Embrapa Agrobiologia.

Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste Scott-Knott ($P < 0,05$).

Conclusões

A aplicação de *Azospirillum brasilense* influenciou positivamente o desempenho da cultivar BRS Integra, sendo a aplicação isolada do inoculante CNPAB capaz de promover ganhos semelhantes àqueles observados com a adubação nitrogenada, especialmente nas variáveis SPAD, taxa de acúmulo e massa de forragem. No entanto não há efeito sinérgico entre a adubação nitrogenada e a inoculação.

Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Fapemig), pelo apoio financeiro aos projetos APQ 00063-23 e APQ 03630-23. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Brasil (CNPq), pelo apoio financeiro processo CNPq 403434/2023-8.

Referências

- BRIGHENTI, A. M.; PACIULLO, D. S. C.; GOMIDE, C. A. M.; CASTRO, C. R. T.; SOUZA, E. M. B.; SILVA, R. B.; SOUZA SOBRINHO, F. **Taxas de semeadura e métodos de plantio da 'BRS Integra' (*Urochloa ruziziensis*) no consórcio com o milho, em cultivo de segunda safra.** Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2023. 26 p. (Embrapa Gado de Leite. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 50). Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/1156240/1/Taxas-de-semeadura-e-metodos-de-plantio-da-BRS-Integra.pdf>. Acesso em: 13 ago. 2025.
- CRUZ, A. T. S. **Inoculação de bactérias diazotróficas em *Urochloa ruziziensis* cv. BRS Integra: efeitos na produção de raízes, acúmulo de biomassa e valor nutritivo.** 2025. 53 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) - Universidade Federal de São João del-Rei, São João del-Rei, 2025.
- DUARTE, C. F. D.; CECATO, U.; HUNGRIA, M.; FERNANDES, H. J.; BISERRA, T. T.; GALBEIRO, S.; TONIATO, A. K. B.; SILVA, D. R. Morphogenetic and structural characteristics of *Urochloa* species under inoculation with plant-growth-promoting bacteria and nitrogen fertilisation. **Crop and Pasture Science**, v. 71, n. 1, p. 82-89, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1071/CP18455>.
- MEIRELLES, G. C.; HEINRICHS, R.; LIRA, M.; VIRGÍLIO, I. R.; SANTOS, L. F. M.; CASSIMIRO, J. B.; RUFFO, M. L.; SOARES FILHO, C. V.; MOREIRA, A. Ammonia volatilization and pasture yield of *Urochloa decumbens* fertilized with nitrogen sources. **Archives of Agronomy and Soil Science**, v. 69, n. 10, p. 1946-1954, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1080/03650340.2022.2129049>.
- NAÇÕES UNIDAS. **Os Objetivos de Desenvolvimento Sustentável no Brasil.** Disponível em: <https://brasil.un.org/pt-br/sdgs>. Acesso em: 13 maio 2025.
- NASCIMENTO, D. B.; LOPES, M. L. S.; IZIDRO, J. L. P. S.; BEZERRA, R. C. A.; GOIS, G. C.; AMARAL, T. N. E.; DIAS, W. S.; BARROS, M. M. L.; OLIVEIRA, A. R. S.; SOBRINHO, J. L. F.; COÊLHO, J. J. Ciclagem

de nitrogênio, fósforo e potássio em ecossistemas de pastagem. **Ciência Animal Brasileira**, v. 25, 76743E, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1590/1809-6891v25e-76743p>.

ZAMAI, M. A.; ZAMAI, M. A.; MARTINES, D. B. A.; OLIVEIRA, U. C. Avaliação da produtividade de diferentes cultivares de *Urochloa* inoculados com *Azospirillum brasilense* submetido a diferentes doses de nitrogênio. **Revista FT**, v. 29, n. 142, p. 22-23, 2025. DOI: <https://doi.org/10.69849/revistافت/ni10202501051122>.

ZEFFA, D. M.; PERINI, L. J.; SILVA, M. B.; SOUSA, N. V.; SCAPIM, C. A.; OLIVEIRA, A. L. M.; AMARAL JÚNIOR, A. T.; GONÇALVES, L. S. A. *Azospirillum brasilense* promotes increases in growth and nitrogen use efficiency of maize genotypes. **PLoS ONE**, v. 14, n. 4, e0215332, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0215332>.

Desempenho agrônomo de genótipos do gênero *Urochloa*

Bianca de Assis Mateus⁽¹⁾⁽⁷⁾, Carlos Augusto de Miranda Gomide⁽²⁾, Domingos Sávio Campos Paciullo⁽²⁾, Rafael Bolina da Silva⁽³⁾, Pablo Gonçalves de Paula⁽⁴⁾, Carlos Renato Tavares de Castro⁽²⁾, Julia Crespo dos Santos⁽⁵⁾, Ana Teresa da Silva Cruz⁽⁵⁾, Maria Lauane Gonçalves Miranda⁽⁶⁾ e Laura Eliza Fontes Paiva⁽³⁾

⁽¹⁾Bolsista (Pibic/CNPq), Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG. ⁽²⁾Pesquisador, Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG. ⁽³⁾Bolsista (Pibic/Fapemig), Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG. ⁽⁴⁾Bolsista (IC/CNPq), Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG. ⁽⁵⁾Estagiário(a), Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG. ⁽⁶⁾Bolsista, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, MG. ⁽⁷⁾Pesquisador, Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG. ⁽⁷⁾E-mail: biancaassis2012@gmail.com.

Resumo — O objetivo deste estudo foi avaliar o desempenho agrônomo de genótipos de *Urochloa* provenientes de cruzamentos intra e interespecíficos, na região da Zona da Mata Mineira. O experimento foi realizado em parcelas de 5x4 metros em delineamento de blocos casualizados com quatro repetições. Foram avaliados quatro genótipos de *Urochloa*, dois híbridos intraespecíficos (254-1 e R086), e dois interespecíficos (776-10 e 1242-10), além das testemunhas Marandu (*U. brizantha*) e Basilisk (*U. decumbens*). Foram avaliadas as seguintes variáveis: altura de plantas, massa de forragem verde, relação lâminas foliares / colmos, número de perfilhos por metro quadrado, taxa de acúmulo de forragem e massa de folhas. Os resultados mostraram que os genótipos 254-1 e R086 alcançaram as maiores alturas, enquanto 776-10 e 1242-10 apresentaram porte mais baixo. A relação folha/colmo foi maior nos genótipos 1242-10 e 776-10, sugerindo melhor qualidade nutricional. A produção total de forragem verde e a taxa de acúmulo não diferiram entre os materiais testados, porém o genótipo 776-10 se destacou na produção de folhas. A cultivar Basilisk mostrou maior densidade de perfilhos. Conclui-se que os genótipos 1242-10 e 776-10 apresentam relação lâmina/ colmo, com potencial para produção de forragem de qualidade.

Termos para indexação: características morfológicas, cruzamento interespecífico, densidade de perfilhos, melhoramento de pastagens tropicais, produção de forragem.

Agronomic performance of genotypes of the genus *Urochloa*

Abstract — The objective of this study was to evaluate the agronomic performance of *Urochloa* genotypes from intra- and interspecific crosses in the Zona da Mata region of Minas Gerais. The experiment was carried out in 5x4-meter plots in a randomized complete block design with four replications. Four *Urochloa* genotypes were evaluated: two intraspecific hybrids (254-1 and R086) and two interspecific hybrids (776-10 and 1242-10), in addition to the controls Marandu (*U. brizantha*) and Basilisk (*U. decumbens*). The following variables were evaluated: plant height, green forage mass, leaf/stem ratio, number of tillers per square meter, forage accumulation rate, and leaf mass. The results showed that genotypes 254-1 and R086 reached the greatest heights, while 776-10 and 1242-10 were shorter. The leaf/stem ratio was higher in genotypes 1242-10 and 776-10, suggesting better nutritional quality. Total green forage production and accumulation rate did not differ among the tested materials, but genotype 776-10 stood out in leaf production. The Basilisk cultivar showed higher tiller density. It is concluded that genotypes 1242-10 and 776-10 have a leaf/stem ratio, with potential for quality forage production.

Index terms: forage production, morphological traits, interspecific hybridization, tiller density, tropical pasture breeding.

Introdução

Cultivares forrageiras mais produtivas e adaptadas aos diferentes biomas têm contribuído para o avanço da pecuária brasileira nas últimas décadas. O gênero *Urochloa*, por sua rusticidade e versatilidade, é a base da pecuária a pasto no Brasil (Paula et al., 2017). Avanços no melhoramento desse gênero têm selecionado genótipos de grande potencial para pastejo em áreas de baixa fertilidade e/ou relevo acentuado (*U. decumbens*) e para produção de palhada e/ou pastejo em sistemas integrados (*U. ruziziensis*) (Furlan et al., 2019; Rodrigues et al., 2023).

A realização de cruzamentos interespecíficos oferecem maior diversidade genética para novas combinações de características entre diferentes espécies, enquanto os cruzamentos intraespecíficos proporcionam refinamento de determinadas características dentro da espécie (Matias et al., 2021). Estas abordagens podem resultar ganhos em resistência, produtividade e adaptabilidade que culminam no lançamento de novas cultivares.

Diante disso, é fundamental a avaliação agrônômica de genótipos provenientes desses cruzamentos para identificar possíveis genótipos superiores. Por tanto, objetivou-se avaliar o desempenho agrônômico de genótipos de *Urochloa* provenientes de cruzamentos intra e interespecíficos, na região da Zona da Mata Mineira, no período chuvoso.

As informações geradas no presente estudo vão ao encontro dos Objetivos do Desenvolvimento Sustentável (ODS) contidos na Agenda 2030, proposta pela Organização das Nações Unidas, da qual o Brasil é signatário, sobretudo nos seguintes objetivos específicos: ODS 2 - Erradicação da fome: Acabar com a fome, alcançar a segurança alimentar e melhoria da nutrição e promover a agricultura sustentável; ODS 12 - Consumo Responsável: Assegurar padrões de produção e de consumo sustentáveis; ODS 15 - Vida Sobre a Terra: Proteger, recuperar e promover o uso sustentável dos ecossistemas terrestres, gerir de forma sustentável as florestas, combater a desertificação, deter e reverter a degradação da terra e deter a perda de biodiversidade (Nações Unidas, 2025).

Material e métodos

O experimento foi conduzido no Campo Experimental José Henrique Bruschi, da Embrapa Gado de Leite, localizado em Coronel Pacheco, MG, (21°33'22" de latitude sul, 43°06'15" de longitude oeste e 410 m de altitude). O solo das áreas experimentais é classificado como Latossolo Vermelho-Amarelo distrófico, de textura argilosa (Santos et al., 2018).

O ensaio foi instalado em parcelas de 5 x 4 m no delineamento em blocos casualizados com quatro repetições. Foram avaliados quatro novos genótipos de *Urochloa* provenientes da Embrapa Gado de Corte, componentes do Programa de Melhoramento Genético de Forrageiras da Embrapa, sendo os genótipos 254-1 e R086 intraespecíficos (*decumbens* x *decumbens*) e os genótipos 776-10 e 1242-10 interespecíficos (*decumbens* x *ruziziensis*) e duas testemunhas, as cultivares comerciais Marandú (*Urochloa brizantha*) e Basilisk (*Urochloa decumbens*).

Foi realizado um corte de uniformização no dia 09/01/2025, e dois cortes avaliativos nas datas de 14/02/2025 e 04/04/2025. Todos os cortes foram realizados a 10 cm do nível do solo. No dia anterior ao corte, as parcelas foram avaliadas quanto a altura média do horizonte de folhas em três pontos aleatórios dentro da parcela. No momento dos cortes foi coletada uma amostra de forragem em uma moldura de 1 x 0,5 m. A massa de forragem foi colhida e levada para o laboratório para determinação das variáveis; foi contabilizado o número de perfilhos, estimada a produção de massa verde total (MVT), sendo também

retirada amostra para a determinação do teor de matéria seca (% MS) e separação dos componentes morfológicos (lâminas foliares, e colmos + bainhas). Em seguida as amostras foram levadas a estufa de circulação forçada de ar por 72 horas (Detmann et al., 2021), para determinar o peso seco e participação relativa de cada componente na composição morfológica da forragem e estimar massa de folhas, taxa de acúmulo de forragem e relação lâmina foliar/colmo. Para as análises estatísticas foi obtida a média dos dois cortes e posteriormente procedeu-se à análise de variância com uso do software R utilizando o pacote Expdes.pt, e as médias, quando pertinente, foram comparadas pelo teste Tukey a 10% de probabilidade.

Resultados e discussão

Foi observado efeito de genótipos para as variáveis altura de planta, relação lâmina foliar/colmo (RLC) e densidade populacional de perfilhos (DPP). Para as variáveis massa de forragem verde (MFV), taxa de acúmulo de forragem (TAF) e massa de folhas (MF), não foram observadas diferenças entre os genótipos ($p > 0,05$) (Tabela 1).

Os genótipos 254-1 e R086 destacaram-se com as maiores alturas (82 cm e 81 cm, respectivamente), já os genótipos 1242-10 e 776-10 apresentaram as menores alturas (55 cm e 48 cm).

Tabela 1. Desempenho agrônomo de genótipos de *Urochloa* spp.

Genótipos	Altura (cm)	MFV ⁽¹⁾ (kg/ha)	RLC ⁽²⁾	DPP ⁽³⁾ (nº/m²)	TAF ⁽⁴⁾ (kg/ha/dia)	MF ⁽⁵⁾ (kg/ha)
254-1	82 a	3.914	0,99 c	484 ab	100	1.731 ab
R086	81 a	3.773	1,13 c	436 ab	97	1.710 ab
1242-10	55 c	2.639	3,39 a	317 b	67	1.872 ab
776-10	48 c	3.605	2,50 ab	359 ab	91	2.339 a
Marandu	73 b	3.247	1,91 bc	287 b	83	1.915 ab
Basilisk	72 b	3.637	0,99 c	605 a	92	1.607 b
Média	68	3.469	1,82	415	88	1.862
P-valor	0,001	0,181	0,001	0,009	0,256	0,087
CV ⁽⁶⁾ (%)	5,04	20,14	33,17	26,35	22,15	17,98
EPM ⁽⁷⁾	2,75	150,62	0,22	29,03	4,07	80,27

Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 10% de probabilidade.

⁽¹⁾ MFV = Massa de forragem verde; ⁽²⁾ RLC = Relação lâmina/colmo; ⁽³⁾ DPP = Densidade populacional de perfilhos; ⁽⁴⁾ TAF = Taxa de acúmulo de forragem; ⁽⁵⁾ MF = Massa de folhas; ⁽⁶⁾ CV = Coeficiente de variação; ⁽⁷⁾ EPM = Erro-padrão da média.

A relação lâmina foliar/colmo (RLC) foi maior no genótipo 1242-10, seguido pelo 776-10, enquanto os demais genótipos apresentaram valores inferiores à Marandu. Maior RLC é desejável, uma vez que as folhas possuem maior valor nutritivo (maior digestibilidade e teor proteico) em comparação aos colmos. Além disso, maiores proporções de colmo podem afetar a estrutura do pasto e prejudicar o consumo animal (Heimbach et al., 2020; Rodríguez et al., 2024). Esses resultados indicam que os genótipos 1242-10, e 776-10 têm potencial para produção de forragem de boa estrutura e melhor valor nutricional.

O genótipo 776-10 apresentou maior massa de folha (MF), a cultivar Basilisk a menor, e os demais genótipos apresentaram produção intermediária. Esse resultado é uma evidência que reforça a possibilidade de que o genótipo 776-10 proporcione uma forragem de melhor

qualidade e maior quantidade de folhas, o que pode resultar em maiores produção de leite ou ganho de peso pelos animais.

A cultivar Basilisk registrou a maior densidade populacional de perfilhos (DPP), diferindo do genótipo 1242-10 e Marandu, enquanto os demais apresentaram valores intermediários. Esse resultado pode estar relacionado à adaptação e capacidade de estabelecimento mais agressivo da cultivar Basilisk. O perfilhamento é considerado uma característica importante para a persistência da pastagem, especialmente em condições de pastejo intensivo (Silva et al., 2020). No entanto, vale ressaltar que só foram realizadas duas colheitas até o momento, sendo necessárias mais avaliações para constatar o real potencial dos genótipos.

Conclusões

Os genótipos apresentam MFV e TAF semelhantes às testemunhas (Marandu e Basilisk) e perfilhamento inferior à cultivar Basilisk no período de estabelecimento. No entanto o genótipo 1242-10 apresentou maior RLC, e o genótipo 776-10 maior massa de folha, sugerindo maior potencial nutritivo desses em comparação às testemunhas.

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Brasil (CNPq), pela concessão da cota de bolsa dentro do programa Pibic da Embrapa Gado de Leite. Ao apoio financeiro da Unipasto e do CNPq, processo 403434/2023-8. À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Fapemig), pelo apoio financeiro ao projeto APQ 03630-23. À Embrapa Gado de Leite pela oportunidade, o que nos proporcionou obter experiência e aprendizado; aos pesquisadores Carlos Augusto de Miranda Gomide e Domingos Sávio Campos Paciullo pelo acompanhamento, orientação e apoio durante o período de estudos e treinamento.

Referências

- DETMANN, E.; SILVA, L. F. C.; ROCHA, G. C.; PALMA, M. N. N.; RODRIGUES, J. P. P. **Métodos para análise de alimentos**: INCT Ciência Animal. 2. ed. [S.l.]: Ed. dos Autores, 2021. 350 p.
- FURLAN, F.; BORGIO, L.; RABÊLO, F.; ROSSI, M.; LINHARES, F.; MARTINELLI, A.; AZEVEDO, R.; LAVRES, J. Aluminum-induced toxicity in *Urochloa brizantha* genotypes: a first glance into root Al-apoplastic and -symplastic compartmentation, Al-translocation and antioxidant performance. **Chemosphere**, v. 243, 125362, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125362>.
- HEIMBACH, N.; ÍTAVO, C.; ÍTAVO, L.; DIFANTE, G.; DIAS, A.; BRUMATTI, R.; GOMES, M.; BAUR, C.; MORAES, G.; COSTA, M.; KOZERSKI, N.; LEAL, E.; GURGEL, A. Diferentes disponibilidades de gramíneas em pastagens tropicais sobre o desempenho e a carcaça de cordeiros. **Tropical Animal Science Journal**, v. 43, n. 3, p. 211-218, 2020. DOI: <https://doi.org/10.5398/tasj.2020.43.3.211>.
- MATIAS, F.; CANDIDO, A.; MACHADO, W.; AMARAL, P.; DIAS, A.; VALLE, C.; BARRIOS, S.; VALÉRIO, J.; TORRES, F.; VERZIGNASSI, J.; ARRUDA, C. de; GOUVEIA, B.; NOBRE, A. *Urochloa* spp. multivariate performance: Similarities and divergences among intra and interspecific populations. **Crop Science**, v. 61, n. 2, p. 1104-1116, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1002/csc2.20401>.
- NAÇÕES UNIDAS. **Os Objetivos de Desenvolvimento Sustentável no Brasil**. Disponível em: <https://brasil.un.org/pt-br/sdgs>. Acesso em: 13 maio 2025.
- PAULA, L.; CEZÁRIO, A.; DE OLIVEIRA, N.; DE LIMA VIEIRA, M.; BARROS, J.; DAMASCENA, E.; RABELO, A.; SANTO, W. Manejo e adaptação de pastagens do gênero *Urochloa* em solos de cerrado. **Colloquium Agrariae**, v. 13, p. 276-288, 2017. DOI: <https://doi.org/10.5747/ca.2017.v13.nesp.000233>.
- RODRIGUES, P.; PACIULLO, D.; SOARES, N.; GOMIDE, C.; MORENZ, M.; LOPES, F.; SOBRINHO, F.; LANA, Â. Productive traits and nutritional value of *Urochloa ruziziensis* submitted to different planting

densities and defoliation intensities. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 75, n. 5, p. 1005-1015, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1590/1678-4162-12976>.

RODRÍGUEZ, J. G.; GARAY-MARTÍNEZ, J.; ESTRADA-DROUAILLET, B.; LIMAS-MARTÍNEZ, A.; BAUTISTA-MARTÍNEZ, Y.; JOAQUÍN-CANCINO, S. Produtividade e valor nutritivo de híbridos de *Urochloa* em diferentes idades de rebrota. **Agro Produtividade**, v. 17, p. 151-159, 2024. DOI: <https://doi.org/10.32854/agrop.v17i17.2814>.

SANTOS, H. G. dos; JACOMINE, P. K. T.; ANJOS, L. H. C. dos; OLIVEIRA, V. A. de; LUMBRERAS, J. F.; COELHO, M. R.; ALMEIDA, J. A. de; ARAÚJO FILHO, J. C. de; OLIVEIRA, J. B. de; CUNHA, T. J. F. **Sistema Brasileiro de Classificação de Solos**. 5. ed. rev. e ampl. Brasília, DF: Embrapa, 2018.

SILVA, L.; SILVA, V.; YASUOKA, J.; SOLLENBERGER, L.; PEDREIRA, C. Tillering dynamics of 'Mulato II' brachiariagrass under continuous stocking. **Crop Science**, v. 60, n. 2, p. 1105-1112, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1002/csc2.20008>.

Avaliação da citotoxicidade in vitro de filme nanocompósito à base de subprodutos industriais de laranja em células CHO para potenciais aplicações na cadeia produtiva do leite

Davi Glanzmann⁽¹⁾⁽⁵⁾, Letícia Ludmilla Oliveira Arakaki⁽²⁾, Rafael Marques⁽³⁾ e Humberto de Mello Brandão⁽⁴⁾

⁽¹⁾Bolsista (Pibic/CNPq), Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG. ⁽²⁾Estagiário, Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG. ⁽³⁾Bolsista (Pibic/Fapemig), Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG. ⁽⁴⁾Pesquisador, Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG. ⁽⁵⁾E-mail: davi.glanz@gmail.com.

Resumo — Este trabalho aborda a avaliação citotóxica de um filme nanocompósito produzido a partir de resíduos industriais de laranja e nanocristais de celulose, investigando seu potencial como material alternativo para embalagens alimentares ativas, inteligentes, biodegradáveis e possivelmente comestíveis. O trabalho objetivou identificar eventuais efeitos tóxicos em células CHO-K1, por meio dos ensaios de absorção de Vermelho Neutro e exclusão por Azul de Tripán. Os resultados indicam que o ensaio de Azul de Tripán não apontou citotoxicidade significativa ($p > 0,05$), enquanto o Vermelho Neutro revela perda de viabilidade celular em concentrações iguais ou superiores a 3,125 mg/mL ($p < 0,03978$), com 12,5 mg/mL próximo ao ponto de inibição letal de 50% (IL 50). Conclui-se, que o material é promissor para uso em embalagens, mas requer aprimoramentos para garantir estabilidade e segurança adequadas.

Termos para indexação: azul de tripan, embalagens biodegradáveis, nanotoxicidade, resíduos agroindustriais, vermelho neutro.

In vitro evaluation of a nanocomposite filme derived from industrial orange by-products in CHO cells

Abstract — This study addresses the cytotoxic evaluation of a nanocomposite film produced from industrial orange by-products and cellulose nanocrystals, investigating its potential as an alternative material for active, intelligent, biodegradable, and possibly edible food packaging. The aim was to identify potential toxic effects on CHO-K1 cells through Neutral Red uptake and Trypan Blue exclusion assays. The results indicate that the Trypan Blue assay did not show significant cytotoxicity ($p > 0.05$), while the Neutral Red assay revealed a loss of cell viability at concentrations equal to or higher than 3.125 mg/mL ($p < 0.03978$), with 12.5 mg/mL approaching the 50% lethal inhibition point (IL50). It is concluded that the material is promising for packaging applications but requires further improvements to ensure adequate stability and safety.

Index terms: agro-industrial waste, biodegradable packaging, nanotoxicity, neutral red, trypan blue.

Introdução

A crescente preocupação com os impactos ambientais dos polímeros sintéticos tem impulsionado o desenvolvimento de materiais alternativos, renováveis, biodegradáveis e de menor pegada ambiental (Nilsen-Nygaard et al., 2021). Apenas cerca de 9% dos plásticos produzidos globalmente são reciclados, enquanto o restante se acumula em aterros ou no ambiente, agravando a poluição mundial (Singh; Walker, 2024). Nesse cenário, filmes poliméricos biodegradáveis despontam como alternativa promissora aos plásticos convencionais, especialmente quando incorporam funções adicionais, como

atividade antimicrobiana ou indicadores de qualidade — características de embalagens ativas e inteligentes (Melo et al., 2019). O uso de resíduos agroindustriais como matéria-prima para esses biopolímeros reforça a economia circular, agregando valor a subprodutos de descarte pouco valorizados ou onerosos (Perotto et al., 2018). Entre os resíduos agroindustriais, destaca-se a casca de laranja, abundante na indústria cítrica e rica em compostos bioativos, com potencial para formar filmes com propriedades funcionais (Figueira et al., 2023). A adição de nanocristais de celulose, devido à alta cristalinidade, propriedades renováveis e elevada razão de aspecto, reforça mecanicamente os filmes e aprimora suas barreiras físico-químicas (Genet et al., 2025). No entanto, avaliar a citotoxicidade desses nanocompósitos é fundamental para garantir sua segurança em contato com alimentos ou ingestão, como no caso de filmes comestíveis (Cockburn et al., 2012). Ensaios *in vitro* fornecem dados preliminares sobre a biocompatibilidade, sendo essenciais ao desenvolvimento e regulamentação de novos materiais para embalagens alimentícias (International Organization for Standardization, 2009).

Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar a citotoxicidade *in vitro* de um filme nanocompósito desenvolvido a partir de resíduos industriais de laranja e nanocristais de celulose, visando sua aplicação como embalagem ativa, inteligente e biodegradável, com potencial para embalar derivados lácteos, como queijos e demais derivados da cadeia produtiva do leite. Espera-se, com isso, contribuir para a expansão de alternativas sustentáveis ao plástico convencional, alinhadas às demandas ambientais e de segurança alimentar da sociedade contemporânea.

As informações geradas no presente estudo vão ao encontro dos Objetivos do Desenvolvimento Sustentável (ODS) contidos na Agenda 2030, proposta pela Organização das Nações Unidas, da qual o Brasil é signatário, sobretudo no ODS 12- Consumo Responsável: Assegurar padrões de produção e de consumo sustentáveis (Nações Unidas, 2025).

Material e métodos

O filme utilizado neste estudo foi obtido por meio de um projeto em parceria com o Centro Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento de Instrumentação Agropecuária e o Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Leite. Para a avaliação da citotoxicidade do filme nanocompósito, foi utilizada a linhagem celular CHO-K1 (células de ovário de hamster chinês), cedida pelo Laboratório de Nanobiotecnologia e Nanotoxicologia da Universidade Federal de Juiz de Fora. As células foram cultivadas em meio DMEM-F12, suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1% de solução de aminoácidos não essenciais e 1% de antibióticos (penicilina e estreptomicina), em incubadora com 5% de CO₂, 90-95% de umidade e 37 °C.

A solução estoque da fração solúvel do filme foi preparada conforme o Guia 129 da OECD (Organization for Economic Co-Operation and Development, 2010), considerando que esta é a maior fração do material em proporção de massa. O material foi pesado para alcançar uma concentração final de 100 mg/mL da fração solúvel, disperso em DMEM-F12 e agitado overnight. Então, a solução foi esterilizada por filtração (0,22 µm), diluída e ajustada para as concentrações de exposição. Ambos os ensaios de citotoxicidade foram conduzidos em duas etapas: preliminar e principal. A etapa preliminar seguiu as concentrações indicadas no guia (0,0001 a 1000 µg/mL). Com base nos resultados, as concentrações na etapa principal foram ajustadas para 1,56 a 50 mg/mL, respeitando o limite de solubilização do material.

O ensaio de absorção de Vermelho Neutro seguiu o Guia 129 da OECD. O corante foi preparado a 400 µg/mL em DMEM-F12 e diluído para 40 µg/mL no momento do uso. A solução de descoloração foi composta por etanol 96° (50%), água ultrapura (49%) e ácido acético glacial (1%). No teste preliminar, células CHO-K1 foram plaqueadas em 96 poços ($\approx 1 \times 10^4$ células/poço), incubadas por 24 h e expostas às concentrações definidas (1:1 entre tratamento e meio). Após 24h adicionou-se o corante, seguido de nova incubação por 2h. O excesso foi removido, os poços lavados com PBS, e adicionada a solução de descoloração. Após 15 minutos de agitação orbital, a absorbância foi lida a 540 nm. No ensaio principal, o protocolo foi mantido, com ajustes nas concentrações (1,56 a 50 mg/mL) e leituras em 490, 540 e 630 nm, para atender a requisitos técnicos internos relacionados às limitações dos equipamentos do laboratório.

O ensaio de exclusão por Azul de Tripán foi realizado conforme o protocolo de Crowley et al. (2016), com o objetivo de complementar os resultados obtidos no outro ensaio. No teste preliminar, as células foram semeadas em placas de 24 poços ($\approx 5 \times 10^4$ células/poço), incubadas por 24h e tratadas com concentrações de 0,0001 a 1000 µg/mL (proporção 1:1). Após 24h, as células foram tripsinizadas, centrifugadas e ressuspensas em DMEM-F12. Em seguida, foram misturadas com o corante Azul de Tripán (10 µL de célula + 10 µL de corante), incubadas por 2 minutos e quantificadas em câmara de Neubauer. No ensaio principal, o mesmo procedimento foi seguido, com placas de 48 poços ($\approx 3 \times 10^4$ células/poço) e concentrações ajustadas para 1,56 a 50 mg/mL, mantendo-se a proporção 1:1 com volumes reduzidos (200 µL de meio e 200 µL de tratamento).

Foram realizados testes de normalidade (Shapiro-Wilk), análises de variância One-way ANOVA e testes post hoc de Tukey para comparação entre grupos, considerando $p < 0,05$ significativo.

Resultados e discussão

Nos testes preliminares, não foi constatado efeito citotóxico significativo em nenhum dos tratamentos testados (0,0001 até 1000 µg/mL) em comparação com o grupo controle ($p > 0,05$). Diante desse resultado, provou-se necessária a ampliação das concentrações testadas, motivando a realização de um ensaio principal com doses mais elevadas, variando de 1,56 mg/mL a 50 mg/mL.

O ensaio principal de absorção de Vermelho Neutro demonstrou que o filme nanocompósito apresentou efeito citotóxico dependente da concentração. Na Figura 1 é possível notar que na concentração de 1,56 mg/mL não foi observada diferença estatística significativa em relação ao controle ($p > 0,05$). Entretanto, a partir da concentração de 3,125 mg/mL, todas as doses resultaram em redução significativa da viabilidade celular ($p < 0,05$). Destaca-se que na concentração de 12,5 mg/mL, a viabilidade foi reduzida para 50,22%, valor que se aproxima de uma concentração inibitória letal de 50% (IL_{50}) no período de exposição de 24h.

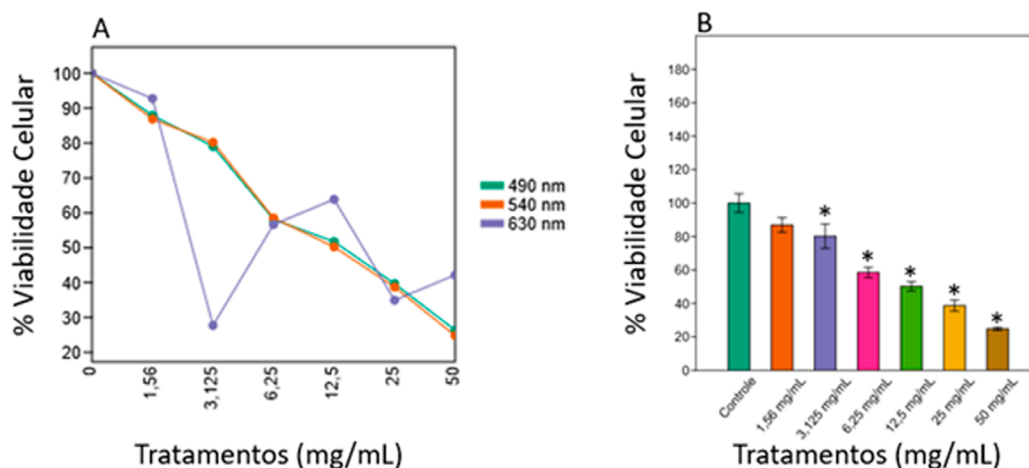


Figura 1. Viabilidade celular (%) medida pelo ensaio de absorção de vermelho neutro após 24h de exposição ao filme nanocompósito em várias concentrações, com leituras a 490 (verde), 540 (vermelho) e 630 (azul) nm. (A) Gráfico de linhas mostra a média dos controles e tratamentos em ordem crescente de concentração para cada comprimento de onda. (B) Gráfico de barras apresenta médias e desvios padrões, comparando os grupos. Diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$) foram encontradas a partir de 3,125 mg/mL (*) (ANOVA one-way; teste de Tukey).

Em contrapartida, o ensaio principal de exclusão por Azul de Tripán não demonstrou diferença estatística significativa em nenhuma das concentrações testadas no período de 24h (Figura 2), possivelmente pelos mecanismos distintos de cada corante e pela forma de análise de cada um.

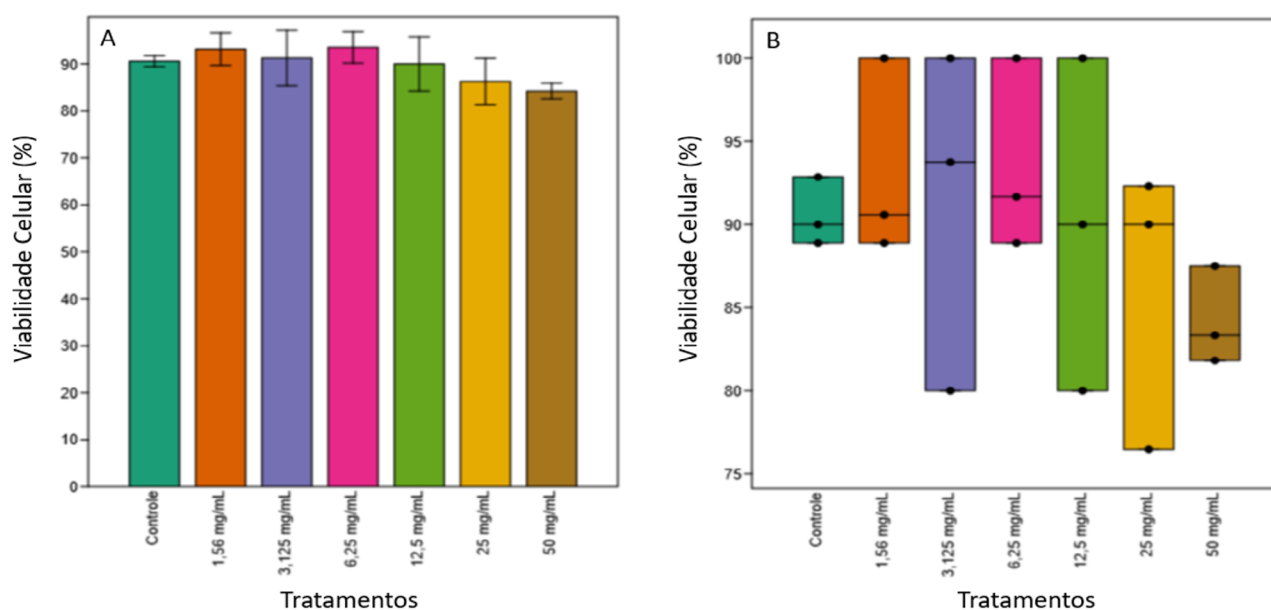


Figura 2. Viabilidade celular (%) obtida pelo ensaio de exclusão por Azul de Tripán após 24h de exposição ao filme nanocompósito em várias concentrações. (A) Gráfico de barras com médias e desvios padrões dos grupos controle e tratados, em ordem crescente de concentração. (B) Boxplot mostrando a distribuição dos valores individuais. Não houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ($p = 0,6576$; ANOVA one-way; teste de Tukey).

Conclusões

Em conjunto, esses resultados indicam que o filme possui potencial para uso como material de embalagem alimentar ativa ou biodegradável, mas que ajustes por meio de testes complementares são recomendados para garantir níveis de segurança adequados ao contato com alimentos ou aplicações comestíveis.

Agradecimentos

Ao apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) – Brasil, pela concessão de bolsa Pibic. Parte do projeto Estudos de segurança de nanomateriais. SEG nº 20.22.03.013.00.02.005 e 20.22.03.013.00.03.006. À Embrapa Instrumentação pela disponibilidade do filme nanocompósito utilizado neste estudo. À Embrapa Gado de Leite pela oportunidade de treinamento, o que nos proporcionou obter experiência e aprendizado; ao pesquisador Dr. Humberto de Mello Brandão pelo acompanhamento, orientação e apoio durante o período de estudos e capacitação.

Referências

COCKBURN, A.; BRADFORD, R.; BUCK, N.; CONSTABLE, A.; EDWARDS, G.; HABER, B.; HEPBURN, P.; HOWLETT, J.; KAMPERS, F.; KLEIN, C.; RADOMSKI, M.; STAMM, H.; WIJNHOFEN, S.; WILDEMAN, T. Approaches to the safety assessment of engineered nanomaterials (ENM) in food. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, n. 6, p. 2224-2242, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2011.12.029>.

CROWLEY, L. C.; MARFELL, B.; CHRISTENSEN, M. E.; WATERHOUSE, N. J. Measuring cell death by trypan blue uptake and light microscopy. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 2016, n. 7, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1101/pdb.prot087155>.

FIGUEIRA, O.; PEREIRA, V.; CASTILHO, P. C. A Two-step approach to orange peel waste valorization: consecutive extraction of pectin and hesperidin. **Foods**, v. 12, n. 20, p. 3834-3834, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/foods12203834>.

GENET, M. B.; ZHUANG, X.; TAN, X.; ZHANG, Q.; MIAO, C.; ZHANG, Z.; JEMBERE, A. L. Cellulose nanocrystal-based synthetic biodegradable biopolymeric composites: A comprehensive review on recent progress. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 299, p. 140098, 2025. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2025.140098>.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 10993-5:2009**: Biological evaluation of medical devices - Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity. Geneva, 2009.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. **Guidance document on using cytotoxicity tests to estimate starting doses for acute oral systemic toxicity tests**. Paris, 2010. 54 p. (Series on Testing and Assessment, n. 129).

PEROTTO, G.; CESERACCIU, L.; SIMONUTTI, R.; PAUL, U. C.; GUZMAN-PUYOL, S.; TRAN, T.-N.; BAYER, I. S.; ATHANASSIOU, A. Bioplastics from vegetable waste via an eco-friendly water-based process. **Green Chemistry**, v. 20, n. 4, p. 894-902, 2018.

MELO, P. E. F.; SILVA, A. P. M.; MARQUES, F. P.; RIBEIRO, P. R. V.; SOUZA FILHO, M. de S. M. de; BRITO, E. S. de; LIMA, J. R.; AZEREDO, H. M. C. de. Antioxidant films from mango kernel components. **Food Hydrocolloids**, v. 95, p. 487-495, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.04.061>.

NAÇÕES UNIDAS. **Objetivo de Desenvolvimento Sustentável 12**: Consumo e produção responsáveis. Disponível em: <https://brasil.un.org/pt-br/sdgs/12>. Acesso em: 13 mar. 2025.

NILSEN-NYGAARD, J.; FERNÁNDEZ, E. N.; RADUSIN, T.; ROTABAKK, B. T.; SARFRAZ, J.; SHARMIN, N.; SIVERTSVIK, M.; SONE, I.; PETTERSEN, M. K. Current status of biobased and biodegradable food packaging materials: impact on food quality and effect of innovative processing technologies. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 20, n. 2, p. 1333-1380, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12715>.

SINGH, N.; WALKER, T. R. Plastic recycling: a panacea or environmental pollution problem. **Materials Sustainability**, v. 2, n. 1, article 17, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1038/s44296-024-00024-w>.

Avaliação da relação entre índices climáticos para o monitoramento da seca na Bacia do Rio Paracatu

Pâmella Ferreira da Silva⁽¹⁾⁽⁴⁾, Ricardo Guimarães Andrade⁽²⁾, Celso Bandeira de Melo Ribeiro⁽³⁾ e Marcos Cicarini Hott⁽²⁾

⁽¹⁾Bolsista (Pibic/CNPq), Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG. ⁽²⁾Pesquisador, Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG. ⁽³⁾Professor, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG. ⁽⁴⁾E-mail: pamellaferreira34@gmail.com.

Resumo — Este estudo avaliou a relação entre índices climáticos e a resposta da vegetação na Bacia do Rio Paracatu, com foco na identificação de padrões de seca e seus impactos sobre agricultura e pecuária. Foram utilizados dados de precipitação (CHIRPS) e evapotranspiração potencial (TerraClimate) para o cálculo dos índices SPI e SPEI em escalas de 3, 6, 9 e 12 meses, e o NDVI (MODIS e GIMMS) para monitoramento da cobertura vegetal entre 2003 e 2023. As análises, realizadas no Google Earth Engine e RStudio, incluíram o teste de Lag para determinar o tempo de resposta da vegetação a eventos de seca. Os resultados indicaram que o SPI na escala de seis meses apresentou a melhor correlação com o NDVI ($r = 0,89$; Lag = 2), sendo o mais indicado para o monitoramento. Esses achados permitem aprimorar o planejamento agrícola e o manejo pecuário, contribuindo para reduzir perdas produtivas e fortalecer a resiliência ante a variabilidade climática.

Termos para indexação: SPI, SPEI, NDVI, cerrado.

Assessment of the relationship between climate indices for drought monitoring in the Paracatu River Basin

Abstract — This study evaluated the relationship between climate indices and vegetation response in the Paracatu River Basin, focusing on identifying drought patterns and their impacts on agriculture and livestock. Precipitation (CHIRPS) and potential evapotranspiration (TerraClimate) data were used to calculate the SPI and SPEI indices on 3-, 6-, 9-, and 12-month scales, and NDVI (MODIS and GIMMS) was used to monitor vegetation cover between 2003 and 2023. The analyses, performed in Google Earth Engine and RStudio, included a Lag test to determine the response time of vegetation to drought events. The results indicated that the 6-month SPI had the best correlation with NDVI ($r = 0.89$; Lag = 2), making it the most suitable for monitoring. These findings allow for improved agricultural planning and livestock management, contributing to reduced production losses and strengthened resilience to climate variability.

Index terms: SPI, SPEI, NDVI, cerrado.

Introdução

Estudos realizados em regiões agrícolas da Europa e dos Estados Unidos mostram que índices climáticos, como o SPI e o SPEI, são eficazes para monitorar a intensidade e a duração de eventos de seca, permitindo compreender melhor os impactos sobre a vegetação e a produção agropecuária (McKey et al., 2012). Ferreira et al. (2019) destacam que pastagens e áreas agrícolas não irrigadas são particularmente sensíveis a essas variações, apresentando correlações significativas entre o vigor da vegetação, medido pelo NDVI, e os índices de déficit hídrico. A Bacia do Rio Paracatu, localizada no Cerrado, é de grande importância para a produção de grãos, café, leite e carne no Brasil. Contudo, enfrenta crescentes conflitos pelo uso da água, os quais se intensificam durante estiagens

prolongadas, quando índices climáticos apontam déficits hídricos persistentes. Pesquisas indicam que o SPEI, por considerar a evapotranspiração potencial, apresenta maior sensibilidade a condições de estresse hídrico do que o SPI, que leva em conta apenas a precipitação (Stagge et al., 2017). Estudos também mostram que há divergências entre SPI e SPEI na detecção de secas, reforçando a importância de análises em múltiplas escalas temporais para avaliar a resposta da vegetação (Baronetti et al., 2024). Nesse contexto, objetivou-se avaliar a relação entre índices climáticos (SPI e SPEI) e o vigor da vegetação (NDVI) na Bacia do Rio Paracatu, com foco na identificação de padrões de seca e seus impactos sobre agricultura e pecuária, subsidiando estratégias de gestão hídrica e mitigação de perdas produtivas.

As informações geradas no presente estudo vão ao encontro dos Objetivos do Desenvolvimento Sustentável (ODS) contidos na Agenda 2030, proposta pela Organização das Nações Unidas, da qual o Brasil é signatário, sobretudo nos seguintes objetivos específicos: ODS 6 - Água limpa e saneamento: Garantir disponibilidade e manejo sustentável da água e saneamento para todos; 12 - Consumo Responsável: Assegurar padrões de produção e de consumo sustentáveis; 13 - Combate às Mudanças Climáticas: Tomar medidas urgentes para combater a mudança climática e seus impactos (Nações Unidas, 2025).

Material e métodos

A área de estudo foi delimitada a partir de dados geoespaciais da Agência Nacional de Águas e Saneamento Básico (2025) e utilizada como máscara para as análises. Dados de precipitação (CHIRPS) e evapotranspiração potencial (TerraClimate) permitiram calcular os índices SPI e SPEI em escalas de 3 a 12 meses, associadas a períodos críticos dos ciclos produtivos. A cobertura vegetal foi analisada por meio do NDVI (MODIS e GIMMS) entre 2003 e 2023. Os índices climáticos foram calculados a partir de dados de precipitação e evapotranspiração potencial (ETp). A precipitação mensal foi obtida do conjunto CHIRPS (Climate Hazards Group InfraRed Precipitation with Station data), com resolução espacial de $0,05^\circ$ (~ 5 km). A ETp foi extraída do conjunto TerraClimate, com resolução de $0,0417^\circ$ (~ 4 km). A cobertura vegetal foi monitorada pelo NDVI, obtido das séries MODIS (1 km, 2003-2023) e GIMMS NDVI3g (~ 8 km). Os índices SPI (Standardized Precipitation Index), SPEI (Standardized Precipitation Evapotranspiration Index) e NDVI (Normalized Difference Vegetation Index) foram calculados em escalas de 3, 6, 9 e 12 meses, de forma a capturar diferentes respostas hidrológicas e fenológicas aos déficits hídricos. Os cálculos seguiram as metodologias originais de McKee et al. (1993) e Vicente-Serrano et al. (2010), com padronização estatística para permitir comparabilidade temporal e espacial. A relação entre variáveis climáticas e resposta da vegetação foi avaliada por meio de correlação cruzada com teste de Lag, permitindo determinar o deslocamento temporal ótimo entre eventos de seca e alterações no NDVI. A significância estatística foi testada ao nível de 5% ($p < 0,05$). Os dados foram processados no Google Earth Engine (GEE) e RStudio, gerando séries temporais. Os índices obtidos foram espacialmente analisados e correlacionados, considerando padrões de seca e estresse hídrico sobre agricultura e pecuária.

Resultados e discussão

A análise das séries temporais revelou variações significativas entre os índices SPI, SPEI e o NDVI para a bacia do rio Paracatu, considerando as escalas de 3, 6, 9 e 12 meses (Figura 1). Em escala de três meses, o SPI apresentou forte correlação negativa com o NDVI ($r = -0,88$; Lag = -4) (Tabela 1), indicando que períodos de déficit hídrico tendem a impactar rapidamente a vegetação, com resposta negativa em até quatro meses. O SPEI, na mesma

escala, mostrou correlação positiva moderada ($r = 0,44$; $\text{Lag} = -1$), sugerindo que, apesar da inclusão da evapotranspiração potencial, sua sensibilidade ao estresse hídrico de curto prazo foi menor que a do SPI. Na escala de 6 meses, observou-se a maior correlação positiva entre os índices, com o SPI registrando $r = 0,89$ ($\text{Lag} = 2$) (Tabela 1). Esse resultado indica que, para períodos médios, o aumento da disponibilidade hídrica se reflete diretamente no vigor da vegetação, corroborando achados de Vicente-Serrano et al. (2013), que destacam a relevância do SPI em escalas intermediárias para monitorar impactos sobre a cobertura vegetal. O SPEI, por sua vez, apresentou correlação positiva fraca ($r = 0,33$; $\text{Lag} = -5$) (Tabela 1), refletindo maior influência de variáveis climáticas adicionais, como temperatura e evapotranspiração. Na escala de nove meses, tanto o SPI ($r = 0,69$; $\text{Lag} = 2$) quanto o SPEI ($r = -0,22$; $\text{Lag} = -2$), como se vê na Tabela 1, evidenciaram que os efeitos das condições hídricas prolongadas sobre a vegetação são mais persistentes quando capturados pelo SPI. Esse comportamento é consistente com estudos que mostram que, em áreas agrícolas do Cerrado, o SPI tende a apresentar maior estabilidade na relação com índices de vegetação, enquanto o SPEI pode sofrer maior variabilidade devido à inclusão da evapotranspiração (Beguería et al., 2014). Por fim, na escala de 12 meses, as correlações foram baixas para ambos os índices na Tabela 1 (SPI: $r = 0,15$; $\text{Lag} = 3$; SPEI: $r = -0,20$; $\text{Lag} = 7$), sugerindo que, em períodos anuais, a resposta do NDVI pode ser influenciada por outros fatores além da disponibilidade hídrica acumulada, como manejo agrícola, uso do solo e condições fenológicas específicas (Huete et al., 2002). De forma geral, os resultados indicam que a escala de seis meses para o SPI apresentou a melhor associação com o NDVI na bacia do rio Paracatu, sendo a mais indicada para o monitoramento de impactos da seca sobre áreas agrícolas e de pastagens. Além disso, a aplicação do teste de Lag permitiu identificar defasagens temporais relevantes, fundamentais para compreender o tempo de resposta da vegetação às condições de estresse hídrico.

Tabela 1. Relação entre índices climáticos e resposta da vegetação com base no teste de Lag na Bacia do Rio Paracatu.

NDVI Escala	Índice	Escala (meses)	Lag ótimo (meses)	Correlação
NDVI13	SPI	3	- 4	- 0.884
NDVI13	SPEI	3	- 1	0.442
NDVI16	SPI	6	2	0.894
NDVI16	SPEI	6	- 5	0.329
NDVI19	SPI	9	2	0.696
NDVI19	SPEI	9	- 2	- 0.226
NDVI12	SPI	12	3	0.15
NDVI12	SPEI	12	7	- 0.206

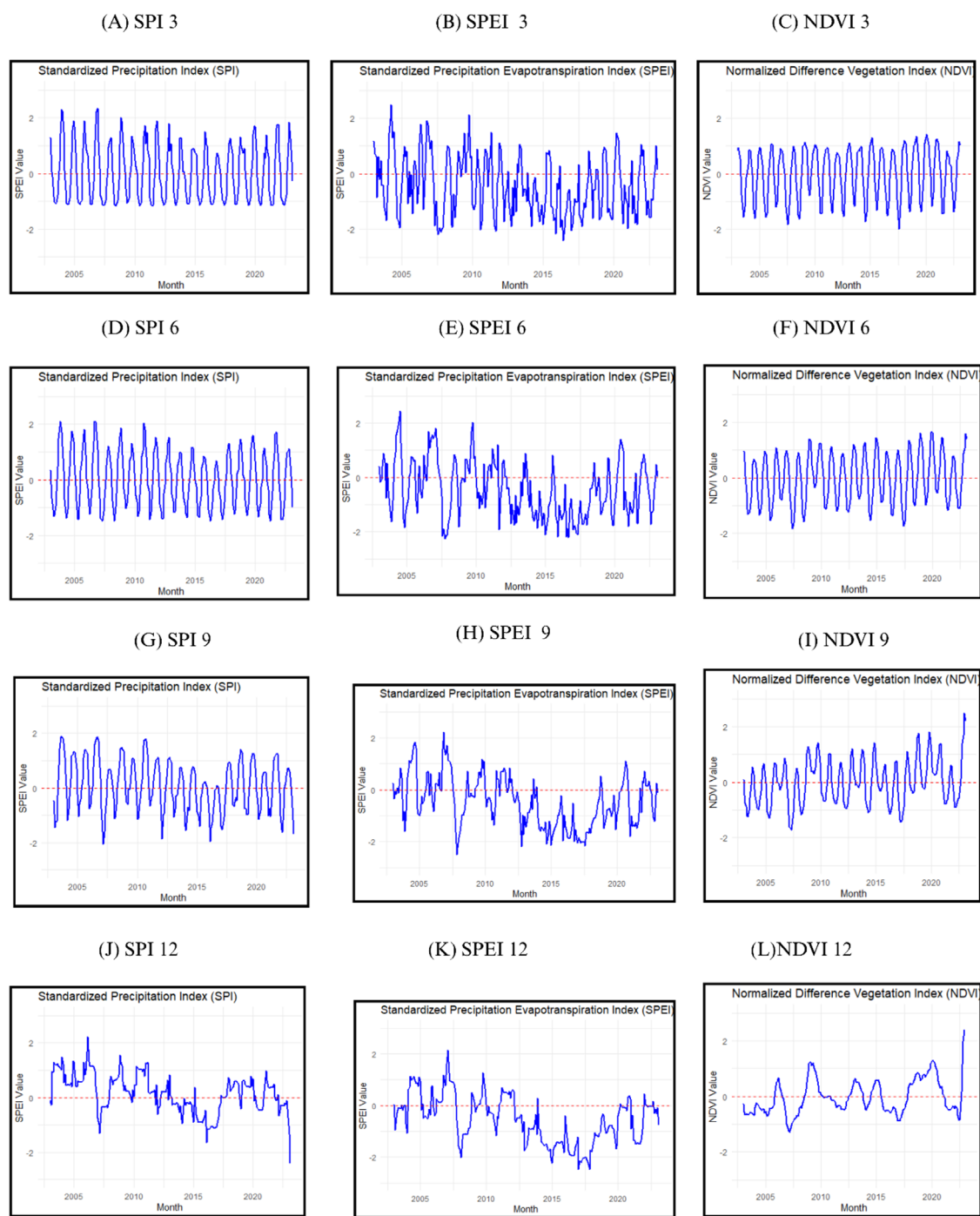


Figura 1. Relação entre índices climáticos e resposta da vegetação com base no teste de Lag na Bacia do Rio Paracatu.

Conclusões

O SPI em escala de seis meses foi o de melhor correlação com o NDVI, sendo o mais indicado para monitorar a seca na bacia do rio Paracatu. A análise de Lag permitiu estimar o tempo de resposta da vegetação ao déficit hídrico, subsidiando ajustes no calendário agrícola, otimização da irrigação e manejo preventivo de pastagens. A integração de índices climáticos e de vegetação mostrou-se eficaz para reduzir perdas produtivas e aumentar a resiliência agropecuária frente a variabilidade climática.

Agradecimentos

Ao apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) – Brasil, pela concessão de bolsa no programa Pibic e à Embrapa Gado de Leite pela oportunidade de treinamento.

Referências

- AGÊNCIA NACIONAL DE ÁGUAS E SANEAMENTO BÁSICO. **Base hidrográfica Ottocodificada**: versão 2025. Brasília, DF, 2025. Disponível em: <https://metadados.ana.gov.br>. Acesso em: 31 jul. 2025.
- BARONETTI, A.; MENICHINI, M.; PROVENZALE, A. Vegetation response to droughts: the case of northern Italy. **International Journal of Climatology**, v. 44, n. 2, p. 501-520, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1002/joc.8340>.
- BEGUERÍA, S.; VICENTE-SERRANO, S. M.; REIG, F.; LATORRE, B. Standardized precipitation evapotranspiration index (SPEI) revisited: parameter fitting, evapotranspiration models, tools, datasets and drought monitoring. **International Journal of Climatology**, v. 34, n. 10, p. 3001-3023, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1002/joc.3887>.
- FERREIRA, J.; PEREZ, R.; SANCHEZ, N.; HERRERA, A.; TORRES, J. A high-resolution spatial assessment of drought variability impacts on vegetation activity in Spain. **Natural Hazards and Earth System Sciences**, v. 19, n. 6, p. 1189-1209, 2019. DOI: <https://doi.org/10.5194/nhess-19-1189-2019>.
- HUETE, A. R.; DIDAN, K.; MIURA, T.; RODRIGUEZ, E. P.; GAO, X.; FERREIRA, L. G. Overview of the radiometric and biophysical performance of the MODIS vegetation indices. **Remote Sensing of Environment**, v. 83, n. 1/2, p. 195-213, 2002. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0034-4257\(02\)00096-2](https://doi.org/10.1016/S0034-4257(02)00096-2).
- MCKEE, T. B.; DOESKEN, N. J.; KLEIST, J. The relationship of drought frequency and duration to time scales. In: CONFERENCE ON APPLIED CLIMATOLOGY, 8., 1993, Anaheim. **Proceedings [...]**. Washington: American Meteorological Society, 1993. p. 179-184.
- MCKEE, T. B.; PIAO, S.; FRANK, D.; DAI, A.; SNYDER, P. K. Response of vegetation to drought time scales across global land biomes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 31, p. 11964-11969, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.1207068110>.
- NAÇÕES UNIDAS. **Os Objetivos de Desenvolvimento Sustentável no Brasil**. Disponível em: <https://brasil.un.org/pt-br/sdgs>. Acesso em: 13 maio 2025.
- STAGGE, J. H.; KINGSTON, D. G.; TALLAKSEN, L. M.; HANNAH, D. M. Observed drought indices show increasing divergence across Europe. **Scientific Reports**, v. 7, article 14045, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-14283-2>.
- VICENTE-SERRANO, S. M.; BEGUERÍA, S.; LÓPEZ-MORENO, J. I. A multiscalar drought index sensitive to global warming: the standardized precipitation evapotranspiration index. **Journal of Climate**, v. 23, n. 7, p. 1696-1718, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1175/2009JCLI2909.1>.
- VICENTE-SERRANO, S. M.; GOUVEIA, C.; CAMARERO, J. J.; SANCHEZ-LOURENZO, A. Response of vegetation to drought time-scales across global land biomes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 1, p. 52-57, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.1207068110>.

Plataforma Web para gestão e monitoramento de tecnologias voltadas à integração Lavoura-Pecuária-Floresta: uma ferramenta para o Núcleo de Intensificação Sustentável da Agropecuária

Enzo Faceroli Marques Moreira⁽¹⁾⁽⁴⁾, Vanessa Maia Aguiar de Magalhães⁽²⁾, Frank Angelo Tomita Bruneli⁽³⁾, Maria Gabriela Campolina Diniz Peixoto⁽³⁾ e Marcelo Dias Müller⁽³⁾

⁽¹⁾Bolsista (Pibic/CNPq), Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG. ⁽²⁾Analista, Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG. ⁽³⁾Pesquisador(a), Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG. ⁽⁴⁾E-mail: enzo.faceroli@gmail.com.

Resumo— Foi desenvolvida uma plataforma web para o Núcleo de Intensificação Sustentável da Agropecuária (NISA), com foco em integração Lavoura-Pecuária-Floresta na região da Mata Atlântica. Foram consideradas quatro etapas de desenvolvimento: (1) a Engenharia de Requisitos definiu colaborativamente as funcionalidades essenciais da plataforma; (2) o Design de Interface e Experiência do Usuário (UI/UX) priorizou a navegabilidade e a conformidade com os padrões da Embrapa; (3) o Desenvolvimento Técnico resultou em um protótipo visual em HTML5 e CSS3; e (4) a Validação confirmou a aderência aos objetivos e a viabilidade de implementação. O protótipo navegável serviu de base para o website final, desenvolvido com o CMS Liferay e implementado pelo setor responsável da Embrapa. A ferramenta digital possibilitou ampliar a visibilidade institucional, a formação de parcerias e a transferência de tecnologias por meio da criação desse canal centralizado de divulgação voltado a produtores rurais, agentes de assistência técnica e extensão rural e à sociedade em geral.

Termos para indexação: comunicação digital, design de interface, prototipagem visual, transferência de tecnologia.

Web Platform for managing and monitoring technologies focused on Crop-Livestock-Forest integration: a tool for the Sustainable Agriculture Intensification Hub

Abstract — A web platform was developed for the Sustainable Agriculture Intensification Hub (NISA), with a focus on Crop-Livestock-Forest integration systems in the Atlantic Forest region. The development process was structured into four stages: (1) Requirements Engineering collaboratively defined the platform's essential functionalities; (2) User Interface and User Experience (UI/UX) Design prioritized navigability and compliance with Embrapa's standards; (3) Technical Development resulted in a visual prototype using HTML5 and CSS3; and (4) Validation confirmed alignment with the objectives and the technical feasibility of implementation. The navigable prototype served as the foundation for the final website, developed with the Liferay CMS and implemented by Embrapa's responsible department. This digital tool enhanced institutional visibility, fostered partnerships, and facilitated technology transfer through the creation of a centralized communication channel aimed at rural producers, technical assistance and rural extension agents, and society at large.

Index terms: digital communication, interface design, technology transfer, visual prototyping.

Introdução

Localizado no Campo Experimental “Santa Mônica” (CESM) da Embrapa Gado de Leite, o Núcleo de Intensificação Sustentável da Agropecuária (NISA) constitui um complexo de dispositivos de pesquisa que abrange tecnologias do programa ABC+ (Agricultura de Baixo Carbono - Plano setorial para adaptação à mudança do clima e baixa emissão de carbono na agropecuária) com o objetivo de ampliar alternativas de sistemas de integração lavoura-pecuária-floresta (iLPF), promovendo a diversificação de atividades, de renda e de provimento de serviços ecossistêmicos do solo em propriedades leiteiras situadas nas áreas montanhosas da Mata Atlântica. O Núcleo atua por meio do desenvolvimento de pesquisas, do fortalecimento de parcerias nacionais e internacionais, do uso compartilhado da infraestrutura, da formação de recursos humanos e das ações de transferência de tecnologia. Apesar da excelência em sua atividade-fim, o NISA foi estabelecido sem uma plataforma de divulgação correspondente. Como uma entidade nova, o Núcleo operava em um vácuo de comunicação digital que, no contexto do século XXI, comprometeu sua visibilidade externa, dificultando o recrutamento de parcerias, a divulgação de resultados, e a transferência de tecnologia. Face a esse cenário, o objetivo do presente trabalho foi desenvolver uma página web institucional para o NISA, com função estratégica de centralizar informações, ampliar o alcance das ações do Núcleo e fortalecer sua missão principal: a disseminação científica voltada à transferência de tecnologias sustentáveis.

As informações geradas no presente estudo vão ao encontro dos Objetivos do Desenvolvimento Sustentável (ODS) contidos na Agenda 2030, proposta pela Organização das Nações Unidas, da qual o Brasil é signatário, sobretudo nos seguintes objetivos específicos: ODS 8 - Empregos dignos e crescimento econômico: Promover o crescimento econômico sustentado, inclusivo e sustentável, emprego pleno e produtivo, e trabalho decente para todos; ODS - 9. Construir infraestruturas resilientes, promover a industrialização inclusiva e sustentável e fomentar a inovação (Nações Unidas, 2025).

Material e métodos

Foi adotada uma abordagem de desenvolvimento sequencial, estruturada em quatro fases principais: (1) Engenharia de Requisitos; (2) Design de Interface e Experiência do Usuário (UI/UX); (3) Desenvolvimento Técnico com Tecnologias Web Padrão; e (4) Entrega do Protótipo (Sommerville, 2011).

1. Engenharia de Requisitos:

A fase inicial do projeto foi dedicada à Engenharia de Requisitos, composta por três atividades fundamentais: a elicitación e análise de requisitos por meio da interação com os stakeholders; a especificação dos requisitos em formato padrão; e a validação, que assegurou que os requisitos refletissem os serviços esperados e as restrições operacionais do sistema. Com o apoio da equipe do NISA, foram levantados os seguintes requisitos funcionais (RF):

RF1. Página inicial com descrição do NISA, áreas de atuação, botões de navegação e linha do tempo do Núcleo;

RF2. Página com apresentação de todos os projetos do Núcleo;

RF3. Página individual para cada projeto, contendo nome, data de início, responsável e descrição;

RF4. Página dedicada ao CESM, com introdução, linha do tempo e galeria de fotos;

RF5. Página com publicações relacionadas ao Núcleo, acessíveis via biblioteca da Embrapa;

RF6. Página com os membros envolvidos e links para seus perfis institucionais;

RF7. Página com informações de contato do Núcleo (telefone e e-mail);

RF8. Página com as instituições parceiras do NISA.

2. Design de Interface e Experiência do Usuário (UI/UX):

Após a definição dos requisitos, desenvolveu-se o design das interfaces e da experiência do usuário, com base nos princípios da Interação Humano-Computador (Barbosa; Silva, 2010). Priorizou-se a criação de uma interface intuitiva, alinhada aos padrões visuais da Embrapa e às limitações do sistema de gerenciamento de conteúdo (CMS) utilizado pelo setor de Transferência de Tecnologia da empresa.

3. Desenvolvimento Técnico com Tecnologias Web Padrão:

A terceira fase consistiu na codificação do protótipo visual, utilizando tecnologias fundamentais da web: HTML5 e CSS3.

- HTML5 (HyperText Markup Language 5): Conforme a MDN Web Docs (2025), o HTML define a estrutura do conteúdo por meio de elementos de marcação, as tags semânticas. Neste projeto, empregaram-se elementos como `<main>` e `<section>` para estruturar o layout, `<ul>` e `<li>` para listas, e a tag não semântica `<div>` para agrupamentos visuais.

- CSS3 (Cascading Style Sheets): Foi utilizado para estilização visual. Iniciou-se com um Reset CSS para normalizar estilos entre navegadores. Na sequência, foram definidas variáveis CSS, no escopo global: root, centralizando a gestão de cores, margens e tamanhos. O layout foi estruturado com o módulo Flexbox, além do uso da propriedade position e pseudo-elementos de sobreposições complexas.

Nenhuma tecnologia de banco de dados e nem linguagens back-end foram empregadas, alinhando-se ao objetivo de entregar um protótipo puramente estrutural e visual.

4. Entrega do Protótipo:

Decorridas as etapas de desenvolvimento, o protótipo foi entregue à equipe do NISA para fins de avaliação interna.

Resultados e discussão

O protótipo navegável foi apresentado à equipe do NISA, que validou sua estrutura e funcionalidades conforme os requisitos previamente definidos. Posteriormente, o material (arquivos .HTML e .CSS) e o website final foram entregues ao setor de Transferência de Tecnologia da Embrapa Gado de Leite, que serviram como alicerce visual e estrutural para a implementação do site oficial (Embrapa, 2025), desenvolvido sobre a plataforma CMS Liferay. A análise comparativa (Figuras 1 e 2) revela que, apesar de divergências visuais pontuais, houve total aderência aos requisitos funcionais.



Figura 1. (A).Implementação do RF1 no website público; (B) no protótipo.



Figura 2. (A).Implementação do RF2 no website público; (B) no protótipo.

Ajustes foram necessários para adequação ao padrão visual corporativo da Embrapa. Ainda assim, a estruturação semântica com HTML5 permitiu organizar o conteúdo de forma lógica e hierárquica, facilitando a navegação e a compreensão por parte dos usuários. A aplicação de CSS3, com uso de Reset CSS e variáveis globais, garantiu consistência visual e simplificou a manutenção do estilo. O uso do módulo Flexbox contribuiu para o alinhamento eficiente dos elementos, enquanto técnicas como position e pseudo-elementos possibilitaram sobreposições visuais mais complexas. Enfim, o protótipo atendeu ao que se esperava como prova de conceito tangível, validando o design e a experiência de usuário, mitigando riscos e servindo como uma ponte de comunicação entre as equipes de pesquisa e transferência de tecnologia, alinhada às necessidades estratégicas do NISA.

Conclusões

A plataforma web foi desenvolvida com êxito e solucionou a carência de comunicação digital do NISA. A criação de um protótipo funcional, orientada por requisitos bem definidos, foi decisiva para a implementação do site oficial pela Embrapa. A nova interface superou a invisibilidade institucional do Núcleo, consolidando-se como um recurso estratégico para a divulgação científica, a transferência de tecnologias sustentáveis e o engajamento com produtores, pesquisadores e potenciais parceiros. Conclui-se que o projeto entregou um ativo essencial de comunicação, que fortalece a missão do NISA e amplia o alcance de suas contribuições para a agropecuária sustentável. A plataforma tende a se consolidar como o principal instrumento para o recrutamento de novos colaboradores, para a captação de recursos e a promoção gratuita e acessível de alternativas de sistemas de iLPF junto aos diferentes públicos de interesse.

Agradecimentos

Ao apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) – Brasil, pela concessão de bolsa no programa Pibic e à Rede iLPF, pelo aporte financeiro.

Referências

- BARBOSA, S. D. J.; SILVA, B. S. da. **Interação humano-computador**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010. 560 p.
- EMBRAPA. **Núcleo de Intensificação Sustentável da Agropecuária (NISA)**. Disponível em: <https://www.embrapa.br/gado-de-leite/infraestrutura/nisa>. Acesso em: 13 mar. 2025.
- NAÇÕES UNIDAS. **Os Objetivos de Desenvolvimento Sustentável no Brasil**. Disponível em: <https://brasil.un.org/pt-br/sdgs>. Acesso em: 13 maio 2025.
- SOMMERVILLE, I. **Engenharia de software**. 9. ed. São Paulo: Pearson Education, 2011. 552 p.

Efeitos da suplementação com diferentes concentrações de nitrato de cálcio na dieta de bovinos em recria sobre os parâmetros hematológicos e na meta-hemoglobina

Larissa Kirchmeyer Vianelo de Oliveira⁽¹⁾⁽⁵⁾, Mariana Gomes Barbosa⁽²⁾, Alina Vaz das Graças⁽¹⁾, Anaclara Romano Schimitz⁽¹⁾, Hugo Rezende Furtado⁽³⁾, Julia dos Santos Silva⁽¹⁾, Lays Meirelles Trindade⁽²⁾ e Thierry Ribeiro Tomich⁽⁴⁾

⁽¹⁾Bolsista (Pibic/CNPq), Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG. ⁽²⁾Estagiário(a), Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG. ⁽³⁾Bolsista (Faperj), Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG. ⁽⁴⁾Pesquisador, Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG. ⁽⁵⁾E-mail: larissa_vianelo@hotmail.com.

Resumo — Este estudo avaliou os efeitos hematológicos do aditivo nitrato de cálcio em bovinos. Vinte e seis novilhos foram submetidos a quatro níveis de inclusão (0%; 2,5%; 5% e 10%) do suplemento durante 88 dias. Foram analisados hemograma, leucograma, plaquetas e meta-hemoglobina. Observou-se aumento de leucócitos totais e volume plaquetário médio com doses crescentes, sugerindo efeitos sobre os sistemas imunológico e hemostático. Não houve alterações nos índices eritrocitários nem nos níveis de meta-hemoglobina. Conclui-se que o nitrato de cálcio é seguro do ponto de vista hematológico e pode promover respostas fisiológicas adaptativas nos níveis testados.

Termos para indexação: metano entérico, toxicidade por nitrato, aditivos nutricionais bovinos, efeitos hematotóxicos de aditivos, biomarcadores hematológicos.

Effects of supplementation of different concentrations of calcium nitrate in the diet of beef cattle in rearing on hematological parameters and methemoglobin

Abstract — This study evaluated the hematological effects of the additive calcium nitrate in beef cattle. Twenty-six steers were submitted to four supplement levels (0%, 2.5%, 5%, and 10%) for 88 days. Complete blood count, white blood cell count, platelet count, and methemoglobin levels were analyzed. Increases in total leukocytes and mean platelet volume were observed with increasing doses, suggesting effects on the immune and hemostatic systems. There were no changes in erythrocyte indices or methemoglobin levels. The conclusion is that calcium nitrate is safe from a hematological perspective and can promote adaptive physiological responses at the levels tested.

Index terms: enteric methane, nitrate toxicity, bovine nutritional additives, hematotoxic effects of additives, hematological biomarkers.

Introdução

A busca por maior eficiência e sustentabilidade na bovinocultura tem incentivado o uso de aditivos alimentares, especialmente os que modulam o metabolismo ruminal e reduzem a produção de metano entérico (Beauchemin et al., 2008). O uso de sais nitrogenados, como o nitrato de cálcio, altera o metabolismo ruminal, entretanto, há preocupações toxicológicas, principalmente pela formação de meta-hemoglobina, que compromete o transporte de oxigênio (Qin et al., 2015).

Com base nessas premissas, o presente trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos hematológicos do aditivo nitrato de cálcio na dieta de bovinos, com foco em indicadores de função eritrocitária, atividade leucocitária, parâmetros plaquetários e níveis de meta-hemoglobina, visando verificar sua segurança e potenciais efeitos fisiológicos.

As informações geradas no presente estudo vão ao encontro dos Objetivos do Desenvolvimento Sustentável (ODS) contidos na Agenda 2030, proposta pela Organização das Nações Unidas, da qual o Brasil é signatário, sobretudo nos seguintes objetivos específicos: ODS 13 - Combate às Mudanças Climáticas: Tomar medidas urgentes para combater a mudança climática e seus impactos (Nações Unidas, 2025).

Material e métodos

O experimento foi realizado no Campo Experimental José Henrique Bruschi, da Embrapa Gado de Leite, em Coronel Pacheco (MG), no Laboratório Multiusuário de Bioeficiência e Sustentabilidade da Pecuária. Os procedimentos envolvendo animais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Embrapa Gado de Leite, processo nº 3.795.129.424. Foram utilizados 26 novilhos Nelore castrados (14 meses, $360 \pm 28,79$ kg) durante 88 dias. Os animais foram distribuídos em quatro tratamentos (níveis de inclusão do aditivo: 0%; 2,5%; 5% e 10%) segundo o delineamento inteiramente casualizado. A fonte de nitrogênio não proteico (NNP) foi parcialmente substituída por nitrato de cálcio, em dieta simulando o período seco, com feno de tifton (5,41% de proteína bruta) e suplementação de 0,5% do peso vivo.

Coletas de sangue foram realizadas 1h30min e 3h após a suplementação; os tubos com EDTA foram envolvidos em papel alumínio para protegê-los da incidência de luz para análise de meta-hemoglobina por espectrofotometria UV/VIS.

Também foram realizadas análises hematológicas (leucócitos totais, linfócitos, monócitos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos, hemácias, hemoglobina, hematócrito, volume corpuscular médio, hemoglobina corpuscular média, amplitude de distribuição eritrocitária, plaquetas e volume plaquetário médio), a partir de amostras coletadas em tubos com EDTA. A análise foi realizada no equipamento MHLab (BH-5100).

As análises estatísticas foram conduzidas por meio do PROC MIXED do SAS. Para contrastes lineares e quadráticos dos tratamentos, empregou-se o PROC IML com a função ORPOL, adotando-se nível de significância de 0,05.

Resultados e discussão

A análise hematológica indicou que a suplementação com nitrato de cálcio promoveu alterações significativas em parâmetros do leucograma (Tabela 1). Houve efeito linear ($p = 0,037$) sobre o número total de leucócitos, com aumento no grupo com 10% de inclusão ($18,3 \times 10^9/L$), sugerindo ativação imunológica ou estímulo hematopoiético. As contagens diferenciais de leucócitos (linfócitos, monócitos, neutrófilos, eosinófilos e basófilos), tanto em valores absolutos quanto percentuais, apresentaram, em sua maioria, estabilidade ($p > 0,05$). No entanto, foram observadas diferenças significativas nas contagens de monócitos ($p = 0,024$) e neutrófilos ($p = 0,047$), sugerindo alterações específicas na resposta imune.

Tabela 1. Parâmetros hematológicos e meta-hemoglobina de novilhos Nelore submetidos a suplementação com níveis crescentes de nitrato de cálcio.

Variável	Tratamentos				EPM ⁽¹⁾	Valor-P	
	0	2,5	5	10		Linear	Quadrático
Leucócitos ($\times 10^9$ g/L)	14,1	13,7	14,8	18,3	1,58	0,037	0,353
Linfócitos (%)	62,8	62,2	64,5	60,3	3,37	0,616	0,560
Monócitos (%)	4,94	5,03	5,12	5,12	0,35	0,712	0,833

Continua...

Continuação.

Variável	Tratamentos				EPM ⁽¹⁾	Valor-P	
	0	2,5	5	10		Linear	Quadrático
Neutrófilos (%)	30,2	30,0	29,3	33,4	3,50	0,484	0,573
Eosinófilos (%)	1,96	0,92	1,06	1,15	0,69	0,525	0,381
Basófilos (%)	0,10	0,10	0,06	0,08	0,03	0,557	0,673
Linfócitos # (x 10 ⁹ /L)	9,0	8,4	9,5	10,9	1,02	0,108	0,526
Monócitos # (x 10 ⁹ /L)	0,70	0,66	0,75	0,93	0,08	0,024	0,377
Neutrófilos # (x 10 ⁹ /L)	4,16	4,49	4,33	6,32	0,78	0,047	0,395
Eosinófilos # (x 10 ⁹ /L)	0,28	0,12	0,17	0,19	0,10	0,690	0,362
Basófilos # (x 10 ⁹ /L)	0,01	0,01	0,01	0,01	0,00	0,928	0,618
Hemácias (x 10 ¹² /L)	8,56	8,28	8,12	8,70	0,43	0,730	0,302
Hemoglobina (g/dL)	11,1	10,8	11,1	11,7	0,53	0,302	0,499
Hematócrito (%)	28,6	27,9	28,5	30,6	1,39	0,217	0,445
Volume Corpuscular Médio (fL)	33,5	33,8	35,4	35,2	0,81	0,093	0,376
Hemoglobina Corpuscular Média (pg)	12,9	13,0	13,6	13,4	0,35	0,257	0,404
Concentração de Hemoglobina Corpuscular média (g/dL)	38,8	38,7	38,6	38,3	0,38	0,320	0,905
Largura de Distribuição dos Glóbulos Vermelhos – CV %	20,1	20,8	20,4	20,3	0,49	0,953	0,413
Plaquetas (x 10 ⁹ /L)	184	195	159	114	36,1	0,103	0,660
Volume Plaquetário Médio (fL)	6,58	6,57	7,02	7,25	0,20	0,008	0,958
Meta-hemoglobina (%)	0,54	0,58	0,46	0,54	0,08	0,825	0,562

⁽¹⁾ Erro Padrão da Média

No hemograma, as variáveis hemoglobina (HGB), hematócrito (HCT), volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) também não apresentaram alterações significativas ($p > 0,05$), demonstrando que a capacidade de transporte de oxigênio e o perfil eritrocitário foram mantidos, independentemente do nível de suplementação.

Observou-se efeito linear para o volume plaquetário médio (VPM; $p = 0,008$), que aumentou de 6,58 fL para 7,25 fL no grupo com 10% do aditivo, indicando possível ativação ou renovação plaquetária. Já a contagem total de plaquetas (PLQ) não apresentou diferença significativa ($p = 0,103$), sugerindo manutenção do número de plaquetas circulantes.

No que se refere à meta-hemoglobina, não foram observadas diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos. Isso indica que a suplementação com nitrato de cálcio não comprometeu a oxigenação tecidual, uma vez que o acúmulo de meta-hemoglobina, uma forma oxidada da hemoglobina incapaz de transportar oxigênio, permaneceu dentro dos limites fisiológicos e sem tendência de acúmulo.

De forma geral, os resultados demonstram que a suplementação não promoveu alterações adversas nos parâmetros hematológicos avaliados, com exceção de respostas específicas relacionadas à leucocitose e ao aumento do volume plaquetário médio nos níveis testados.

Conclusões

A suplementação com diferentes níveis de nitrato de cálcio promoveu alterações em parâmetros hematológicos específicos, como o aumento linear no número total de leucócitos e no volume plaquetário médio, sem provocar mudanças relevantes nos índices eritrocitários ou nos níveis de meta-hemoglobina. Dessa forma, o uso do aditivo, nos níveis estudados, é seguro sob os aspectos hematológicos considerando.

Agradecimentos

Ao apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) - Brasil, pela concessão de bolsa Pibic. Aos pesquisadores Mariana Magalhães Campos e Thierry Ribeiro Tomich e à mestranda Mariana Barbosa pela oportunidade de aprendizagem e pelos ensinamentos passados durante a realização do experimento. Aos amigos que fiz nessa jornada, incluindo todos os funcionários da Embrapa Gado de Leite, sempre solícitos e atenciosos.

Referências

BEAUCHEMIN, K. A.; KREUZER, M.; O'MARA, F.; MCALLISTER, T. A. Nutritional management for enteric methane abatement: a review. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v. 48, n. 2, p. 21-27, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1071/EA07199>.

NAÇÕES UNIDAS. **Objetivo de Desenvolvimento Sustentável 13**: Ação contra a mudança global do clima. Disponível em: <https://brasil.un.org/pt-br/sdgs/13>. Acesso em: 13 maio 2025.

QIN, W.; ZHANG, X.; YANG, L.; XU, L.; ZHANG, Z.; WU, J.; WANG, W. Microcystin-LR altered mRNA and protein expression of endoplasmic reticulum stress signaling molecules related to hepatic lipid metabolism abnormalities in mice. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 40, n. 1, p. 114-121, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.etap.2015.05.002>.

Níveis de suplementação com nitrato de cálcio para mitigação do metano entérico e os efeitos no consumo e no desempenho de novilhos

Anaclara Romano Schmitz Loures⁽¹⁾⁽⁵⁾, Mariana Gomes Barbosa⁽²⁾, Alina Vaz das Graças⁽¹⁾, Laura Alice Jesus Silva⁽²⁾, Sabrina Evelin Ferreira⁽²⁾, Larissa Kirchmeyer Vianelo de Oliveira⁽¹⁾, Hugo Rezende Furtado⁽³⁾ e Fernanda Samarini Machado⁽⁸⁾

⁽¹⁾Bolsista (Pibic/CNPq), Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG. ⁽²⁾Estagiária, Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG. ⁽³⁾Bolsista (Faperj), Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG. ⁽⁴⁾Pesquisadora, Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG. ⁽⁵⁾E-mail: anaclararoures@gmail.com.

Resumo — O presente estudo avaliou os efeitos da suplementação com diferentes níveis de nitrato de cálcio sobre o consumo e desempenho de novilhos castrados. Foram utilizados 26 animais distribuídos em delineamento inteiramente casualizado, com quatro tratamentos: 0%, 2,5%, 5% e 10% de inclusão de nitrato de cálcio no suplemento, fornecido a 0,5% do peso vivo. A dieta foi composta por feno de tifton de baixa qualidade e suplemento proteico. A inclusão do aditivo não influenciou o consumo de matéria seca (CMS) do feno, nem o CMS total. No entanto, observou-se efeito quadrático sobre o consumo de suplemento ($P = 0,0122$), com redução no nível mais elevado, e efeito linear na ingestão relativa do suplemento ($P = 0,0102$). Não houve efeito significativo sobre o ganho médio diário. Conclui-se que, apesar da redução no consumo do suplemento no maior nível de nitrato de cálcio, não houve prejuízo ao desempenho dos novilhos.

Termos para indexação: estratégias nutricionais, suplemento, dieta.

Effects of calcium nitrate supplementation on feed intake and performance of beef steers

Abstract — The present study evaluated the effects of supplementation with different levels of calcium nitrate on dry matter intake and performance of castrated steers. Twenty-six animals were used in a completely randomized design with four treatments: 0%, 2.5%, 5%, and 10% inclusion of calcium nitrate in the supplement, provided at 0.5% of body weight. The diet consisted of low-quality tifton hay and a protein supplement. The inclusion of the additive did not affect hay dry matter intake (DMI) or total DMI. However, a quadratic effect was observed for supplement DMI ($P = 0.0122$), with reduced intake at the highest inclusion level, and a linear effect for supplement intake as a percentage of total DMI ($P = 0.0102$). No significant effect was observed on average daily gain. It is concluded that, although supplement intake decreased at the highest calcium nitrate level, there was no negative impact on animal performance.

Index terms: nutritional strategies, supplement, diet.

Introdução

O efeito estufa tem se intensificado devido ao aumento das emissões de gases na atmosfera, como metano (CH_4), dióxido de carbono (CO_2) e óxido nitroso (N_2O) (Richter et al., 2021). Nesse contexto, a pecuária é frequentemente criticada por emitir grandes quantidades de gases de efeito estufa (GEE), especialmente o metano, que é naturalmente produzido pelos ruminantes durante o processo de fermentação ruminal. Segundo Machado et al. (2011), cerca de 85 a 90% do metano produzido pelos ruminantes tem origem na fermentação entérica, sendo o restante proveniente dos dejetos.

A modificação da fermentação ruminal torna possível a redução da produção de metano, por meio da alteração dos tipos de carboidratos na dieta, da suplementação com lipídeos e da manipulação da microbiota ruminal com o uso de aditivos alimentares ou compostos naturalmente presentes nos alimentos (Mohammed et al., 2004). A manipulação dos prótons H^+ no rúmen é considerada uma das principais estratégias para o controle da emissão de metano, buscando-se reduzir sua produção, estimular sua utilização em vias alternativas de fermentação e inibir a atividade das archaeas metanogênicas (Machado et al., 2011).

Diante desse cenário, o presente estudo teve como objetivo avaliar diferentes níveis de suplementação com nitrato de cálcio para mitigação do metano entérico e os efeitos no consumo e no desempenho de novilhos.

As informações geradas no presente estudo vão ao encontro dos Objetivos do Desenvolvimento Sustentável (ODS) contidos na Agenda 2030, proposta pela Organização das Nações Unidas, da qual o Brasil é signatário, sobretudo no seguinte objetivo específico: ODS 8 - Empregos dignos e crescimento econômico: Promover o crescimento econômico sustentado, inclusivo e sustentável, emprego pleno e produtivo, e trabalho decente para todos (Nações Unidas, 2025).

Material e métodos

Os procedimentos envolvendo animais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Embrapa Gado de Leite sob o número 3.795.129.424. O experimento foi conduzido no Laboratório Multiusuário de Bioeficiência e Sustentabilidade da Pecuária, localizado no Campo Experimental José Henrique Bruschi, da Embrapa Gado de Leite, em Coronel Pacheco, MG.

Foram utilizados 26 novilhos castrados da raça Nelore, com idade média de 14 meses e peso corporal inicial de $360 \pm 28,79$ kg por um período de 88 dias. O delineamento experimental adotado foi inteiramente casualizado, com quatro tratamentos distintos: grupo 1 – suplemento sem adição do aditivo; grupo 2 – suplemento contendo 2,5% do aditivo; grupo 3 – suplemento com 5% do aditivo; e grupo 4 – suplemento com 10% do aditivo. O aditivo, à base de nitrato de cálcio, foi incluído no suplemento em substituição parcial à fonte de nitrogênio não proteico (NNP) utilizada no tratamento controle. A dieta utilizada simulava as condições do período seco, sendo composta por feno de tifton de baixa qualidade (5,41% de proteína bruta) e suplemento proteico fornecido na proporção de 0,5% do peso vivo.

O feno era pesado e fornecido diariamente, permitindo-se sobras de 5 a 10%. O fornecimento do feno foi fracionado ao longo do dia, dividido em três refeições. O suplemento era oferecido separadamente em cochos individuais, todos os dias, às 11 horas da manhã. Tanto a quantidade fornecida quanto as sobras foram pesadas diariamente para o cálculo do consumo voluntário. Os animais foram pesados semanalmente, sempre no mesmo horário, antes do fornecimento dos alimentos, para o monitoramento do desempenho ao longo do período experimental.

Os dados foram analisados por meio do PROC MIXED do SAS, segundo delineamento inteiramente casualizado com peso vivo inicial como covariável. Os níveis de contrastes para tratamentos foram corrigidos por meio do PROC IML, função ORPOL, sendo realizados contrastes dos efeitos de ordem linear e quadrática dos níveis de nitrato de cálcio. O valor de significância adotado foi de 0,05.

Resultados e discussão

Os resultados indicam que a inclusão de diferentes níveis de nitrato de cálcio na dieta não influenciou o consumo de matéria seca (CMS) do feno e o CMS total (Tabela 1). No entanto, o CMS do suplemento foi afetado pelos níveis do aditivo, apresentando efeito quadrático ($P = 0,0122$), com redução do consumo no nível de 10% de inclusão de nitrato de cálcio.

Tabela 1. Consumo e desempenho de novilhos Nelore castrados suplementados com níveis crescentes de nitrato de cálcio.

Ítems	Tratamentos				EPM ⁽⁷⁾	Valor-P	
	0	2,5	5	10		Linear	Quadrático
CMSf ⁽¹⁾	5,1554	4,5793	5,2579	4,9915	0,2424	0,9009	0,8274
CMSs ⁽²⁾	1,8734	1,8214	1,8809	1,5824	0,0383	<0,0001	0,0122
CMS ⁽³⁾	6,1525	5,6051	6,2483	5,7510	0,2255	0,4825	0,8369
CMSpv ⁽⁴⁾	16,2201	14,8279	16,2035	15,0437	0,5436	0,3210	0,9789
MSis ⁽⁵⁾	0,2757	0,2959	0,2719	0,2487	0,0102	0,0170	0,1573
GMD ⁽⁶⁾	0,2749	0,2816	0,3455	0,2951	0,0466	0,6727	0,4072

⁽¹⁾ Consumo de matéria seca de feno (kg); ⁽²⁾ CMSs: Consumo de matéria seca de suplemento (kg); ⁽³⁾ CMS: Consumo total de matéria seca (kg); ⁽⁴⁾ CMSpv: Consumo em g/kg de peso vivo de matéria seca; ⁽⁵⁾ MSis: Matéria seca ingerida de suplemento (%); ⁽⁶⁾ GMD: Ganho médio diário (kg/dia); ⁽⁷⁾ Erro padrão médio.

Além disso, observou-se efeito linear ($P = 0,0102$) na ingestão de matéria seca do suplemento expressa em percentual da matéria seca ingerida, sendo a menor ingestão observada também no grupo com 10% de inclusão. Esses resultados sugerem que níveis mais elevados de nitrato de cálcio podem comprometer o consumo do suplemento.

Não foram observados efeitos significativos do CMS em relação ao peso vivo, nem diferenças no ganho de peso dos animais entre os tratamentos (Tabela 1). Isso indica que, embora o consumo do suplemento tenha sido reduzido nos níveis mais elevados de inclusão do aditivo, essa redução não foi suficiente para impactar negativamente o desempenho dos novilhos durante o período experimental.

Conclusões

A suplementação com diferentes níveis de nitrato de cálcio não influenciou o consumo de matéria seca do feno e matéria seca total, mas influenciou o consumo de matéria seca do suplemento. Não houve efeito da suplementação com os diferentes tratamentos no ganho de peso diário dos animais. Logo, a adição de nitrato de cálcio apesar de influenciar negativamente o consumo de suplemento, não influenciou o consumo de matéria seca nem o desempenho dos animais, nos níveis estudados.

Agradecimentos

Ao apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) - Brasil, pela concessão de bolsa Pibic. Às pesquisadoras Mariana Magalhães Campos e Fernanda Samarini Machado, à mestrandia Mariana Barbosa, aos meus amigos de iniciação científica e a todos os funcionários da Embrapa Gado de Leite pelo apoio.

Referências

MACHADO, F. S.; PEREIRA, L. G. R.; GUIMARÃES JÚNIOR, R.; LOPES, F. C. F.; CHAVES, A. V.; CAMPOS, M. M.; MORENZ, M. J. F. **Emissões de metano na pecuária**: conceitos, métodos de avaliação e estratégias de mitigação. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2011. 92 p. (Embrapa Gado de Leite. Documentos, 147). Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/895247/1/Doc147Emissoesmetano.pdf>. Acesso em: 14 maio 2025.

MOHAMMED, N.; ONODERA, R.; ITABASHI, H.; LILLA, Z. A. Effects of ionophores, vitamin B6 and distiller's grains on in vitro tryptophan biosynthesis from indolepyruvic acid, and production of other related compounds by ruminal bacteria and protozoa. **Animal Feed Science and Technology**, v.116, n. 3/4, p. 301-311, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2004.07.017>.

NAÇÕES UNIDAS. **Objetivo de Desenvolvimento Sustentável 8**: Trabalho decente e crescimento econômico. Disponível em: <https://brasil.un.org/pt-br/sdgs/8> . Acesso em: 13 maio 2025.

RICHTER, M. F.; LARA, D. M. D.; ANDREAZZA, R. de C. L. Educação Ambiental e Gases do Efeito Estufa (GEE): uma abordagem do papel do metano para educação básica. **Revista Brasileira de Educação Ambiental**, v. 16, n. 5, p. 431-445, 2021. DOI: <https://doi.org/10.34024/REVB EA.2021.V16.12400>.

Efeitos da suplementação com nitrato de cálcio sobre os parâmetros ruminais de novilhos em recria

Alina Vaz das Graças⁽¹⁾⁽⁴⁾, Mariana Gomes Barbosa⁽²⁾, Larissa Kirchmeyer Vianelo de Oliveira⁽²⁾, Anaclara Romano Schimitz⁽²⁾, Ana Luiza Guimarães André⁽²⁾, Mariana Garcia Martins⁽²⁾ e Mariana Magalhães Campos⁽³⁾

⁽¹⁾Bolsista (Pibic/CNPq), Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG. ⁽²⁾Estagiária, Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG. ⁽³⁾Pesquisadora, Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG. ⁽⁴⁾E-mail: vazdasgracasalina@gmail.com.

Resumo — O uso de aditivos na alimentação de ruminantes tem sido uma das estratégias propostas para reduzir a emissão de metano entérico e, assim, mitigar os impactos ambientais da pecuária. Avaliou-se os efeitos da suplementação com aditivo à base de nitrato de cálcio, em diferentes níveis de inclusão (0; 2,5; 5,0; e 10,0%) sobre os parâmetros ruminais de novilhos Nelore. Utilizou-se 26 animais alimentados com feno de baixa qualidade (5,41% de proteína bruta), simulando o período seco do ano, e suplemento contendo doses crescentes de nitrato de cálcio. Foram avaliadas as concentrações de acetato, butirato, propionato, relação acetato: propionato e nitrogênio amoniacal (N-NH₃). Os dados foram analisados por meio do PROC MIXED do SAS. A suplementação não influenciou significativamente o N-NH₃, e as concentrações de acetato e propionato. No entanto, observou-se efeito linear na relação acetato: propionato ($p = 0,009$) e tendência de efeito quadrático para a concentração de butirato ($p = 0,057$), sugerindo alterações no perfil fermentativo ruminal. Conclui-se que a suplementação com nitrato de cálcio pode alterar discretamente o padrão de fermentação ruminal.

Termos para indexação: bovinos, fermentação ruminal, metano.

Effects of supplementation with calcium nitrite additive, at different levels, on ruminal parameters in beef cattle during rearing

Abstract — The use of additives in ruminant feed has been one of the strategies proposed to reduce enteric methane emissions and thus mitigate the environmental impacts of livestock farming. The effects of calcium nitrate supplementation at different inclusion levels (0, 2.5, 5.0, and 10.0%) on the ruminal parameters of Nelore steers were evaluated. Twenty-six animals were fed low-quality hay (5.41% crude protein), simulating the dry season, and a supplement with increasing doses of calcium nitrate. The concentrations of acetate, butyrate, propionate, acetate:propionate ratio, and ammoniacal nitrogen (NH₃-N) were evaluated. Data were analyzed using SAS PROC MIXED program. Supplementation did not significantly influence NH₃-N, acetate and propionate concentrations. However, a linear effect was observed in the acetate:propionate ratio ($p = 0.009$) and a tendency towards a quadratic effect for butyrate concentration ($p = 0.057$), suggesting changes in the ruminal fermentation profile. It is concluded that calcium nitrate supplementation can slightly alter the ruminal fermentation pattern.

Index terms: bovine cattle, ruminal fermentation, methane.

Introdução

Estima-se que até 2.080 o planeta conte com aproximadamente 10,3 bilhões de pessoas, um crescimento de 2,1 bilhões de pessoas quando comparado ao ano de 2024 (Grayley, 2025). Com isso, surge a preocupação sobre como produzir a quantidade necessária de alimento para todas essas pessoas sem degradar ainda mais o meio ambiente. Esse desafio

também tem sido associado à criação de estratégias que reduzam as emissões de gases de efeito estufa (GEE).

Em 2024 foram abatidos 39,27 milhões de cabeças de bovinos, um aumento de 15,2% quando comparado a 2023 (IBGE, 2025). Diante desses números, a pecuária tem sido apontada como uma das atividades que mais contribuem para o aquecimento global por meio da emissão de metano, resultado da fermentação entérica.

A produção de metano pelos ruminantes ocorre durante o processo de digestão dos alimentos, em que os carboidratos são degradados pelos microrganismos presentes no rúmen e transformados em ácidos graxos de cadeia curta, utilizados como fonte de energia. Nesse processo, também ocorre a produção de dióxido de carbono (CO₂) e metano (CH₄), importantes GEE (Mombach et al., 2016). O metano tem 25 vezes mais potencial de intensificar o efeito estufa do que o CO₂ e, além disso, gera perdas econômicas para a produção animal, uma vez que 6 a 18% da energia bruta é perdida durante o processo de fermentação (Johnson et al., 1990; Van Soest; Demeyer, 1996; Pedreira; Primavesi, 2006).

Nesse cenário, várias estratégias têm sido adotadas para mitigar a produção de CH₄ entérico em bovinos, visando contribuir para a redução de GEE e minimizar seus efeitos sobre as mudanças climáticas. Essas estratégias envolvem: uso de aditivos, melhoria na qualidade da forragem, manipulação da microbiota ruminal e seleção de animais com menor emissão de CH₄. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da suplementação com aditivo à base de nitrato de cálcio em diferentes níveis na dieta sobre os parâmetros ruminais de novilhos Nelore na fase de recria.

As informações geradas no presente estudo vão ao encontro dos Objetivos do Desenvolvimento Sustentável (ODS) contidos na Agenda 2030, proposta pela Organização das Nações Unidas, da qual o Brasil é signatário, sobretudo nos seguintes objetivos específicos: ODS 13 – Combate às Mudanças Climáticas: Tomar medidas urgentes para combater a mudança climática e seus impactos (Nações Unidas, 2025).

Material e métodos

Os procedimentos envolvendo animais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Embrapa Gado de leite nº 3.795.129.424. O estudo foi conduzido no Laboratório Multiusuário de Bioeficiência e Sustentabilidade da Pecuária, no Campo Experimental José Henrique Bruschi, da Embrapa Gado de Leite, em Coronel Pacheco, MG.

Para a realização desse experimento foram utilizados 26 novilhos machos castrados da raça Nelore, com idade de 14 meses e peso médio inicial de 360 ± 28,79 kg. O experimento foi conduzido utilizando o delineamento inteiramente casualizado com quatro tratamentos: grupo 1 - suplemento com 0% do aditivo; grupo 2 - suplemento com 2,5% do aditivo; grupo 3 - suplemento com 5% do aditivo e grupo 4 - suplemento com 10,0% do aditivo. O aditivo à base de nitrato de cálcio foi adicionado para substituir parcialmente a fonte de nitrogênio não proteico (NNP) do suplemento controle. A dieta simulou o período seco do ano, sendo composta por feno de tifton de baixa qualidade (5,41% de proteína bruta) e suplementação (0,5% do peso vivo).

Para a avaliação dos AGVs (acetato, butirato e propionato) foram coletadas amostras de conteúdo ruminal na última semana de experimento, utilizando sonda oroesofágica em um sistema à vácuo, 3 horas após o fornecimento do suplemento. Após a coleta, as amostras

foram filtradas em peneira com gaze. Uma alíquota de 5 mL foi separada e adicionada em recipiente contendo 1 mL de ácido metafosfórico (20% v/v). Nessa amostra foi realizada a mensuração dos AGVs utilizando cromatógrafo de fase líquida (Waters Alliance e2695 Chromatograph, Waters Technologies do Brasil LTDA, Barueri, SP, Brasil). Outra alíquota de 5 mL foi separada e adicionada em outro recipiente contendo 2 mL de ácido sulfúrico (50% v/v) a 0,1 N, para determinação do nitrogênio amoniacal (N-NH₃).

Os dados foram analisados por meio do PROC MIXED do SAS, os níveis de contraste para tratamentos foram corrigidos por meio do PROC IML, função ORPOL, sendo realizados contrastes dos efeitos de ordem linear e quadrática dos níveis de SILVAIR. O valor de significância adotado foi de 0,05.

Resultados e discussão

Não houve diferença significativa nas concentrações de acetato, propionato e N-NH₃ entre os tratamentos. Entretanto, houve tendência de efeito quadrático para a concentração de butirato e efeito linear na relação acetato: propionato, sugerindo alteração no perfil de AGVs (Tabela 1).

Tabela 1. Efeito da suplementação com aditivo composto por nitrato de cálcio, em diferentes níveis de inclusão, sobre os parâmetros ruminiais de bovinos Nelore na fase de recria.

Parâmetros ruminiais	Tratamentos (% Ca(NO ₃) ₂)				EPM ⁽¹⁾	P - valor	
	0	2,5	5	10		Linear	Quadrático
Acetato; mmol/L	29,194	29,497	28,766	34,232	2,262	0,110	0,336
Propionato; mmol/L	6,214	6,422	5,483	6,881	0,505	0,440	0,193
Butirato; mmol/L	3,202	2,935	2,409	3,473	0,354	0,560	0,057
Acetato: Propionato	4,677	4,625	5,247	5,016	0,112	0,009	0,067
N-NH ₃ %	7,189	7,235	7,423	7,272	0,097	0,465	0,181

⁽¹⁾ Erro padrão da médio.

Um estudo semelhante, foi conduzido com vacas leiteiras comparando uma dieta controle (0g de nitrato), com dietas com diferentes níveis de nitrato. Os autores observaram uma tendência de linearidade no aumento da concentração de butirato e AGVs totais e tendência de diminuição nas proporções de propionato, mesmo sem efeito geral nos tratamentos (Olijhoek et al., 2016).

Bharanidharan et al. (2025) observaram aumento na concentração de butirato em novilhos da raça Hanwoo alimentados com nitrato de cálcio e amônio, diferentemente do que foi observado nesse estudo. Esses autores, não observaram efeito no pH ruminal e no N-NH₃, porém é possível que haja aumento do pH ruminal com a adição de nitrato na dieta (Wyngaard et al., 2018).

Conclusões

A suplementação com diferentes níveis de nitrato de cálcio não influenciou o N-NH₃ e as concentrações de acetato e propionato no rúmen de bovinos na fase de recria. Entretanto, a relação acetato:propionato foi maior a partir do nível de inclusão a 5% e houve tendência de efeito quadrático para a concentração de butirato. Logo, a adição de nitrato de cálcio pode alterar o perfil dos ácidos graxos no rúmen considerando os níveis de inclusão do produto.

Agradecimentos

Ao apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) - Brasil, pela concessão de bolsa Pibic. À pesquisadora Mariana Magalhães Campos, à mestranda Mariana Barbosa, aos meus amigos de iniciação científica e a todos os funcionários da Embrapa Gado de Leite.

Referências

- BHARANIDHARAN, R.; TOMPLE, B. M.; LEE, J.; ATHAUDA, A. A. K. N.; HUH, S.; HONG, W.; KIM, N. Y.; LIM, D. H.; KIM, J. G.; KIM, K. H.; OH, J. Effects of dietary supplementation of nitrate on enteric methane production, performance, and rumen microbiome of Hanwoo steers. **Journal of Animal Science**, v. 103, skaf109, 2025. DOI: <https://doi.org/10.1093/jas/skaf109>.
- GRAYLEY, M. **ONU estima que mundo terá 10,3 bilhões de pessoas em meados de 2080**. Disponível em: <https://news.un.org/pt/story/2025/04/1847096>. Acesso em: 31 jul. 2025.
- IBGE. **2024 registra recorde no abate de bovinos, frangos e suínos**. Agência IBGE Notícias, 18 mar. 2025. Disponível em: <https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-sala-de-imprensa/2013-agencia-de-noticias/releases/42898-2024-registra-recorde-no-abate-de-bovinos-frangos-e-suinos>. Acesso em: 31 jul. 2025.
- JOHNSON, D. E.; JOHNSON, K. A.; BALDWIN, R. L. Changes in liver and gastrointestinal tract energy demands in response to physiological workload in ruminants. **Journal of Nutrition**, v. 120, n. 6, p. 649-655, 1990. DOI: <https://doi.org/10.1093/jn/120.6.649>.
- MOMBACH, M. A.; PEDREIRA, B. C.; PEREIRA, D. H.; CABRAL, L. S.; RODRIGUES, R. A. R. Emissão de metano entérico por bovinos: o que sabemos e que podemos fazer? In: SIMPÓSIO DE PECUÁRIA INTEGRADA, 2., 2016, Sinop. **Anais [...]**. Cuiabá: Fundação Uniselva, 2016. p. 181-202. Tema: Recuperação de pastagens. Disponível em: <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/1060780/1/2016cpamtpedreiraemissaometanoentericobovinos181202.pdf>. Acesso em: 31 jul. 2025.
- NAÇÕES UNIDAS. **Objetivo de Desenvolvimento Sustentável 13: Ação contra a mudança global do clima**. Disponível em: <https://brasil.un.org/pt-br/sdgs/13>. Acesso em: 13 mar. 2025.
- OLIJHOEK, D. W.; HELLWING, A. L. F.; BRASK, M.; WEISBJERG, M. R.; HOJBERG, O.; LARSEN, M. K.; DIJKSTRA, J.; ERLANDSEN, E. J.; LUND, P. Effect of dietary nitrate level on enteric methane production, hydrogen emission, rumen fermentation, and nutrient digestibility in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 8, p. 6191-6205, 2016. DOI: <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10691>.
- PEDREIRA, S. M.; PRIMAVESI, O. Impacto da produção animal sobre o ambiente. In: BERCHIELLI, T.T.; PIRES, A. V.; OLIVEIRA, S. G. (ed.). **Nutrição de ruminantes**. Jaboticabal: Funep, 2006. p. 497-511.
- VAN NEVEL, C. J.; DEMEYER, D. I. Controlo f rumen methanogenesis. **Environmental Monitoring Assessment**, v. 42, n. 1/2, p. 73-97, 1996. DOI: <https://doi.org/10.1007/bf00394043>.
- WYNGAARD, J. D. V. van; MEESKE, R.; ERASMUS, L. J. Effect of dietary nitrate on enteric methane emissions, production performance and rumen fermentation of dairy cows grazing kikuyu-dominant pasture during summer. **Animal Feed Science and Technology**, v. 244, p. 76-87, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2018.08.005>.

Novo método de genotipagem de Deficiência de adesão leucocitária bovina (BLAD) por T-ARMS PCR

Gabrielle da Silva Brugger⁽¹⁾⁽⁶⁾, João Victor Moreira Fialho⁽²⁾, Maria Clara de Moura Mintelowsky⁽³⁾, Pedro Almeida de Abreu⁽¹⁾, Daniele Ribeiro de Lima Reis Faza⁽⁴⁾, Robert Domingues⁽⁴⁾, João Cláudio do Carmo Panetto⁽⁵⁾, Marcos Vinicius Gualberto Barbosa da Silva⁽⁵⁾, Marta Fonseca Martins⁽⁵⁾ e Marco Antônio Machado⁽⁵⁾

⁽¹⁾Bolsista (Pibic/CNPq), Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG. ⁽²⁾Estagiária, Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG. ⁽³⁾Bolsista (Pibic/Fapemig), Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG. ⁽⁴⁾Analista, Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG. ⁽⁵⁾Pesquisador(a), Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG. ⁽⁶⁾E-mail: gabriellesbrugger@gmail.com.

Resumo — A Deficiência de adesão leucocitária bovina (BLAD) é uma doença genética autossômica recessiva causada por uma mutação no gene CD18 que ocasiona o comprometimento do sistema imune e pode levar à morte precoce de animais homozigotos. Sua detecção é essencial para o controle da doença nos rebanhos, principalmente aqueles formados por raças europeias e seus cruzamentos. O objetivo do trabalho foi o desenvolvimento e validação da técnica T-ARMS-PCR para genotipagem de BLAD. Um total de 12 animais da raça Girolando com genótipos conhecidos foram usados como controle positivo e negativo para o desenvolvimento de uma metodologia de genotipagem utilizando a técnica de T-ARMS-PCR (Reação em cadeia da polimerase com sistema de amplificação refratária à mutação por tetraprimer). Esta apresentou resultado satisfatório, possibilitando a genotipagem dos alelos do gene CD18, por meio de uma técnica mais rápida e econômica de genotipagem, com apenas um único ensaio de PCR seguido de eletroforese em gel de agarose. Esta nova metodologia foi implementada no Laboratório de Genética Molecular para genotipar os animais que serão incorporados no Banco de DNA de Bovinos de Leite, da Embrapa Gado de Leite, assim como os animais participantes dos programas de melhoramento coordenados pela Unidade.

Termos para indexação: bovinos, doença genética, Girolando, SNP.

New genotyping method for Bovine leukocyte adhesion deficiency (BLAD) using tetra-ARMS PCR

Abstract — Bovine leukocyte adhesion deficiency (BLAD) is an autosomal recessive genetic disease caused by a point mutation in the CD18 gene that compromises the immune system and can lead to premature death in homozygous animals. Detection of BLAD is essential for disease control in herds, especially those comprised of European breeds and their crossbreeds. The objective of this study was to develop and validate the T-ARMS-PCR technique for BLAD genotyping. This mutation impairs the immune system and leads to early death in homozygous animals. Carrier detection is essential for controlling the spread of the disease within cattle herds. A total of 12 Girolando cattle with known genotypes were used as controls for the development of a genotyping methodology based on the T-ARMS-PCR (Tetraprimer amplification refractory mutation system polymerase chain reaction) technique. After multiple rounds of optimization, the methodology was successfully established, enabling the genotyping of CD18 alleles through a simple and cost-effective approach, requiring only a single PCR reaction followed by agarose gel electrophoresis. This new method can be applied to genotype animals that will be included in the Dairy cattle DNA bank of Embrapa Dairy Cattle.

Index terms: bovines, genetic disease, Girolando, SNP.

Introdução

A Deficiência de adesão leucocitária bovina (BLAD) é uma doença hereditária originada na raça holandesa causada por uma mutação autossômica recessiva do gene CD18 na posição 383, caracterizada por uma mutação com substituição de uma adenina por uma guanina, causando assim uma alteração na sequência de aminoácidos, com a troca do ácido aspártico por uma glicina (Nagahata, 2004). Em animais homozigotos para o alelo mutante há o desenvolvimento de sintomas como pneumonias, crescimento atrofiado, perda de dentes e problemas relacionados ao sistema imune, ocasionando a morte precoce do animal. Já animais heterozigotos, ou seja, portadores do alelo recessivo, apresentam desenvolvimento normal e não são afetados (Meydan et al., 2010). A disseminação do alelo mutante para a doença se deu por conta do alto valor genético atrelado ao touro Osborndale Ivanhoe da raça holandesa e a utilização do seu sêmen e dos seus descendentes, originando diversos descendentes portadores (Nagahata, 2004). É de suma importância identificar animais portadores deste alelo mutante, para impedir a disseminação desta doença em rebanhos de todo o mundo, visto que mesmo com o diagnóstico e controle nos cruzamentos, ainda hoje encontramos animais portadores.

Atualmente a técnica para a genotipagem dessa doença no Laboratório de genética molecular Dr. Mário Luiz Martinez é a PCR-RFLP (Polymerase chain reaction - restriction fragment length polymorphism), na qual, após a PCR convencional, é necessário realizar uma digestão enzimática do DNA amplificado, para que as endonucleases possam clivar o DNA em posições conhecidas, gerando assim fragmentos com tamanhos diferentes para a identificação de polimorfismos (Nagahata et al., 1997). Esta técnica utilizada, apesar de eficiente, possui um custo alto e um tempo maior para execução. A técnica de T-ARMS-PCR (Tetraprimer amplification refractory mutation system polymerase chain reaction) possui um melhor custo benefício, pois é eficiente, mais rápida e mais barata pois não utiliza enzimas de restrição. Apenas uma reação de PCR com dois conjuntos de primers são necessários. O funcionamento desse tipo de primer se dá pela combinação dos primers internos (específicos para cada alelo) a um dos primer externos, para dar origem a fragmentos de tamanhos diferentes de acordo com o alelo presente (Li et al., 2014).

Assim, o objetivo deste trabalho foi desenvolver uma metodologia de genotipagem para a doença genética BLAD por T-ARMS -PCR, a fim de genotipar os animais do banco de DNA de bovinos de leite da Embrapa Gado de Leite (BDBL) e fazer o monitoramento do alelo mutante nos animais participantes dos programas de melhoramento genético coordenados pela Unidade.

As informações geradas no presente estudo vão ao encontro dos Objetivos do desenvolvimento sustentável (ODS) contidos na Agenda 2030, proposta pela Organização das Nações Unidas, da qual o Brasil é signatário, sobretudo nos seguintes objetivos específicos: ODS 2 - Erradicação da fome: Acabar com a fome, alcançar a segurança alimentar e melhoria da nutrição e promover a agricultura sustentável (Nações Unidas, 2025).

Material e métodos

Foram selecionadas 12 amostras de DNA de touros e vacas da raça Girolando armazenadas no BDBL com genótipos previamente conhecidos para BLAD, sendo sete animais portadores e cinco animais não portadores, anteriormente genotipados pela técnica de PCR-RFLP descrita por Nagahata et al. (1997).

O desenho dos quatro primers, dois internos (inner primers - FI e RI) e dois externos (outer primers - FO e RO), foi realizado com a utilização do programa Primer 1 (<http://primer1.soton.ac.uk/primer1.html>), a partir da sequência do gene depositada no banco de dados do National center for biotechnology information (NCBI). A sequências dos primers desenhados são: FI AGGGCCAAGGGCTACCCCATAGA, RI GGAGTAGGAGAGGTCCATCAGGTAGTACATGC, FO CCCCAACCCCAAGACCAGATAGTACA e RO TGGGGTTTCAGGGGAAGATGGAGT. Os produtos de PCR gerados após a amplificação apresentaram um tamanho de 138 pb para o alelo mutante, 175 pb para o alelo normal e 258 pares de base para ambos os alelos.

Para obter a melhor condição de PCR, foram testadas diferentes quantidades de primers e DNA alvo por reação e temperaturas de anelamento dos primers. Foram testadas também as melhores condições de visualização das bandas em gel de agarose corados com brometo de etídeo e visualizados na luz ultravioleta.

Resultados e discussão

Um novo protocolo baseado na técnica de T-ARMS-PCR foi desenvolvido neste estudo para identificação do alelo mutante causador de BLAD. As reações de PCR consistiram em 0,15 μ M do primer RO, 0,15 μ M de primer FO, 0,8 μ M de primer RI, 0,8 μ M de primer FI, 1X Taq DNA Polymerase Master Mix (Promega, Madison, WI, EUA), 80 ng de DNA alvo e volume final de reação de 20 μ L. As condições de ciclagem foram: 94 °C por dois minutos; 30 ciclos de 94 °C por 30 segundos; 60 °C por 30 segundos, 72 °C por 30 segundos; e uma etapa final de 72 °C por cinco minutos. As melhores condições de eletroforese para visualização das bandas foram: gel de agarose 2,5%, corrida a 90 V por 3 horas. Na Figura 1, pode-se verificar a imagem do gel de agarose com o protocolo desenvolvido por Tetra-ARMS PCR. Todos os genótipos anteriormente obtidos por PCR-RFLP foram confirmados, mostrando que o teste foi 100% eficaz na identificação dos alelos de BLAD.

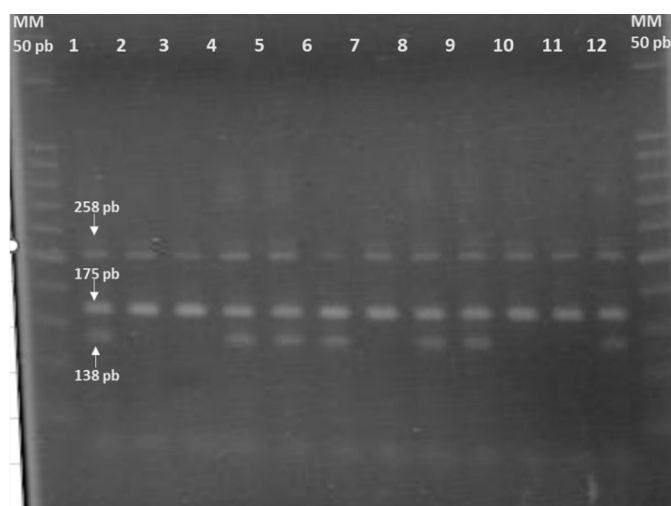


Figura 1. Padrão do tamanho dos fragmentos obtidos pela técnica T-ARMS-PCR para genotipagem para a doença BLAD. (1, 4, 5, 6, 8, 9 e 12) portadores do alelo BLAD; (2, 3, 7, 10 e 11) não portadores do alelo BLAD; (M50) Marcador de peso molecular de 50 pb.

A vantagem do desenvolvimento desta nova metodologia por T-ARMS-PCR, se comparada com as descritas por Nagahata et al. (1997) e Meydan et al. (2010), que são baseadas em PCR-RFLP, são principalmente o tempo e a facilidade de execução, uma vez que com apenas um ensaio de PCR já se pode obter o diagnóstico e, assim, um custo mais baixo por amostra, pois a etapa de digestão com enzima de restrição é eliminada.

Delvaux et al. (2015) avaliaram a relação custo-benefício de quatro técnicas moleculares para genotipagem dos polimorfismos rs12997860 e rs8099917, destacando T-ARMS-PCR como a mais vantajosa, tanto pelo menor custo quanto pela facilidade de implementação em laboratórios com recursos limitados. Resultados semelhantes foram encontrados por Fateh et al. (2016), que compararam três métodos de genotipagem: sequenciamento direto, PCR-RFLP e T-ARMS-PCR quanto ao custo e tempo de execução. Excluindo o custo da extração da amostra, comum a todos os métodos, estimaram-se os valores de US\$ 4,70 para PCR-RFLP, US\$ 3,10 para T-ARMS-PCR e US\$ 16,20 para sequenciamento, com respectivos tempos de 6h45min, 2h40min e 2 dias. Concluíram, assim, que a T-ARMS-PCR é o método mais eficiente e confiável para aplicação clínica rotineira. Por ser uma técnica simples, econômica, rápida e que não necessita de equipamentos elaborados, a T-ARMS-PCR tem sido cada vez mais utilizada em pesquisas de polimorfismo (Kindermann et al., 2023). No presente trabalho, não foi feita análise de custo e se espera que também a comparação entre os custos das duas técnicas seja semelhante.

Conclusões

Foi desenvolvido e validado o protocolo de genotipagem de BLAD pela técnica de T-ARMS-PCR em 12 animais da raça Girolando genotipados anteriormente pela técnica PCR-RFLP. Esta nova metodologia poderá ser utilizada para genotipar os animais que serão incorporados no Banco de DNA de Bovinos de Leite, da Embrapa Gado de Leite, assim como os animais pertencentes aos programas de melhoramento genético conduzidos na Unidade.

Agradecimentos

Ao apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) - Brasil, pela concessão de bolsa Pibic e à Embrapa Gado de Leite pelo financiamento do trabalho.

Referências

DELVAUX, N.; COSTA, V. D. da; COSTA, M. M. da; LAMPE, E. Comparison of four methods of genotyping IL28B polymorphisms in chronic hepatitis C patients. **Journal of Virological Methods**, v. 220, p. 1-4, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2015.04.001>

FATEH, A.; AGHASADEGHI, M.; SIADAT, S. D.; VAZIRI, F.; SADEGHI, F.; FATEH, R.; KEYVANI, H.; TASBITI, A. H.; YARI, S.; ATAIE-PIRKOOH, A.; MONAVARI, S. H. Comparison of three different methods for detection of IL28 rs12979860 polymorphisms as a predictor of treatment outcome in patients with hepatitis C virus. **Osong Public Health and Research Perspectives**, v. 7, n. 2, p. 83-89, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.phrp.2015.11.004>.

KINDERMANN, E. H. S.; CAMPOS, K. R.; CATERINO-DE-ARAUJO, A. Performance of the tetra-primer PCR technique compared to PCR-RFLP in the search for rs12979860 (C/T) and rs8099917 (T/G) single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the IFNL4 gene. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 82, e39195, 2023. DOI: <https://doi.org/10.53393/rial.2023.v.82.39195>.

LI, M. X.; SUN, X. M.; JIANG, J.; SUN, Y. J.; LAN, X. Y.; LEI, C. Z.; ZHANG, C. L.; CHEN, H. Tetra-primer ARMS-PCR is an efficient SNP genotyping method: an example from SIRT2. **Analytical Methods**, v. 6, n. 6, p. 1835-1840, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1039/C3AY41370E>.

MEYDAN, H.; YILDIZ, M. A.; AGERHOLM, J. S. Screening for bovine leukocyte adhesion deficiency, deficiency of uridine monophosphate synthase, complex vertebral malformation, bovine citrullinaemia, and factor XI deficiency in Holstein cows reared in Turkey. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 52, n. 1, article 56, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1186/1751-0147-52-56>.

NAÇÕES UNIDAS. **Objetivo de Desenvolvimento Sustentável 2**: Fome zero e agricultura sustentável. Disponível em: <https://brasil.un.org/pt-br/sdgs/2>. Acesso em: 13 mar. 2025.

NAGAHATA, H.; MIURA, T.; TAGAKI, K.; OHTAKE, M.; NODA, H.; YASUDA, T.; NIOKA, K. Prevalence and allele frequency estimation of bovine leukocyte adhesion deficiency (BLAD) in Holstein-Friesian cattle in Japan. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 59, n. 4, p. 233-238, 1997. DOI: <https://doi.org/10.1292/jvms.59.233>.

NAGAHATA, H. Bovine leukocyte adhesion deficiency (BLAD): a review. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 66, n. 12, p. 1475-1482, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1292/jvms.66.1475>.

Identificação de touros portadores de doenças genéticas recessivas na raça Girolando

João Victor Moreira Fialho⁽¹⁾⁽⁵⁾, Gabrielle da Silva Brugger⁽²⁾, Pedro Almeida de Abreu⁽²⁾, Maria Clara de Moura Mintelowsky⁽²⁾, Daniele Ribeiro de Lima Reis Faza⁽³⁾, Robert Domingues⁽³⁾, João Cláudio do Carmo Panetto⁽⁴⁾, Marco Antônio Machado⁽⁴⁾, Marta Fonseca Martins⁽⁴⁾ e Marcos Vinicius Gualberto Barbosa da Silva⁽⁴⁾

⁽¹⁾Bolsista (Pibic/CNPq), Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG. ⁽²⁾Estagiário(a), Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG. ⁽³⁾Analista, Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG. ⁽⁴⁾Pesquisador(a), Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG. ⁽⁵⁾E-mail: joavbnt@gmail.com.

Resumo — A raça Girolando, amplamente utilizada nos rebanhos leiteiros brasileiros, combina a alta produtividade com adaptabilidade tropical. No entanto, sua ascendência da raça holandesa pode introduzir mutações recessivas deletérias. Para este estudo, 25 touros participantes do teste de progênie da raça, em 2025, foram genotipados para seis doenças: Deficiência de adesão leucocitária bovina (BLAD), Deficiência da uridina monofosfato sintase (DUMPS), Complexo de malformação vertebral (CVM), Brachyspina, Deficiência do fator XI (FXID) e Citrulinemia. Para a distinção dos alelos, o DNA foi extraído, quantificado, amplificado via PCR e analisado por eletroforese. Por meio das análises, foram identificados dois indivíduos portadores: um para BLAD e outro para Brachyspina. Nenhum portador foi detectado para as outras quatro doenças. Estes achados ressaltam a importância do monitoramento genético contínuo dos reprodutores participantes do programa de melhoramento, a fim de prevenir a disseminação de alelos prejudiciais e, assim, preservar a saúde e a produtividade dos rebanhos.

Termos para indexação: BLAD, Brachyspina, Citrulinemia, CVM, DUMPS, FXID, genotipagem.

Identification of Girolando sires carrying autosomal recessive genetic disorders

Abstract — The Girolando breed, widely used in Brazilian dairy herds, combines high milk yield with tropical adaptability. However, its Holstein ancestry can introduce deleterious recessive mutations. For this study, twenty-five Girolando sires from the 2025 progeny test were genotyped for six disorders: Bovine leukocyte adhesion deficiency (BLAD), Uridine monophosphate synthase deficiency (DUMPS), Complex vertebral malformation (CVM), Brachyspina, Factor XI deficiency (FXID), and Citrullinemia. To distinguish between the alleles, DNA was extracted, quantified, amplified via PCR, and analyzed through electrophoresis. The screening identified two carriers: one for BLAD and one for Brachyspina. No carriers were detected for the other four disorders. These findings underscore the importance of continuous genetic monitoring in sire selection programs to prevent the spread of harmful alleles, thereby safeguarding herd health and productivity.

Index terms: BLAD, Brachyspina, Citrullinemia, CVM, DUMPS, FXID, genotyping.

Introdução

A raça Girolando responde por cerca de 80% da produção leiteira nacional, combinando rusticidade, longevidade produtiva e alto potencial genético (Silva et al., 2025). Em 1997, foi criado o Programa de Melhoramento Genético do Girolando (PMGG), baseado no teste de progênie, cujo objetivo é avaliar o potencial genético dos reprodutores. Entretanto, desde sua criação, foram usados touros da raça Holandesa. Alguns desses touros, apesar de possuírem alto potencial genético para produção de leite, eram portadores de alelos ligados à algumas doenças genéticas de herança autossômica recessiva, como, por exemplo, a

Deficiência de adesão leucocitária bovina (BLAD), a Deficiência da uridina monofosfato sintase (DUMPS), o Complexo de malformação vertebral (CVM), a Brachyspina, a Deficiência do fator XI (FXID) e a Citrulinemia. Quando em homozigose, esses alelos podem comprometer a viabilidade embrionária, a saúde neonatal e a produtividade (Gozdek et al., 2024).

Para evitar possíveis acasalamentos entre animais portadores e reduzir a frequência dos alelos deletérios, a genotipagem dos reprodutores é de extrema importância, pois possibilita diminuir, ou mesmo impedir, a disseminação desses alelos (Gozdek et al., 2024). Assim, o objetivo deste estudo foi genotipar 25 touros Girolando participantes do 27º grupo do PMGG para seis doenças genéticas.

As informações geradas no presente estudo vão ao encontro dos Objetivos do Desenvolvimento Sustentável (ODS) contidos na Agenda 2030, proposta pela Organização das Nações Unidas, da qual o Brasil é signatário, sobretudo nos seguintes objetivos específicos: ODS 2 - Erradicação da fome: Acabar com a fome, alcançar a segurança alimentar e melhoria da nutrição e promover a agricultura sustentável (Nações Unidas, 2025).

Material e métodos

O DNA de 25 touros da raça Girolando, participantes do teste de progênie em 2025, foi extraído de amostras de sangue utilizando o método de fenol-clorofórmio, conforme descrito por Sambrook et al. (1989) com modificações. A pureza e concentração do material genético foram aferidas por espectrofotometria. As genotipagens para os seis genes foram realizadas por PCR seguido de eletroforese, de acordo com as metodologias detalhadas na literatura (Tabela 1). Com base na presença ou ausência dos alelos mutantes, os genótipos foram classificados como portador (P) ou não portador (NP).

Tabela 1. Tamanhos dos amplicons (Amp), alelos normais (N) e mutantes (M) de doenças genéticas bovinas.

Doença	Método	Tamanhos dos Alelos (pb)	Referência
DUMPS	PCR-RFLP	Amp 108; N: 53/36/19; M: 89/19	Schwenger et al. (1993)
CVM (Malformação Vertebral Complexa)	PCR alelo-específico	Prod 395; M detectado; ausente em N.	Ghanem et al. (2008)
FXID (Deficiência do FatorXI)	PCR convencional	Amp 244/320; N: 244; M: 320 (+76 ins).	Meydan et al. (2010)
Citrulinemia (CTLN)	PCR-RFLP	Amp 198; N: 109/89; M:198	Meydan et al. (2010)
BLAD (Imunodeficiência de Adesão Leucocitária Bovina)	PCR-RFLP	M: 58; N: 32/26	Nagahata et al. (1997)
Brachyspina	PCR multiplex	M:409 (deleção); N: sem amplificação; banda controle: 269	Li et al. (2016)

Resultados e discussão

Os resultados das genotipagens estão detalhados na Figura 1. Dos 25 touros analisados, 23 (92%) foram classificados como não portadores (NP) para todas as doenças avaliadas. Apenas um touro apresentou genótipo positivo para Brachyspina e um touro para BLAD. Foram identificados dois animais portadores: um para o alelo da Brachyspina e outro para o da BLAD. Nenhum portador foi detectado para DUMPS, CVM, FXID ou Citrulinemia.

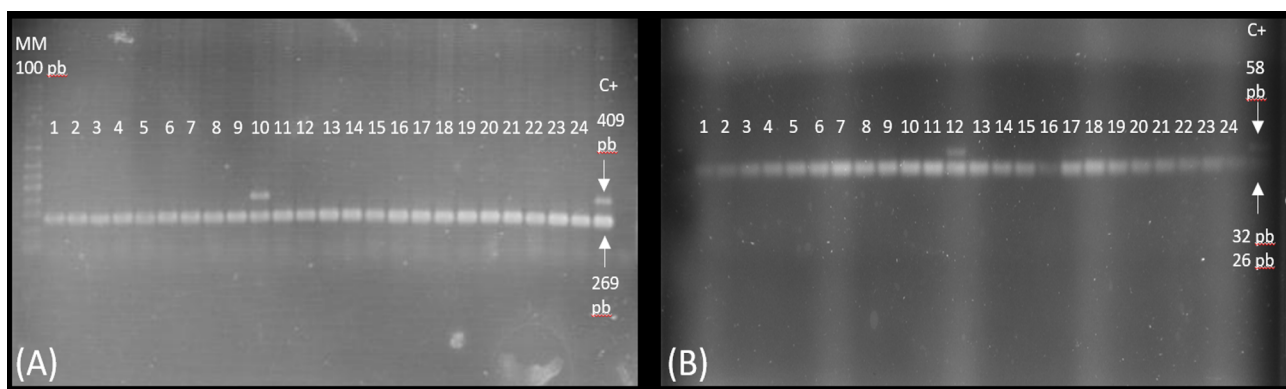


Figura 1. Genotipagem de touros da raça Girolando para as doenças genéticas Brachyspina e BLAD. (A) Resultado da PCR para detecção do alelo causador de Brachyspina: O touro 10 é portador e os demais touros são não portadores, C+ é o controle positivo e MM100 pb é o marcador de peso molecular de 100 pares de bases. (B) Resultado da PCR-RFLP para detecção do alelo causador de BLAD: O touro 12 é portador e demais touros são não portadores, onde C+ é o controle positivo.

Apesar da baixa incidência observada, a presença de até um único animal portador já representa risco relevante. O acasalamento entre dois portadores pode gerar descendentes homozigotos afetados, o que pode acarretar perdas reprodutivas e econômicas significativas, como abortos, malformações e distúrbios de saúde típicos associados a cada uma dessas doenças. Portanto, a identificação prévia de portadores é uma ferramenta importante que permite realizar os acasalamentos dirigidos ou a exclusão desses animais do programa reprodutivo, mantendo a produtividade sem comprometer a saúde genética do rebanho.

Neste estudo, a frequência de portadores de BLAD (4%) foi superior à reportada por Paiva et al. (2013) que encontraram 0,7% na mesma raça. Para Brachyspina, a frequência de 4% foi inferior às taxas encontradas em populações na raça holandesa, como na China (4,9%) (Fang et al., 2013), EUA (6%) (VanRaden et al., 2011) e Holanda (7,4%) (Charlier et al., 2012). Esses dados comparativos reforçam a importância do monitoramento genético contínuo, uma vez que mutações deletérias circulam globalmente e suas frequências podem variar entre populações. É importante ressaltar que o número amostral limitado deste estudo (n=25) pode influenciar as frequências alélicas observadas, o que pode justificar, em parte, as variações encontradas em relação a outros trabalhos com amostras maiores.

Conclusões

A genotipagem de 25 touros Girolando demonstrou baixa frequência geral de portadores de doenças hereditárias. Contudo, a detecção de alelos para BLAD e Brachyspina serve como um alerta crítico de que mutações deletérias persistem na base genética da raça. A identificação prévia de heterozigotos evita acasalamentos e perdas reprodutivas e econômicas associadas. Assim, a utilização da genotipagem como ferramenta de detecção para apelos deletérios deve ser contínua no programa de melhoramento do Girolando.

Agradecimentos

Ao apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) - Brasil, pela concessão de bolsa Pibic, à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – (Fapemig) (APQ-02750-23) e à Embrapa Gado de Leite pelo financiamento do trabalho.

Referências

- CHARLIER, C.; AGERHOLM, J. S.; COPPIETERS, W.; KARLSKOV-MORTENSEN, P.; LI, W.; JONG, G. de; FASQUELLE, C.; KARIM, L.; CIRERA, S.; CAMBISANO, N.; AHARIZ, N.; MULLAART, E.; GEORGES, M.; FREDHOLM, M. A deletion in bovine FANCI gene compromises fertility by causing fetal death and Brachyspina. **PLoS One**, v. 7, n. 8, e43085, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043085>.
- FANG, L.; LI, Y.; ZHANG, Y.; SUN, D.; LIU, L.; ZHANG, Y.; ZHANG, S. Identification of Brachyspina syndrome carriers in Chinese Holstein cattle. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 25, n. 4, p. 508-510, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1177/1040638713488387>.
- GHANEM, M. E.; NAKAO, T.; AKITA, M.; MATSUI, M. Complex vertebral malformation in Holstein cows in Japan and its inheritance to crossbred F1 generation. **Animal Reproduction Science**, v. 103, n. 3/4, p. 348-354, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2006.12.013>.
- GOZDEK, M.; MUCHA, S.; PROSTEK, A.; SADKOWSKI, T. Selected monogenic genetic diseases in Holstein cattle: a review. **Genes**, v. 15, n. 8, 1052, 2024. DOI: <https://doi.org/10.3390/genes15081052>.
- LI, Y.; ZHAI, L.; FANG, L.; ZHANG, S.; LIU, L.; ZHU, Y.; XUE, J.; LI, X.; QIAO, L.; SUN, D. A novel multiplex polymerase chain reaction method for the identification of Brachyspina syndrome carriers in Chinese Holstein cattle. **Journal of Veterinary Science & Medical Diagnosis**, v. 5, n. 3, 1000200, 2016. DOI: <http://doi.org/10.4172/2325-9590.1000200>.
- MEYDAN, H.; YILDIZ, M. A.; AGERHOLM, J. S. Screening for bovine leukocyte adhesion deficiency, deficiency of uridine monophosphate synthase, complex vertebral malformation, bovine citrullinaemia, and factor XI deficiency in Holstein cows reared in Turkey. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 52, n. 1, article 56, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1186/1751-0147-52-56>.
- NAÇÕES UNIDAS. **Objetivo de Desenvolvimento Sustentável 2: Fome zero e agricultura sustentável**. Disponível em: <https://brasil.un.org/pt-br/sdgs/2>. Acesso em: 13 mar. 2025.
- NAGAHATA, H.; MIURA, T.; TAGAKI, K.; OHTAKE, M.; NODA, H.; YASUDA, T.; NIOKA, K. Prevalence and allele frequency estimation of bovine leukocyte adhesion deficiency (BLAD) in Holstein-Friesian cattle in Japan. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 59, n. 4, p. 233-238, 1997. DOI: <https://doi.org/10.1292/jvms.59.233>.
- PAIVA, D. S.; FONSECA, I.; PINTO, I. S. B.; IANELLA, P.; CAMPOS, T. A.; CAETANO, A. R.; PAIVA, S. R.; SILVA, M. V. G. B.; MARTINS, M. F. Incidence of bovine leukocyte adhesion deficiency, complex vertebral malformation, and deficiency of uridine-5-monophosphate synthase carriers in Brazilian Girolando cattle. **Genetics and Molecular Research**, v. 12, n. 3, p. 3186-3192, 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.4238/2013.August.29.2>.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2. ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 1.659 p.
- SCHWENGER, B.; SCHÖBER, S.; SIMON, D. DUMPS cattle carry a point mutation in the uridine monophosphate synthase gene. **Genomics**, v. 16, n. 1, p. 241-244, 1993. DOI: <https://doi.org/10.1006/geno.1993.1165>.
- SILVA, M. V. G. B.; MARTINS, M. F.; FERREIRA JUNIOR, E.; PANETTO, J. C. do C.; MACHADO, M. A. (ed.). **Programa de Melhoramento Genético da Raça Girolando**: sumário de touros: resultado do teste de progênie (avaliação genética/genômica): junho 2025. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2025. 160 p. (Embrapa Gado de Leite. Documentos, 297). Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/1176489/1/Programa-de-Melhoramento-Genetico-da-Raca-Girolando-Touros-junho-2025.pdf>. Acesso em: 10 jul. 2025.
- VANRADEN, P. M.; OLSON, K. M.; NULL, D. J.; HUTCHISON, J. L. Harmful recessive effects on fertility detected by absence of homozygous haplotypes. **Journal of Dairy Science**, v. 94, n. 12, p. 6153-6161, 2011. DOI: <https://doi.org/10.3168/jds.2011-4624>.

Sequenciamento do genoma de bacteriófagos que infectam *Staphylococcus aureus*

Pedro Almeida de Abreu⁽¹⁾⁽⁵⁾, Carla Eduarda Ladeira Pereira⁽²⁾, Robert Domingues⁽³⁾, Daniele Ribeiro de Lima Reis Faza⁽³⁾, Edna Froeder Arcuri⁽⁴⁾, Emanuelle Baldo Gaspar⁽⁴⁾ e Marta Fonseca Martins⁽⁴⁾

⁽¹⁾Bolsista (Pibic/CNPq), Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG. ⁽²⁾Estagiária, Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG. ⁽³⁾Analista, Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG. ⁽⁴⁾Pesquisadora, Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG. ⁽⁵⁾E-mail: pedroaa14@gmail.com.

Resumo — *Staphylococcus aureus* é um importante patógeno da mastite bovina, e o uso excessivo de antibióticos tem favorecido o surgimento de cepas resistentes, destacando a necessidade de alternativas como bacteriófagos líticos e suas endolisinas para seu enfrentamento. Em estudo anterior, seis fagos foram isolados, sendo dois (Fagos 2 e 4) selecionados para análises morfológicas, fisiológicas e moleculares, que sugeriram sua classificação dentro da ordem Caudovirales, subfamília *Azeredovirinae* e gêneros Dubowvirus ou Phietavirus. Com o objetivo de confirmar essa classificação e para atender à requisitos regulatórios de um ativo tecnológico em desenvolvimento, o DNA dos fagos foi extraído por meio do método de Fenol-clorofórmio e submetido ao sequenciamento genético de short reads em plataforma Illumina. Os dados de sequenciamento foram analisados em plataforma Galaxy. Foram obtidos 7,96 milhões de reads de 150 pares de bases, com alta qualidade (Q20 >99%, Q30 > 96%, GC 33,8%). A análise de similaridade dos contigs obtidos mostrou 97,63% de identidade com *Staphylococcus phage phiNM2* (Viruses; Duplodnaviria; *Heunggongvirae*; Uroviricota; Caudoviricetes; *Azeredovirinae*; Dubowvirus; Dubowvirus NM2), corroborando os dados prévios. A montagem completa dos genomas será finalizada em etapas futuras.

Termos para indexação: bioinformática, genômica, mastite bovina.

Analysis of genome sequencing data from bacteriophages infecting *staphylococcus aureus*

Abstract — *Staphylococcus aureus* is an important bovine mastitis pathogen, and the overuse of antibiotics has favored the emergence of resistant strains, highlighting the need for alternatives such as lytic bacteriophages and their endolysins. In a previous study, six phages were isolated, two of which (Phages 2 and 4) were selected for morphological, physiological and molecular analyses, which suggested their classification within the order Caudovirales, subfamily *Azeredovirinae*, and genera Dubowvirus or Phietavirus. To confirm this classification and meet regulatory requirements for a technological asset under development, phage DNA was extracted using the phenol-chloroform method and subjected to short-read genetic sequencing on an Illumina platform. The sequencing data were analyzed on the Galaxy platform. A total of 7.96 million 150-base pair reads were obtained, with high quality (Q20 >99%, Q30 >96%, GC 33.8%). Similarity analysis of the obtained contigs showed 97.63% identity with *Staphylococcus phage phiNM2* (Viruses; Duplodnaviria; *Heunggongvirae*; Uroviricota; Caudoviricetes; *Azeredovirinae*; Dubowvirus; Dubowvirus NM2), corroborating previous data. Complete genome assembly will be completed in future stages.

Index terms: bioinformatics, genomics, bovine mastitis.

Introdução

Staphylococcus aureus é um dos principais agentes etiológicos da mastite contagiosa em rebanhos leiteiros e o seu controle baseia-se principalmente na administração de antibióticos. No entanto, o uso indiscriminado desses fármacos em animais de produção tem contribuído para a seleção de linhagens bacterianas resistentes (Jayalakshmi et al., 2017; Patel et al., 2021). Diante do aumento progressivo da resistência a antimicrobianos, a Organização Mundial da Saúde (OMS) destacou a necessidade urgente de desenvolver novas alternativas terapêuticas, entre as quais se destacam os bacteriófagos líticos e suas endolisinas (World Health Organization, 2021).

Bacteriófagos líticos são vírus que infectam bactérias, replicam-se em seu interior e promovem a lise da célula hospedeira por meio da ação de endolisinas, liberando novas partículas virais (Liu et al., 2023). Em estudo anterior, dois fagos (fagos 2 e 4) isolados de água de lavagem de curral demonstraram elevada especificidade e atividade lítica frente a estirpes de *S. aureus* associadas à mastite bovina e a produtos lácteos. A caracterização morfológica por microscopia eletrônica revelou estrutura típica da ordem *Caudovirales* e da família *Siphoviridae* (Leite et al., 2019; Pereira, 2023; Pereira et al., 2025).

O presente estudo teve como objetivo central confirmar a identidade taxonômica dos fagos, cuja similaridade gênica e filogenia sugeriam a classificação na subfamília *Azeredovirinae* e nos gêneros *Dubowvirus* ou *Phietavirus* (Pereira, 2023). A validação dessa classificação, essencial para a proteção intelectual e regulatória, será realizada por meio de sequenciamento de nova geração (NGS), técnica amplamente empregada na caracterização genômica de microrganismos (Stoler; Nekrutenko, 2021).

As informações geradas no presente estudo vão ao encontro dos Objetivos do Desenvolvimento Sustentável (ODS) contidos na Agenda 2030, proposta pela Organização das Nações Unidas, da qual o Brasil é signatário, sobretudo nos seguintes objetivos específicos: ODS 8 - Empregos dignos e crescimento econômico: Promover o crescimento econômico sustentado, inclusivo e sustentável, emprego pleno e produtivo, e trabalho decente para todos (Nações Unidas, 2025).

Material e métodos

Propagação e purificação dos fagos

Uma mistura contendo volumes iguais de uma cultura de *S. aureus* (5161) em caldo BHI e suspensão estoque de cada fago (F2 – $3,0 \times 10^8$ UFP/mL; F4 – $4,7 \times 10^7$ UFP/mL) foi preparada, inoculada em meio BHI semissólido liquefeito suplementado com CaCl_2 1 M, e vertida sobre placas de Petri com ágar BHI, que foram incubadas a 37 °C overnight. Após a lise, os fagos foram extraídos com tampão SM (100 mM NaCl, 10 mM MgSO_4 , 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0,01% gelatina), centrifugados ($13.000 \times g$, 5 min, 4°C), filtrados (0,22 μm) e tratados com RNase A (20 mg/mL) e DNase I (1 U/ μL). A concentração foi realizada por precipitação com PEG 8000 (10% p/v) e NaCl 1 M, seguida de nova centrifugação e ressuspensão dos peletes em tampão SM.

Extração de DNA dos fagos

O DNA dos fagos foi extraído pelo método de Fenol-Clorofórmio (Sambrook; Russell, 2006), adicionando-se volumes iguais de fenol e clorofórmio: álcool isoamílico (24:24:1) às suspensões de fagos obtidas. As fases aquosas foram recuperadas e submetidas às etapas de precipitação com isopropanol e lavagem com etanol 70%. As amostras foram

ressuspensas em água ultrapura, em equipamento Qubit (Invitrogen, Singapore) usando o kit dsDNA Broad Range Assay (Invitrogen, Eugene, USA) e avaliadas quanto à integridade por eletroforese em gel de agarose 0,8%.

Análise de sequenciamento

Suspensões de DNA dos fagos (5 µg) foram aplicadas em tubos de 0,5 mL (GenTegra, Pleasanton, USA), secas em concentrador de amostras Savant DNA 120 OP (ThermoScientific, Asheville, USA) (25 °C, 80 min) e enviadas para sequenciamento de short reads em plataforma Illumina (HiSeq, San Diego, USA). As análises de bioinformática foram conduzidas na plataforma Galaxy (versão 25.0.2.dev0) para controle de qualidade das reads usando ferramenta Falco (versão 1.2.4+galaxy0; subsampling factor: 1) (Brandine; Smith, 2021), trimagem com a ferramenta Trimmomatic (versão 0.39+galaxy2; parâmetros SLIDINGWINDOW: 4:20; LEADING: 3; TRAILING: 15; MINLEN: 50) (Bolger et al., 2014) e montagem genômica usando a ferramenta Spades (versão 4.2.0+galaxy0; pipeline options: isolate; set coverage cutoff option: auto; select K-mer size values: 21, 33, 55, 77, 99; set Phred quality effect: auto) (Bankevich et al., 2012). Foram obtidos 36 contigs, dentre os quais aqueles com cobertura adequada foram submetidos à análise de similaridade com sequências depositadas no GenBank/NCBI, usando o domínio Vírus (Taxid: 10239) por meio da ferramenta BLAST (Zhang et al., 2000).

Resultados e discussão

As amostras de DNA dos fagos 2 e 4 apresentaram concentrações adequadas de 2,3 e 1,5 µg/µL, respectivamente, e integridade confirmada por eletroforese. O sequenciamento gerou 3.824.574 reads para o fago 2 e 4.136.219 reads para o fago 4, com alta qualidade (Q20 > 99%, Q30 > 96%, GC 33,8%) e baixa incidência de bases indefinidas. A análise de similaridade dos contigs revelou 97,63% de identidade com *Staphylococcus phage phiNM2*, sugerindo que os isolados analisados são variantes do Dubowvirus NM2.

Conclusões

A análise de similaridade entre os contigs obtidos e genomas virais do GenBank/NCBI indicou alta identidade com fagos de *S. aureus* da ordem Caudovirales, subfamília *Azeredovirinae* e gênero Dubowvirus. Esses resultados corroboram dados anteriores obtidos pela equipe. A montagem completa do genoma será finalizada para confirmar a classificação e atender aos requisitos regulatórios e de proteção intelectual do ativo tecnológico.

Agradecimentos

Ao apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) - Brasil, pela concessão de bolsa IC e incentivo à inserção de estudantes de graduação em atividades de pesquisa. À Embrapa pela concessão de infraestrutura a apoio financeiro para o desenvolvimento do projeto SEG 10.23.03.042.00.00.

Referências

BOLGER, A. M.; LOHSE, M.; USADEL, B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. **Bioinformatics**, v. 30, n. 15, p. 2114-2120, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>.

BANKEVICH, A.; NURK, S.; ANTIPOV, D.; GUREVICH, A. A.; DVORKIN, M.; KULIKOV, A. S.; LESIN, V. M.; NIKOLENKO, S. I.; PHAM, S.; PRJIBELSKI, A. D.; PYSHKIN, A. V.; SIROTKIN, A. V.; VYAHHI, N.; TESLER, G.; ALEKSEYEV, M. A.; PEVZNER, P. A. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its

applications to single-cell sequencing. **Journal of Computational Biology**, v. 19, n. 5, p. 455-477, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1089/cmb.2012.0021>.

BRANDINE, G. de S.; SMITH A. D. Falco: high-speed FastQC emulation for quality control of sequencing data. **F1000Research**, v. 8, 1874, 2021. DOI: <https://doi.org/10.12688/f1000research.21142.2>.

JAYALAKSHMI, K.; PARAMASIVAM, M.; SASIKALA, M.; TAMILAM, T. V.; SUMITHRA, A. Review on antibiotic residues in animal products and its impact on environments and human health. **Journal of Entomology and Zoology Studies**, v. 5, n. 3, p. 1446-1451, 2017.

LEITE, J. A.; PEREIRA, H. P.; ALVES, B. R. C.; BORGES, C. A. V.; RAMOS, A. I. A. P.; MARTINS, M. F.; ARCURI, E. F. Lytic bacteriophages as a potential alternative to control *Staphylococcus aureus*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 54, e00917, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1678-3921.pab2019.v54.00917>.

LIU, H.; HU, Z.; LI, M.; YANG, Y.; LU, S.; RAO, X. Therapeutic potential of bacteriophage endolysins for infections caused by Gram-positive bacteria. **Journal of Biomedical Science**, v. 30, article 29, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12929-023-00919-1>.

NAÇÕES UNIDAS. **Objetivo de Desenvolvimento Sustentável 8**: Trabalho decente e crescimento econômico. Disponível em: <https://brasil.un.org/pt-br/sdgs/8>. Acesso em: 13 mar. 2025.

PATEL, K.; GODDEN, S. M.; ROYSTER, E. E.; CROOKER, B. A.; JOHNSON, T. J.; SMITH, E. A.; SREEVATSAN, S. Prevalence, antibiotic resistance, virulence and genetic diversity of *Staphylococcus aureus* isolated from bulk tank milk samples of US dairy herds. **BMC Genomics**, v. 22, n. 1, 367, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12864-021-07603-4>.

PEREIRA, H. P. **Avaliação e caracterização de bacteriófagos líticos e suas endolisinas recombinantes para controle de *Staphylococcus aureus* na cadeia produtiva do leite**. 2023. 103 p. Tese (Doutorado em Genética e Biotecnologia) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2023. DOI: <https://doi.org/10.34019/ufff/te/2023/00012>.

PEREIRA, H. P.; ARCURI, E. F.; OLIVEIRA, F. R.; CARVALHO, C. V.; HONÓRIO, N. T. B. S.; GASPAR, E. B.; FAZA, D. R. L. R.; DOMINGUES, R.; BORGES, C. A. V.; SOUZA, G. N.; LANGE, C. C.; MARTINS, M. F. Evaluation and characterization of lytic phages and their recombinant endolysins for control of *Staphylococcus aureus* aiming to mitigate bovine mastitis. **Microbial Pathogenesis**, v. 199, 107188, 2025. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2024.107188>.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. Purification of nucleic acids by extraction with phenol: chloroform. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 2006, n. 1, pdb.prot4455, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1101/pdb.prot4455>.

STOLER, N.; NEKRUTENKO, A. Sequencing error profiles of Illumina sequencing instruments. **NAR Genomics & Bioinformatics**, v. 3, n. 1, lqab019, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1093/nargab/lqab019>.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **2021 Antibacterial agents in clinical and preclinical development: an overview and analysis**. Geneva, 2021. Disponível em: <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/354545/9789240047655-eng.pdf?sequence=1>. Acesso em: 14 mar. 2025.

ZHANG, Z.; SCHWARTZ, S.; WAGNER, L.; MILLER, W. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. **Journal of Computational Biology**, v. 7, n. 1/2, p. 203-214, 2000. DOI: <https://doi.org/10.1089/10665270050081478>

Métodos de plantio e taxas de semeadura de BRS Integra: produtividade do milho para silagem e desempenho da braquiária em sistema de integração

Julia Crespo dos Santos⁽¹⁾⁽⁷⁾, Pablo Gonçalves de Paula⁽²⁾, Bianca de Assis Mateus⁽³⁾, Laura Eliza Fontes Paiva⁽⁴⁾, Rafael Bolina da Silva⁽⁴⁾, Carlos Augusto Brandão de Carvalho⁽⁵⁾, Carlos Augusto de Miranda Gomide⁽⁶⁾, Alexandre Magno Brighenti dos Santos⁽⁶⁾, Carlos Renato Tavares de Castro⁽⁶⁾ e Domingos Sávio Campos Paciullo⁽⁶⁾

⁽¹⁾Estagiária, Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG. ⁽²⁾Bolsista (IC/CNPq), Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG. ⁽³⁾Bolsista (Pibic/CNPq), Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG. ⁽⁴⁾Bolsista (Pibic/Fapemig), Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG. ⁽⁵⁾Professor, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ. ⁽⁶⁾Pesquisador, Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG. ⁽⁷⁾E-mail: juliacrespo10@gmail.com.

Resumo — Objetivou-se avaliar o efeito de métodos de plantio e taxas de semeadura de *U. ruziziensis* cv. BRS Integra, em sistema de integração, sobre a produtividade do milho (*Zea Mays*) para silagem e a produção de massa da BRS Integra (forragem e formação de palhada). Foi utilizado o delineamento de blocos casualizados, em parcelas subdivididas, com quatro repetições. Nas parcelas foram alocados os métodos de plantio (em linha ou a lanço) e, nas subparcelas, as taxas de semeadura (2, 4, 6 e 8 kg/ha de sementes puras viáveis - SPV). Foram avaliadas a produção de MS do milho e a biomassa de BRS Integra (palhada e forragem), conforme as estratégias de manejo: i) pastejo (simulação com corte, 40 dias após a colheita do milho – DAC) e ii) silagem (60 DAC). A produção de MS de milho não variou com os tratamentos, assim como a massa de BRS Integra para silagem. O método a lanço proporcionou maior biomassa para palhada, e maior massa na simulação de pastejo. A biomassa para dessecação apresentou efeito linear e a MF na simulação de pastejo, resposta quadrática (ponto de máxima de 5,5 kg/ha de SPV). Essa taxa de semeadura é recomendada para o estabelecimento da BRS Integra em consórcio com o milho, visando a produção de forragem.

Termos para indexação: *Brachiaria*, consórcio de espécies, massa de forragem, sistema de plantio direto, *Zea mays*.

Planting method and seeding rates of BRS Integra: silage corn productivity and *Brachiaria* performance in an integrated system

Abstract — The objective of this study was to evaluate the effect of planting methods and seeding rates of *U. ruziziensis* cv. BRS Integra, in an integrated system, on the productivity of corn (*Zea Mays*) for silage and the dry matter production of BRS Integra for forage and for desiccation, aiming at the formation of straw. A randomized complete block design was used, in a split-plot scheme, with four replications. Planting methods (in-row or by throwing) were allocated in the plots and, in the subplots, four seeding rates of BRS Integra (2, 4, 6 and 8 kg/ha of viable pure seeds - VPS). The forage mass (FM) of BRS Integra were evaluated, according to the management strategies: i) grazing (simulation with cutting, 40 days after corn harvest - DAC) and ii) for silage production (60 DAC). The DM production of corn did not vary with the treatments, as well as the FM of BRS Integra for silage. The throwing planting method provided greater biomass for straw formation, as well as higher FM in the grazing simulation. The biomass for desiccation showed a linear effect, and the MF in the grazing simulation showed a quadratic response (maximum point of 5.5 kg/ha of SPV). This seeding rate is recommended for the establishment of BRS Integra in intercropping with corn, aiming at forage production.

Index terms: *Brachiaria*, forage mass, no-tillage system, species consortium, *Zea mays*.

Introdução

Os sistemas integrados de produção são uma alternativa para intensificação sustentável na agropecuária, tendo em vista sua capacidade para otimizar a eficiência de uso da terra, recuperar áreas degradadas de produção e possibilitar a diversificação de renda para produtores rurais (Barbosa et al., 2015). O sucesso destes sistemas depende de estratégias que promovam a interação positiva entre os diferentes componentes do sistema. Na implantação do consórcio, o período inicial de desenvolvimento dos componentes é considerado o mais crítico, especialmente para as lavouras, que apresentam maior potencial de perda de produtividade em situações de competição (Brighenti et al., 2023). A definição de estratégias adequadas relacionadas ao método de plantio e à taxa de semeadura da forrageira é de fundamental importância para minimizar a competição entre os componentes (Brighenti et al., 2023). Este fato se torna mais relevante para sistemas com a cultivar de *U. ruziziensis* BRS Integra, devido ao seu recente lançamento e potencial para se tornar uma das forrageiras mais cultivadas do País. O objetivo deste estudo foi estabelecer estratégias de implantação e manejo da cv. BRS Integra, no sistema consorciado com o milho.

As informações geradas no presente estudo vão ao encontro dos Objetivos do Desenvolvimento Sustentável (ODS) contidos na Agenda 2030, proposta pela Organização das Nações Unidas, da qual o Brasil é signatário, sobretudo nos seguintes objetivos específicos: ODS 1- Erradicação da pobreza: Acabar com a pobreza em todas as suas formas, em todos os lugares; ODS - 2 Erradicação da fome: Acabar com a fome, alcançar a segurança alimentar e melhoria da nutrição e promover a agricultura sustentável; ODS 8 - Empregos dignos e crescimento econômico: Promover o crescimento econômico sustentado, inclusivo e sustentável, emprego pleno e produtivo, e trabalho decente para todos; ODS 12 - Consumo Responsável: Assegurar padrões de produção e de consumo sustentáveis (Nações Unidas, 2025).

Material e métodos

O experimento foi conduzido no Campo Experimental José Henrique Bruschi, pertencente à Embrapa Gado de Leite, localizado no município de Coronel Pacheco, MG. O período experimental teve início em outubro de 2023 com a dessecação da *Urochloa ruziziensis* cv. BRS Integra, estabelecida na safra de 2022/2023, e finalizou em novembro de 2024. Foi utilizado delineamento em blocos casualizados, em esquema de parcelas subdivididas, com quatro repetições. Nas parcelas foram alocados dois métodos de plantio (semeadura manual a lanço e semeadura em linhas, com semeadora) e nas subparcelas, quatro taxas de semeadura da BRS Integra (2, 4, 6 e 8 kg/ha de sementes puras viáveis). A área experimental apresentava 2.240 m², (parcelas de 280 m² e subparcelas de 70 m²). O herbicida glifosato foi aplicado na dose de 2,0 L/ha, para dessecação da BRS Integra e formação de palhada para o plantio direto. Para o milho e a BRS Integra semeada em linha foi utilizada uma semeadora múltipla de plantio direto, calibrada para aplicar 350 kg/ha da formulação NPK (08-28-16) e densidade de aproximadamente 4,5 sementes de milho por metro linear. Para a semeadura a lanço, primeiro foi realizada a distribuição manual das sementes de BRS Integra, em seguida foi realizado o plantio do milho com a semeadora mencionada. Características avaliadas: i) biomassa de matéria seca (MS) de BRS Integra para formação de palhada, para o plantio direto da safra 2023/2024, ii) produtividade de MS do milho para silagem e iii) massa de forragem (MF) de BRS Integra, conforme as estratégias de simulação de pastejo (40 dias após a colheita - DAC) e produção de silagem (60 DAC). A biomassa de BRS Integra disponível para dessecação foi estimada pelo corte manual rente ao solo em área de 0,5 m². As amostras foram pesadas e secadas em estufa de ventilação forçada a 55 °C por 72 horas. A produção de MS de milho foi estimada

quando as plantas atingiram, aproximadamente, 35% de MS, nas três linhas centrais, em 3 metros lineares. Para estimativa da MF, na simulação de pastejo (resíduo de 20 cm) e para ensilagem (resíduo de 10 cm), as amostras foram coletas com cutelo, dentro de molduras de 0,5 m² e levadas para o laboratório, para pesagem e secagem em estufa de 55 °C, por 72 horas. Os dados foram inicialmente testados para a normalidade pelo Proc Univariante (Shapiro-Wilk) e submetidos à análise de variância e regressão (efeito de taxas de semeadura), utilizando-se o procedimento PROC GLM. As médias foram estimadas pelo LSMEANS e comparadas pela PDIFF do SAS® 9.4 (p>0,05).

Resultados e discussão

A produção de MS de milho para silagem não foi influenciada pelo método de plantio (Tabela 1). Este resultado demonstra que a competição entre a BRS Integra e o milho não foi suficiente para reduzir a produtividade do milho. Fica evidente também que a maior quantidade de biomassa para dessecação, que resultou em maior massa de palhada sobre o solo, não interferiu na germinação das sementes de milho nem em seu desenvolvimento até a colheita.

Houve efeito de método de plantio para biomassa de BRS Integra para dessecação e para MF de BRS Integra na simulação de pastejo, não sendo observado efeito, contudo, na MF de BRS Integra para produção de silagem (Tabela 1).

Tabela 1. Produção de MS de milho para silagem, biomassa de BRS Integra para dessecação e massa de forragem (MF) de BRS Integra na simulação de pastejo (40 dias após colheita) e para produção de silagem (60 dias após a colheita do milho), em sistema integrado de produção, em função do método de plantio da BRS Integra.

Característica	Método de plantio		EPM ⁽¹⁾	P-valor
	Lanço	Linha		
Produção de milho para silagem (MS kg/ha)	16.271 ^a	17.109 ^a	1.795	0,2037
Biomassa de BRS Integra para dessecação (MS kg/ha)	5.028 ^a	2.319 ^b	934	0,0001
MF de BRS Integra na simulação de pastejo (MS kg/ha)	4.569 ^a	3.955 ^b	704	0,0240
MF de BRS Integra para produção de silagem (MS kg/ha)	4.960 ^a	4.554 ^a	817	0,1769

Médias seguidas de mesma letra minúscula na linha, não diferem entre si pelo Teste F (p<0,05).

⁽¹⁾ Erro padrão da média.

A maior média de biomassa da BRS Integra para dessecação foi observada na semeadura a lanço, em relação à semeadura nas linhas do milho. Embora a literatura aponte para melhor estabelecimento da braquiária no plantio mecanizado, na linha e/ou entrelinha do milho (Andrade et al., 2015), quando comparado ao plantio a lanço, os resultados contrários a este padrão, observados neste trabalho, podem ser justificados por problemas na regulagem da semeadora no plantio na linha, na safra 2022/2023, que proporcionou a deposição das sementes de BRS Integra a uma profundidade de, aproximadamente, 10 cm. Para *U. ruziziensis*, a profundidade não deve ultrapassar 6 cm (Ceccon et al., 2008), a fim de favorecer o rompimento das camadas superficiais do solo durante o processo de germinação, evitar o atraso emergência das plântulas e obter o estande de plantas adequado. Por outro lado, os resultados de Brighenti et al. (2023) corroboram as evidências deste trabalho, com estabelecimento satisfatório da *U. ruziziensis* na semeadura a lanço.

A MF na simulação de pastejo, após a colheita de milho, foi maior na semeadura a lanço, em comparação ao sistema em linha. Esse resultado pode estar associado à maior quantidade de palhada presente nessas áreas (Tabela 1). No plantio a lanço sem incorporação, as sementes permanecem expostas na superfície do solo, estando suscetíveis ao arraste pela chuva, à radiação solar excessiva e ao consumo por aves e roedores, além de apresentarem menor contato com o solo, o que dificulta a fixação da radícula (Lima et al., 2016). No entanto, a mecanização para o plantio do milho, logo após a semeadura a lanço, pode ter atuado como um fator de compactação, atenuando os efeitos negativos das intempéries sobre as sementes.

A ausência de efeito do método de plantio na MF de BRS Integra para silagem (Tabela 1), indica uma tendência dos dosséis se aproximarem em termos de massa de forragem, ao longo do tempo.

As taxas de semeadura influenciaram na biomassa para dessecação e na MF na simulação de pastejo (Tabela 2). Na biomassa para dessecação, a análise de regressão mostrou efeito linear, enquanto para MF na simulação de pastejo houve significância para o efeito quadrático, com ponto de máxima de 4.713 kg/ha de MS, na taxa de semeadura de 5,5 kg/ha de SPV. O padrão quadrático da equação de regressão evidencia que taxas superiores a 5,5 kg/ha não resultam em acréscimos significativos na produção, provavelmente causado pela maior competição por recursos bióticos e abióticos de produção (Brighenti et al., 2023). Seguindo o padrão de resposta para métodos de plantio, a ausência de efeito de taxas de semeadura na produção do milho indica que o nível de competição entre as plantas de milho e a BRS Integra não foi prejudicial ao desenvolvimento do milho, fato desejado nos sistemas de integração.

Tabela 2. Biomassa de BRS Integra para dessecação e massa de forragem (MF) de BRS Integra na simulação de pastejo (40 dias após colheita), em sistema integrado de produção, em função da taxa de semeadura.

Característica	Taxa de semeadura (kg/ha SPV)				Efeito	P-valor
	2	4	6	8		
Biomassa de BRS Integra para dessecação (MS kg/ha)	2,787	3,260	4,167	4,481	Linear ⁽¹⁾	0,968
MF de BRS Integra na simulação de pastejo (MS kg/ha)	3,630	4,533	4,674	4,213	Quadrático ⁽²⁾	0,998

⁽¹⁾ (P<0,001); ⁽²⁾ (P<0,005).

Conclusões

O método de plantio a lanço promoveu condições mais favoráveis para a produção de massa de forragem e biomassa para formação de palhada de *Urochloa ruziziensis* cv. BRS Integra.

A produção de palhada responde linearmente até 8 kg/ha de SPV, enquanto a produção de forragem, após a colheita do milho, apresenta máxima resposta com 5,5 kg/ha de SPV de BRS Integra.

Os métodos e taxas de semeadura da BRS Integra não comprometeram a produção de massa seca de milho para silagem.

Agradecimentos

À FAPEMIG pelo apoio financeiro ao projeto APQ 03630-23.

Referências

ANDRADE, C. M. S.; ABREU, A. Q.; ZANINETTI, R. A.; VERZIGNASSI, J. R. Métodos de semeadura dos capins Xaraés e Llanero em plantio direto de pasto. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ZOOTECNIA, 25., 2015, Fortaleza. **Anais** [...]. Brasília, DF: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2015. Tema: Dimensões tecnológicas e sociais da zootecnia.

BARBOSA, F. A.; COSTA, P. M.; ANDRADE, V. J.; MAIA FILHO, G. H. B.; MACIEL, I. C. F.; SAULO, Q. L. Avaliação econômica e produtiva dos sistemas integrados de lavoura-pecuária-floresta. **Cadernos de Ciências Agrárias**, v. 7, p. 151-165, 2015. Disponível em: <https://periodicos.ufmg.br/index.php/ccaufmg/article/view/2847>. Acesso em: 4 ago. 2025.

BRIGHENTI, A. M.; PACIULLO, D. S. C.; GOMIDE, C. A. de M.; CASTRO, C. R. T. de; SOUZA, E. M. B. de; SILVA, R. B. da; SOUZA SOBRINHO, F. de. **Taxas de semeadura e métodos de plantio da "BRS Integra" (*Urochloa ruziziensis*) no consórcio com milho em cultivo de segunda safra**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2023. 25 p. (Embrapa Gado de Leite. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 50). Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/1156240/1/Taxas-de-semeadura-e-metodos-de-plantio-da-BRS-Integra.pdf>. Acesso em: 4 ago. 2025.

CECCON, G.; MATOSO, A. O.; NUNES, D. P. Germinação de *Brachiaria ruziziensis* em consórcio com milho em função da profundidade de semeadura e tipos de sementes In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 27.; SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE A LAGARTA-DO-CARTUCHO, SPODOPTERA FRUGIPERDA, 2.; WORKSHOP SOBRE MANEJO E ETIOLOGIA DA MANCHA BRANCA DO MILHO, 2008, Londrina. **Resumos** [...]. Londrina: Associação Brasileira de Milho e Sorgo, 2008. Tema: Agroenergia, produção de alimentos e mudanças climáticas: desafios para milho e sorgo. Disponível em: <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/254073/1/31045.pdf>. Acesso em: 5 ago. 2025.

LIMA, S. F.; TIMOSSI, P. C.; ALMEIDA, D. P. Métodos de semeadura e aplicação de 2,4-D na formação de *Braquiária ruziziensis* para plantio direto. **Cultura Agronômica**, v. 25, n. 2, p. 175-186, 2016. DOI: <https://doi.org/10.32929/2446-8355.2016v25n2p175-186>.

NAÇÕES UNIDAS. **Os Objetivos de Desenvolvimento Sustentável no Brasil**. Disponível em: <https://brasil.un.org/pt-br/sdgs>. Acesso em: 13 maio 2025.

Produção de biomassa e atributos estruturais de genótipos de *Urochloa ruzizensis* para produção de silagem

Pablo Gonçalves de Paula⁽¹⁾⁽⁶⁾, Carlos Augusto de Miranda Gomide⁽²⁾, Rafael Bolina da Silva⁽³⁾, Domingos Sávio Campos Paciullo⁽²⁾, Carlos Renato Tavares de Castro⁽²⁾, Laura Elisa Fontes Paiva⁽³⁾, Fausto de Souza Sobrinho⁽²⁾, Bianca de Assis Mateus⁽⁴⁾, Maria Lauane Gonçalves Miranda⁽⁵⁾ e Ana Teresa da Silva Cruz⁽⁵⁾

⁽¹⁾Bolsista (IC/CNPq), Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG. ⁽²⁾Pesquisador, Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG. ⁽³⁾Bolsista (Pibic/Fapemig), Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG. ⁽⁴⁾Bolsista (Pibic/CNPq), Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG. ⁽⁵⁾Estagiária, Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG. ⁽⁶⁾E-mail: pablogoncalvesjf@gmail.com.

Resumo — O objetivo deste estudo foi avaliar a produção de forragem e características estruturais de genótipos de *U. ruzizensis* colhidas aos 70 dias de rebrotação para confecção de silagem. Foram avaliados, num delineamento em blocos casualizados com três repetições, quatro genótipos, além da testemunha BRS Integra. Foram avaliadas a massa de forragem verde (MFV), a massa de folhas (MFO), a altura do dossel e a altura estendida, o índice de tombamento e a relação lâmina/colmo (RLC). Maior MFV foi observada para o genótipo G3 (9.623 kg/ha de MS) e menor para o G2 (6.740 kg/ha de MS) e a BRS Integra (6.531 kg/ha de MS), ficando do G1 e G4 com valores intermediários. A massa de folhas também foi maior para o genótipo G1 (2.884 kg/ha de MS) e os menores valores para o G2, G4 e a BRS Integra, com valor médio de 1.748 kg/ha de MS. As variáveis estruturais não apresentaram diferença entre os genótipos. Houve uma redução da altura média estendida de 85 cm para 70 cm na altura média do dossel. O índice de tombamento não variou entre os genótipos, sendo o valor médio observado de 1,23. A RLC não variou entre os genótipos com valor médio de 0,4. Os resultados apontam para o potencial de produção de forragem dos genótipos G1 e G3, sendo que o genótipo G3 ainda apresenta baixo índice de tombamento.

Termos para indexação: altura da planta, índice de tombamento, sistemas integrados, relação folha-colmo.

Biomass production and structural attributes of *Urochloa ruzizensis* genotypes for silage production

Abstract — The objective of this study was to evaluate the forage production and structural characteristics of *U. ruzizensis* genotypes harvested 70 days after regrowth for silage production. Four genotypes, in addition to the control BRS Integra, were evaluated in a randomized block design with three replicates. Green forage mass (GFM), leaf mass (LFM), canopy height and extended height, damping-off index, and blade-to-stem ratio (BLR) were evaluated. The highest GFM was observed for genotype G3 (9,623 kg/ha DM) and the lowest for G2 (6,740 kg/ha DM) and BRS Integra (6,531 kg/ha DM), with intermediate values for G1 and G4. Leaf mass was also highest for genotype G1 (2,884 kg/ha DM) and the lowest values for G2, G4, and BRS Integra, with an average value of 1,748 kg/ha DM. Structural variables did not differ among genotypes. There was a reduction in the average extended height from 85 cm to 70 cm in the average canopy height. The lodging index did not vary among genotypes, with an average value of 1.23. The RLC did not vary among genotypes, with an average value of 0.4. The results indicate the forage production potential of genotypes G1 and G3, with genotype G3 still presenting a low lodging index.

Index terms: integrated systems, leaf-stem ratio, lodging index, plant height.

Introdução

O gênero *Urochloa*, por sua rusticidade e versatilidade, é a base da pecuária a pasto no Brasil. A *Urochloa ruziziensis* (sinonímia *Brachiaria ruziziensis*) se destaca como planta forrageira perante as demais espécies deste gênero por seu maior valor nutritivo. Além disso, devido à sua maior sensibilidade ao Glifosato (Brighenti et al., 2011) e consequente facilidade de dessecação, tem sido uma das principais forrageiras utilizadas em sistemas de integração lavoura-pecuária (Souza Sobrinho et al., 2022).

Além da produção de palhada para o sistema de plantio direto, sua integração com o milho permite a utilização tanto para pastejo no início do outono, o chamado boi safrinha, como para a confecção de silagem.

A cultivar BRS Integra foi a primeira cultivar de *U. ruziziensis* desenvolvida no Brasil, apresentando maior produtividade em relação à cultivar Kennedy nos períodos de transição outono-inverno e inverno-primavera (Souza Sobrinho et al., 2022). Também, em avaliação sob pastejo, apresentou maior relação folha-colmo em comparação com a testemunha, a cultivar Kennedy (Paciullo et al., 2021). Esta cultivar foi obtida no terceiro ciclo de seleção do programa de melhoramento da espécie. Contudo, com o desenvolvimento contínuo do programa novos ciclos de seleção e recombinação vêm sendo realizados e novos genótipos selecionados.

O objetivo deste trabalho foi avaliar as características estruturais da pastagem e a produção de forragem para confecção de silagem de novos genótipos de *U. ruziziensis*.

As informações geradas no presente estudo vão ao encontro dos Objetivos do Desenvolvimento Sustentável (ODS) contidos na Agenda 2030, proposta pela Organização das Nações Unidas, da qual o Brasil é signatário, sobretudo nos seguintes objetivos específicos: ODS 1- Erradicação da pobreza: Acabar com a pobreza em todas as suas formas, em todos os lugares; ODS - 2 Erradicação da fome: Acabar com a fome, alcançar a segurança alimentar e melhoria da nutrição e promover a agricultura sustentável; ODS 8 - Empregos dignos e crescimento econômico: Promover o crescimento econômico sustentado, inclusivo e sustentável, emprego pleno e produtivo, e trabalho decente para todos; ODS 12 - Consumo Responsável: Assegurar padrões de produção e de consumo sustentáveis (Nações Unidas, 2025).

Material e métodos

O experimento foi conduzido no Campo Experimental José Henrique Bruschi, da Embrapa Gado de Leite, localizado em Coronel Pacheco, MG (21°33'22" de latitude sul, 43°06'15" de longitude oeste) a 410 m de altitude. O solo da área experimental é classificado como Latossolo Vermelho-Amarelo distrófico, de textura argilosa (Santos et al., 2018).

O ensaio foi instalado num delineamento em blocos casualizados com três repetições para a avaliação de cinco genótipos de *U. ruziziensis*. Além da testemunha, BRS Integra, quatro novos genótipos (G1, G2, G3 e G4), selecionados do Programa de Melhoramento de Forrageiras da Embrapa, foram plantados por mudas em parcelas de 5 x 4 m. O plantio das parcelas experimentais ocorreu em 23/10/25 com a distribuição das mudas em covas espaçadas de 50 cm entre linhas e 50 cm entre plantas. No dia 08/11/24 foi realizada a adubação de cobertura para o estabelecimento das plantas com o equivalente a 20 kg/ha de N por meio da formulação 20-05-20 (N-P-K). Em 09/12/24 foi feito o corte de uniformização das parcelas a 15 cm de altura.

Ao longo da época chuvosa foram realizados dois cortes de avaliação da produção de forragem. Após o segundo corte (em 05/02/25) as parcelas rebrotaram por um período de 70 dias para avaliação da produção de forragem para confecção de silagem, simulando uma condição após a retirada da lavoura de milho num sistema de integração (ILP).

Assim, em 16/04/25, as parcelas foram novamente cortadas a 5 cm do solo para avaliação da produção de forragem para silagem. Nesta data foram avaliadas: a altura do dossel das parcelas (4 pontos/parcela), a altura estendida de perfilhos e a massa de forragem. A massa de forragem foi colhida numa moldura de 1,0 x 0,5 m em ponto representativo da altura média do dossel de cada parcela. Uma amostra da forragem colhida foi levada para o laboratório, pesada, separada nas frações folha, colmo e forragem morta e secadas em estufa por 72h a 55 °C. Foram estimados: a massa de forragem verde/ha, a massa de folhas, a relação folha/colmo e o índice de tombamento da forragem. O índice de tombamento da forragem foi calculado como a razão entre a altura estendida de perfilhos e altura não estendida do dossel, conforme Wallau et al. (2015).

Os dados foram analisados com uso do software R utilizando o pacote Expdes.pt, e as médias, quando pertinente, foram comparadas pelo teste Tukey a 10% de probabilidade.

Resultados e discussão

A massa de forragem verde (Figura 1a) foi superior para o genótipo G3 em relação à BRS Integra e o G2, enquanto os genótipos G1 e G4 apresentaram valores intermediários. Para a massa de folhas (Figura 1b) também o genótipo G3 apresentou a maior em relação à BRS Integra, G2 e G4, ficando o G1 em posição intermediária. Estes resultados revelam a evolução do programa de melhoramento que continua produzindo genótipos com maior potencial de produção de forragem. Paciullo et al. (2021) e Souza Sobrinho et al. (2022) relataram uma superioridade de 15 a 20% na produção de forragem da BRS Integra em relação a cultivar Kennedy nos períodos de transição água-seca e seca-água. Os dados apresentados na Figura 1a revelam que o genótipo G1 apresentou 47% mais massa de forragem verde em relação à BRS Integra.

A produção total de forragem é uma importante característica a ser avaliada para a produção de silagem de capim devido à sua grande importância para a redução dos custos (Pereira et al., 2016). Já a massa de folhas contribui para melhorar o valor nutritivo da massa de forragem ensilada.

As características estruturais da forragem de genótipos de *Urochloa ruziziensis* estão apresentadas na Tabela 1. A altura estendida dos genótipos aos 70 dias de rebrota apresentou pequena variação, entre 83 e 88 cm. Entretanto, a altura média do dossel variou de 59 a 82 cm, respectivamente para os genótipos G1 e G2. Como consequência, o índice de tombamento variou de 1,09 para o G2, a 1,42 para o G1.

O índice de tombamento é importante ser avaliado em condições de diferimento de pastagens (Santos et al., 2009; Wallau et al., 2015), mas também em sistemas de produção de silagem de capim em que o maior período de rebrotação eleva a altura das plantas podendo levar ao acamamento e consequente aumento de perdas na colheita.

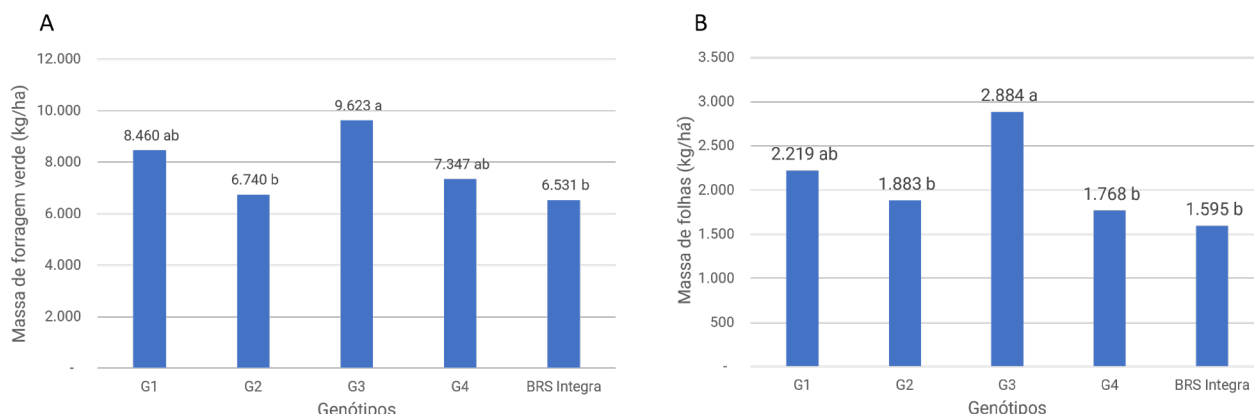


Figura 1. Massa de forragem verde (a) e massa de folhas (b) de genótipos de *U. ruziziensis* colhidos aos 70 dias rebrotação.

Os valores do índice de tombamento encontrados neste trabalho são comparáveis àqueles apresentados por Santos et al. (2009), que avaliaram as características estruturais do capim-braquiária (*Urochloa decumbens*) em diferentes idades de diferimento. Os autores encontraram valores variando de 1,30 aos 73 dias de diferimento, até 3,29 aos 160 dias.

Tabela 1. Características estruturais de genótipos de *U. ruziziensis* colhidas aos 70 dias de rebrotação.

Genótipos	Altura Estendida (cm)	Altura (cm)	Índice de tombamento	RLC ⁽¹⁾
G1	83	59	1,42	0,42
G2	88	82	1,09	0,41
G3	86	73	1,19	0,46
G4	85	68	1,26	0,36
BRS Integra	84	70	1,21	0,35
Médias	85	70	1,23	0,4
P-valor	0,797	0,196	0,309	0,385
EPM	1,2	2,81	0,05	0,02

⁽¹⁾ Relação lâmina/colmo.

Os valores da relação lâmina/colmo (RLC) variaram de 0,46 a 0,35, mas não apresentou diferença significativa entre os genótipos, apesar da diferença observada na massa de folhas (Figura 1b). Por outro lado, é interessante notar que a maior massa de forragem do genótipo G3 foi acompanhada pela manutenção da RLC, podendo contribuir para evitar a redução do valor nutritivo da forragem ensilada. Contudo, os dados de valor nutritivo da forragem e da silagem ainda estão sendo analisados e serão importantes, assim como um segundo ano de avaliação, para a definição do potencial destes genótipos para a produção de silagem.

Conclusão

Os genótipos G3 e G1 apresentaram maior massa de forragem verde em relação à BRS Integra.

A altura estendida não variou entre os genótipos, mas a altura do dossel reduziu em média 28% após 70 dias de rebrotação.

Houve baixo índice de tombamento, variando de 1,42 a 1,02, respectivamente para os genótipos G1 e G2.

A relação lâmina/como não variou entre os genótipos, apresentando valor médio de 0,40.

Referências

- BRIGHENTI, A. M.; SOUZA SOBRINHO, F.; ROCHA, W. S. D.; MARTINS, C. E.; DEMARTINI, D.; COSTA, T. R. Suscetibilidade diferencial de espécies de braquiária ao herbicida glifosato. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 46, n. 10, p. 1241-1246, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2011001000018>.
- NAÇÕES UNIDAS. **Os Objetivos de Desenvolvimento Sustentável no Brasil**. Disponível em: <https://brasil.un.org/pt-br/sdgs>. Acesso em: 13 maio 2025.
- PACIULLO, D. S. C.; RODRIGUES, P. do R.; SOARES, N. de A.; GOMIDE, C. A. de M.; SOUZA SOBRINHO, F. de; MORENZ, M. J. F. **Produção de forragem de *Brachiaria ruziziensis* cv. BRS Integra sob pastejo, ao longo do ano**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2021. 23 p. (Embrapa Gado de Leite. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 43). Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/1131568/1/BOP-43-Produt807a771o-de-Forragem.pdf>. Acesso em: 13 jul. 2025.
- PEREIRA, A. V.; LEDO, F. J. da S.; MORENZ, M. J. F.; LEITE, J. L. B.; BRIGHENTI, A. M.; MARTINS, C. E.; MACHADO, J. C. **BRS Capiacu: cultivar de capim-elefante de alto rendimento para produção de silagem**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2016. 6 p. (Embrapa Gado de Leite. Comunicado Técnico, 79). Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/1056288/1/ComunicadoTecnico79.pdf>. Acesso em: 13 jul. 2025.
- SANTOS, H. G. dos; JACOMINE, P. K. T.; ANJOS, L. H. C. dos; OLIVEIRA, V. A. de; LUMBRERAS, J. F.; COELHO, M. R.; ALMEIDA, J. A. de; ARAUJO FILHO, J. C. de; OLIVEIRA, J. B. de; CUNHA, T. J. F. **Sistema Brasileiro de Classificação de Solos**. 5. ed. rev. e ampl. Brasília, DF: Embrapa, 2018. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/1094003/2/SiBCS2018ISBN9788570358004.pdf>. Acesso em: 13 jul. 2025.
- SANTOS, M. E. R.; FONSECA, D. M.; EUCLIDES, V. P. B.; NASCIMENTO JÚNIOR, D.; QUEIROZ, A. C.; RIBEIRO JÚNIOR, J. I. Características estruturais e índice de tombamento de *Brachiaria decumbens* cv. Basilisk em pastagens diferidas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38, n. 4, p. 626-634, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1516-35982009000400006>.
- SOUZA SOBRINHO, F. de; AUAD, A. M.; BRIGHENTI, A. M.; GOMIDE, C. A. de M.; MARTINS, C. E.; CASTRO, C. R. T. de; PACIULLO, D. S. C.; BENITES, F. R. G.; ROCHA, W. S. D. da. **BRS Integra: nova cultivar de *Urochloa ruziziensis* para a ILPF**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2022. 11 p. (Embrapa Gado de Leite. Comunicado Técnico, 93). Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/1140781/1/COT-93-BRS-Integra-nova-cultivar-de-Urochloa-ruziziensis-para-a-ILPF.pdf>. Acesso em: 13 jul. 2025.
- WALLAU, M. O.; SOLLENBERGER, L. E.; VENDRAMINI, J. M. B.; MULLENIX, M. K.; QUESENBERRY, K. H.; GOMIDE, C. A. M.; COSTA, V.; DILORENZO, N. Herbage accumulation and nutritive value of limpgrass breeding lines under stockpiling management. **Crop Science**, v. 55, n. 5, p. 2377-2383, 2015. DOI: <https://doi.org/10.2135/cropsci2014.11.0797>.

Desenvolvimento de um protocolo para descontaminação de córneas bovinas provenientes de abatedouro

Vittoria Cucurullo Pioli⁽¹⁾, Victor Hugo Halfeld Kelmer Maluf⁽²⁾, Letícia Milena de Jesus⁽³⁾, Valquíria da Silva Oliveira⁽³⁾, Robert Domingues⁽⁴⁾, Marta Fonseca Martins⁽⁵⁾, Wanessa Araújo Carvalho⁽⁵⁾ e Emanuelle Baldo Gaspar⁽⁵⁾

⁽¹⁾Bolsista (Pibic/CNPq), Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG. ⁽²⁾Bolsista (CNPq/nível C), Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG. ⁽³⁾Estagiária, Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG. ⁽⁴⁾Analista, Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG. ⁽⁵⁾Pesquisadora, Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG. ⁽⁶⁾E-mail: v.pioli@yahoo.com.br.

Resumo — A ceratoconjuntivite infecciosa bovina (CIB) causa prejuízos econômicos e afeta o bem-estar animal, tendo a bactéria *Moraxella bovis* como principal agente etiológico. O uso de modelos in vitro é uma alternativa importante para estudar a patogênese da doença, mas a alta carga microbiana das córneas oriundas de abatedouros representa um obstáculo técnico. Este estudo teve como objetivo desenvolver um protocolo de descontaminação de córneas bovinas de abatedouro para uso em cultivo in vitro. Três experimentos foram realizados, testando diferentes etapas de pré-processamento, processamento e cultivo, com variações nos compostos antimicrobianos, concentrações, temperaturas e tempos de exposição. O primeiro apresentou contaminação generalizada, indicando necessidade de ajustes. O segundo incluiu etapas estéreis e uso de clorexidina, mas a opacificação das córneas e a persistência de contaminação exigiram novas modificações. No terceiro, alteraram-se concentração de iodopovidona, tempo de exposição e temperatura, resultando em redução significativa da carga microbiana e ausência de crescimento em várias amostras após 48 horas em ágar sangue. Conclui-se que o terceiro experimento apresentou os melhores resultados e atende às exigências para aplicação em modelos in vitro de estudo da CIB.

Termos para indexação: ceratoconjuntivite infecciosa bovina, crescimento microbiano, globos oculares bovinos, esterilização.

Development of a decontamination protocol for bovine corneas obtained from slaughterhouses

Abstract — Infectious bovine keratoconjunctivitis (IBK) is a disease that causes economic losses and affects animal welfare, with *Moraxella bovis* being its main etiological agent. The use of in vitro models is a relevant alternative for studying the pathogenesis of the disease; however, the high microbial load of corneas obtained from slaughterhouses represents a technical obstacle. Thus, this study aimed to develop a protocol for the decontamination of bovine corneas from slaughterhouses for use in in vitro cultures. Three protocols were tested, in which different pre-processing, processing, and culturing steps were evaluated, with variations in antimicrobial compounds, concentrations, temperatures, and exposure times. The first protocol resulted in widespread contamination of the samples, indicating the need for adjustments. The second protocol introduced sterile handling steps and the use of chlorhexidine, but corneal opacification and persistent contamination required further modifications. In the third protocol, adjustments were made to the concentration of the decontaminant (povidone-iodine), exposure times, and solution temperatures. A significant reduction in microbial load was observed, with several samples showing no microbial growth on blood agar after 48 hours. It is concluded that the third protocol yielded the best results and meets the requirements for using bovine corneas in in vitro models for the study of IBK.

Index terms: infectious bovine keratoconjunctivitis, microbial growth, bovine ocular globes, sterilization.

Introdução

Aceratoconjuntivite infecciosa bovina (CIB) é uma doença ocular que promove diminuição na produção e interfere no bem-estar animal, resultando em perdas econômicas (Sheedy et al., 2021). Embora não seja fatal, o desconforto e a possibilidade de perda de visão causados pela infecção podem ocasionar redução na produção de leite ou carne, além de resultar em custos com o tratamento (Conceição; Turnes, 2003). O principal agente etiológico associado à CIB é a bactéria *Moraxella bovis*. Outras espécies de bactérias, como *M. bovoculi* e *Mycoplasma* spp., também foram isoladas em animais afetados e acredita-se que estejam implicadas na patogênese (Angelos, 2015; Dickey et al., 2016).

Uma das formas para se responder se outras espécies bacterianas participam da patogênese da doença é a utilização de modelos in vitro para investigar aspectos biológicos desses agentes, como a interação com o hospedeiro, evitando procedimentos invasivos e potencialmente dolorosos em animais vivos. Contudo, córneas bovinas de abatedouros apresentam alta contaminação microbiana, o que pode comprometer a viabilidade dos resultados dos estudos. Diante disso, o presente trabalho teve por objetivo desenvolver um protocolo para a descontaminação de córneas bovinas provenientes de abatedouros, visando reduzir a carga microbiana das mesmas, de forma a garantir a descontaminação tecidual necessária para posteriores análises morfológicas, microbiológicas e moleculares relacionadas à CIB.

As informações geradas no presente estudo vão ao encontro dos Objetivos do Desenvolvimento Sustentável (ODS) contidos na Agenda 2030, proposta pela Organização das Nações Unidas, da qual o Brasil é signatário, sobretudo nos seguintes objetivos específicos: ODS 8 - Empregos dignos e crescimento econômico: Promover o crescimento econômico sustentado, inclusivo e sustentável, emprego pleno e produtivo, e trabalho decente para todos (Nações Unidas, 2025).

Material e métodos

Três experimentos consecutivos foram conduzidos para estabelecer a descontaminação eficiente das córneas. Todos os materiais e soluções foram previamente autoclavados e as soluções foram mantidas a 4 °C (Sperling; Sørensen, 1981). Os globos oculares foram transportados do abatedouro ao laboratório em PBS (Onorato, 2021). A integridade dos globos oculares foi confirmada antes da dissecação das córneas. No primeiro experimento, no fluxo laminar, os globos oculares foram imersos em iodopovidona a 5% por 2 min. e lavados em PBS. Em seguida, foram imersos em tiosulfato de sódio a 0,1% por 1 min e novamente lavados em PBS. Por fim, foram imersos em gentamicina (200 µg/mL) diluída em meio de cultivo M199 (Merck) por 1 min. e lavados em PBS. As córneas, então, foram removidas com material cirúrgico estéril, mantendo 1 a 2 mm de esclerótica (Parekh et al., 2012). As córneas foram cultivadas por 24 horas em meio M199 contendo diferentes combinações e concentrações de antibióticos a 35 °C (Biochemical oxygen demand, Fanem, São Paulo) (Tabela 1 - Apêndice). Os antibióticos empregados foram gentamicina, penicilina-estreptomicina e a combinação de penicilina-estreptomicina com anfotericina B. Como os resultados de descontaminação não foram satisfatórios, no segundo experimento (Figura 1), adotou-se uma etapa denominada “pré-processamento”, que consiste na descontaminação com iodopovidona a 10% por 2 min., lavagem em PBS e imersão em tiosulfato de sódio a 0,1% por 1 min., antes de colocar as córneas no fluxo laminar. Imediatamente após a passagem das córneas para o fluxo laminar iniciou-se a etapa denominada “processamento”, que consistiu em tratamento com iodopovidona a 10% por 2 min., seguido por lavagem em PBS, tiosulfato de sódio a 0,1% por 1 min, e lavagem em

PBS. Foi testado ainda o uso de clorexidine 0,5% por 1 min. e/ou gentamicina 200 µg/mL por 1 min. O cultivo foi feito em meio M199 contendo gentamicina a 200 µg/mL a 35 °C na estufa B.O.D. A coleta do material do meio de cultivo com swab estéril e inoculação em ágar sangue foram realizadas 24 e 48 h após o cultivo (Tabela 2 - Apêndice).

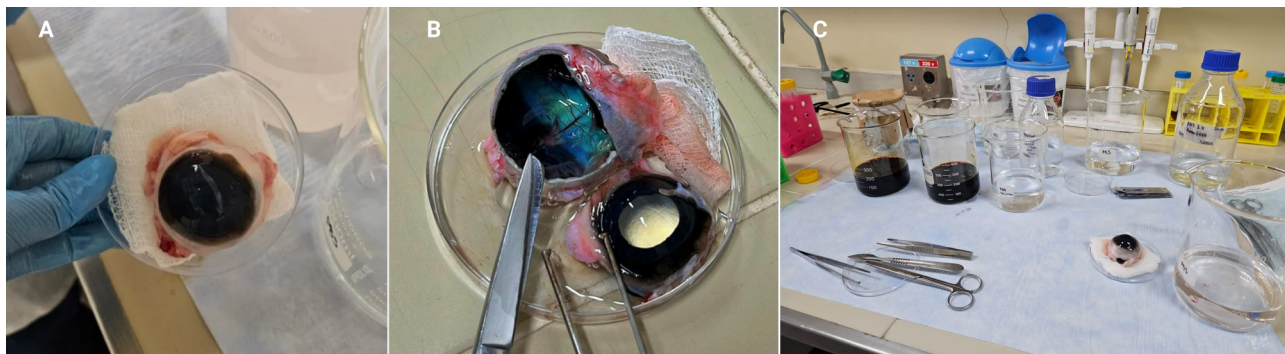


Figura 1. (A) globo ocular bovino; (B) pré-tratamento; (C) dissecação do globo ocular.

No terceiro experimento (Tabela 3 - Apêndice), optou-se por ajustar o tempo e a temperatura do tratamento de descontaminação (Parekh et al., 2012). As soluções foram mantidas à temperatura ambiente e, assim como no experimento anterior, foram realizadas as etapas de pré-processamento, processamento e cultivo. Foram utilizadas 12 córneas e as condições foram testadas em triplicata. No pré-processamento, a modificação consistiu em retornar ao uso de iodopovidona a 5%. No processamento, as etapas foram: 1. Imersão em iodopovidona a 5% por 10 min.; 2. Lavagem em PBS; 3. Imersão em tiosulfato de sódio a 0,1% por 2 min.; 4. Lavagem em PBS; 5. Remoção da córnea; 6. Imersão em gentamicina (200 µg/mL) diluída em meio M199 por 2 min. As condições de cultivo permaneceram as mesmas. Neste experimento, a coleta do material da superfície da córnea e a inoculação em ágar sangue foram realizadas 24 h e 48 h após a incubação em meio M199.

Resultados e discussão

Ao final do primeiro experimento observou-se que as placas de ágar sangue e os poços estavam majoritariamente contaminados, com incontáveis colônias de bactérias e fungos (Tabela 1 – Apêndice). Esse resultado exigiu alterações no experimento, resultando na realização do segundo experimento. Entretanto, no segundo experimento desenvolvido ainda não se obteve a descontaminação efetiva das córneas, as quais apresentaram predominantemente crescimento incontável de colônias ao final de 48h (Tabela 2 – Apêndice). Ademais, o uso de clorexidina a 0,5% e iodopovidona a 10% exerceram efeito citotóxico, devido à alta concentração, e tornaram as córneas opacas. Por outro lado, no terceiro experimento, as modificações realizadas levaram a uma melhora significativa no processo de descontaminação, desde que fossem observadas as etapas de “pré-processamento” e “processamento”, independente do uso de gentamicina (Tabela 3 - Apêndice).

Conclusão

Os experimentos permitiram desenvolver um protocolo para a descontaminação de córneas bovinas provenientes de abatedouro, viabilizando seu uso em modelos in vitro para estudos sobre CIB. Apesar da contaminação inicial elevada, as modificações do terceiro experimento demonstraram redução significativa no crescimento microbiano. A etapa subsequente deste estudo deve avaliar possíveis efeitos citotóxicos do novo protocolo.

Agradecimentos

Ao apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) - Brasil, pela concessão de bolsa IC e incentivo à inserção de estudantes de graduação em atividades de pesquisa. Também ao CNPq, pelo projeto de rede 403830-2023-0. À Fapemig, pelo apoio financeiro por meio do projeto APQ-00957-23. À Embrapa pela concessão de infraestrutura.

Referências

ANGELOS, J. A. Infectious bovine keratoconjunctivitis (pinkeye). **Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice**, v. 31, n. 1, p. 61-79, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2014.11.006>.

CONCEIÇÃO, F. R.; TURNES, C. G. Moraxella bovis: influência das características genotípicas e fenotípicas no controle da ceratoconjuntivite infecciosa bovina. **Ciência Rural**, v. 33, n. 4, p. 779-788, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0103-84782003000400033>.

DICKEY, A. M.; LOY, D. J.; BONO, J. L.; SMITH, T. P. L.; APLEY, M. D.; LUBBERS, B. V.; DEDONDER, K. D.; CAPIK, S. F.; LARSON, R. L.; WHITE, B. J.; BLOM, J.; CHITKO-MCKOWN, C. G.; CLAWSON, M. L. Large genomic differences between Moraxella bovoculi isolates acquired from the eyes of cattle with infectious bovine keratoconjunctivitis versus the deep nasopharynx of asymptomatic cattle. **Veterinary Research**, v. 47, article 31, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13567-016-0316-2>.

NAÇÕES UNIDAS. **Objetivo de Desenvolvimento Sustentável 8: Trabalho decente e crescimento econômico**. Disponível em: <https://brasil.un.org/pt-br/sdgs/8>. Acesso em: 13 maio 2025.

PAREKH, M.; FERRARI, S.; DI IORIO, E.; BARBARO, V.; CAMPOSAMPIERO, D.; KARALI, M.; PONZIN, D.; SALVALAIO, G. A simplified technique for in situ excision of cornea and evisceration of retinal tissue from human ocular globe. **Journal of Visualized Experiments**, n. 64, e3765, 2012. DOI: <https://doi.org/10.3791/3765>.

ONORATO, G. de C. **Desenvolvimento de método de criopreservação de córneas para potencial aplicação em teste de permeabilidade e opacidade da córnea bovina (BCOP)**. 2021. 77 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2021.

SHEEDY, D. B.; SAMAH, F. E.; GARZON, A.; FAUSAK, E.; VAN NOORD, M.; ANGELOS, J. A.; MAIER, G. U. Non-antimicrobial approaches for the prevention or treatment of infectious bovine keratoconjunctivitis in cattle applicable to cow-calf operations: a scoping review. **Animal**, v. 15, n. 6, 100245, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.animal.2021.100245>.

SPERLING, S.; SØRENSEN, I. G. Decontamination of cadaver corneas. **Acta Ophthalmologica**, v. 59, n. 1, p. 126-133, 1981. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1755-3768.1981.tb06720.x>.

Apêndice - Tabelas

Tabela 1. Tratamentos de descontaminação aplicados em pares de córneas e contagem bacteriana após 24h de cultivo em meio M199 contendo diferentes antibióticos e antifúngico.

Pares de córneas	Gen (µg/mL) ⁽¹⁾	Pen-Est (U/mL)/(mg/mL) ⁽²⁾	Pen-Est-AnfB (U/mL)/(mg/mL)/(µg/mL) ⁽³⁾	Contagem bacteriana (número de colônias) ⁽⁴⁾ após 24h de cultivo
A	50			Inc
B	100			Inc
C	200			Inc
D		100/0,1		Inc
E			100/0,1/0,25	Inc
F	100	100/0,1		Inc
G	100		100/0,1/0,25	Inc

⁽¹⁾ Gen: gentamicina; ⁽²⁾ Pen: penicilina - Est: estreptomicina; ⁽³⁾ AnfB: anfotericina B; ⁽⁴⁾ Inc: incontáveis.

Tabela 2. Tratamentos de descontaminação aplicados em pares de córneas e contagem bacteriana após 24h e 48h de cultivo em meio M199, incluindo pré-processamento dos globos oculares, processamento das córneas e dois antibióticos.

Pares de córneas	Tratamentos de descontaminação				Contagem bacteriana (número de colônias)	
	Pré ⁽¹⁾	Proc ⁽²⁾	Clor ⁽³⁾	Gen ⁽⁴⁾	24h	48h
A	X	X		X	Inc	Inc
B	X	X	X	X	18	Inc
C	X	X			0	0
D	X	X	X		0	Inc
E		X		X	Inc	Inc
F		X	X	X	0	Inc
G		X			0	Inc
H		X	X		0	Inc

⁽¹⁾ Pré: pré-processamento (iodopolvidine 10%; 2'/tiosulfato 0,1% 1'); ⁽²⁾ Proc: processamento (iodopolvidine 10%; 2'/tiosulfato 0,1% 1'); ⁽³⁾ Clor: clorexidina (0,5% 1'); ⁽⁴⁾ Gen: gentamicina 200 ug/mL 2'.

Tabela 3. Tratamentos de descontaminação aplicados em trios de córneas e contagem bacteriana após 24h e 48h de cultivo em meio M199, incluindo pré-processamento dos globos oculares, processamento das córneas e antibiótico.

Pares de córneas	Descontaminação			Contagem bacteriana (número de colônias) ⁽⁴⁾	
	Pré ⁽¹⁾	Proc ⁽²⁾	Gen ⁽³⁾	24h	48h
A	X	X		0	0
B	X	X	X	0	0
C		X		0	Inc
D		X	X	0	Inc

⁽¹⁾ Pré: pré-processamento (iodopolvidine 5%; 2'/tiosulfato 0,1% 1'); ⁽²⁾ Proc: processamento (iodopolvidine 5%; 10'/tiosulfato 0,1% 2'); ⁽³⁾ Gen: gentamicina 200 ug/mL 1'. ⁽⁴⁾ Inc: incontáveis.

Eletroporação e biópsia embrionária: implicações para edição do gene da beta-lactoglobulina em embriões bovinos

Leandra Cristina Brandt de Jesus⁽¹⁾⁽⁴⁾, Hyago Passe Pereira⁽²⁾, Eliza Diniz de Souza⁽²⁾, Carolina David Vieira⁽²⁾ e Luiz Sergio de Almeida Camargo⁽³⁾

⁽¹⁾Bolsista (Pibic/CNPq), Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG. ⁽²⁾Estagiária, Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG. ⁽³⁾Pesquisador, Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG. ⁽⁴⁾E-mail: leandrabrandt00@gmail.com.

Resumo — A eletroporação do sistema CRISPR/Cas9 em zigotos é uma ferramenta promissora para a edição genômica em bovinos. Paralelamente, a biópsia embrionária permite a avaliação genômica pré-implantacional e pode ser aplicada para seleção de embriões geneticamente editados. Este estudo investigou os efeitos da eletroporação de zigotos bovinos com CRISPR/Cas9 para edição do gene da beta-lactoglobulina sobre a viabilidade embrionária pós-biópsia, avaliada pela capacidade de reexpansão da blastocoele, e a qualidade das análises genéticas subsequentes. A taxa de reexpansão da blastocoele foi semelhante ($p>0,05$) entre o grupo controle (80%) e eletroporado (62,8%). Amostras de biópsias do grupo controle não apresentaram falhas da amplificação por PCR, enquanto 21,7% das amostras falharam no eletroporado, porém sem diferenças entre os grupos ($p>0,05$). Não houve diferenças ($p>0,05$) nas concentrações de DNA nas amostras entre grupos controle ($6,09 \pm 1,01$ ng/ μ L) e eletroporado ($4,9 \pm 0,5$ ng/ μ L), e na qualidade dos cromatogramas. Os resultados indicam que a eletroporação não compromete a viabilidade embrionária pós-biópsia e nem interfere negativamente na amplificação por PCR ou na qualidade do sequenciamento, evidenciando sua viabilidade para aplicações de edição do gene da beta-lactoglobulina.

Termos para indexação: CRISPR/Cas9, diagnóstico pré-implantacional, edição gênica, melhoramento animal.

Electroporation and embryo biopsies: implications for beta-lactoglobulin gene editing in bovine embryos

Abstract — Electroporation of the CRISPR/Cas9 system in zygotes is a promising tool for genome editing in cattle. In parallel, embryo biopsy allows preimplantation genomic assessment and can be applied to select genetically edited embryos. This study investigated the effects of electroporation of bovine zygotes with CRISPR/Cas9 for editing the beta-lactoglobulin gene on post-biopsy embryo viability, assessed by blastocoele re-expansion capacity, and the quality of subsequent genetic analyses. The blastocoele re-expansion rate was similar ($P>0.05$) between the control (80%) and electroporated (62.86%) groups. In the post-biopsy analysis, samples from the control group did not show PCR amplification failures, while 21.71% of the samples failed in the electroporated one, but with no differences between groups ($p>0.05$). There were no differences ($p>0.05$) in DNA concentrations in the samples between control (6.09 ± 1.01 ng/ μ L) and electroporated (4.92 ± 0.54 ng/ μ L) groups, nor in the quality of the chromatograms. The results indicate that the technique does not compromise post-biopsy embryo viability nor negatively interfere with PCR amplification or sequencing quality, evidencing its viability for editing applications of the beta-lactoglobulin gene.

Index terms: CRISPR/Cas9, pre-implantation diagnosis, gene editing, animal improvement.

Introdução

A edição gênica representa uma ferramenta biotecnológica avançada e de alto impacto no melhoramento genético animal, possibilitando modificações precisas e direcionadas no genoma. Essa abordagem tem viabilizado a introdução de alterações genômicas específicas em genes associados a características de interesse zootécnico, como o aumento da produtividade, a resistência ao estresse térmico, a inativação de genes relacionados a reações alérgicas e a conferência de resistência a patógenos (Camargo et al., 2023; Lemos, 2024).

O sistema CRISPR/Cas9 é a principal tecnologia de edição gênica e atua por meio de interações RNA-DNA e ação da enzima Cas9 para promover edições no genoma (Doudna; Charpentier, 2014). A entrega do sistema CRISPR/Cas9 para citoplasma de zigotos tem sido comumente realizada por microinjeção citoplasmática, mas recentemente foi relatado alta eficiência de edição utilizando a eletroporação (Camargo et al., 2020). Neste contexto, a técnica de eletroporação de embriões associada ao sistema CRISPR/Cas9 emerge como uma estratégia promissora para otimizar a taxa de sucesso e a especificidade das edições gênicas (Miao et al., 2019; Camargo et al., 2020).

Adicionalmente, a biópsia embrionária desempenha papel fundamental em protocolos de transferência embrionária, permitindo avaliação genômica pré-implantacional e reconhecida como uma técnica segura (Oliveira et al., 2023). Sua aplicação na identificação antecipada da edição genômica tem o potencial de elevar a previsibilidade dos resultados e favorecer a geração de animais com características específicas de forma mais consistente (Camargo et al., 2023). O material biológico obtido pode ser utilizado em reações de PCR para a genotipagem, que consiste na amplificação específica da região alvo do DNA desejada; contudo, os efeitos da eletroporação para edição gênica sobre a viabilidade embrionária pós-biópsia não são conhecidos.

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar se a eletroporação de zigotos com o sistema CRISPR/Cas9 interfere na viabilidade embrionária, avaliada pela capacidade de reexpansão da blastocle após a biópsia de blastocistos derivados, assim como analisar os efeitos dessa técnica sobre as análises pós-amplificação por PCR do DNA extraído das amostras biopsiadas, tendo como modelo a edição do gene da beta-lactoglobulina (BLG), que codifica uma das principais proteínas alergênicas do leite de vaca.

As informações geradas no presente estudo vão ao encontro dos Objetivos do Desenvolvimento Sustentável (ODS) contidos na Agenda 2030, proposta pela Organização das Nações Unidas, da qual o Brasil é signatário, sobretudo nos seguintes objetivos específicos: ODS 2 - Erradicação da fome: Acabar com a fome, alcançar a segurança alimentar e melhoria da nutrição e promover a agricultura sustentável (Nações Unidas, 2025).

Material e métodos

Os oócitos utilizados para a produção in vitro de zigotos foram obtidos de ovários provenientes de matadouro-frigorífico comercial localizado na cidade de Juiz de Fora – MG. Oócitos foram maturados in vitro em meio de maturação (BioKlone, Passo Fundo, RS) durante 22 horas em incubadora a 38,5 °C com 5% de CO₂ em ar atmosférico e a fertilização in vitro (FIV) foi realizada pela coincubação de 2 x 10⁶ espermatozoides/mL com os oócitos maturados por oito horas em meio FIV (BioKlone, Passo Fundo, RS), também em incubadora a 38,5 °C em 5% CO₂ em ar atmosférico. Em seguida, os zigotos foram desnudados e submetidas à eletroporação (Nepa21, Nepagene, Chiba, Japão) de 20V/mm, com 100:200

ng/ μ L de sgRNA:Cas9 respectivamente, para editar o gene da betalactoglobulina (BLG) em oócitos bovinos fertilizados in vitro. Após a eletroporação, os embriões foram alocados aleatoriamente para cultivo em dois grupos: controle e eletroporado. Após o período de sete dias de cultivo foi realizada biópsia manual dos embriões em estágio de blastocisto. As contrapartes embrionárias foram submetidas à avaliação da reexpansão da blastocèle 3 horas após a realização da biópsia embrionária. A classificação da reexpansão foi realizada de forma semiquantitativa, utilizando uma escala ordinal de quatro categorias: “0” (Não reexpandido): ausência de reexpansão da blastocèle; “1” (Pouco reexpandido): início discreto de reexpansão da blastocèle; “2” (Reexpandido): reexpansão parcial ou completa da blastocèle; e “3” (Muito reexpandido): reexpansão completa e proeminente da blastocèle. As biópsias coletadas foram submetidas à lise celular para expor o DNA genômico utilizando um protocolo com tampão de lise contendo proteinase K (1,5 μ g/ μ L). A amplificação por PCR da região alvo foi realizada em duplicata, seguida de purificação e sequenciamento Sanger (SeqStudio Genetic Analyzer, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA) e os resultados foram analisados utilizando o software SnapGene (versão 6.2.1) para determinar sua qualidade e confiabilidade. A avaliação baseou-se em dois critérios principais: a presença de picos cromatográficos uniformemente espaçados e a ausência ou pouco ruído na linha de base, indicativos de uma leitura de alta qualidade; sequências que apresentavam muito ruído de linha de base foram consideradas não-aceitáveis (Al-Shuhaib; Hashim, 2023). Para garantir uma análise abrangente, foram avaliadas as regiões de 120 pares de bases (pb) antes e 120 pb após a região-alvo de interesse. Dados de proporção foram analisados por Teste Exato de Fischer e de DNA por análise de variância, considerando nível de significância de 5%.

Resultados e discussão

A eletroporação dos zigotos não interferiu no desenvolvimento até blastocistos (22,7%, 84/369), resultando em taxa similar ($p > 0.05$) ao do grupo controle (23,3%, 32/137). Dos 50 embriões biopsiados, seis (12%) estavam em estágio de blastocisto e 44 (88%) em estágio de blastocisto expandido. A eletroporação também não interferiu ($p > 0.05$) na capacidade desses embriões em reexpandir a blastocèle após a biópsia. A taxa de reexpansão da blastocèle foi de 80% (12/15) no grupo controle e de 62,8% (22/35) no grupo eletroporado. Esse resultado indica que a eletroporação não compromete substancialmente a viabilidade embrionária, avaliada pela capacidade de reexpansão da blastocèle, após a biópsia dos blastocistos, e é consistente com estudos anteriores que relataram segurança da eletroporação em embriões bovinos. Enquanto Camargo et al. (2020) identificaram que a eletroporação em embriões bovinos pode ser realizada de forma eficiente sem comprometer o desenvolvimento embrionário, Oliveira et al. (2023) observaram que a biópsia embrionária se mostrou segura, apresentando taxas de gestação e de nascimento comparáveis às aquelas observadas em embriões não biopsiados. Desse modo, a manutenção da integridade embrionária, crucial para o sucesso reprodutivo, valida a eletroporação e a biópsia embrionária como técnicas promissoras para aplicações em edição gênica.

Para aprofundar a investigação sobre os efeitos da eletroporação, avaliamos seu impacto nas análises genéticas pós-biópsia embrionária. Os resultados mostraram que a taxa de falhas na amplificação por PCR foi de 0% no grupo controle (0/12 embriões com falha), enquanto no grupo eletroporado, observamos uma taxa de 21,71% (9/35). A análise estatística revelou $p < 0.10$, porém acima do nível de significância adotado neste estudo ($p > 0.05$). É importante considerar que a quantidade limitada de material biológico obtido na biópsia embrionária é um desafio inerente à eficiência da amplificação por PCR, conforme destacado por Scapin et al. (2021). Esse fator, independentemente da eletroporação, pode contribuir para as taxas de falha observadas. Nossos dados reforçam a necessidade de otimização dos protocolos de PCR para amostras com baixa

concentração de DNA inicial, a fim de maximizar o sucesso das análises genéticas em embriões submetidos a biópsia e eletroporação.

Ainda no contexto das análises genéticas, investigamos a quantificação do DNA purificado e a qualidade dos cromatogramas das sequências geradas por sequenciamento Sanger. As concentrações médias de DNA foram similares entre os grupos, sendo de $6,09 \pm 1,01$ ng/ μ L (n=12) no grupo controle e $4,92 \pm 0,54$ ng/ μ L (n=26) no grupo eletroporado, o que fortalece o conceito de que a eletroporação não interfere de forma relevante na qualidade ou na quantidade de DNA obtido para amplificação. Em relação à qualidade dos cromatogramas, nenhuma biópsia controle apresentou cromatograma inadequado (0/12), enquanto no grupo eletroporado houve 15,3% (4/26) biópsias com cromatogramas comprometidos ou não-aceitáveis, sem diferença entre eles ($P>0,05$). Isso sugere que, embora possam ocorrer variações individuais, a eletroporação para edição do gene BLG não compromete de forma relevante a qualidade final do sequenciamento de amostras de biópsias embrionárias.

Conclusão

A eletroporação e a biópsia embrionária podem ser empregadas como ferramentas eficazes para procedimentos de edição do gene da beta-lactoglobulina com o sistema CRISPR/Cas9 sem comprometer as etapas subsequentes de análise genômica pós-biópsia embrionária. Essa abordagem permite a manutenção da integridade do material genético e a confiabilidade dos dados.

Agradecimentos

Ao apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) - Brasil, pela concessão de bolsa e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Fapemig) pelo apoio. À Embrapa Gado de Leite pela oportunidade de treinamento e ao pesquisador Luiz Sergio de Almeida Camargo pelo acompanhamento, orientação e apoio.

Referências

- AL-SHUHAIB, M. B. S.; HASHIM, H. O. Mastering DNA chromatogram analysis in Sanger sequencing for reliable clinical analysis. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 21, n. 1, 115, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1186/s43141-023-00587-6>.
- CAMARGO, L. S. A.; OWEN, J. R.; VAN EENENNAAM, A. L.; ROSS, P. J. Efficient one-step knockout by electroporation of ribonucleoproteins into zona-intact bovine embryos. **Frontiers in Genetics**, v. 11, 570069, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.570069>.
- CAMARGO, L. S. A.; SARAIVA, N. Z.; OLIVEIRA, C. S.; CARMICKLE, A.; LEMOS, D. R.; SIQUEIRA, L. G. B.; DENICOL, A. C. Perspectives of gene editing for cattle farming in tropical and subtropical regions. **Animal Reproduction**, v. 19, n. 4, e20220108, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1590/1984-3143-ar2022-0108>.
- DOUDNA, J. A.; CHARPENTIER, E. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. **Science**, v. 346, n. 6213, 1258096, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.1258096>.
- LEMOS, D. R. **Edição gênica em embriões bovinos para reduzir o efeito do estresse térmico em bovinos de corte e leite**. 2024. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2024.
- MIAO, D.; GIASSETTI, M. I.; CICARELLI, M.; LOPEZ-BILADEAU, B.; OATLEY, J. M. Simplified pipelines for genetic engineering of mammalian embryos by CRISPR-Cas9 electroporation. **Biology of Reproduction**, v. 101, n. 1, p. 177-187, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1093/biolre/ioz075>.
- NAÇÕES UNIDAS. **Objetivo de Desenvolvimento Sustentável 2: Fome zero e agricultura sustentável**. Disponível em: <https://brasil.un.org/pt-br/sdgs/2>. Acesso em: 13 mar. 2025.

OLIVEIRA, C. S.; SILVA, M. V. G. B. da; QUINTÃO, C. C.; OTTO, P. I.; ALONSO, R. V.; FERES, L. F.; PANETTO, J. C. D.; MACHADO, M. A.; CAMARGO, L. S. A. Imputation accuracy for genomic selection using embryo biopsy samples in Gir. **Reproductive Biology**, v. 23, n. 2, 100765, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.repbio.2023.100765>.

SCAPIN, B. A.; MESQUITA, C. C.; PADILHA, R. T.; PADILHA, D. M. M. Avanços em testes genéticos pré-implantacionais: revisão de literatura. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 15, e429101523103, 2021. DOI: <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i15.23103>.

Características neonatais de bovinos Angus submetidos à edição do gene PRLR

Luis Gustavo Milani Neri⁽¹⁾⁽⁵⁾, Verônica Schinaider do Amaral Pereira⁽²⁾, André Lopes Cirino⁽³⁾, Luiz Sérgio de Almeida Camargo⁽⁴⁾ e Luiz Gustavo Bruno Siqueira⁽⁴⁾

⁽¹⁾Bolsista (Pibic/CNPq), Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG. ⁽²⁾Analista, Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG. ⁽³⁾Estagiário, Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG. ⁽⁴⁾Pesquisador, Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG. ⁽⁵⁾E-mail: luisgmneri@gmail.com.

Resumo — O objetivo foi avaliar as características neonatais de bovinos da raça Angus submetidos à edição do gene receptor da prolactina (PRLR), associado ao fenótipo slick. Doadoras Angus foram submetidas à ovum pick-up e os complexos cumulus-oócitos recuperados foram maturados e fertilizados in vitro. Os zigotos foram submetidos à eletroporação e CRISPR/Cas9 tendo como alvo o gene PRLR e cultivados in vitro por 6 dias. Blastocistos foram biopsiados (n=16) para sequenciamento do DNA ou não submetidos à biópsia (controle, n=7). Embriões biopsiados e não-biopsiados foram transferidos para receptoras sincronizadas. A taxa de gestação aos 32 dias foi 37,5% (6 de 16) para embriões biopsiados e 28,6% (2 de 7) para embriões não-biopsiados. Cinco gestações seguiram a termo, com duração de 279,8±6,1 dias e o nascimento de animais sadios (machos e fêmeas), com peso ao nascimento (PN) de 49,4±6,8 Kg. Destes, três apresentaram edição bem-sucedida, demonstrada pelo sequenciamento das regiões-alvo. Um macho e uma fêmea apresentaram o fenótipo slick (pelagem curta e lisa). O PN dos animais slick (n=2) foi 50,9±5,6 Kg vs 48,3±8,6 Kg de animais sem o fenótipo (n=3). Conclui-se que a edição gênica do PRLR é eficaz na produção de prenhez e bezerros Angus com fenótipo slick.

Termos para indexação: CRISPR/Cas9, eletroporação, fenótipo slick.

Neonatal characteristics of Angus cattle submitted to gene editing of PRLR

Abstract — The objective was to evaluate neonatal characteristics of Angus cattle submitted to gene editing of the prolactin receptor (PRLR), associated to the slick phenotype. Angus donors were submitted to ovum pick-up and cumulus-oocyte complexes were in vitro matured and fertilized. Presumptive zygotes were submitted to electroporation and CRISPR/Cas9 to target the PRLR gene and cultured in vitro for 6 days. Blastocysts were biopsied (n=16) for DNA sequencing or not biopsied (control, n=7). Biopsied and non-biopsied embryos were transferred to synchronized recipients. Pregnancy rate was 37.5% (6 of 16) for biopsied and 28.6% (2 of 7) for non-biopsied embryos. Five pregnancies went to term with a duration of 279.8±6.1 days and the successful birth of healthy offspring (males and females), with birth weight of 49.4±6.8 Kg. Three of those had a successful gene editing, demonstrated by sequencing of the target region. One male and one female calf had the slick phenotype (short and sleek haircoat). Birth weight of slick calves (n=2) was 50.9±5.6 Kg vs 48.3±8.6 Kg for non-slick calves (n=3). We conclude that gene editing of the PRLR gene is efficient to produce pregnancies and Angus offspring having the slick phenotype.

Index terms: CRISPR/Cas9, electroporation, slick phenotype.

Introdução

O Brasil, com seu enorme rebanho e posição de líder global na exportação de carne bovina, encontra-se em um cenário ideal para adotar tecnologias avançadas na produção animal, incluindo organismos geneticamente modificados (OGMs) e editados geneticamente

(Yamashita, 2025). A edição gênica pode ser utilizada para induzir a resistência a doenças ou aumentar a frequência de alelos ou polimorfismos associados a características favoráveis, como tolerância ao calor e produção/composição de leite e/ou carne (Camargo et al., 2020), em um cenário de melhoramento genético de precisão. Por sua vez, o estresse térmico por calor resulta de uma combinação de diferentes variáveis climáticas, incluindo temperatura ambiente, umidade relativa do ar, radiação solar e velocidade do vento, as quais podem ter impactos negativos no bem-estar animal e na redução da produtividade dos rebanhos bovinos (Camargo; Pereira, 2022; Thornton et al., 2022). Nos últimos anos, a tecnologia Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat (CRISPR) - associada à enzima nuclease Cas9 (sistema CRISPR/Cas9) emergiu como a principal ferramenta de edição gênica devido à sua eficiência e precisão. Essa tecnologia permite a introdução de mutações específicas em genes de interesse, proporcionando uma nova abordagem para a melhoria genética em bovinos (Lemos, 2024). Já a técnica de eletroporação utiliza pulsos de alta voltagem para formar poros temporários na membrana celular, facilitando a entrada dos reagentes do sistema CRISPR/Cas9 (Bishop; Van Eenennaam, 2020). Na pesquisa agropecuária, um dos alvos de grande interesse para resiliência ao estresse por calor é o gene do receptor da prolactina (PRLR) que está associado a mutações responsáveis pelo fenótipo "slick" em bovinos, caracterizado por conferir maior termotolerância aos animais (Cuellar et al., 2024; Lemos, 2024) devido à pelagem curta. Diversas populações de bovinos nas Américas do Sul e Central possuem mutações naturais no PRLR, resultando em animais afetados com pelos curtos e termotolerantes (Cuellar et al., 2024). A pelagem curta e lisa pode ser considerada um fenótipo indicativo ou indireto de algumas características de produção altamente importantes, visto que está consistentemente associada a maior termotolerância (Porto-Neto et al., 2018). Um dos principais efeitos esperados da termotolerância do gado slick é uma queda menos drástica na produção de leite durante os períodos de estresse por calor, como observado durante os meses de verão (Camargo; Pereira, 2022). Nesse contexto, a modificação genética dos animais tem sido apresentada como uma possível solução para evitar a queda na produção e melhorar o bem-estar dos animais durante os períodos de maior calor (Lemos, 2024), o que é particularmente importante para sistemas de produção nos trópicos.

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar as características neonatais de bovinos da raça Angus submetidos à edição gênica por eletroporação e CRISPR/Cas9, com alvo no gene do receptor da prolactina (PRLR).

As informações geradas no presente estudo vão ao encontro dos Objetivos do Desenvolvimento Sustentável (ODS) contidos na Agenda 2030, proposta pela Organização das Nações Unidas, da qual o Brasil é signatário, sobretudo nos seguintes objetivos específicos: ODS 8 - Empregos dignos e crescimento econômico: Promover o crescimento econômico sustentado, inclusivo e sustentável, emprego pleno e produtivo, e trabalho decente para todos (Nações Unidas, 2025).

Material e métodos

Os procedimentos para uso de animais foram aprovados pela Comissão Interna de Biossegurança (CiBio) e Comissão de Ética no Uso de Animais da Embrapa Gado de Leite (CEUA, protocolo Nº 1.733.110.425).

Complexos cumulus-oócito (COC) foram obtidos por aspiração folicular guiada por ultrassom transvaginal de doadoras da raça Angus (n=4). Os COCs foram selecionados e submetidos à maturação in vitro (MIV) por 20h, em incubadora a 38,5 °C e 5% CO₂. A fecundação in vitro (FIV) foi realizada utilizando sêmen convencional de um único touro Angus, por meio da co-incubação dos gametas por oito horas, em incubadora a 38,5 °C e 5% CO₂. Após a FIV, presumíveis zigotos foram desnudados e distribuídos em grupos

compostos por no máximo 30 estruturas, conforme as doadoras, e mantidos em gotas contendo meio Talp-Hepes aquecido a 38,5 °C sobre uma placa aquecedora. A solução de CRISPR/Cas9 foi preparada utilizando a proporção molar de 1:2 de Cas9:SgRNA e os zigotos foram submetidos à eletroporação pelo sistema Nepa21 (Nepagene, Chiba, Japão) empregando pulsos com 20V/mm. O cultivo in vitro foi realizado em meio SOF, a 38,5 °C, 20% O₂ e 5% CO₂, até o dia 7 de desenvolvimento embrionário. Blastocistos no dia 7 foram biopsiados manualmente (n=16) para coletas de amostras de células do trofotoderma e posterior sequenciamento da região-alvo. Parte dos embriões produzidos (n=7) não foi submetida à biópsia para que fosse possível a posterior determinação de taxas de gestação de embriões biopsiados e não-biopsiados.

Receptoras da raça Girolando (n=23) foram sincronizadas para transferência de embriões em tempo fixo (TETF) utilizando o seguinte protocolo: dia 0, inserção de um implante intravaginal de progesterona (Primer 1g, Tecnopec/Agener União, Embú-Guaçu, SP) e 2 mg de benzoato de estradiol (RIC-BE) via intramuscular. No dia 8 foi removido o implante e foram administrados 0,5 mg de cloprostenol sódico (Estron, Tecnopec/Agener União), 300 UI de gonadotrofina coriônica equina (eCG; Novormon, Zoetis, São Paulo, SP), e 1 mg de cipionato de estradiol (Cipiotec, Tecnopec/Agener União) por via intramuscular. O dia 10 foi arbitrariamente considerado o dia da ovulação e a transferência de embriões (TE) foi realizada no dia 18 do protocolo de TETF. Imediatamente antes da TE, cada receptora foi examinada com o auxílio de ultrassonografia modo-B para determinar a presença e tamanho do CL. Receptoras com CL >2,0 cm² de área foram submetidas a anestesia epidural com 3 mL de cloridrato de lidocaína e receberam, de forma aleatória, um embrião depositado no terço cranial do corno uterino ipsilateral ao ovário contendo o CL. O diagnóstico de gestação (DG) foi realizado 25 dias após a TE (32 dias de gestação) por ultrassonografia. A presença de um embrião com batimento cardíaco foi considerada como prenhez positiva. As gestações foram acompanhadas até o nascimento e foram registrados a duração da gestação e o peso ao nascimento.

Devido ao caráter de relato de caso deste estudo, que teve o intuito de demonstrar a viabilidade da técnica para gerar animais nascidos saudáveis, com baixo número amostral de embriões transferidos, os dados foram compilados e reportados como estatística descritiva (média±DP), sem a sua análise por testes de hipóteses.

Resultados e discussão

A taxa de gestação após a TE (P/TE) para embriões biopsiados e não-biopsiados (6 de 16; 37,5% vs 2 de 7; 28,6%, respectivamente) ficou dentro dos valores esperados após a TE de embriões produzidos in vitro. As duas receptoras prenhes no grupo não-biopsiado foram ressincronizadas após o DG com a aplicação de 0,5 mg de cloprostenol sódico i.m. e uma receptora prenhe do grupo biopsiado, cuja amostra de biópsia demonstrou ausência de edições, também foi ressincronizada com o mesmo tratamento. Desta forma, cinco gestações chegaram a termo (três machos e duas fêmeas) e a duração da gestação foi de 279,8±6,1 dias. O peso ao nascimento geral foi 49,4±6,8 Kg, sendo que bezerros machos tiveram peso ao nascimento 53,1±5,5 Kg e fêmeas 43,8±4,6 kg. Dentre os cinco animais nascidos, três (60%) foram editados com sucesso na região-alvo, o que foi demonstrado pelo sequenciamento do genoma. Contudo, dois (um macho e uma fêmea) apresentaram o fenótipo slick, com pelos curtos e lisos. Um animal editado (33%) não apresentou o fenótipo. O peso ao nascimento dos bezerros com fenótipo slick foi 50,9±5,6 Kg vs 48,3±8,6 Kg para os que não apresentaram o fenótipo.

Este estudo, portanto, evidenciou a viabilidade da produção de progênie da raça Angus, derivados de embriões submetidos à edição gênica do gene PRLR, utilizando a tecnologia CRISPR/Cas9 associada à eletroporação, sem alterações na taxa de gestação, duração da gestação, e

no peso ao nascimento dos bezerros machos e fêmeas. Cuellar et al. (2024) demonstrou que a introdução de novas mutações slick na edição genética de PRLR em bovinos Angus e Jersey melhorou sua capacidade de regular a temperatura corporal, ao mesmo tempo em que aumentou sua capacidade de crescimento, sem comprometer nenhuma das medições da função reprodutiva masculina. Portanto, a edição genética representa uma estratégia útil para a rápida introdução de genes de termotolerância em bovinos. Pesquisas futuras poderão examinar características de termotolerância dos animais nascidos com o fenótipo slick, abrindo novas perspectivas para o melhoramento genético de precisão.

Conclusões

Esses resultados preliminares indicam que embriões com edição do gene PRLR via eletroporação de CRISPR-Cas9 são capazes de gerar gestações e bezerros com fenótipo Slick sem alterar a duração da gestação e peso ao nascimento. Vislumbra-se um potencial aprimoramento da termorregulação nestes animais, com potencial redução dos efeitos do estresse térmico por calor, levando ao maior desempenho produtivo e reprodutivo em condições de clima quente.

Agradecimentos

Ao apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) - Brasil, pela concessão de bolsa; à Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (Fapemig) pelo apoio. À Embrapa Gado de Leite pela oportunidade de capacitação, o que nos proporcionou obter experiência e aprendizado; ao pesquisador Luiz Gustavo Bruno Siqueira pelo acompanhamento, orientação e apoio durante o período de estudos e treinamento.

Referências

- BISHOP, T. F.; VAN EENENNAAM, A. L. Genome editing approaches to augment livestock breeding programs. **Journal of Experimental Biology**, v. 223, jeb207159, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1242/jeb.207159>.
- CAMARGO, L. S. A.; OWEN, J. R.; VAN EENENNAAM, A. L.; ROSS, P. J. Efficient one-step knockout by electroporation of ribonucleoproteins into zona-intact bovine embryos. **Frontiers in Genetics**, v. 11, e570069, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.570069>.
- CAMARGO, L. S. A.; PEREIRA, J. F. Genome-editing opportunities to enhance cattle productivity in the tropics. **CABI Agriculture and Bioscience**, v. 3, article 8, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1186/s43170-022-00075-w>.
- CUELLAR, C. J.; AMARAL, T. F.; RODRIGUEZ-VILLAMIL, P.; ONGARATTO, F.; MARTINEZ, D. O.; LABRECQUE, R.; LOSANO, J. D. de A.; ESTRADA-CORTÉS, E.; BOSTROM, J. R.; MARTINS, K.; RAE, D. O.; BLOCK, J.; HOORN, Q. A.; DAIGNEAULT, B. W.; JONATHAN MERRIAM, J.; LOHUIS, M.; DIKMEN, S.; BITTAR, J. H. J.; MAIA, T. S.; CARLSON, D. F.; LARSON, S.; SONSTEGARD, T. S.; HANSEN, P. J. Consequences of gene editing of PRLR on thermotolerance, growth, and male reproduction in cattle. **FASEB bioAdvances**, v. 6, n. 8, p. 223-234, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1096/fba.2024-00029>.
- LE MOS, D. R. **Edição gênica em embriões bovinos para reduzir o efeito do estresse térmico em bovinos de corte e leite. 2024.** Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2024.
- NAÇÕES UNIDAS. **Objetivo de Desenvolvimento Sustentável 8:** Trabalho decente e crescimento econômico. Disponível em: <https://brasil.un.org/pt-br/sdgs/8>. Acesso em: 13 mar. 2025.
- PORTO-NETO, L. R.; BICKHART, D. M.; LANDAETA-HERNANDEZ, A. J.; UTSUNOMIYA, Y. T.; PAGAN, M.; JIMENEZ, E.; HANSEN, P. J.; DIKMEN, S.; SCHROEDER, S. G.; KIM, E. S.; SUN, J.; CRESPO, E.; ANATI, N.; COLE, J. B.; NULL, D. J.; GARCIA, J. F.; REVERTER, A.; BARENDSE, W.; SONSTEGARD, T. S. Convergent evolution of slick coat in cattle through truncation mutations in the prolactin receptor. **Frontiers in Genetics**, v. 9, article 57, 2018. DOI: <https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00057>.
- THORNTON, P.; NELSON, G.; MAYBERRY, D.; HERRERO, M. Impacts of heat stress on global cattle production during the 21st century: a modelling study. **Lancet Planetary Health**, v. 6, n. 3, p. e192-e201, 2022. DOI: [https://doi.org/10.1016/s2542-5196\(22\)00002-x](https://doi.org/10.1016/s2542-5196(22)00002-x).
- YAMASHITA, M. S. A. **Edição genômica utilizando a ferramenta CRISPR/Cas9 em células e embriões para inserção de genes de interesse no locus H11 no genoma bovino.** 2025. 164 p. Tese (Doutorado em Biologia Animal) - Universidade de Brasília, Brasília, DF, 2025.

Efeitos da estação do ano na resposta a protocolos de superovulação com FSH recombinante em vacas Girolando

Lívia Thurler Pires⁽¹⁾⁽⁶⁾, Pedro Henrique Evangelista Guedes⁽²⁾, Felipe Zandonadi Brandão⁽³⁾, Naiara Zoccal Saraiva⁽⁴⁾, Célio de Freitas⁽⁵⁾, Bruno Campos Carvalho⁽⁴⁾ e Clara Slade Oliveira⁽⁵⁾

⁽¹⁾Bolsista (Pibic/Fapemig), Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG. ⁽²⁾Estagiário, Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG. ⁽³⁾Professor, Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ. ⁽⁴⁾Pesquisador, Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG. ⁽⁵⁾Analista, Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG. ⁽⁶⁾E-mail: liviathurler@hotmail.com.

Resumo — O aquecimento global, impulsionado por atividades humanas e emissões de gases de efeito estufa, afeta a produtividade da pecuária leiteira, sobretudo em regiões tropicais, causando alterações fisiológicas e redução da eficiência reprodutiva em fêmeas bovinas sob estresse térmico. Este estudo avaliou parâmetros fisiológicos e reprodutivos de vacas Girolando $\frac{3}{4}$ (n=20) submetidas a protocolo de superovulação com 180 µg de FSH recombinante (Zimbria, Ceva), implante de progesterona, gonadotrofina coriônica equina recombinante (140 UI) e lecirelina (50 µg) durante os períodos de verão e inverno. Frequência cardíaca, respiratória e temperatura retal foram coletadas quinzenalmente nos mesmos horários. Os comportamentos típicos de estro foram monitorados desde a retirada do implante até cessar a manifestação. Folículos >12 mm foram contados no D8 por ultrassonografia. Observou-se efeito da estação na frequência cardíaca, respiratória e temperatura retal. Embora o início do estro não tenha variado, sua duração foi menor durante o verão. O número de folículos >12 mm não diferiu entre estações. A redução da duração do estro sugere necessidade de ajustes no protocolo. Resultados de dinâmica folicular e recuperação embrionária seguem em análise para subsidiar tais ajustes.

Termos para indexação: estresse térmico, reprodução assistida, superovulação.

Seasonal effects on the response to superovulation protocols with recombinant FSH in Girolando cows

Abstract — Global warming, driven by human activities and greenhouse gas emissions, affects dairy cattle productivity, especially in tropical regions, leading to physiological changes and reduced reproductive efficiency in females under heat stress. This study evaluated physiological and reproductive parameters of $\frac{3}{4}$ Girolando cows (n=20) subjected to a superovulation protocol with 180 µg recombinant FSH (Zimbria, Ceva), progesterone implant, recombinant equine chorionic gonadotropin (140 IU), and lecorelin (50 µg) during summer and winter. Heart rate, respiratory rate, and rectal temperature were recorded biweekly at the same time of day. Estrous behaviors were monitored from implant removal until cessation of manifestation. Follicles >12 mm were counted on D8 by ultrasonography. Seasonal effects were observed on heart rate, respiratory rate, and rectal temperature. Although estrus onset did not vary, its duration was shorter in summer. The number of follicles >12 mm did not differ between seasons. The reduced estrus duration suggests the need for protocol adjustments. Analyses of follicular dynamics and embryo recovery are ongoing to support such adjustments.

Index terms: heat stress , assisted reproduction, superovulation.

Introdução

As atividades humanas, principalmente por meio das emissões de gases de efeito estufa, inequivocamente causaram o aquecimento global, com a temperatura da superfície global atingindo valor 1,1 °C mais alto entre 2011-2020 do que no período de 1850-1900

(Intergovernmental Panel on Climate Change, 2023). Vacas doadoras e receptoras são especialmente sensíveis a esses desafios, uma vez que a fertilidade dos animais é fortemente prejudicada (Ouellet et al., 2021). Essa queda na performance reprodutiva justifica-se em razão da alta sensibilidade do oócito ao estresse térmico na fase final de maturação e do embrião em seus estágios iniciais de desenvolvimento (Roth, 2017). Em razão das elevadas temperaturas já constatadas em regiões tropicais e subtropicais, o aquecimento previsto para os próximos anos torna cada vez mais necessária a pesquisa sobre os efeitos negativos do estresse térmico na reprodução do gado leiteiro e a partir disto elaborar propostas de mitigação. O objetivo deste estudo é relatar alterações encontradas nos aspectos fisiológicos e reprodutivos de 20 vacas da raça Girolando (3/4 Hol., 1/4 Gir.) durante protocolos de superovulação com FSH recombinante, durante o inverno e verão.

As informações geradas no presente estudo vão ao encontro dos Objetivos do Desenvolvimento Sustentável (ODS) contidos na Agenda 2030, proposta pela Organização das Nações Unidas, da qual o Brasil é signatário, sobretudo nos seguintes objetivos específicos: ODS 8 - Empregos dignos e crescimento econômico: Promover o crescimento econômico sustentado, inclusivo e sustentável, emprego pleno e produtivo, e trabalho decente para todos (Nações Unidas, 2025).

Material e métodos

O presente experimento foi conduzido no Campo Experimental Santa Mônica (CESM) pertencente à Embrapa Gado de Leite, localizado no município de Valença, RJ, durante o período de verão (dezembro de 2024 a fevereiro de 2025) e inverno (junho a agosto de 2025); previamente, havia sido aprovado pela CEUA Embrapa Gado de Leite (CEUA/EGL) nº 1.303.111.124

Foram selecionadas 20 fêmeas da raça Girolando ($\frac{3}{4}$ Hol., $\frac{1}{4}$ Gir.) com média de 58 meses e escore de condição corporal (ECC) entre 3,5 e 4,5, clinicamente saudáveis, sem histórico de problemas reprodutivos, cíclicas, não lactantes e mantidas em sistema extensivo.

Desenho experimental - O protocolo de superovulação estabelecido foi: (i) D0 (8:00) – introdução de implante intravaginal contendo 1.200 mg progesterona (P4); aplicação via intramuscular (IM) de progesterona de longa ação (50 mg) e benzoato de estradiol (BE) (2mg); (ii) D4 (8:00) – aplicação via IM de FSH recombinante (180 µg); (iii) D6 (8:00) – primeira aplicação via IM de cloprostenol (0,5 mg); (iv) D7 (8:00) – segunda aplicação via IM de cloprostenol (0,5 mg); aplicação via IM de gonadotrofina coriônica equina recombinante (reCG) (140 UI); (v) D7 (20:00) - remoção do implante intravaginal de P4; (vi) D8 (8:00) – aplicação via IM de lecorelina (50 µg) (vii) D8 (20:00) – realização da primeira inseminação artificial (IA) utilizando sêmen sexado para fêmea (SexedULTRA 4M® da Sexing Technologies®); e (viii) D9 (8:00) – realização da segunda IA com o mesmo sêmen. Seis dias após a segunda IA (D15) foi realizada coleta transcervical dos embriões.

Os animais foram examinados por ultrassonografia para determinação do número de folículos maiores que 12 mm no D8 de protocolo. A partir do D7 foi observado o intervalo entre a retirada do implante intravaginal de P4 e o início da manifestação estral, bem como sua duração.

Coleta de dados fisiológicos – A cada 15 dias foram aferidos, às 14 horas, os seguintes parâmetros: (i) frequência cardíaca; (ii) frequência respiratória e (iii) temperatura retal.

Os resultados foram analisados utilizando o teste T pareado, comparando indicadores obtidos nos mesmos animais no protocolo do verão e do inverno. O nível de significância de 5% foi adotado.

Resultados e discussão

Os dados fisiológicos coletados mostraram alteração dos parâmetros no verão e inverno, conforme esperado (Tabela 1). A frequência cardíaca, frequência respiratória e temperatura retal foram maiores ($p < 0,01$) no verão do que no inverno.

Com relação à manifestação do estro (Tabela 1), não houve diferença entre as estações no parâmetro início do estro, relativo ao tempo entre a retirada do implante e a manifestação inicial. Entretanto, a duração do estro foi maior ($p < 0,05$) no inverno do que no verão. O encurtamento do estro no verão pode impactar o protocolo de superovulação, e possíveis ajustes serão propostos após análise completa da dinâmica folicular e recuperação de embriões.

Durante o verão foi observado comportamento típico em 90% dos animais (dois animais não apresentaram estro), com média de intervalo entre a retirada do dispositivo intravaginal de P4 e início de 10,5 horas ($\pm 0,8$) e duração de 15,5 horas ($\pm 2,2$). Durante o inverno, o comportamento estral foi registrado em 100% dos animais, com intervalo médio de 14,4 horas ($\pm 1,3$) e duração de 14,1 horas ($\pm 0,5$).

Não houve diferença entre o número de folículos maiores que 12 mm entre as estações. Durante o período do verão, a avaliação ultrassonográfica realizada na noite do dia 8 do protocolo revelou a média de 7,4 folículos com diâmetro ≥ 12 mm ($\pm 0,9$). No inverno, a média de folículos acima de 12 mm foi de 7,8 ($\pm 1,2$).

Tabela 1. Parâmetros observados em vacas Girolando superovuladas com FSH recombinante no verão e inverno.

Grupo	Frequência cardíaca	Frequência respiratória	Temperatura retal	Duração Estro	Início Estro	FOLS. >12MM
VERÃO	74.5 $\pm$ 0.9	51.3 $\pm$ 2.0	38.65 $\pm$ 0.04	10.5 $\pm$ 0.8	15.5 $\pm$ 2.2	7.4 $\pm$ 0.9
INVERNO	64.8 $\pm$ 0.8	34.0 $\pm$ 0.9	38.49 $\pm$ 0.04	14.1 $\pm$ 0.5	14.4 $\pm$ 1.3	7.8 $\pm$ 1.2
P	<0.001	<0.001	0.003	0.001	0.623	0.734

Conclusões

Os resultados apresentados confirmam efeitos fisiológicos da estação verão sobre os animais, elevando frequência cardíaca e respiratória e temperatura retal. Foi observado efeito sobre a duração do estro, mais curto em vacas superovuladas com FSH recombinante no verão, mas não houve impacto da estação do ano no número de folículos maiores que 12mm. Esses resultados são úteis para a proposição de ajustes nos protocolos realizados no verão. Os resultados de dinâmica folicular e recuperação embrionária estão em fase de análise, para dar suporte aos ajustes no protocolo.

Agradecimentos

Ao apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) - Brasil, pela concessão de bolsa; à Embrapa Gado de Leite e equipe envolvida no projeto, incluindo Clara Slade Oliveira, pela orientação, Pedro Henrique Evangelista Guedes, pelos ensinamentos, e toda a equipe do Campo Experimental de Santa Mônica (CESM), cujo acolhimento e colaboração foram fundamentais para a realização deste estudo.

Referências

INTERGOVERNMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE. **Climate Change 2023**: synthesis report: summary for policymakers. Geneva, 2023. Disponível em: https://www.ipcc.ch/report/ar6/syr/downloads/report/IPCC_AR6_SYR_SPM.pdf. Acesso em: 12 jul. 2025.

NAÇÕES UNIDAS. **Objetivo de Desenvolvimento Sustentável 8**: Trabalho decente e crescimento econômico. Disponível em: <https://brasil.un.org/pt-br/sdgs/8>. Acesso em: 13 maio 2025.

OUELLET, V.; BOUCHER, A.; DAHL, G. E.; LAPORTA, J. Consequences of maternal heat stress at different stages of embryonic and fetal development on dairy cows' progeny. **Animal Frontiers**, v. 11, n. 6, p. 48-56, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1093/af/vfab059>.

ROTH, Z. Effect of heat stress on reproduction in dairy cows: insights into the cellular and molecular responses of the oocyte. **Annual Review of Animal Biosciences**, v. 5, p. 151-170, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev-animal-022516-022849>.

Caracterização funcional da enzima estearoil-CoA dessaturase 1 na competência oocitária em bovinos

Alexandre Marcos de Melo⁽¹⁾⁽⁵⁾, Carolina Capobianco Romano Quintão⁽²⁾, Clara Slade Oliveira⁽²⁾, Yuri Sabbagh Terra⁽³⁾, Wasim Al Shebli⁽³⁾, Luiz Sérgio de Almeida Camargo⁽⁴⁾ e Naiara Zoccal Saraiva⁽⁴⁾

⁽¹⁾Bolsista (Pibic/CNPq), Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG. ⁽²⁾Analista, Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG. ⁽³⁾Estagiário, Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG. ⁽⁴⁾Pesquisador, Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG. ⁽⁵⁾E-mail: alexandremelo.cb@gmail.com.

Resumo — A estearoil-CoA dessaturase 1 (SCD1) é uma enzima fundamental na regulação do metabolismo lipídico e na modulação da competência oocitária em bovinos. Este trabalho investigou a expressão e distribuição celular da SCD1 em oócitos bovinos submetidos a diferentes suplementações com precursores e produtos da enzima durante a maturação in vitro (MIV). Utilizando imunofluorescência, observou-se que a localização periférica da SCD1 nos complexos cumulus-oócitos (COCs) foi significativamente mais intensa nos grupos suplementados com ácido esteárico, ácido trans-vacênico e soro fetal bovino, em comparação ao controle apenas com BSA (Albumina sérica bovina) e aos grupos tratados com produtos da SCD1, como ácido oleico e CLA. Tais resultados indicam que a presença de precursores da enzima favorece sua redistribuição para a periferia oocitária, potencialmente, otimizando sua atividade. Assim, sugere-se que a modulação da localização subcelular da SCD1 pode representar uma estratégia promissora para aprimorar a qualidade oocitária e, consequentemente, a eficiência da produção in vitro de embriões bovinos.

Termos para indexação: SCD1, lipídios, maturação in vitro.

Functional characterization of stearoyl-CoA desaturase 1 on bovine oocyte competence

Abstract — Stearoyl-CoA desaturase 1 (SCD1) plays a key role in lipid metabolism and in regulating bovine oocyte competence. This study investigated the expression and cellular distribution of SCD1 in bovine oocytes subjected to different supplementations with precursors and products of the enzyme during in vitro maturation (IVM). Using immunofluorescence, it was found that peripheral localization of SCD1 was significantly increased in groups supplemented with stearic acid, trans-vaccenic acid, and fetal bovine serum, compared to the control and groups treated with SCD1 products such as oleic acid and CLA. These results suggest that the presence of enzyme precursors favors redistribution of SCD1 to the oocyte periphery, potentially optimizing its function. The findings indicate that modulating the subcellular localization of SCD1 may be a promising strategy to improve oocyte quality and, consequently, the efficiency of in vitro embryo production in cattle.

Index terms: SCD1, lipid metabolism, in vitro maturation.

Introdução

A produção in vitro de embriões (PIVE) é atualmente a principal biotecnologia reprodutiva aplicada à bovinocultura, superando em larga escala os métodos tradicionais de reprodução assistida (Viana, 2024). Apesar dos avanços, a eficiência da PIVE ainda depende fortemente da qualidade dos oócitos utilizados, sendo este um dos principais gargalos para o sucesso dos programas reprodutivos.

A qualidade oocitária é determinada por diversos fatores, entre eles a composição e o metabolismo

lipídico, que participam ativamente da manutenção da homeostase celular, produção de energia, integridade da membrana plasmática e sinalização intracelular (Paton; Ntambi, 2009; IGAL, 2016). Nesse contexto, a enzima estearoil-CoA dessaturase 1 (SCD1) se destaca por catalisar a conversão de ácidos graxos saturados em insaturados, regulando a composição lipídica intracelular e a fluidez das membranas (Gutiérrez-Juárez et al., 2006; Lolicato et al., 2015).

Estudos recentes indicam que a expressão da SCD1 nos ovários e nas células do cumulus pode influenciar diretamente a competência oocitária, sendo sua deficiência associada à lipotoxicidade e disfunções celulares (Fayezi et al., 2018; Mardomi et al., 2018). A regulação espacial da SCD1, especialmente sua localização dentro do citoplasma oocitário, pode ser tão relevante quanto sua atividade enzimática, visto que a organização intracelular das enzimas está diretamente relacionada ao seu desempenho funcional (Rezamand et al., 2014).

Diante disso, o presente trabalho teve por objetivo investigar a distribuição celular da SCD1 em oócitos bovinos maturados *in vitro* sob diferentes condições de suplementação lipídica, utilizando técnicas de imunofluorescência. A hipótese central é de que a presença de precursores da SCD1 no meio de cultivo direciona sua expressão no oócito, favorecendo sua atividade e, conseqüentemente, a qualidade do gameta.

As informações geradas no presente estudo vão ao encontro dos Objetivos do Desenvolvimento Sustentável (ODS) contidos na Agenda 2030, proposta pela Organização das Nações Unidas, da qual o Brasil é signatário, sobretudo nos seguintes objetivos específicos: ODS 8 - Empregos dignos e crescimento econômico: Promover o crescimento econômico sustentado, inclusivo e sustentável, emprego pleno e produtivo, e trabalho decente para todos (Nações Unidas, 2025).

Material e métodos

O experimento foi conduzido com oócitos bovinos obtidos de ovários coletados em abatedouro, mantidos em solução salina a 30–35 °C até o processamento laboratorial. Os complexos cumulus-oócito (COCs) foram selecionados após aspiração de folículos ovarianos (2–7 mm) com agulha 18G e observação estereomicroscópica, adotando-se como critério a presença de múltiplas camadas de células do cumulus e citoplasma homogêneo.

Os COCs foram alocados em sete grupos experimentais distintos para a etapa de maturação *in vitro* (MIV): Controle BSA (meio base com 8 mg/mL de albumina sérica bovina - BSA), Controle com 10% de soro fetal bovino (SFB), Ácido Esteárico (AE, 25 µM), Ácido Oleico (AO, 200 µM), Ácido Trans-Vacênico (AV, 100 µM), Ácido Linoleico Conjugado cis-9, trans-11 (CLA, 100 µM) e grupo Imaturo (fixado antes da MIV). A MIV foi realizada em meio TCM-199 suplementado com FSH, hCG, estradiol, piruvato de sódio e amicacina, mantido por 24 horas em incubadora a 38,5 °C, 5% de CO₂.

A imunomarcação da proteína SCD1 foi realizada após fixação dos COCs em paraformaldeído a 4%, permeabilização com Triton X-100 0,5% e bloqueio com BSA 5%. Os COCs foram incubados com anticorpo primário monoclonal de camundongo anti-SCD1 (1:25) overnight a 4 °C, seguido de incubação com anticorpo secundário de cabra anti-camundongo conjugado Alexa Fluor 488 (1:200) e marcação nuclear com Hoechst 493 (1:50) por 1,5 h em temperatura ambiente. A análise das imagens foi feita em microscópio de fluorescência EVOS 5000 (Thermo Fisher).

A quantificação da fluorescência foi realizada no software ImageJ (ImageJ1.54d; National Institutes of Health, Wisconsin, USA). Para cada COC, foram desenhadas duas regiões de interesse (ROI): uma central e outra periférica. A Intensidade de Fluorescência Total Corrigida (CTCF) foi calculada pela fórmula: $CTCF = RawIntDen - (\text{Área do ROI} \times \text{Mean Gray Value do background})$. A razão centro/periferia (C/P) foi utilizada como métrica de distribuição subcelular da SCD1. Os dados foram analisados por ANOVA, com teste de Tukey ($p < 0,05$).

Resultados e discussão

A análise da imunofluorescência revelou diferenças significativas na distribuição subcelular da enzima SCD1 nos oócitos maturados sob diferentes condições lipídicas. Os resultados, expressos pela razão entre a intensidade de fluorescência no centro e na periferia do oócito (Razão C/P), estão apresentados na Figura 1.

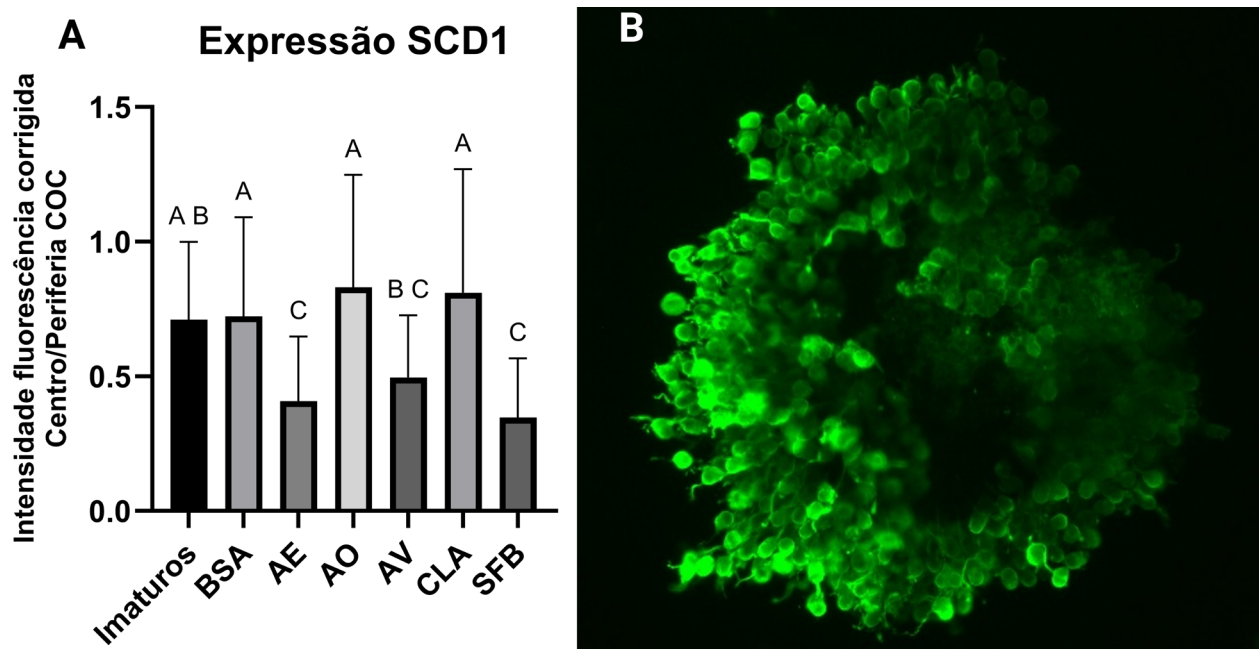


Figura 1. (A) Razão da intensidade de fluorescência da enzima SCD1 entre as regiões do centro e da periferia do citoplasma de oócitos bovinos maturados in vitro sob diferentes suplementações lipídicas. O gráfico de barras exibe a razão Centro/Periferia para os grupos: Oócitos Imaturos, Controle BSA, Ácido Esteárico, Ácido Oleico, Ácido Trans-Vacênico, CLA e, SFB. Letras diferentes acima das barras indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$); (B) Imunomarcagem da proteína SCD1 em complexo cumulus-oócito de bovino exposto a precursor da enzima durante a MIV (verde), Aumento de 200x.

Os resultados mostraram que a distribuição subcelular da SCD1 nos oócitos bovinos maturados in vitro varia de acordo com o tipo de suplementação lipídica utilizada durante a MIV. A principal métrica avaliada foi a razão de fluorescência entre o centro e a periferia do oócito, o que refletiu no padrão de localização da enzima SCD1.

Grupos suplementados com ácido esteárico, ácido trans-vacênico e SFB apresentaram menor razão C/P em comparação aos demais, indicando concentração aumentada da enzima na periferia do oócito. Tal padrão sugere que a presença de substratos diretos da SCD1 estimula sua redistribuição para regiões periféricas, possivelmente em resposta a uma demanda metabólica localizada. Este achado é consistente com observações em outros tecidos, onde a localização enzimática é regulada pela disponibilidade de substratos lipídicos (Rezamand et al., 2014).

O SFB, amplamente utilizado como suplemento complexo para MIV, apresentou comportamento semelhante aos grupos tratados com ácidos graxos saturados precursores da enzima, sugerindo que seus efeitos positivos sobre a competência oocitária podem ser mediados, ao menos em parte, pela modulação da SCD1. Considerando a composição heterogênea do soro, é plausível que ele contenha proporções de ácido esteárico ou ative vias metabólicas similares.

Por outro lado, os grupos suplementados com ácido oleico e CLA não apresentaram redistribuição periférica da SCD1, permanecendo com perfil semelhante ao grupo controle BSA. Isso indica que os produtos da enzima não têm papel regulatório direto sobre sua localização, mas podem atuar como protetores celulares frente à lipotoxicidade, sinalizando para ação positiva desta via metabólica. Tais resultados corroboram os achados de Aardema et al. (2011) e Lolicato et al. (2015), que destacam o papel citoprotetor do ácido oleico sem necessariamente envolver regulação enzimática.

De forma geral, os dados indicam que a localização subcelular da SCD1 pode ser um marcador funcional importante da competência oocitária e reforçam a importância de se considerar a natureza lipídica do meio de MIV como um fator crítico para a qualidade dos embriões gerados in vitro.

Conclusões

A distribuição subcelular da enzima SCD1 pode ser modulada pela composição lipídica do meio de MIV em bovinos, sendo que a suplementação com substratos diretos da enzima promove sua maior expressão na periferia do oócito, padrão que pode estar relacionado a uma possível maior competência funcional. Assim, propõe-se que a localização subcelular da SCD1 seja considerada um marcador funcional adicional na avaliação da qualidade oocitária, e que estratégias de suplementação definidas possam aprimorar os protocolos de PIVE.

Agradecimentos

Ao apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) - Brasil, pela concessão de bolsa; à Embrapa Gado de Leite pela oportunidade de treinamento; à Fapemig pelo financiamento do projeto e à Dra. Naiara Zoccal Saraiva pela orientação científica, acompanhamento e incentivo ao longo da condução do projeto.

Referências

- AARDEMA, H.; VOS, P. L. A. M.; LOLICATO, F.; ROELEN, B. A. J.; KNIJN, H. M.; VAANDRAGER, A. B.; HELMS, J. B.; GADELHA, B. M. Oleic acid prevents detrimental effects of saturated fatty acids on bovine oocyte developmental competence. **Biology of Reproduction**, v. 85, n. 1, p. 62-69, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1095/biolreprod.110.088815>.
- FAYEZI, S.; NOVIN, M. G.; DARABI, M.; NOROUZIAN, M.; NOURI, M.; FARZADI, L.; DARABI, M. Primary culture of human cumulus cells requires stearyl-coenzyme a desaturase 1 activity for steroidogenesis and enhancing oocyte in vitro maturation. **Reproductive Sciences**, v. 25, n. 6, p. 844-853, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1177/1933719117698578>.
- GUTIÉRREZ-JUÁREZ, R.; POCAI, A.; MULAS, C.; ONO, H.; BHANOT, S.; MONIA, B. P.; ROSSETTI, L. Critical role of stearyl-CoA desaturase-1 (SCD1) in the onset of diet-induced hepatic insulin resistance. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 116, n. 6, p. 1686-1695, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1172/jci26991>.
- IGAL, R. A. Stearyl CoA desaturase-1: new insights into a central regulator of cancer metabolism. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1861, n. 12, p. 1865-1880, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2016.09.009>.
- LOLICATO, F.; BROUWERS, J. F.; LEST, C. H. A. van; WUBBOLTS, R.; AARDEMA, H.; PRIORE, P.; ROELEN, B. A. J.; HELMS, J. B.; GADELLA, B. M. The cumulus cell layer protects the bovine maturing oocyte against fatty acid-induced lipotoxicity. **Biology of Reproduction**, v. 92, n. 1, article 16, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1095/biolreprod.114.120634>.

MARDOMI, A.; NOURI, M.; FARZADI, L.; ZARGHAMI, N.; MEHDIZADEH, A.; YOUSEFI, M.; SHANEBANDI, D.; SHAAKER, M.; DARABI, M. Human charcoal-stripped serum supplementation enhances both the stearoyl-coenzyme A desaturase 1 activity of cumulus cells and the in vitro maturation of oocytes. **Human Fertility**, v. 22, n. 3, p. 212-218, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1080/14647273.2018.1466400>.

NAÇÕES UNIDAS. **Objetivo de Desenvolvimento Sustentável 8**: Trabalho decente e crescimento econômico. Disponível em: <https://brasil.un.org/pt-br/sdgs/8>. Acesso em: 13 mar. 2025.

PATON, C. M.; NTAMBI, J. M. Biochemical and physiological function of stearoyl-CoA desaturase. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 297, n. 1, p. E28-E37, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1152/ajpendo.90897.2008>.

REZAMAND, P.; WATTS, J. S.; YAVAH, K. M.; MOSLEY, E. E.; MA, L.; CORL, B. A.; MCGUIRE, M. A. Relationship between stearoyl-CoA desaturase 1 gene expression, relative protein abundance, and its fatty acid products in bovine tissues. **Journal of Dairy Research**, v. 81, n. 3, p. 333-339, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1017/s0022029914000181>.

VIANA, J. H. M. 2023 statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals. **Embryo Technology Newsletter**, v. 42, n. 4, p. 1-15, 2024.

Aplicação de biorreatores laboratoriais para simulação de cama de *Compost Barn*

Sophia Andrade⁽¹⁾⁽⁴⁾, Gabriela Maria Fernandes Fiães⁽²⁾, Luana de Araujo Coimbra⁽²⁾, Alessandro de Sá Guimarães⁽³⁾, Marcelo Henrique Otenio⁽³⁾

⁽¹⁾Bolsista (Pibic/CNPq), Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG. ⁽²⁾Estagiária, Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG. ⁽³⁾ Pesquisador, Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG. ⁽⁴⁾E-mail: sophia.andrade.161103@gmail.com.

Resumo — O sistema *Compost Barn* é uma alternativa de alojamento dos animais na pecuária leiteira, melhorando o bem-estar e o manejo de resíduos orgânicos. Sua eficácia depende do controle de variáveis como temperatura, umidade e aeração do substrato, que influenciam a compostagem e a qualidade microbiológica da cama. Este trabalho objetivou instalar e operar um modelo laboratorial que simula a cama de *Compost Barn*, permitindo controle preciso dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos. Foram usados três biorreatores aeróbios sob condições térmicas controladas ou sem controle, onde a reação aeróbia gera o calor. As composteiras receberam diariamente fezes e urina de vacas leiteiras, simulando a operação real. Análises físico-químicas abrangeram pH, umidade, sólidos, fósforo, nitrogênio e carbono orgânico total; a caracterização microbiológica determinou bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, fungos e leveduras. Os resultados indicaram que o controle térmico aumentou a estabilidade do processo, reduziu a carga microbiana, especialmente microrganismos indicadores sanitários, e melhorou a qualidade do composto. O modelo é ferramenta útil para estudos futuros do funcionamento e dinâmica da compostagem e práticas sustentáveis na agropecuária.

Termos para indexação: compostagem, pecuária, resíduos orgânicos.

Application of laboratory bioreactors for simulation of *Compost Barn* bedding

Abstract — The *Compost Barn* system is an efficient alternative in dairy farming, improving animal welfare and organic waste management. Its effectiveness depends on controlling variables such as temperature, humidity, and aeration, which influence composting and the microbiological quality of the bedding. This study aimed to install and operate a laboratory model simulating *Compost Barn* bedding, allowing precise control of physicochemical and microbiological parameters. Three aerobic bioreactors were used under controlled or uncontrolled thermal conditions, where the aerobic reaction generates heat. The composters were daily supplied with feces and urine from dairy cows, simulating real operation. Physicochemical analyses included pH, humidity, solids, phosphorus, nitrogen, and total organic carbon; microbiological characterization evaluated Gram-positive and Gram-negative bacteria, fungi, and yeasts. Results showed thermal control increased process stability, reduced microbial load especially sanitary indicator microorganisms—and improved compost quality. The model is a useful tool for future studies and sustainable agricultural practices.

Index terms: composting, livestock, organic waste.

Introdução

O sistema *Compost Barn* tem se destacado não apenas por promover conforto animal, mas também por oferecer uma solução eficaz no gerenciamento de resíduos, transformando-os em composto orgânico (Oliveira et al., 2024). O funcionamento eficiente do *Compost Barn* depende diretamente do controle de variáveis como temperatura, umidade, aeração e

proporção dos materiais que compõem a cama, que são fundamentais para garantir a atividade microbiológica responsável pela decomposição da matéria orgânica (Andrade et al., 2022). Contudo, os estudos em escala real apresentam limitações, principalmente devido à dificuldade no controle de variáveis ambientais e aos custos operacionais elevados. Diante disso, a utilização de biorreatores laboratoriais surge como alternativa viável, permitindo simular e controlar de forma precisa as condições da cama de *Compost Barn*. Esses sistemas têm sido amplamente utilizados em pesquisas de processos biotecnológicos, possibilitando o acompanhamento da dinâmica microbiológica, perdas de nutrientes, eficiência de aeração e controle térmico (Kuppan et al., 2024).

Dessa forma, este trabalho teve como objetivo instalar e operar biorreatores laboratoriais que mimetizam as condições de uma cama de *Compost Barn*, possibilitando avaliar o comportamento físico-químico e microbiológico do sistema, além de oferecer uma base para melhorias no manejo e na sustentabilidade do processo.

As informações contidas nesse documento contribuem para o alcance do Objetivo de Desenvolvimento Sustentável (ODS) de número 8 - Empregos dignos e crescimento econômico: Promover o crescimento econômico sustentado, inclusivo e sustentável, emprego pleno e produtivo, e trabalho decente para todos, com destaque para a Meta 8.2 - Atingir níveis mais elevados de produtividade das economias por meio da diversificação, modernização tecnológica e inovação, inclusive por meio de um foco em setores de alto valor agregado e dos setores intensivos em mão de obra.

Material e métodos

O sistema *Compost Barn* foi simulado em laboratório com três biorreatores de bancada, operando com controle de temperatura ou em condições de aquecimento pela reação aeróbia da compostagem. Cada reator continha ~1 kg de cama coletada no sistema *Compost Barn* instalado no Campo Experimental José Henrique Bruschi, da Embrapa Gado de Leite, em Coronel Pacheco, MG. Diariamente, adicionaram-se 15,7 g de fezes e 6,9 g de urina de vacas holandesas, com revolvimento manual por 5 minutos e aeração forçada contínua (2 L/h). A temperatura foi monitorada em tempo real via sensores conectados ao software Sitrad. Dois testes semanais foram realizados: um sem controle térmico (Teste 1) e outro com regime mesofílico -39 °C (Teste 2).

As análises físico-químicas (condutividade elétrica, pH, matéria orgânica, sólidos, fósforo, nitrato, nitrogênio e carbono orgânico) foram realizadas por laboratório terceirizado. As análises microbiológicas ocorreram nos Testes 1 e 2, com coletas no início e fim de cada semana. Amostras de cama (10 g) foram diluídas em 90 mL de solução salina a 0,9% (Manni; Filali-Maltouf, 2022) e agitadas por 30 minutos. As diluições (até 10⁻⁸) foram plaqueadas em ágar BHI (0,1 mL/alça de Drigalsky) para contagem total. A diferenciação microbiana foi feita em ágar seletivos: Manitol (Gram+), EMB (Gram-) e Sabouraud (fungos/leveduras). As colônias características passaram por testes bioquímicos para identificação presumtiva. As placas foram incubadas a 35 °C por 24 h, e os resultados, expressos em log₁₀ UFC/g, consideraram placas com 20–200 colônias. A taxa de decaimento microbiano foi calculada pela seguinte fórmula:

$$k = \frac{1}{t} \cdot \ln\left(\frac{N(t)}{N_0}\right)$$

Onde: $N(t)$ é a população microbiana no tempo t ; N_0 é a população inicial (tempo zero); k é a constante de decaimento microbiano; t é o tempo de incubação ou monitoramento.

Resultados e discussão

O monitoramento térmico mostrou aumento de temperatura após a adição de fezes e urina, indicando maior atividade microbiana devido à inclusão de nutrientes. A fase termofílica foi breve, como esperado em sistemas de pequeno volume (~1 kg), nos quais o processo é mais rápido. No Teste 2, o controle da temperatura em níveis mesofílicos (máx. 45 °C) visava maior estabilidade e inativação de patógenos. Porém, mesmo com o sistema SITRAD®, houve baixa degradação orgânica e redução microbiana ineficaz. A temperatura não atingiu o nível crítico de 55 °C, essencial para eliminar patógenos (Lin et al., 2022). Conclui-se que a compostagem mesofílica, isoladamente, não garante a sanitização adequada da cama orgânica em sistemas *Compost Barn*.

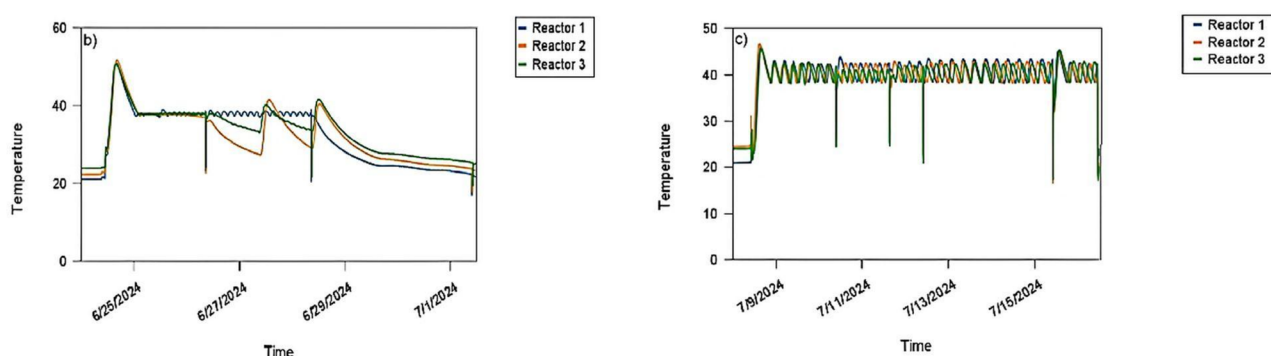


Figura 1. Monitoramento da temperatura nos Testes 1 e 2.

Os parâmetros físico-químicos avaliados estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Resultados das análises físico-químicas da cama do sistema *Compost Barn*.

Análises	Esterco bovino	Maravalha	<i>Compost Barn</i>
Condutividade (μS/cm)	3411	136,9	1268
Material orgânica (mg/kg)	259342,2	60332,2	152512,1
Nitrato (mg/kg)	1033	54,1	380
Nitrito (mg/kg)	—	—	—
Nitrogênio total (mg/kg)	11481	536	4342
pH	5,04	6,96	9,43
Sólidos totais (%)	19	90	36,4
Fósforo total (mg/kg)	3283	0,482	1545
Carbono orgânico total (mg/kg)	150430,5	34995,5	88464,1
Nitrogênio Kjeldahl (mg/kg)	11248	—	—
Sólidos fixos (mg/kg)	45455	6667	102151
Sólidos voláteis (mg/kg)	954545	993333	897849

Traço (—): informação não aplicável.

No Teste 1, observou-se uma redução significativa das populações microbianas, principalmente das bactérias Gram-negativas, cujas contagens diminuíram de 7,3 para

valores médios de 5,3; 4,9 e 4,6 $\log_{10}$ UFC/g nas triplicatas. Também houve reduções em fungos e leveduras (de 5,8 para 5,9; 5,0 e 4,7 $\log_{10}$ UFC/g) e em bactérias Gram-positivas (de 8,6 para 8,8; 7,4 e 8,2 $\log_{10}$ UFC/g), embora com menor magnitude. Esses resultados indicam que a aeração ativa, combinada à adição de substrato fresco, contribuiu para o declínio microbiano, mesmo sem controle térmico. Por sua vez, no Teste 2, realizado sob temperatura mesofílica controlada (39 °C), a eficiência de redução microbiana foi menor. Em alguns casos, como fungos e leveduras, houve aumento nas contagens. As bactérias Gram-negativas variaram de 6,8 para 6,4; 6,7 e 7,0 $\log_{10}$ UFC/g, e as Gram-positivas de 9,5 para 8,7; 8,0 e 8,0 $\log_{10}$ UFC/g. Isso reforça que a temperatura mesofílica não foi suficiente para promover supressão microbiana eficaz, como apontado por United States (1995) e por Lin et al. (2022).

De forma geral, os resultados comparativos entre os testes destacam a importância de atingir a faixa termofílica durante a compostagem para garantir a redução adequada de microrganismos e atender aos padrões sanitários para reutilização segura do composto em sistemas *Compost Barn*.

Tabela 2. Caracterização microbiológica dos Testes 1 e 2 em $\log_{10}$ UFC.g⁻¹.

Contagem de microrganismos ($\log_{10}$ cfu.g ⁻¹)				
Microrganismos	Compost Barn (T0) ⁽¹⁾	R1 (Tf) ⁽²⁾	R2 (Tf) ⁽³⁾	R3 (Tf) ⁽⁴⁾
Teste 1				
Bactérias Gram+	8,6	8,8	7,4	8,2
Bactérias Gram-	7,3	5,3	4,9	4,6
Fungos e leveduras	5,8	5,9	5,0	4,7
Teste 2				
Bactérias Gram+	9,5	8,7	8,0	8,0
Bactérias Gram-	6,8	6,4	6,7	7,0
Fungos e leveduras	5,7	6,1	6,0	6,2

⁽¹⁾ T0: tempo inicial de amostragem, imediatamente após a montagem dos experimentos nos biorreatores; ⁽²⁾ R1: biorreator 1; ⁽³⁾ R2: Biorreator 2; ⁽⁴⁾ R3: Biorreator 3;

Tf: Tempo final do processo de compostagem, após sete dias de monitoramento.

Conclusões

O modelo de biorreator laboratorial utilizado possibilitou o controle preciso de temperatura, umidade e aeração durante o processo de compostagem. Isso permitiu analisar a dinâmica microbiana e a eficiência na eliminação de microrganismos indicadores. O controle térmico mostrou-se fundamental para aumentar a estabilidade e o funcionamento da compostagem. O sistema é uma ferramenta valiosa para otimizar o manejo de resíduos em sistemas *Compost Barn*. Este modelo oferece suporte para futuras pesquisas e práticas.

Agradecimentos

Ao apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) - Brasil, pela concessão de bolsa. À Fapemig - Processo nº APQ-00665-22 – Projeto: "Saúde no período de transição de vacas leiteiras alojadas em Sistemas *Compost Barn*".

Referências

- ANDRADE, R. R.; CAMPOS, A. T.; SILVA, C. J. A.; CECON, P. R.; SILVA, G. A.; PER EIRA, R. G. A. Spatial distribution of compost bed parameters and implications for animal welfare and milk production in a compost barn system with tunnel ventilation. **Journal of Thermal Biology**, v. 106, 103234, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2022.103234>.
- KUPPAN, N.; PADMAN, M.; MAHADEVA, M.; SRINIVASAN, S.; DEVARAJAN, R. A comprehensive review of sustainable bioremediation techniques: eco-friendly solutions for waste and pollution management. **Waste Management Bulletin**, v. 2, n. 3, p. 154-171, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.wmb.2024.07.005>.
- LIN, M.; REN, L. J.; WANDERA, S. M.; LIU, Y.; DONG, R. J.; QIAO, W. Enhancing pathogen inactivation in pig manure by introducing thermophilic and hyperthermophilic hygienization in a two-stage anaerobic digestion process. **Waste Management**, v. 144, 123-131, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2022.03.019>.
- MANNI, A.; FILALI-MALTOUF, A. Diversity and bioprospecting for industrial hydrolytic enzymes of microbial communities isolated from deserted areas of south-east Morocco. **AIMS Microbiology**, v. 8, n. 1, p. 5-25, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/su162310408>.
- OLIVEIRA, K. R.; RODRIGUES, M. S.; SILVA, L. H. R.; SALGADO, P. T. R.; SILVA, A. L.; ROTTA, P. P. Reduced manure treatment needs with compost-bedded pack systems in dairy cows. **Sustainability**, v. 16, n. 23, 10408, 2024. DOI: <https://doi.org/10.3390/su162310408>.
- UNITED STATES. Environmental Protection Agency. **A guide to the Federal EPA rule for land application of domestic septage to non-public contact sites**. Washington, DC, 1995. EPA/832-B-92-005.

Avaliação do crescimento de *Pseudomonas* sp. em permeado de soro de leite

Pedro Henrique Gomes Picoli⁽¹⁾⁽⁴⁾, Otávio Augusto Braga de Paula⁽²⁾, Marcelo Henrique Otenio⁽³⁾, Edna Froeder Arcuri⁽³⁾, Pedro Braga Arcuri⁽³⁾

⁽¹⁾Bolsista (Pibic/Fapemig), Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG. ⁽²⁾Estagiário, Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG. ⁽³⁾ Pesquisador, Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG. ⁽⁴⁾E-mail: pedropicoli.ph@gmail.com.

Resumo — A produção de biossurfactantes a partir de resíduos agroindustriais representa uma alternativa sustentável e inovadora dentro da biotecnologia ambiental. Neste contexto, o presente trabalho avaliou o crescimento de linhagens de *Pseudomonas* sp. utilizando o permeado de soro de leite (PSL), subproduto da ultrafiltração na indústria de laticínios, como meio de cultivo microbiano. O PSL, rico em lactose e frequentemente descartado, representa risco ambiental, mas pode ser valorizado em processos biotecnológicos. Foram utilizadas 25 linhagens de *Pseudomonas* sp., cultivadas em meio contendo apenas PSL neutralizado e esterilizado. A viabilidade de crescimento foi avaliada por contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) no tempo zero (T0) e após 48 horas de incubação (T48). Os resultados demonstraram crescimento significativo da maioria das linhagens, considerando a taxa de crescimento, indicando que o PSL suporta o desenvolvimento microbiano e tem potencial como meio de cultivo alternativo. O estudo conclui que o PSL é um resíduo viável para aplicação biotecnológica, o próximo desafio do trabalho é avaliar a capacidade de produção de biossurfactantes com este meio de cultivo.

Termos para indexação: resíduos, laticínio, meios de cultivo, biomoléculas.

Assessment of *Pseudomonas* sp. Growth in whey permeate

Abstract — The production of biosurfactants from agro-industrial waste represents a sustainable and innovative alternative within environmental biotechnology. In this context, this study evaluated the growth of *Pseudomonas* sp. strains using whey permeate (WMP), a byproduct of ultrafiltration in the dairy industry, as a microbial culture medium. WMP, rich in lactose and frequently discarded, poses an environmental risk but can be used in biotechnological processes. Twenty-five *Pseudomonas* sp. strains were grown in a medium containing only neutralized and sterilized WMP. Growth prediction was assessed by counting colony-forming units (CFU) at time zero (T0) and after 48 hours of incubation (T48). The results demonstrated significant growth of most strains, considering the growth rate, suggesting that WMP supports microbial development and has potential as an alternative culture medium. The study concludes that PSL is a viable advantage for biotechnological application. The next challenge of the work is to evaluate the production capacity of biosurfactants with this culture medium.

Index terms: residue, dairy, culture media, biomolecules.

Introdução

Os surfactantes são compostos anfipáticos com segmentos hidrofílicos e hidrofóbicos que se acumulam em interfaces entre líquidos imiscíveis, como óleo e água, promovendo a redução da tensão superficial e a estabilização de emulsões. Dentre esses compostos, destacam-se os biossurfactantes, produzidos por microrganismos a partir da biotransformação de substratos renováveis (Hee-Sik et al., 1997; Banat et al., 2010).

Entre os microrganismos produtores de biossurfactantes, destaca-se a *Pseudomonas aeruginosa*, capaz de sintetizar raminolipídeos, um tipo de glicolipídeo constituído por uma ou duas moléculas de raminose ligadas a cadeias de ácidos graxos de 8 a 12 carbonos. A produção desses compostos é influenciada por múltiplos fatores, como a composição do meio de cultura, a fonte de carbono e nitrogênio, a aeração e a agitação do sistema fermentativo, exigindo estratégias de otimização para maximizar sua produtividade (Francy et al., 1991).

A busca por matérias-primas de baixo custo e ambientalmente sustentáveis para viabilizar economicamente a produção de biossurfactantes tem incentivado a utilização de resíduos agroindustriais como substratos fermentativos. Nesse contexto, o permeado do soro de leite (PSL), subproduto abundante e de baixo valor agregado da indústria de laticínios, surge como alternativa promissora (Cameotra; Makkar, 2004; Anjana, 2010).

Embora já tenha sido demonstrada a eficácia da *Pseudomonas aeruginosa* na produção de raminolipídeos utilizando óleo de soja residual como substrato (Lima, 2007), não foram encontrados trabalhos que aplicam o permeado de soro de leite com essa finalidade.

Dessa forma, este trabalho teve como objetivo investigar o crescimento de linhagens de *Pseudomonas* sp. utilizando permeado do soro do leite como principal fonte de carbono, avaliando sua viabilidade técnica e potencial de valorização dentro de um contexto de sustentabilidade e inovação na indústria de laticínios.

As informações geradas no presente estudo vão ao encontro dos Objetivos do Desenvolvimento Sustentável (ODS) contidos na Agenda 2030, proposta pela Organização das Nações Unidas, da qual o Brasil é signatário, sobretudo nos seguintes objetivos específicos: ODS 6 - Água limpa e saneamento: Garantir disponibilidade e manejo sustentável da água e saneamento para todos; ODS 8. Empregos dignos e crescimento econômico: Promover o crescimento econômico sustentado, inclusivo e sustentável, emprego pleno e produtivo, e trabalho decente para todos (Nações Unidas, 2025).

Material e métodos

O permeado de soro de leite utilizado para o experimento foi coletado em laticínio da cidade de Lima Duarte, em junho de 2024. O volume de 20 litros foi neutralizado e esterilizado em autoclave a 121 °C por 15 minutos. Paralelamente, 25 linhagens de *Pseudomonas* sp., preservadas a -80 °C a partir do estoque de trabalho da equipe do projeto, foram recuperadas em placas de ágar BHI (brain and heart infusion).

Essas linhagens foram conduzidas para teste de crescimento, que iniciou com diluição da massa obtida da recuperação em tampão fosfato (0,5 na escala McFarland). Posteriormente, 45 µl dessa solução foram inoculados em 3 ml de PSL; a partir deste inóculo foram realizadas diluições seriadas para dois tratamentos (tempo de incubação): diluições entre a faixa de 10^{-1} e 10^{-4} sem incubação do inóculo (T0) e diluições entre 10^{-2} e 10^{-5} após 48 horas de incubação (T48), esta incubação em mesa agitadora (100 rpm) a 30 °C.

Estas diluições foram utilizadas para avaliação do crescimento por meio da técnica de contagem de microgotas (Hoben; Somasegaran, 1982). Foram pipetadas quatro gotas (10 µl cada gota) de cada diluição em quadrantes de placas de ágar BHI, que foram incubadas em estufa a 30 °C em condições de aerobiose por 24 horas. A contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) foi feita manualmente, para os dois tempos avaliados, com o auxílio de contador de colônias.

Para avaliação do crescimento do (T0) para o (T48) foi utilizada a fórmula de taxa de crescimento (Von Sperling, 2005):

$$k = \frac{1}{t} \cdot \ln\left(\frac{N(t)}{N_0}\right)$$

Onde: k = taxa específica de crescimento (ou decaimento), geralmente expressa em unidades como h⁻¹, min⁻¹, etc; t = tempo de incubação ou monitoramento; N₀ = população microbiana inicial (T0); N(t) = população no tempo determinado (T48); ln = logaritmo natural (aproximadamente 2,718).

Resultados e discussão

Os resultados obtidos de UFC/ml por linhagem para cada tratamento de tempo estão expressos em base logarítmica decimal (log₁₀) na Tabela 1, bem como a taxa de crescimento. Foram informados também espécie e gênero para as linhagens cuja identificação era conhecida.

Tabela 2. Tratamentos de descontaminação aplicados em pares de córneas e contagem bacteriana após 24h e 48h de cultivo em meio M199, incluindo pré-processamento dos globos oculares, processamento das córneas e dois antibióticos.

Nº da linhagem	Espécie	Contagem (log ₁₀) T ⁰	Contagem (log ₁₀) T ⁴⁸	Taxa de Crescimento
P86	<i>Pseudomonas sp.</i>	7,62	7,56	- 0,002878
P98	<i>Pseudomonas sp.</i>	7,44	7,69	0,011993
P116	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	6,74	7,25	0,024465
P129	<i>Pseudomonas sp.</i>	7,11	7,27	0,007675
P145	<i>Pseudomonas sp.</i>	7,44	7,34	- -0,004797
P169	<i>Pseudomonas sp.</i>	7,57	7,17	- -0,019188
P175	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	5,91	6,43	0,024945
P257	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	5,61	7,46	0,088745
P260	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	5,90	INC	NR
P263	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	5,92	6,43	0,024465
P266	<i>Pseudomonas sp.</i>	NR	NR	NR
P267	<i>Pseudomonas sp.</i>	5,96	6,46	0,023985
P270	<i>Pseudomonas sp.</i>	4,60	5,53	0,044613
P273	<i>Pseudomonas sp.</i>	4,54	6,63	0,100258
P275	<i>Pseudomonas sp.</i>	5,97	7,44	0,070517
P279	<i>Pseudomonas sp.</i>	6,04	7,72	0,080590
P280	<i>Pseudomonas sp.</i>	5,38	6,04	0,031661
P282	<i>Pseudomonas sp.</i>	4,53	6,71	0,104576
P284	<i>Pseudomonas sp.</i>	4,47	6,96	0,119447
P290	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	5,80	7,43	0,078192
P294	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	5,79	7,69	0,091144

Continua...

Continuação.

Nº da linhagem	Espécie	Contagem ($\log_{10}$) T ⁰	Contagem ($\log_{10}$) T ⁴⁸	Taxa de Crescimento
P295	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	5,32	7,43	0,101218
P302	<i>Pseudomonas sp.</i>	5,47	6,89	0,068118
P316	<i>Pseudomonas sp.</i>	5,95	6,56	0,029262
P323	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	7,17	7,64	0,022546

Legenda: INC = incontável, NR = não realizado

As 25 linhagens de *Pseudomonas sp.* foram avaliadas quanto à taxa específica de crescimento microbiano (k) após 48 horas de incubação em permeado de soro de leite, utilizado como meio de cultivo. Dentre essas, 21 apresentaram valores positivos de k, indicando aumento populacional ao longo do tempo, o que demonstra que o permeado foi eficiente como substrato para o desenvolvimento da maioria dos isolados.

Linhagens como P284, P282, P295 e P294 apresentaram as maiores taxas específicas de crescimento, sugerindo elevada adaptabilidade ao meio e potencial biotecnológico para aplicações futuras, como produção de biossurfactantes. Por outro lado, algumas linhagens, como P86, P145, P169 e P175, apresentaram valores negativos de k, refletindo uma redução na densidade celular, possivelmente associada à baixa adaptação, limitação nutricional ou condições inibitórias específicas do meio. Duas linhagens (P260, P266) não permitiram o cálculo do parâmetro por ausência ou nulidade de dados.

A viabilidade do uso do permeado como meio de cultivo microbiológico já foi demonstrada em outros estudos, como no trabalho de Hassemer (2016), que evidenciou o crescimento significativo de *Bacillus megaterium* utilizando esse subproduto como fonte de carbono. Os resultados apresentados mostram que o permeado de soro de leite pode ser uma alternativa viável para o cultivo de linhagens de *Pseudomonas sp.*, favorecendo o crescimento de diversas linhagens, com destaque para aquelas com maior performance metabólica, que podem ser exploradas em aplicações como produção de biossurfactantes ou biodegradação.

Conclusões

Os resultados demonstram a viabilidade do permeado de soro de leite como meio de cultivo para crescimento de *Pseudomonas sp.*, evidenciando seu potencial para aplicações em processos biotecnológicos, além de contribuir para o reaproveitamento de um resíduo agroindustrial de baixo valor agregado. Conclui-se, portanto, que o permeado de soro de leite é um resíduo viável para aplicação biotecnológica.

Agradecimentos

Ao apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) - Brasil, pela concessão de bolsa. À Embrapa Gado de Leite pela oportunidade de treinamento, o que nos proporcionou obter experiência e aprendizado; à equipe do projeto e ao mestrando Otávio pelo acompanhamento, orientação e apoio durante o período de estudos e treinamento.

Ao financiamento do projeto: FAPEMIG APQ-02254-23: Produção de biossurfactante por *Pseudomonas spp* em permeado de soro de leite; e pela Bolsa de Iniciação Científica (BIC)

da Fapemig dentro do mesmo projeto.

Referências

- ANJANA, J. D. Production of biosurfactants. In: KOSARIC, N.; SUKAN, F. V. (ed.). **Biosurfactants**: production, properties, applications. New York: Marcel Dekker, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1201/9780585355702>.
- BANAT, I. M.; FRANZETTI, A.; GANDOLFI, I.; BESTELLI, G.; MARTINOTTI, M. G.; FRACCHIA, L.; SMYTH, T. J.; MARCHANT, R. Microbial biosurfactants production, applications and future potential. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 87, n. 2, p. 429-440, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2589-0>.
- CAMEOTRA, S. S.; MAKAR, R. S. Recent applications of biosurfactants as biological and immunological molecules. **Current Opinion in Microbiology**, v. 7, n. 3, p. 266-273, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mib.2004.04.006>.
- FRANCY, R. J.; THOMAS, J. M.; RAYMOND, R. L.; WARD, C. H. Emulsification of hydrocarbons by subsurface bacteria. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 8, n. 4, p. 237-246, 1991. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF01576061>.
- HASSEMER, G. de S. **Produção de P(3HB) por *Bacillus megaterium* utilizando permeado de soro de leite. 2016.** 108 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2016.
- HEE-SIK, K.; BYUNG-DAE, Y.; CHANG-HO, L.; HYUN-HYO, S.; HEE-MOCK, O.; TOHORU, K.; YOSHIKI, T. Production and properties of a lipopeptide biosurfactant from *Bacillus subtilis* C9. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 84, n. 1, p. 41-46, 1997. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0922-338X\(97\)82784-5](https://doi.org/10.1016/S0922-338X(97)82784-5).
- HOBEN, H. J.; SOMASEGARAN, P. Comparison of the pour, spread, and drop plate methods for enumeration of *Rhizobium* spp. in inoculants made from presterilized peat. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 44, n. 5, p. 1246-1247, 1982. DOI: <https://doi.org/10.1128/aem.44.5.1246-1247.1982>.
- LIMA, C. J. B. de. **Produção de biossurfactante por *Pseudomonas aeruginosa* empregando óleo de soja residual.** 2007. 168 p. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2007.
- NAÇÕES UNIDAS. **Objetivo de Desenvolvimento Sustentável 8**: Trabalho decente e crescimento econômico. Disponível em: <https://brasil.un.org/pt-br/sdgs/8>. Acesso em: 13 mar. 2025.
- VON SPERLING, M. V. **Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos.** 4. ed. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 2005.

Apoio

