ÓLEO DE UCUUBA (*Virola surinamensis* (Rol.) Warb.) NA FERMENTAÇÃO RUMINAL IN VITRO DE DIETAS COM DIFERENTES RELAÇÃO VOLUMOSO: CONCENTRADO

**Vitoria Pereira Barcelo, Universidade Federal do Norte do Tocantins,**

**e-mail:** [vitoria.barcelo@mail.uft.edu.br](mailto:vitoria.barcelo@mail.uft.edu.br)

**Luciano Fernandes Sousa, Universidade Federal do Norte do Tocantins,**

**e-mail:** [luciano.sousa@mail.uft.edu.br](mailto:luciano.sousa@mail.uft.edu.br)

**Laysa Barbosa Nunes, Universidade Federal do Norte do Tocantins,**

**e-mail:** [laysa.barbosa@mail.uft.edu.br](mailto:laysa.barbosa@mail.uft.edu.br)

**Isabella Martins Chaves, Universidade Federal do Norte do Tocantins, e-mail:** [isabella.martins@mail.uft.edu.br](mailto:isabella.martins@mail.uft.edu.br)

**Amanda Araújo Borges, Universidade Federal do Norte do Tocantins, e-mail:** [amanda.borges1@mail.uft.edu.br](mailto:amanda.borges1@mail.uft.edu.br)

Objetivou-se avaliar o efeito da adição de óleo de ucuuba (OU) em dietas com diferentes relações volumoso:concentrado sobre a fermentação ruminal *in vitro.* O experimento foi desenvolvido na Universidade Federal do Norte do Tocantins (UFNT), Campus de Araguaína - TO. O inóculo ruminal foi obtido de três bovinos fistulados (250 ± 25 kg de peso corporal). Os tratamentos consistiram em quatro dietas com diferentes relações volumoso:concentrado (100:0; 67:33, 33:67 e 0:100) e da adição de três níveis de óleo de ucuuba (0; 1 e 2%). O padrão cinético de produção de gases foi alterado com a inclusão de óleo de ucuuba nos níveis de 1 e 2%, ambos promoveram a redução na produção total de gases (mL). A produção cumulativa de gases aumentou conforme elevou-se a proporção de concentrado nas dietas. Foi verificado interações entre as dietas e os níveis de inclusão de OU (p<0,05) após às 96 horas de incubação para degradabilidade da matéria seca (DMS) e matéria orgânica (DMO). As dietas com concentrações mais elevadas de fibra em detergente neutro (FDN) manifestaram menor DMS e DMO. A inclusão do óleo de ucuuba reduziu a produção de metano às dietas que possuíam maiores níveis de concentrado. Concluiu-se que a adição do óleo de ucuuba nas dietas influencia a cinética de degradação de carboidrato e reduz a produção total de gases e a degradabilidade ruminal *in vitro*. No entanto, a atuação do óleo de ucuuba sobre a produção de metano *in vitro* depende da relação volumoso:concentrado da dieta, onde, dietas com maior proporção de concentrado reduz a produção de metano.

**Palavras chaves:** fermentação ruminal, metano, óleo de ucuuba.

1. Apresentação e Justificativa

O Brasil é listado como um dos maiores contribuintes para as emissões de gases de efeito estufa (GEE), como os gases carbônico e metano devido às emissões advindas da pecuária, principalmente da produção de bovinos (MOMBACH et al., 2016).

A produção de acetato e butirato libera maior quantidade H2, produto da oxidação do NADH durante a fermentação ruminal de carboidratos em bovinos. Esse gás é metabolizado por bactérias metanogênicas para produzir CO2 e CH4. A quantidade de CH4 produzido no rúmen é proporcional à produção de acetato, dietas com maior nível de volumoso geram maior produção de CH4, enquanto dietas altas em concentrado aumentam a produção de propiônico reduzindo a produção de H2, portanto, a síntese de CH4 (KOZLOSKI, 2019).

O uso de aditivos ionóforos e antibióticos são meios de mitigar a produção de CH4, no entanto, tais aditivos foram proibidos na União Europeia (Portaria 1831/2003/EC) com alegação do risco de resistência bacteriana nos animais e humanos, assim alternativas como uso de óleo essencial tem sido cada vez mais estudados devidos seus efeitos bactericidas e bacteriostáticos sobre as bactérias gram-positivas e metanogênicas (SMITH-PALMER et al., 1998). Atualmente, instituições de pesquisa da região Norte do Brasil estão estudando os óleos de árvores da Amazônia Brasileira com efeito antimicrobiano conhecido na saúde humana, entre estas espécies está a ucuuba (RODRIGUES, 1972). A ucuuba (*Virola surinamensis* (Rol.) Warb.) uma árvore que se encontra na floresta amazônica, principalmente no estuário do rio Amazonas (NEVES et al., 2002). Acredita-se que devido ao efeito antimicrobiano ela poderá mitigar a produção de gases de efeito estufa (LE COINTE et al., 1947).

1. Objetivos

**Objetivo geral:** O Avaliar o efeito da adição de óleo de ucuuba em dietas com diferente relação volumoso: concentrado sobre a fermentação ruminal *in vitro*.

**Objetivo específicos:**

1) Avaliar o efeito da adição de óleo de ucuuba sobre a produção de gases *in vitro* de dietas com diferente relação volumoso: concentrado.

2) Avaliar o efeito da adição de óleo de ucuuba sobre a degradação ruminal da matéria seca *in vitro* de dietas com diferente relação volumoso: concentrado.

3) Avaliar o efeito da adição de óleo de ucuuba sobre a produção de ácidos graxos voláteis e alguns gases de interesse ambiental *in vitro* de dietas com diferente relação volumoso:concentrado

1. Metodologia

O experimento foi conduzido na Universidade Federal do Norte do Tocantins (UFNT). Foi obtido de três bovinos (250 ± 25 kg de peso corporal) fistulados e canulados no rúmen. As proporções de ingredientes e composição química das dietas estão dispostas na tabela 1.

A produção de gases das dietas foi mensurada por meio da técnica semiautomática de produção de gases, proposta por Maurício et al. (1999). As medidas de pressão e volume de gases serão tomadas utilizando-se um transdutor de pressão modelo DPI800-P.

As leituras foram realizadas nos tempos 3; 6; 9; 12; 16; 20; 24; 30; 36; 48; 72 e 96 horas após o início do processo de fermentação. Utilizou-se o analisador de gases portátil TEC-GA21BIO® para mensurar o gás metano.

Os dados foram ajustados ao modelo de France et al. (1993): Y= A {1 – exp [- b (t – L) – c x (√ t - √L)]} obtendo-se os seguintes parâmetros referentes à cinética de produção de gases: produção de gases acumulada (mL) “Y”, tempo de incubação “t” (horas), total de gases produzidos (mL) “A”, tempo de colonização “T” (horas) e taxa de degradação fracional (h-1) “μ”. As equações geradas foram comparadas por meio de teste de paralelismo e identidade de curvas (REGAZZI et al., 2004).

**Tabela 1**. Proporção de ingredientes e composição das dietas experimentais.

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Ingredientes** | **Composição (% da MS Total)** | | | |
| **Dieta volumosa** | **Dieta (67:33)** | **Dieta (33:67)** | **Dieta concentrada** |
| **Feno Mombaça** | 97,00 | 67,00 | 33,00 | 0,00 |
| **Milho grão moído** | 0,00 | 17,00 | 41,00 | 54,92 |
| **Farelo de Soja** | 0,00 | 10,96 | 20,96 | 34,35 |
| **Fosfato** | 0,00 | 0,58 | 0,58 | 1,15 |
| **Sal Mineral** | 3,00 | 3,00 | 3,00 | 6,42 |
| **Calcário dolomítico** | 0,00 | 1,46 | 1,46 | 3,12 |
| **Composição química (g kg-1 de MS)** | | | | |
| **Matéria Seca, g kg-1 MN** | 91,69 | 91,22 | 90,54 | 89,72 |
| **Matéria Mineral** | 7,35 | 9,65 | 9,14 | 13,31 |
| **Proteína Bruta** | 10,61 | 12,44 | 13,30 | 19,00 |
| **Extrato Etéreo** | 3.07 | 2,79 | 3,97 | 4,15 |
| **Proteína Insolúvel em Detergente Neutro** | 2,39 | 1,78 | 7,67 | 5,95 |
| **Proteína Insolúvel em Detergente Ácido** | 0,02 | 0,04 | 0,02 | 0,03 |
| **Fibra em Detergente Neutro** | 63,70 | 44,68 | 32,41 | 15,44 |
| **Fibra em Detergente Ácido** | 31,18 | 23,79 | 14,02 | 5,08 |
| **Carboidratos Não Fibrosos** | 18,34 | 30,44 | 41,18 | 48,10 |
| **Cinza Insolúvel em Detergente Ácido** | 1,79 | 1,78 | 1,32 | 1,58 |
| **Cinza Insolúvel em Detergente Neutro** | 1,84 | 2,19 | 2,30 | 4,08 |
| **Lignina** | 6,12 | 4,24 | 3,24 | 0,66 |

O modelo estatístico adotado foi: Yijk = μ + Bi + F1j + F2j + F1× F2j + eijk, em que: μ = média geral; Bi = efeito do Bloco i, i = 1, 2, 3, 4, 5; F1j = efeito das dietas j, j = 1, 2, 3, 4; F2j = efeito dos níveis de OU j, j = 1, 2, 3; F1 × F2j = efeito da interação (Dieta × Níveis dos OU); eijk = erro. Os procedimentos estatísticos foram realizados utilizando o Statistical Analysis System® (SAS). Os dados obtidos foram submetidos à análise variância utilizando-se o delineamento em blocos casualizados com arranjo fatorial 4 × 3. Foi efetuado o contraste ortogonal para estimativa do efeito linear da adição do OU. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro tipo I.

Resultados

Com a inclusão de óleo de ucuuba (OU) nos níveis de 1 e 2% reduziram a produção total de gases (mL) em relação às dietas sem OU. Houve redução na produção total de gases ao aumentarmos o volumoso nas dietas. O tempo de colonização (T) foi maior para dietas ricas em concentrado. A taxa de degradação fracional (h-1) foi maior nos tratamentos com inclusão de 1 e 2% de OU, independentemente da relação volumoso: concentrado das dietas. A degradabilidade efetiva reduziu com o aumento nos níveis de OU para todas as taxas de passagens e dietas (tabela 2).

**Tabela 2 -** Parâmetros da cinética de fermentação ruminal *in vitro* de dietas com adição crescente de concentrado, utilizando o modelo de France e degradabilidade efetiva

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Tratamentos** | **Parâmetros de France** | | | | | | |
| **A\*** | **T\* (h:Min.)** | **μ\*** | **DE\*\* (2%)** | **DE (4%)** | **DE (6%)** | **DE (8%)** |
| **OUUcuuba0R100\_0** | 186,9 | 01:28 | 0,0459 | 72,2822 | 68,8383 | 65,5331 | 62,3615 |
| **OUUcuuba1R100\_0** | 121,1 | 01:17 | 0,0701 | 18,5554 | 17,7439 | 16,9617 | 16,2078 |
| **OUUcuuba2R100\_0** | 114,9 | 01:23 | 0,0718 | 17,2260 | 16,3976 | 15,6033 | 14,8419 |
| **OUUcuuba0R67\_33** | 208,2 | 01:31 | 0,0559 | 76,8609 | 73,3285 | 69,9320 | 66,6666 |
| **OUUcuuba1R67\_33** | 135,0 | 01:23 | 0,0767 | 34,0481 | 32,3064 | 30,6429 | 29,0543 |
| **OUUcuuba2R67\_33** | 145,9 | 02:05 | 0,0718 | 34,8166 | 32,7710 | 30,8345 | 29,0017 |
| **OUUcuuba0R33\_67** | 219,6 | 02:02 | 0,0605 | 84,0278 | 79,1296 | 74,4893 | 70,0941 |
| **OUUcuuba1R33\_67** | 173,3 | 02:20 | 0,0762 | 44,7012 | 41,8741 | 39,2119 | 36,7055 |
| **OUUcuuba2R33\_67** | 169,2 | 02:16 | 0,0748 | 50,3901 | 47,2512 | 44,2921 | 41,5029 |
| **OUUcuuba0R0\_100** | 225,8 | 02:22 | 0,0647 | 94,6838 | 92,8474 | 91,0133 | 89,1815 |
| **OUUcuuba1R0\_100** | 192,7 | 02:16 | 0,0792 | 64,8509 | 60,8228 | 57,0244 | 53,4434 |
| **OUUcuuba2R0\_100** | 182,0 | 02:17 | 0,0740 | 63,8175 | 59,8200 | 56,0528 | 52,5035 |

Total de gases (mL), T: Tempo de colonização (horas) e μ: Taxa de degradação fracional (h-1) \*Parâmetros estimados pelo modelo de France et al. (1993). \*\*Degradabilidade Efetiva

Segundo o teste de paralelismo de curvas (tabela 3), observou-se que houve paralelismo entre os tratamentos sem inclusão de OU, com dietas nas proporções de 100% e 67% de volumoso (OUUcuu0R100\_0 e OUUcuu0R67\_33) diferindo-se dos demais tratamentos que foram paralelos entre si, independente dos níveis de adição de OU e às proporções de V:C.Pelo teste de identidade de curvas, observou-se que somente os tratamentos OUUcuu1R100\_0 e OUUcuu2R100\_0; OUUcuu1R33\_67 e OUUcuu2R33\_67 foram idênticos entre si, diferindo dos demais tratamentos.

**Tabela 3** - Equações da produção acumulativa de gases (PCG), em mL/g de MS de dietas com adição crescente de concentrado.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Tratamentos** | **Equações (Modelo de France)** |  | **R2** |
| **OUUcuu0R100\_0** | Y = 186,9000 x {1 – exp [–(0,0550) x (t –1,4667) – (-0,0716) x (√ t – √1,4667)]} | a F | 99,45 |
| **OUUcuu1R100\_0** | Y = 121,1000 x {1 – exp [–(0,0859) x (t 1,2924) – (-0,1101) x (√ t – √1,2924)]} | b J | 97,43 |
| **OUUcuu2R100\_0** | Y = 114,9000 x {1 – exp [–(0,0890) x (t –1,5238) – (-0,1198) x (√ t – √1,5238)]} | b J | 94,05 |
| **OUUcuu0R67\_33** | Y = 208,2000 x {1 – exp [–(0,0670) x (t –1,3902) – (-0,0823) x (√ t – √1,3902)]} | a C | 98,48 |
| **OUUcuu1R67\_33** | Y = 135,0000 x {1 – exp [–(0,0964) x (t –1,6919) – (-0,1352) x (√ t – √1,6919)]} | b H | 97,76 |
| **OUUcuu2R67\_33** | Y = 145,9000 x {1 – exp [–(0,0920) x (t –2,0897) – (-0,1441) x (√ t – √2,0897)]} | b I | 97,81 |
| **OUUcuu0R33\_67** | Y = 219,6000 x {1 – exp [–(0,0757) x (t –2,0494) – (-0,1139) x (√ t – √2,0494)]} | b B | 99,04 |
| **OUUcuu1R33\_67** | Y = 173,2800 x {1 – exp [–(0,0990) x (t –2,3356) – (-0,1610) x (√ t – √2,3356)]} | b G | 95,74 |
| **OUUcuu2R33\_67** | Y = 169,2000 x {1 – exp [–(0,0967) x (t –2,2826) – (-0,1549) x (√ t – √2,2826)]} | b G | 99,30 |
| **OUUcuu0R0\_100** | Y = 225,8000 x {1 – exp [–(0,0826) x (t –2,3701) – (-0,1327) x (√ t – √2,3701)]} | b A | 98,81 |
| **OUUcuu1R0\_100** | Y = 192,7000 x {1 – exp [–(0,0923) x (t –2,2688) – (-0,1459) x (√ t – √2,2688)]} | b D | 95,41 |
| **OUUcuu2R0\_100** | Y = 182,0000 x {1 – exp [–(0,0950) x (t –2,2995) – (-0,1486) x (√ t – √2,2995)]} | b E | 97,43 |

Equações acompanhadas por letras minúsculas iguais na mesma coluna são paralelas pelo teste de paralelismo de curvas a 5% de probabilidade (FREEZE, 1970). Equações acompanhadas por letras maiúsculas iguais na mesma coluna são idênticas pelo teste de identidade de curvas a 5% de probabilidade (REGAZZI et al., 2004).

As curvas de produção cumulativa de gases (figura 1) para as médias sem OU e com 1 e 2% de OU apresentaram diferença a partir de 6 horas de incubação, com distanciamento da curva média sem OU das demais curvas. O pico de produção de gases ocorreu aproximadamente no tempo de incubação 72 horas para ambas as médias. A produção cumulativa de gases (figura 2), aumentou conforme elevou-se a proporção de concentrado nas dietas, devido à alta degradação do amido da dieta em relação às dietas mais fibrosas.

**Figura 1.** Curva da produção cumulativa de gases em função dos tempos de incubação em diferentes níveis de inclusão de óleo essencial ucuuba.

**Figura 2.** Curva da produção cumulativa de gases em função dos tempos de incubação em diferentes dietas contendo diferentes relações volumoso: concentrado.

Para a degradabilidade da matéria seca (DMS) e orgânica (DMO) foi verificado interações entre as dietas e os níveis de inclusão de OU (V:C X OU) após às 96 horas de incubação. Onde observou-se redução significativa na DMO com a adição de 1 e 2% da MS de OU em todas as dietas em relação aos tratamentos sem OU. No entanto, essa redução na DMO acentuou-se os devido às com maiores proporções de volumoso, onde todas às médias diferiram entre si (Tabela 4).

**Tabela 4 -** Degradabilidade de matéria seca (DMS), degradabilidade de matéria orgânica (DMO) e produção de metano em função da interação volumoso:concentrado (V:C) com adição de óleo de ucuuba (OU).

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **DMS (%)** | | | | | | | | | |
| **OUcuuba** | **V:C** | | | | **Médias** | **P** | | | **CV (%)** |
| **100\_00** | **67\_33** | **33\_67** | **00\_100** |  | **V:C** | **OU** | **V:C x OU** |
| **0%daMS** | 75,87 Ac | 80,53 Ac | 89,20 Ab | 96,52 Aa | 85,53 | <0,001 | <0,001 | <0,001 | 7,52 |
| **1%daMS** | 18,31 Bd | 35,87 Bc | 47,70 Bb | 69,12 Ba | 42,75 |
| **2%daMS** | 18,09 Bd | 36,98 Bc | 53,72 Bb | 68,06 Ba | 44,21 |
| **Médias** | 37,42 | 51,13 | 63,54 | 77,9 | 57,5 |  |  |  |  |
| **DMO (%)** | | | | | | | | | |
| **OUcuuba** | **V:C** | | | | **Médias** | **P** | | | **CV (%)** |
| **100\_00** | **67\_33** | **33\_67** | **00\_100** |  | **V:C** | **OU** | **V:C x OU** |
| **0%daMS** | 75,95 Ac | 82,70 Ac | 91,09 Ab | 100,60 Aa | 87,59 | <0,001 | <0,001 | <0,001 | 8,27 |
| **1%daMS** | 15,46 Bd | 34,27 Bc | 46,03 Bb | 70,45 Ba | 41,55 |
| **2%daMS** | 14,98 Bd | 35,63 Bc | 52,52 Bb | 70,23 Ba | 43,34 |
| **Médias** | 35,46 | 50,87 | 63,21 | 80,43 | 57,49 |  |  |  |  |
| **Metano (g CH4 / kg MOD)** | | | | | | | | | |
| **OUcuuba** | **V:C** | | | | **Médias** | **P** | | | **CV (%)** |
| **100\_00** | **67\_33** | **33\_67** | **00\_100** |  | **V:C** | **OU** | **V:C x OU** |
| **0%daMS** | 50,14 | 42,92 | 36,98 | 29,71 | 39,94 A | <0,01 | <0,005 | 0,509 | 9,39 |
| **1%daMS** | 49,55 | 36,59 | 28,98 | 24,30 | 34,86 B |
| **2%daMS** | 49,09 | 37,30 | 34,64 | 25,02 | 36,51 B |
| **Médias** | 49,60 A | 38,94 B | 33,53 C | 26,34 D |  |  |  |  |  |

MOD= matéria seca digerida; médias seguidas por letras maiúsculas distintas nas colunas e minúsculas nas linhas diferem a (P<0,05), pelo teste de Tukey. V:CxOU= interação óleo de ucuuba x volumoso: concentrado.

Quando avaliamos a produção de metano (CH4), as dietas com diferentes proporções de volumoso: concentrado e o níveis crescentes de inclusão de óleo de ucuuba não interagiram entre si (p>0,05), No entanto, houve efeito das diferentes dietas sobre a produção de metano (p<0,05), com redução de 10,66, 16,07 e 23,26 g CH4/ kg MOD para as dietas com a relação V:C de 67:33, 33:67 e 00:100, respectivamente, em relação à dieta com 100:00. Os níveis de inclusão de OU nas dietas demostraram efeito significativo na produção de metano (p<0,05), onde observou-se que o nível de inclusão 1% da MS reduziu-se cerca de 5,08 g CH4/ kg MOD, e o nível de 2% da MS cerca de 3,43 g CH4/ kg MOD em relação ao não inclusão de óleo na dieta.

Acredita-se que OU possam ter aderido à fibra do alimento, impedindo o contato das enzimas bacterianas, reduzindo a degradação da FDN nas dietas mais volumosas. Segundo (SOUSA et al., 2021) a adição de fontes lipídicas pode reduz a produção de metano, ocorrendo devido a ação deletéria dos lipídeos insaturados sob as bactérias metanogênicas e protozoários.

1. Considerações Finais

A adição do óleo de ucuuba à dieta, nas concentrações de 1 e 2% reduzem a produção total de gases, matéria seca e metano nas diferentes proporções volumoso: concentrado, mas principalmente em dietas com volumoso na composição (100\_00; 67\_33 e 33\_67).

1. Referências Bibliográficas

DOI:10.33448/rsd-v10i13.21039. Disponível em: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/21039>. Acesso em: 15 ago. 2023

FRANCE, J. *et al.* A model to interpret gás accumulation profiles with in vitro degradation of ruminal feeds. **Journal of Theoretical Biology**, v. 163, n. 1, p. 99-111, 1993.

KOZLOSKI, G. V. **Bioquímica dos ruminantes. Terceira edição.** 3° ed. Santa Maria, Rio Grande do Sul. Brasil. Editora UFSM, 2019.

LE COINTE, P. Amazônia brasileira. III. **Árvores e plantas úteis (Indígenas e aclimatadas)**. 8. ed. São Paulo, Ed. Nacional. 506 p., 1947.

MAURÍCIO, R. M. *et al*. A semi-automated *in vitro* gas production technique for ruminant feedstuff evaluation. **Animal Feed Science and Technology**, v. 79, n. 4, p. 321-330, 1999.

MOMBACH, M. A. *et al*. Emissão de metano entérico por bovinos: o que sabemos e que podemos fazer. In: PEREIERA, D.H.; PEDREIRA, B.C. (Eds.). Recuperação das Pastagens. Anais do 2° Simpósio de Pecuária Integrada. Fundação Uniselva. Cuiabá, MT. Brasil, p.181-202, 2016.

NEVES, E. J. M. *et al*. Virola surinamensis: Silvicultura e usos. EMBRAPA Florestas. Colombo, Paraná, Brasil, 2002.

REGAZZI, A. J. *et al.* Teste para verificar a igualdade de parâmetros e a identidade de modelos de regressão não-linear. **Revista de Matemática e Estatística**, v. 22, n. 2, p. 33-45, 2004.

RODRIGUEZ, W, A. A ucuuba da várzea e suas aplicações. **Acta Amazonica**, v. 2 n. 2 p. 29- 47, 1972.

SMITH-PALMER, A. *et al.* Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. **Letters in Applied Microbiology**, v.26, n.2, p. 118-122, 1998

SOUZA, J. G. *et al.* Biohidrogenação ruminal e principal impacto no perfil de ácidos graxos: uma revisão. **Investigação, Sociedade e Desenvolvimento**, v. 10, n. 13, p. 28101321039, 2021. Agradecimentos

Dedicamos esse trabalho em memória ao prof. Luciano Fernandes Sousa, pela dedicação a educação/pesquisa, o seu legado jamais será esquecido.

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