



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
PRÓ-REITORIA DE GRADUAÇÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

MOACIRIA DE SOUZA LEMOS

CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA AMÊNDOA DO CAJU (*Anacardium occidentale* L. var *nanum*) E ANÁLISE DA DIVERSIDADE GENÉTICA ATRAVÉS DE MARCADORES MOLECULARES ISSR E RAPD

MOSSORÓ

2016

MOACIRIA DE SOUZA LEMOS

CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA AMÊNDOA DO CAJU (*Anacardium occidentale* L. var *nanum*) E ANÁLISE DA DIVERSIDADE GENÉTICA ATRAVÉS DE MARCADORES MOLECULARES ISSR E RAPD

Monografia apresentada a Universidade Federal Rural do Semi-Árido como requisito para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Prof.^a Dr^a. Ioná Santos Araújo Holanda.

Co-orientador: Prof. Dr. Glauber Henrique de Sousa Nunes.

MOSSORÓ

2016

©Todos os direitos estão reservados à Universidade Federal Rural do Semi-Árido. O conteúdo desta obra é de inteira responsabilidade do (a) autor (a), sendo o mesmo, passível de sanções administrativas ou penais, caso sejam infringidas as leis que regulamentam a Propriedade Intelectual, respectivamente, Patentes: Lei nº 9.279/1996, e Direitos Autorais: Lei nº 9.610/1998. O conteúdo desta obra tornar-se-á de domínio público após a data de defesa e homologação da sua respectiva ata, exceto as pesquisas que estejam vinculadas ao processo de patenteamento. Esta investigação será base literária para novas pesquisas, desde que a obra e seu (a) respectivo (a) autor (a) seja devidamente citado e mencionado os seus créditos bibliográficos.

L555c Lemos., Moaciria de Souza Lemos..
CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA AMÊNDOA DO
CAJU (*Anacardium occidentale* L. var *nanum*) E
ANÁLISE DA DIVERSIDADE GENÉTICA ATRAVÉS DE
MARCADORES MOLECULARES ISSR E RAPD / Moaciria de
Souza Lemos. Lemos.. - 2016.
54 f. : il.

Orientadora: Ioná Santos Araújo Holanda
Holanda.

Coorientador: Glauber Henrique de Sousa Nunes
Nunes.

Monografia (graduação) - Universidade Federal
Rural do Semi-árido, Curso de Biotecnologia,
2016.

1. *Anacardium occidentale* L.. 2. Diversidade
Genética. 3. Físico-química. I. Holanda, Ioná
Santos Araújo Holanda, orient. II. Nunes, Glauber
Henrique de Sousa Nunes, co-orient. III. Título.

O serviço de Geração Automática de Ficha Catalográfica para Trabalhos de Conclusão de Curso (TCC's) foi desenvolvido pelo Instituto de Ciências Matemáticas e de Computação da Universidade de São Paulo (USP) e gentilmente cedido para o Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (SISBI-UFERSA), sendo customizado pela Superintendência de Tecnologia da Informação e Comunicação (SUTIC) sob orientação dos bibliotecários da instituição para ser adaptado às necessidades dos alunos dos Cursos de Graduação e Programas de Pós-Graduação da Universidade.

CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA AMÊNDOA DO CAJU (*Anacardium occidentale* L. var *nanum*) E ANÁLISE DA DIVERSIDADE GENÉTICA ATRAVÉS DE MARCADORES MOLECULARES ISSR E RAPD

Monografia apresentada a Universidade Federal Rural do Semi-Árido como requisito para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Defendida em: 31 / 10 / 2016

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a, Dr.^a, Ioná Santos Araújo Holanda (UFERSA)
Presidente

Prof.^a, Dr.^a, Elizangela Cabral dos Santos (UFERSA)
Membro Examinador

Msc. Shantyla Geórgia de Azevedo e Silva (UFERSA)
Membro Examinador

A toda minha família em especial aos meus queridos pais, Moacir e Zilmar por todos os ensinamentos, apoio e compreensão.

A todos aqueles que acreditam na ciência como instrumento capaz de mudar a vida das pessoas e contribuir com o desenvolvimento da humanidade.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a UFERSA pelo suporte ofertado para a realização do trabalho e pelo conhecimento adquirido durante todos esses quatro anos.

À meus pais, por todos os ensinamentos e carinho. Dedico todo o meu esforço e sucesso a eles, meus exemplos de vida.

À meus irmãos Hozano, Aldenir, Sueli e Eliane pelo apoio e por serem um exemplo de motivação na minha vida.

À minha orientadora Ioná, por toda paciência, compreensão e dedicação. Agradeço por todos os anos de concessão de bolsa de iniciação científica e por ter me dado a oportunidade de trabalhar com Biotecnologia Vegetal, área que gosto muito.

À Embrapa Agroindústria Tropical pelo envio do material vegetal utilizado na pesquisa, em especial a pesquisadora Patrícia Bordallo pela gentileza e boa vontade e a Conceição por ter trazido o material de Fortaleza até a UFERSA.

Agradeço muito aos meus colegas do laboratório de biotecnologia vegetal, em especial a Belícia, Anna Luísa, Suzana, Jorge, Ruth e Rose pelos momentos de descontração e também pelo constante apoio.

À Shamyra Georgia, pela amizade, ajuda e apoio durante os anos de trabalho juntas. Agradeço pela participação na banca e pelas sugestões e críticas relevantes para o trabalho.

À professora Juliana Vaez, pelo espaço concedido do laboratório de bioquímica para a realização das análises físico-químicas. Agradeço muitíssimo a técnica Tatiana Fernandes pela grande ajuda nas análises e pelo sempre bom humor e carinho com que sempre me recebeu.

As minhas colegas do laboratório de Bioquímica, Beatriz e Valéria, pela constante presença e também pelo carinho com que me acolheram no laboratório.

Aos professores Michele Dalvina, Alexsandra Fernandes, Taffarel Torres, Ana Carla e Gabriela Liberalino pela inesgotável fonte de inspiração profissional durante todo o curso.

De maneira especial agradeço a Euriann Yamamoto, Emanuela Oliveira e Ana Carolina por terem sido minhas orientadoras de bancada e pela constante confiança em mim, mesmo no início da carreira com a falta de experiência. Agradeço também pelo carinho, atenção e pela força que sempre me passaram.

Agradeço aos professores do DCV pela doação de parte dos reagentes para as análises físico-químicas.

À professora Elizangela Cabral pela participação na banca e pelas contribuições relevantes para o trabalho.

Ao professor Gláuber Henrique e a Jonhy Wysllas, monitor de bioestatística, pela boa vontade e ajuda nas análises estatísticas.

Ao professor Emmanuel Jereissati pela concessão de bolsa de monitoria em Bioquímica no último semestre do curso, o que foi de grande ajuda para me manter financeiramente.

Agradeço também a Bárbara Silva, pela amizade e por sempre me fazer acreditar no meu potencial como pesquisadora.

Aos meus colegas de curso, Maria Gabriela, Pedro Henrique, Walter, Rodrigo e Samara pela companhia durante esses quatro anos de curso. Sou muito grata pelas risadas constantes e pela perseverança de todos, onde no fundo, todos nós somos inspirações uns dos outros. Agradeço pelos momentos inesquecíveis que com certeza deixaram memórias indeléveis.

Enfim, agradeço a todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, até mesmo através de pequenos gestos de ajuda e solidariedade.

“Aprender é a única coisa que a mente
nunca se cansa, nunca tem medo e nunca
se arrepende.”

Leonardo Da Vinci

RESUMO

O cajueiro é uma planta pertencente à família *Anacardiaceae* bem adaptada à climas tropicais e subtropicais, sendo uma importante fonte de renda para populações pobres. O principal produto aproveitado para a indústria com grande relevância econômica é a amêndoa do caju, sendo a região Nordeste a principal produtora no Brasil. Dessa forma, trabalhos visando estudar a variabilidade genética de plantas de cajueiro, assim como a seleção de genótipos com características físico-químicas de interesse para o mercado são de grande relevância para a região. Dessa forma, o objetivo do estudo foi determinar as características físico-químicas da amêndoa do caju (*Anacardium occidentale* L. var. *nanum*) e avaliar a diversidade genética de cajueiros provenientes do banco de germoplasma da Embrapa, localizado na cidade de Pacajus-CE. As amêndoas foram caracterizadas quanto ao pH, acidez, umidade, cinzas, proteínas e lipídeos. Após essas duas etapas, realizou-se uma análise de correlação, no intuito de verificar a existência de uma associação entre os resultados obtidos. Os marcadores RAPD e ISSR apresentaram elevado polimorfismo, mostrando haver elevada variabilidade genética, sendo os acessos BRS 274 e BRS 275 os mais próximos e os acessos CCP 1001 e BRS 275, os mais distantes. Foi encontrado resultado semelhante a partir da análise com os caracteres físico-químicos, sendo os acessos CCP 06 e BRS 226 os mais próximos e os acessos BRS 189 e BRS 253 os mais distantes. No estudo foram encontrados valores de correlação baixos, não havendo associação entre os resultados. Na caracterização físico-química as amêndoas apresentaram valores de pH próximo a neutralidade, baixa acidez, teores consideráveis de umidade e cinzas e teores elevados de lipídeos e proteínas, sendo que os últimos foram os únicos que apresentaram diferença significativa a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. A partir dos dados obtidos neste estudo, foi possível indicar acessos de cajueiro com caracteres de interesse para o mercado, sendo os clones BRS 189, BRS 253, CCP 76 e CCP 1001 os mais indicados para cruzamentos.

Palavras-chave: *Anacardium occidentale* L. Diversidade Genética. ISSR. RAPD. Físico-química.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– pH das amêndoas dos 12 acessos de cajueiro anão-precoce.....	31
Figura 2	– Acidez das amêndoas dos 12 acessos de cajueiro anão-precoce.....	32
Figura 3	– Teor de umidade das amêndoas dos 12 acessos de cajueiro anão-precoce.....	34
Figura 4	– Teor de cinzas das amêndoas dos 12 acessos de cajueiro anão-precoce.....	35
Figura 5	– Teor de lipídeos das amêndoas dos 12 acessos de cajueiro anão-precoce.....	36
Figura 6	– Teor de proteínas das amêndoas dos 12 acessos de cajueiro anão-precoce.....	37
Figura 7	– Padrão de amplificação de 12 acessos de cajueiro anão-precoce utilizando o <i>primer</i> ISSR 04. Os números de 06 a 275 correspondem aos acessos de cajueiro anão-precoce estudados.....	38
Figura 8	– Padrão de amplificação de 12 acessos de cajueiro anão-precoce utilizando o <i>primer</i> RAPD OPA 02. Os números de 06 a 275 correspondem aos acessos de cajueiro anão-precoce estudados.....	39
Figura 9	– Dendograma resultante da análise de agrupamento de 12 acessos de cajueiro anão-precoce, obtido pelo método UPGMA, por meio do complemento do índice de similaridade de Jaccard obtido a partir dos marcadores RAPD e ISSR.....	40
Figura 10	– Dendograma resultante da análise de agrupamento de 12 acessos de cajueiro anão-precoce, obtido pelo método UPGMA, a partir das dissimilaridades genéticas com base nas características físico-químicas.....	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	–	<i>Primers</i> ISSR polimórficos com suas respectivas sequências de bases e temperaturas de anelamento (T_m). Mossoró - RN, 2016.....	29
Tabela 2	–	<i>Primers</i> RAPD polimórficos com suas respectivas temperaturas de anelamento (T_m). Mossoró - RN, 2016.....	30

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	15
2.1 ASPECTOS GERAIS DA CULTURA	15
2.2 IMPORTÂNCIA ECONÔMICA DO CAJUEIRO	15
2.3 CAJUCULTURA NO RN	16
2.4 ASPECTOS FÍSICO-QUÍMICOS DA AMÊNDOA DO CAJU	16
2.5 MELHORAMENTO DO CAJUEIRO	17
2.6 DIVERSIDADE GENÉTICA	18
2.7 MARCADORES MOLECULARES	18
3. HIPÓTESES	20
4. JUSTIFICATIVA	21
5. OBJETIVOS DA PESQUISA.....	22
5.1 OBJETIVO GERAL.....	22
5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	22
6. MATERIAL E MÉTODOS.....	23
6.1 COLETA DO MATERIAL	23
6.2 DETERMINAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS.....	24
6.2.1 Medida do pH.....	24
6.2.2 Determinação da Acidez	24
6.2.3 Umidade	24
6.2.4 Cinzas.....	25
6.2.5 Lipídeos.....	25
6.2.6 Proteínas	26
6.2.7 Análise e Interpretação dos Dados	26
6.3 ANÁLISES MOLECULARES COM O DNA DO CAJUEIRO	27
6.3.1 Isolamento do DNA.....	27
6.3.2 Análises com os marcadores ISSR	28
6.3.3. Análises com os marcadores RAPD	29
6.3.4 Análise Estatística.....	30
7.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
7.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS AMÊNDOAS DE CAJU	31
7.1.2 pH e Acidez Titulável	31
7.1.3 Umidade	33

7.1.4	Cinzas.....	35
7.1.5	Lipídeos.....	35
7.1.6	Proteínas.....	36
7.2	ANÁLISE DA DIVERSIDADE GENÉTICA COM OS MARCADORES MOLECULARES RAPD E ISSR.....	38
7.3	ANÁLISE DA DIVERSIDADE GENÉTICA COM BASE NOS CARACTERES FÍSICO-QUÍMICOS.....	43
7.4	ANÁLISE DE CORRELAÇÃO ENTRE OS MARCADORES MOLECULARES (RAPD E ISSR) E AS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS.....	46
8.0	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	49
	REFERÊNCIAS.....	50

1 INTRODUÇÃO

O Cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) pertence à família *Anacardiaceae*, composta por 74 gêneros e 600 espécies tropicais e subtropicais. O gênero *Anacardium* envolve 10 espécies de árvores, arbustos e subarbustos rústicos, típicos de clima tropical. A espécie *Anacardium occidentale* L. é a única aproveitada para fins de cultivo, sendo agrupada em dois tipos, comum e anão-precocce (VIDAL NETO et al., 2013).

As características principais que diferenciam os dois tipos são a precocidade e o porte da planta. O cajueiro do tipo comum se encontra difundido em ambientes naturais e ainda em poucos cultivos, apresentando porte elevado, variações no formato da copa e também variação no peso do fruto – a amêndoa – e do pseudofruto. O anão-precocce, variedade mais indicada para cultivo, possui caracteres de maior interesse para a produção das principais matérias-primas. O anão precocce apresenta porte baixo, copa homogênea, precocidade e adaptação a diferentes condições endofoclimáticas (BRUCKNER, 2008).

O cajueiro é uma frutífera bastante explorada no Brasil, geradora de renda e emprego, apresentando importante papel socioeconômico, principalmente em estados da região Nordeste. A partir da exploração desta cultura pode-se produzir diversas matérias-primas de grande valor para o mercado, tais como a amêndoa da castanha de caju (ACC) e o pseudofruto, sendo o primeiro de maior participação no mercado (BRUCKNER, 2008).

O Brasil é um dos maiores produtores de amêndoa de caju, junto com o Vietnã, Nigéria, Índia e Costa do Marfim. A produção Brasileira apresentou no ano de 2014 uma área colhida de 646.265 hectares, com a produção de 109.909 toneladas. O estado do Rio Grande do Norte se apresenta como segundo maior produtor desta matéria-prima, com uma quantidade de 31.076 toneladas, correspondendo a 28,3% na produção regional, ficando atrás apenas do Ceará com uma produção 52. 318 toneladas (CONAB, 2015).

A exploração das amêndoas para fins industriais e o aproveitamento do pedúnculo se mostraram desde o início atividades econômicas promissoras, fazendo com que logo se iniciassem os estudos de melhoramento com a cultura. O efeito da queda do preço da amêndoa devido em grande parte a variação no peso, acompanhada da indústria de beneficiamento que necessitava constantemente de

matéria prima para exportação, fez com que no ano de 1950 se iniciassem as primeiras pesquisas com o melhoramento do Cajueiro. (CAVALCANTI; VIDAL NETO; BARROS, 2013).

A caracterização físico-química constitui uma ferramenta de grande importância para a indústria de alimentos, pois fornece informações acerca de composição nutricional, permitindo assim o melhoramento dos produtos gerados e seleção de novas matérias-primas para a indústria alimentícia (CARVALHO et al., 2008).

A variabilidade genética é um fator primordial para programas de melhoramento genético, sendo utilizada com a finalidade de incrementar e selecionar genótipos com caracteres agronômicos de interesse. Tendo em vista a importância socioeconômica da cultura do Cajueiro a análise da distância genética entre genótipos, permite auxiliar em cruzamentos para a obtenção de novos materiais.

Estudar a diversidade genética a nível molecular, através da ferramenta de marcadores moleculares, nos permite analisar com maior precisão o parentesco entre genótipos, facilitando a escolha de materiais superiores. Estudos já realizados com a técnica de ISSR por Pessoni (2007) e Frota Júnior et al. (2014), demonstraram a eficiência deste marcador em discriminar os genótipos de cajueiro. O marcador RAPD também tem sido uma técnica bastante informativa e viável para análise com o cajueiro (FALERO, 2007).

Desse modo, o objetivo deste estudo com a variedade de cajueiro Anão-precoce será determinar as características físico-químicas da amêndoa do caju e avaliar a diversidade genética de cajueiros provenientes do banco de germoplasma da Embrapa, localizado na cidade de Pacajus-CE.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 ASPECTOS GERAIS DA CULTURA

A família *Anacardiaceae* é composta por 74 gêneros e 600 espécies tropicais e subtropicais. O gênero *Anacardium* envolve 10 espécies de árvores, arbustos e subarbustos rústicos, típicos de clima tropical, nativas no Panamá, na Guiana Francesa, na Amazônia, na região central e nordeste do Brasil. Dentre todas as espécies conhecidas a única aproveitada para fins comerciais é a *Anacardium occidentale* L. Esta espécie é originária do Brasil, apresentando uma grande variabilidade genética na região Nordeste, na qual a cultura melhor se adaptou (VIEIRA et al., 2006).

O *Anacardium occidentale* L. apresenta folhas simples, inteiras, de aspecto subcoreáceo, glabra e curto-pecioladas. É uma espécie andromonoica e com predominância de fecundação cruzada. O desenvolvimento do pedicelo, origina o pseudofruto (caju), bastante apreciado pelo sabor característico, com elevado teor de vitamina C, sendo consumido *in natura* ou na forma processada (MENDONÇA; MENDONÇA, 2013).

Na natureza são encontrados dois cajueiros da espécie *Anacardium occidentale* L., os quais são diferenciados pelo porte que apresentam e a precocidade, sendo estes o cajueiro comum e o anão-precoces (VIDAL NETO et al., 2013).

O cajueiro comum apresenta porte elevado e grande variação nas outras características morfológicas, como altura variando entre 8 e 15 m e envergadura da copa entre 12 e 16 m. Apresenta também uma grande variação na distribuição de ramos e formato de copa, podendo ser do tipo compacta ou esparsa. A produção da amêndoa é variável, com um peso em gramas de 3 a 33 e o pseudofruto na faixa de 20 a 500 g. Já o cajueiro anão-precoces caracteriza-se pelo porte baixo, copa homogênea, diâmetro de caule e envergadura inferiores aos do tipo comum, sendo que a primeira floração ocorre de 6 a 18 meses, contra 2 a 5 anos do cajueiro comum. A variação no peso da amêndoa vai de 3 a 13 g e o peso do pedúnculo de 20 a 160 g (CAVALCANTI; VIDAL NETO; BARROS, 2013).

2.2 IMPORTÂNCIA ECONÔMICA DO CAJUEIRO

O Brasil é um dos maiores produtores de amêndoa de caju junto com o Vietnã, Nigéria, Índia e Costa do Marfim. A produção Brasileira apresentou no ano de 2014 uma área colhida de 646.265 hectares, com a produção de 109.909 toneladas. A região Nordeste é a maior produtora do país, concentrando quase a totalidade do que é produzido, isto é, aproximadamente 99%. O Ceará apresenta-se como maior produtor e exportador, seguido por Rio Grande do Norte e Piauí. (IBGE, 2014).

O agronegócio do caju desempenha importante papel socioeconômico, principalmente no meio rural, contribuindo para a geração de renda para os trabalhadores do campo em vários países onde a planta é cultivada (LUCENA, 2006).

No ano de 2014 a safra da amêndoa – principal produto comercial – foi de 109.909 toneladas, não alcançando a estimativa do IBGE divulgada em janeiro de 2014 equivalente a 243.965 toneladas, devido principalmente as condições climáticas desfavoráveis à produção.

2.3 CAJUCULTURA NO RN

O Rio Grande do Norte é o segundo maior produtor de amêndoa de caju do país com uma quantidade de 31.076 toneladas, correspondendo a 28,3% na produção regional e uma área de 112.779 hectares (CONAB, 2015).

No estado do Rio Grande do Norte a cajucultura se tornou atividade relevante após a MAISA – Mossoró Agroindústria S/A, no final da década de 1960 e início da década de 70, ter implantado uma área de 12 hectares, com a variedade de cajueiro gigante, no intuito de produzir amêndoa de caju e pseudofruto para a indústria. Com a criação do projeto de colonização denominado “Projeto Serra do Mel” e com a implantação entre os anos de 1978 e 1987 de outros projetos, além de incentivos fiscais pelo programa PROTERRA, Banco do Brasil e pelo Banco do Nordeste, houve intensa expansão da cultura do caju por todas as regiões do estado (SILVA, 2012).

Atualmente, a produção de amêndoa de caju (ACC) se encontra concentrada nos seguintes municípios: Serra do mel, Macaíba, Apodi e Mossoró (IBGE, 2013). Um dos fatores que tem contribuído bastante para o aumento da produção é a introdução dos clones do tipo anão-precoces, permitindo maior precocidade e melhor adensamento dos cajueirais (SILVA, 2012).

2.4 ASPECTOS FÍSICO-QUÍMICOS DA AMÊNDOA DO CAJU

As análises físico-químicas constituem uma ferramenta de grande importância para a indústria de alimentos por fornecer informações acerca da composição nutricional dos alimentos, possibilitando o melhoramento dos produtos gerados e seleção de novas matérias-primas para aproveitamento agroindustrial (CARVALHO et al., 2008).

Estudos sobre análises físico-químicas proporcionam conhecimento sobre as espécies em questão, contribuindo para a área de recursos genéticos e de forma mais ampla, para a indústria alimentícia, possibilitando a escolha de produtos mais nutritivos para os consumidores. Ademais, parâmetros como, umidade, acidez e pH, contribuem para o controle de qualidade dos alimentos e sua estabilidade durante o armazenamento (AQUINO et al., 2011).

A amêndoa do caju – fruto verdadeiro do Cajueiro - é um aquênio reniforme, constituído pelo epicarpo, mesocarpo, endocarpo e amêndoa. (MENDONÇA; MENDONÇA, 2013). É um fruto bastante nutritivo, com elevado teor de lipídeos, proteínas e carboidratos. Uma porção de 100 gramas de amêndoa, apresenta 45,83% de lipídeos (sendo 59,20% de ácido oleico e 18,84% de ácido linoleico), 21,41% de proteína, 20,67% de carboidrato, 4,39% de umidade e 3,21% de cinzas (FREITAS; NAVES, 2010).

O conteúdo proteico da amêndoa apresenta um perfil de aminoácidos que atende as necessidades fisiológicas de indivíduos adultos e em idade escolar (FREITAS; NAVES, 2010). Além disso, este alimento possui baixa umidade, favorável à sua conservação e pH próximo a neutralidade, de sabor agradável aos consumidores. A mesma é consumida na forma torrada ou salgada e como ingrediente presente em pães, bolos, doces, dentre outros (COSTA et al., 2009).

É necessário salientar que a composição centesimal das nozes verdadeiras como a amêndoa, pode variar dependendo das condições de cultivo, solo, práticas agrícolas e genética da espécie cultivada (FREITAS; NAVES, 2010).

2.5 MELHORAMENTO DO CAJUEIRO

Até o início da década de 50, a exploração da amêndoa de caju era feita de forma plenamente extrativista. Foi somente no ano de 1956 que o governo Federal estabeleceu uma coleção de matrizes de cajueiro, na cidade de Pacajús – CE, que seria futuramente alvo de investigação agrônômica (VIDAL NETO et al., 2013).

Com a instalação do parque industrial processador de amêndoa, concentrado no estado do CE e com algumas unidades no RN e no PI, a partir de incentivos fiscais da SUDENE, houve maior demanda pelo produto. Isso culminou em um rápido crescimento da área plantada, aumento na produção com a agroindústria passando a desempenhar uma importante papel econômico. Como os cajueirais eram constituídos com base no plantio de sementes, a produção era irregular e desuniforme. Dessa forma, estudar a diversidade genética contida nas populações naturais se tornou imprescindível para seleção e implementação do programa de melhoramento genético, objetivando o lançamento de genótipos mais produtivos (VIDAL NETO et al., 2013).

2.6 DIVERSIDADE GENÉTICA

O Nordeste abriga a maior diversidade genética da espécie *Anacardium occidentale* L., sendo também a de maior dispersão do gênero. A região amazônica e o Cerrado constituem os centros de diversidade genética do gênero *Anacardium*, sendo que muitas destas espécies são pouco estudadas (CASTRO et al., 2013).

O tipo varietal anão-precocemente apresenta menor variação de caracteres, apresentando facilidade na execução de tratos culturais e precocidade no florescimento, possibilitando a adoção das modernas técnicas de exploração da fruticultura. Na década de 80 foram obtidos os primeiros clones desta variedade a partir de seleção fenotípica individual seguido pelo controle anual da produção dos clones selecionadas (VIDAL NETO et al., 2013). Estes materiais melhorados apresentam características favoráveis ao cultivo e qualidades superiores para o mercado.

2.7 MARCADORES MOLECULARES

Os marcadores moleculares são sequências de DNA, expressas ou não, que podem distinguir indivíduos geneticamente diferentes. Esta tecnologia tem grande aplicação no melhoramento genético de plantas por possibilitarem rapidez nas análises, não sofrerem influência do ambiente e permitir ampla cobertura do genoma vegetal (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1995).

O marcador molecular ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*) é baseado em

sequências de microssatélites e amplificam sequências que se encontram internamente a estas. Este marcador possui expressão dominante, além de elevado grau de polimorfismo e baixo custo (FALERO, 2007).

O marcador RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) identifica polimorfismos produzidos por rearranjos ou deleções no sítio de ligação entre o oligonucleotídeo *primer* e o DNA molde. Apresenta expressão dominante, baixo custo, cobertura elevada do genoma e simplicidade na análise (FERREIRA; GRATAPAGLIA, 1995; AGARWAL; SHRIVASTAVA; PADH, 2008).

3. HIPÓTESES

As cultivares de cajueiro escolhidos para este estudo apresentam base genética estreita devido ao processo de seleção executado, onde algumas plantas foram selecionadas em um mesmo local e outras derivadas de cruzamento entre genótipos aparentados. Dessa forma, espera-se com a análise de diversidade genética, que algumas plantas, em decorrência da seleção e do tipo de cruzamento executado, se apresentem próximas geneticamente.

Como integrante do grupo das nozes verdadeiras espera-se que a amêndoa de caju apresente baixa umidade, baixo teor de cinzas, sabor levemente ácido, alto conteúdo de proteínas e lipídeos. Sendo que estes valores podem variar dependendo da genética da espécie cultivada, o que faz com que as cultivares selecionadas possam apresentar valores diferentes.

4. JUSTIFICATIVA

O Brasil é um dos maiores produtores da amêndoa de caju. O estado do Rio Grande do Norte se apresenta como o segundo maior produtor do país, estando com uma participação 28,3% na produção regional, ficando atrás apenas do Ceará. Desse modo, desempenha grande papel socioeconômico nas regiões mais pobres do Nordeste, gerando um grande número de empregos, uma vez que a amêndoa é uma das mais comercializadas no mercado mundial de nozes comestíveis (CONAB, 2015).

A amêndoa apresenta-se como um alimento rico em proteínas, lipídeos, fósforo, potássio e uma quantidade considerável de carboidratos. Ademais, sua composição lipídica é caracterizada pela presença de ácidos graxos insaturados, principalmente o ácido oleico e linoleico, possuindo ação protetora contra doenças cardiovasculares. Desse modo, torna-se importante a determinação destes parâmetros para verificar a qualidade nutricional das amêndoas (FREITAS; NAVES, 2010).

A realização de análises físico-químicas em alimentos permite obter informações importantes acerca de sua composição nutricional (proteínas, lipídeos, carboidratos e minerais), tornando disponível o seu valor nutritivo, contribuindo para a elaboração de novos produtos. Características físico-químicas tais como umidade, pH e acidez também são de imprescindível importância para a conservação dos alimentos e na escolha de métodos de tratamento térmico utilizado pela indústria alimentícia (AQUINO et al., 2011).

A partir dos estudos físico-químicos e das pesquisas na área de diversidade genética é possível associar esses dois parâmetros e gerar relevantes informações para programas de melhoramento genético e, futuramente, obter novos materiais de qualidade superior para o mercado. Isso contribui diretamente para gerar maior lucratividade, tanto para o produtor, quanto para os consumidores, oferecendo frutos mais atrativos e nutritivos.

5. OBJETIVOS DA PESQUISA

5.1 OBJETIVO GERAL

Determinar as características físico-químicas da amêndoa do caju (*Anacardium occidentale* L. var. *nanum*) e avaliar a diversidade genética de cajueiros provenientes do banco de germoplasma da Embrapa, localizado na cidade de Pacajus-CE.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Caracterizar as amêndoas dos genótipos de caju a partir de parâmetros físico-químicos;

Analisar a diversidade genética através da utilização de marcadores moleculares ISSR e RAPD;

Verificar a existência de correlação entre os dados obtidos a partir das análises físico-químicas e os dados moleculares;

6. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado nos laboratórios de Biotecnologia Vegetal (campus leste) e Bioquímica (campus oeste) da Universidade Federal Rural do Semi-Árido – Mossoró/RN.

6.1 COLETA DO MATERIAL

Os frutos de *Anacardium occidentale* L. var *nanum* foram coletados de 12 clones de cajueiro anão-precoces (CCP 06, CCP 09, CCP 76, CCP 1001, EMBRAPA 50, EMBRAPA 51, BRS 189, BRS 226, BRS 253, BRS 274, BRS 275, BRS 265) provenientes do Banco Ativo de germoplasma de cajueiro (BAG-caju) pertencente a Embrapa agroindústria tropical, localizado no município de Pacajus, litoral leste do estado do Ceará, a 55 Km de Fortaleza.

O município apresenta tipo climático Aw, conforme classificação de Köppen, com temperatura média anual de 26 °C. A área onde localiza-se o BAG-Caju é composta de três unidades pedogenéticas: a) Podzólico Vermelho-Amarelo Tb Eutrófico A fraco, textura arenosa média (PE); b) Podzólicos Vermelho-Amarelo Tb distrófico A fraco, textura arenosa média (PV); e 3) Areias Quartzosas Distróficas A fraco (AQd). O teor de matéria orgânica é baixo, assim também como as quantidades de fósforo, potássio e alumínio. O pH está entre 5,0 e 6,0 (moderadamente ácido) e são considerados de baixa fertilidade natural (BARROS, 1991).

Para a análise físico-química foram selecionadas castanhas retiradas de pseudofrutos com maturação ultrapassada. Em seguida, foram cozidas à vapor por aproximadamente 30 minutos e retiradas para secarem a temperatura ambiente para posterior remoção manual da casca. A película foi removida através da utilização do cozimento das amêndoas com água em micro-ondas por dois minutos e em seguida deixadas para secar. Posteriormente, as amêndoas foram pulverizadas com o auxílio de almofariz e pistilo e em seguida procedeu-se a realização das análises físico-químicas com o granulado obtido.

Para a análise molecular coletaram-se folhas jovens dos 12 clones de cajueiro, sendo acondicionadas em sacos plásticos e enviadas pela Embrapa via Sedex. As amostras permaneceram armazenadas em freezer à -20 °C para posterior extração do DNA.

6.2 DETERMINAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS

O granulado obtido das amêndoas foi caracterizado físico-quimicamente a partir das análises de umidade, pH, acidez titulável, teor de cinzas, extrato etéreo (lipídeos) e proteínas. Todas as análises foram realizadas em triplicata e de acordo com as normas do Instituto Adolfo Lutz (2008).

6.2.1 Medida do pH

Para as análises do pH foi realizada a pesagem de 3 gramas da amostra e adicionado 30 mL de água destilada. A suspensão foi agitada até se obter um homogeneizado com aspecto uniforme. Em seguida, o pH das amostras foi determinado em aparelho potenciômetro previamente calibrado.

6.2.2 Determinação da Acidez

A solução obtida para a determinação do pH foi utilizada para medir a acidez. A mesma foi transferida para erlenmeyers de 250 mL, sendo então adicionado 3 gotas de fenolftaleína para posterior titulação com solução de hidróxido de sódio (NaOH) à 0,1 M.

$$\frac{V \times F \times 100}{P \times c} = \text{acidez em solução molar por cento v/m}$$

V = nº de mL da solução de NaOH 0,1 M gasto na titulação;

f = fator da solução de NaOH 0,1 M;

P = nº de g da amostra usado na titulação;

c = correção para a solução de NaOH 0,1 M, sendo igual à 10.

6.2.3 Umidade

Foi realizada a pesagem de 5 g de cada amostra em cadinho de porcelana, previamente tarado. Em seguida, as amostras foram colocadas na estufa durante 4

horas na temperatura de 105 °C e em seguida colocados em dessecador até a temperatura ambiente. Esta última operação foi repetida até se obter peso constante.

$$\frac{100 \times N}{P} = \text{umidade ou substâncias voláteis à 105 °C por cento m/m}$$

N = n° de gramas de umidade (perda de massa em g);

P = n° de gramas da amostra;

6.2.4 Cinzas

Pesa-se 2 g da amostra em cadinho de porcelana, previamente aquecido em mufla a 550 °C, resfriado em dessecador até a temperatura ambiente e pesado. A amostra seca é levada a mufla por cerca de seis horas. Em seguida, os cadinhos foram levados ao dessecador para resfriamento e posteriormente pesados.

$$\frac{100 \times N}{P} = \text{cinzas por cento m/m}$$

N = n° de g de cinzas;

P = n° de g da amostra;

6.2.5 Lipídeos

O extrato etéreo foi obtido com a utilização de Hexano P.A. por meio de um extrator tipo Soxhlet. Foi feita a pesagem de 1 g da amostra em cartucho de Soxhlet e em seguida, adicionado 125 mL de Hexano para iniciar a extração, com duração de 6 horas. Após a extração, o resíduo extraído foi colocado em estufa a 105 °C e depois em dessecador.

$$\frac{100 \times N}{P} = \text{cinzas por cento m/m}$$

N = n° de gramas de lipídeos;

P = n° de gramas da amostra;

6.2.6 Proteínas

A determinação da proteína bruta foi realizada de acordo com o Método de Kjeldahl clássico, com modificações. Pesou-se 0,5 g da amostra, que foi transferida para tubos de digestão. Em seguida, adicionou-se aproximadamente 200 mg da mistura catalítica (sulfato de potássio e sulfato de Cobre, na proporção de 9:1) e depois 5 mL de ácido sulfúrico concentrado. Esta suspensão foi colocada em bloco digestor (etapa de digestão), dentro de uma capela de exaustão, por 4 horas na temperatura de 350 °C. Feito isso, retirou-se os tubos e foi deixado esfriar dentro da capela.

Depois de esfriar, as paredes do tubo foram lavadas com água destilada e seguiu-se a etapa de destilação. Foi adicionado 20 mL de NaOH à 40% no tubo de inserção. Em um erlenmayer, adicionar 10 mL de ácido bórico à 4% e 2 gotas do indicador misto (verde de bromocresol e vermelho de metila). O erlenmayer foi adaptado ao destilador para receber a amônia liberada na reação química. Após a obtenção de um volume equivalente a 50 mL de destilado, procedeu-se com a etapa de titulação com ácido clorídrico (HCl) à 0,1 N.

$$\frac{V \times N \times F \times 0,014 \times 100}{P} = \text{proteínas por cento m/m}$$

V = diferença entre o nº de mL de ácido sulfúrico 0,05 M e o nº de NaOH 0,1 M gastos na titulação;

N = Normalidade de HCl;

F = fator de conversão (6,25);

0,014 = milequivalente – grama de nitrogênio.

P = nº de g da amostra;

6.2.7 Análise e Interpretação dos Dados

Os resultados das análises físico-químicas das amêndoas foram tratados estatisticamente através da Análise de Variância (ANOVA) e foi também aplicado o teste de Tukey a 5% de probabilidade, pelo Programa Past (HAMMER et al., 2001). Para tanto, no processo de análise da composição nutricional das amêndoas foi

considerado um delineamento inteiramente ao acaso, com três repetições (COSTA et al., 2009).

Ademais, com o intuito de verificar a diversidade genética entre os acessos com base nas características físico-químicas foi realizada uma análise de agrupamento com o auxílio do Programa Genes (CRUZ, 2008), utilizando como critério de agrupamento o método UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Average*). Para validar o agrupamento, ou seja, verificar a capacidade do dendograma em reproduzir a matriz de dissimilaridade foi calculado o Coeficiente de Correlação Cofenético (CCC).

6.3 ANÁLISES MOLECULARES COM O DNA DO CAJUEIRO

6.3.1 Isolamento do DNA

As extrações de DNA foram baseadas no método CTAB, descrito por Ferreira e Grattapaglia (1995). Aproximadamente 0,5 g de tecido fresco foi macerado em nitrogênio líquido, adicionando-se em seguida 800 µL de tampão de isolamento (CTAB 7% (p/v); Tris-HCl 100 mM, pH 8,0; EDTA 20 mM; β-mercaptoetanol 0,2% (v/v)) pré-aquecido à 60 °C. A suspensão assim obtida, foi incubada por 60 minutos à 60 °C, em banho-maria, invertendo-se os microtubos a cada dez minutos. Passado o período de incubação, as amostras foram retiradas do banho-maria e resfriadas a temperatura ambiente. Posteriormente, foi adicionado à cada amostra 400 µL de CIA (clorofórmio : álcool isoamílico) na proporção de 24:1. Os microtubos foram homogeneizados manualmente e centrifugados a 10.000 rpm por 10 minutos na temperatura de 10 °C.

Após realizada a centrifugação, a fase superior formada foi transferida para um novo microtubo e em seguida realizou-se uma segunda extração com CIA, adicionando-se 600 µL do solvente orgânico e centrifugando à 10.000 rpm por 10 minutos à 10 °C. Após isso, transferiu-se a fase aquosa para microtubos novos adicionando-se 2/3 do volume da solução aquosa de isopropanol frio (-20 °C). A solução foi misturada manualmente e incubada à -20 °C por 2 horas. Após isso, os tubos foram centrifugados à 10.000 rpm por 10 minutos à 10 °C. O pellet de DNA foi lavado com 1 mL de álcool etílico 75% e centrifugado à 10.000 rpm por 5 minutos à 10 °C. Em seguida, procedeu-se com uma outra lavagem em álcool etílico à 90% e posteriormente centrifugação à 10.000 rpm por 5 minutos à 10 °C.

Os tubos foram deixados na capela de exaustão para evaporação do álcool. O pellet foi ressuspensionado em 45 µL de água milli-Q autoclavada com a adição de 5 µL de RNase. Os mesmos foram incubados em banho-maria à 37 °C por 30 minutos. Após as extrações, a quantidade e qualidade do DNA foi verificada em gel de agarose 1% (p/v) corado com brometo de etídeo (10 mg/mL), onde em seguida foi realizada uma análise comparativa das amostras em gel de agarose para posterior diluição das mesmas à 10 ng/µL.

6.3.2 Análises com os marcadores ISSR

Para a análise com os marcadores ISSR foram realizados testes preliminares de amplificação com 23 *primers*, utilizando-se de 2 genótipos fenotipicamente contrastantes (EMBRAPA 51 e BRS 226). A partir dos resultados obtidos foram preparadas as reações de PCR, utilizando-se oito *primers* ISSR polimórficos. Os *primers* ISSR polimórficos usados estão descritos na Tabela 1.

As reações de amplificação compreenderam um volume final de 12 µL, sendo compostas por 1,2 µL de tampão de reação 10X (20 mM Tris-HCl (pH 8,0) 100 mM de cloreto de potássio (KCl) e 3,2 mM de cloreto de magnésio (MgCl₂)), 1,0 µL de desoxirribonucleotídeos (dNTPs) (0,25 mM), 2 µL de DNA (10 ng/µL), 2 µL de cada *primer* (0,2 µM), 0,2 µL de Taq DNA Polimerase (5U/µL) e água milli-Q (5,6 µL) para completar o volume de reação.

A programação utilizada nos termocicladores para a PCR (*Polymerase Chain Reaction*) foi de 4 minutos a 94 °C para desnaturação inicial, seguindo-se de 35 ciclos de desnaturação (94 °C por 40 segundos), anelamento de 40 °C, 45 °C ou 50 °C, dependendo do *primer*, 1 minuto a 72 °C (extensão) e extensão final a 72 °C por 2 minutos. Os produtos da amplificação (bandas) foram visualizados através da eletroforese horizontal em gel de agarose a 2,5% (p/v), corado com brometo de etídeo (10 mg/mL) e submetidos a 115 Volts por aproximadamente 3 horas e 40 minutos. Posteriormente os géis foram visualizados sob luz UV em aparelho transiluminador e fotografadas em câmera digital.

Tabela 1. *Primers* ISSR polimórficos com suas respectivas sequências de bases e temperaturas de anelamento (T_m). Mossoró - RN, 2016.

Nome do <i>Primer</i>	Sequência do <i>Primer</i>	T_m (°C)
DiGA3'C	GAGAGAGAGAGAGAGAC	45
DiGA3'T	GAGAGAGAGAGAGAGAT	40
TriAAG 3'RC	AAGAAGAAGAAGAAGRC	40
TriAGG 3'RC	AGGAGGAGGAGGAGGRC	45
TriTCA 3'RC	TCATCATCATCATCARC	40
TriTCT 3'RC	TCTTCTTCTTCTTCTRC	40
TriCAT 3'RC	CATCATCATCATCATRC	50
TriCGA 3'RC	CGACGACGACGACGARC	45

Fonte: Adaptado de Santana et al. (2011), com modificações.

6.3.3. Análises com os marcadores RAPD

Para a análise com os marcadores RAPD foram realizados testes preliminares de amplificação com 78 *primers*, fornecidos pela *Operon Technologies*, utilizando-se de 2 genótipos fenotipicamente contrastantes (EMBRAPA 51 e BRS 226). A partir dos resultados obtidos foram preparadas as reações de PCR, utilizando-se dos *primers* RAPD polimórficos. Os *Primers* polimórficos usados estão descritos na Tabela 2.

Os ensaios de PCR foram feitos para um volume final de 12 μ L, contendo 1,2 μ L de tampão de reação 10X (20 mM Tris-HCl (pH 8,0) 100 mM de KCl e 3,2 mM $MgCl_2$), 1,0 μ L de dNTPs (0,25 mM), 2 μ L de DNA (10 ng/ μ L), 2 μ L de cada *primer* (0,33 μ M), 0,2 μ L de Taq DNA Polimerase (5 U/ μ L) e água milli-Q (5,6 μ L).

A programação utilizada nos termocicladores para a PCR foi de 5 minutos a 94 °C para desnaturação inicial, seguindo-se de 40 ciclos de desnaturação (94 °C por 30 segundos), anelamento de 40 °C, 1 minuto a 72 °C (extensão) e extensão final a 72 °C por 7 minutos. Os produtos da amplificação (bandas) foram visualizados através da eletroforese horizontal em gel de agarose a 1,4%, corado com brometo de etídeo (10 mg/mL) e submetidos a 110 Volts por aproximadamente 2 horas e 30 minutos. Posteriormente os géis foram visualizados sob luz UV em aparelho transiluminador e fotografadas em câmera digital.

Tabela 2 - *Primers* RAPD polimórficos com suas respectivas temperaturas de anelamento (T_m). Mossoró - RN, 2016.

Nome do <i>Primer</i> RAPD	T_m (°C)
OPA 01	40 °C
OPA 02	40 °C
OPA 07	40 °C
OPA 08	40 °C
OPA 10	40 °C
OPA 12	40 °C
OPA 14	40 °C
OPA 19	40 °C
OPAA 03	40 °C
OPAA 07	40 °C
OPD 05	40 °C
OPD 09	40 °C
OPH 01	40 °C
OPH 07	40 °C
OPH 10	40 °C

Fonte: Dados da Pesquisa.

6.3.4 Análise Estatística

Através da análise do padrão de bandas produzido por cada *primer*, foi realizada a montagem de matrizes binárias, onde foi conferido o valor 1 para a presença e 0 para a ausência de bandas polimórficas. A partir dos dados foi construída uma matriz de similaridade genética, utilizando-se o Coeficiente de Jaccard e a análise de agrupamento através do método hierárquico UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Average*), baseado na média das distâncias (FALERO, 2007). A montagem do dendograma dos dados provenientes das análises moleculares foi realizada através do Programa Statistica.

Para comparar as dissimilaridades genéticas entre os acessos de cajueiro obtidas com base em marcadores moleculares RAPD e ISSR e a partir das características físico-químicas, foram calculados coeficientes de correlação de Pearson entre as dissimilaridades genéticas, com auxílio do Programa Genes (CRUZ, 2008).

7.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS AMÊNDOAS DE CAJU

7.1.2 pH e Acidez Titulável

Os resultados obtidos para a determinação do pH e acidez titulável estão expressos nas Figuras 1 e 2, respectivamente.

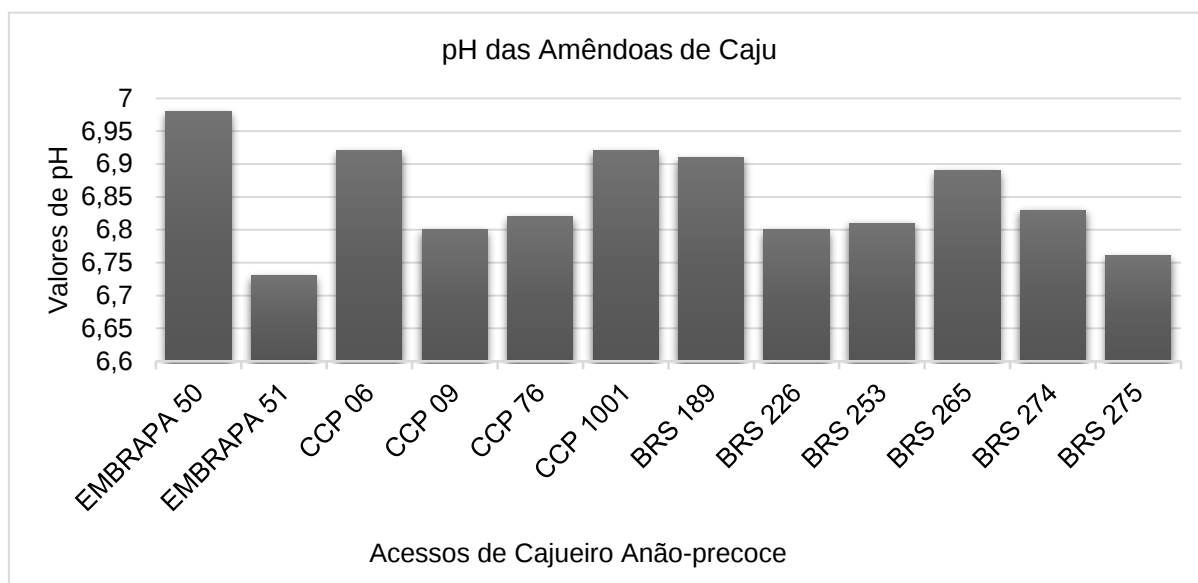


Figura 1 - pH das amêndoas dos 12 acessos de cajueiro anão-precoce.

Conforme mostrado na Figura 1, as amêndoas dos cajueiros anão-precoce mostraram valores de pH próximos a neutralidade, com uma média de 6,8. Esses valores estão em proximidade com os dados na literatura encontrados para a amêndoa cozida (6,14) e para a amêndoa crua (6,20) por Melo et al. (1998). Resultados similares também foram encontrados por Lima (2003) com uma variação de 6,13 a 6,64 e por Muniz (2004), com valores de 6,17 a 6,69, ambos em amêndoas cruas.

O desvio padrão para os valores de pH foi de 0,07, mostrando que houve pouca variação das amostras em torno da média. Esses valores quando submetidos a análise de variância, não se mostraram significativos a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. O acesso EMBRAPA 51 teve o menor pH, sendo de 6,73 e o acesso EMBRAPA 50 apresentou o maior valor entre as amostras, com 6,98.

O conhecimento do pH é de suma importância para a indústria de alimentos devido a ser um dos fatores que determinam o desenvolvimento de micro-organismos que, possuem valores de pH ótimos para o crescimento em torno de 7,0, como bactérias. Dessa forma, quanto menor o pH de um alimento menor será a chance de proliferação bacteriana (LIMA, 2003).

Apesar de baixos valores de pH serem preferenciais para armazenagem de alimentos, este não é desejável em castanhas por causar a rejeição por parte dos consumidores devido ao sabor desagradável. Por isso, valores próximos a neutralidade conferem características organolépticas mais apreciáveis para o público consumidor.

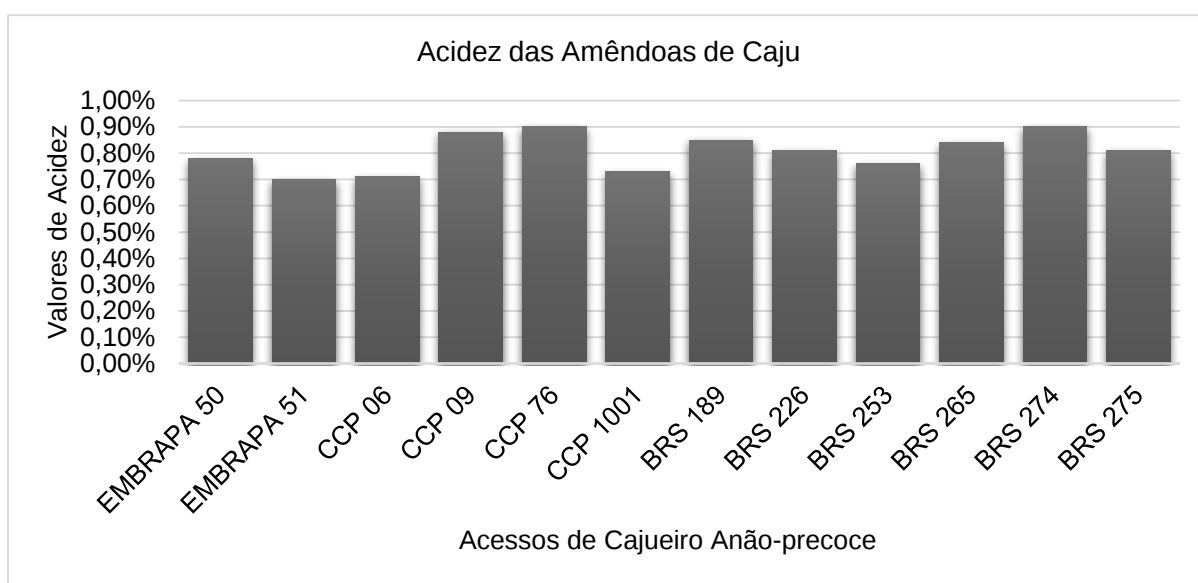


Figura 2 – Acidez das amêndoas dos 12 acessos de cajueiro anão-precoce.

Na determinação de acidez as amostras apresentaram valores homogêneos, com uma média de 0,81%, com valores variando de 0,70% a 0,90%, sendo esses valores correspondentes aos acessos EMBRAPA 51 e BRS 274, respectivamente. O desvio padrão encontrado foi muito baixo, igual a 0,0007, sendo os valores não significativos a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Costa (2009), trabalhando com amêndoas de caju, encontrou valores com média de 0,56% para a amêndoa crua. Melo et al. (1998) observaram valores na média de 0,96%, também para amêndoa crua, um valor mais próximo do encontrado neste trabalho. Além disso, observa-se que as castanhas dos acessos de cajueiro anão-

precoce do presente estudo não são tão indicadas para serem submetidas a processos de fritura.

Na análise de pH determina-se a concentração de íons de hidrogênio (H_3O^+) livres em uma solução. Já a acidez é uma medida dos ácidos orgânicos presentes na solução, os quais podem ser ácidos fracos (não dissociam completamente em água) ou ácidos fortes (dissociam-se completamente em água).

O fato de algumas plantas terem apresentado valores que não estão em concordância com a relação estabelecida entre pH e acidez (quanto menor o pH maior a acidez) como os acessos EMBRAPA 50, CCP 1001, BRS 189 e BRS 265, pode ser esclarecido por essas cultivares apresentarem uma composição de ácidos graxos variável, onde os mesmos podem apresentar variação na sua constante de dissociação e por conseguinte não dissociarem completamente em água. Isso pode acarretar em um aumento do conteúdo de ácidos graxos com baixa constante de dissociação (K_a), resultando em baixa concentração de H_3O^+ livres. Geralmente os ácidos presentes nos vegetais são ácidos fracos.

A acidez em alimentos é um fator muito importante para se determinar o seu estado de conservação, pois reações de oxidação, hidrólise ou fermentação tendem a afetar a concentração de íons de H_3O^+ . Ademais, interfere diretamente no sabor, cor, odor e na manutenção da qualidade dos produtos alimentícios.

7.1.3 Umidade

Os valores obtidos na determinação da umidade dos 12 acessos de cajueiro estão mostrados na Figura 3.

Em relação a este parâmetro avaliado, observou-se uma média de 6,69%, com um desvio padrão de 0,021, sendo este valor considerado elevado. O menor valor foi observado no acesso CCP 1001, com 3,36% e o maior valor para o acesso BRS 274, com 7,99%. O acesso BRS 253 não foi considerado relevante no estudo, pois quando na realização do experimento, este ainda se apresentava com alta umidade, resultante do processo de retirada da película, não sendo um valor confiável.

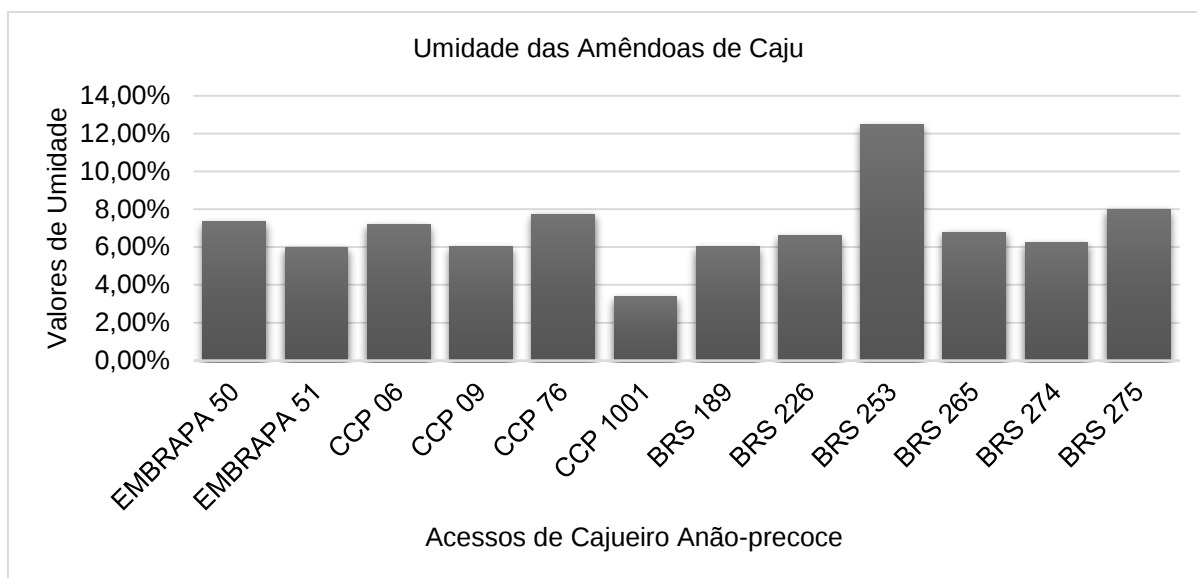


Figura 3 – Teor de umidade das amêndoas dos 12 acessos de cajueiro anão-precoce.

Os valores de umidade entre as amostras diferiram entre si a 5% de probabilidade, segundo o teste de Tukey. Esse resultado pode ser esclarecido pela dificuldade no processo de retirada da película, a qual se encontra fortemente aderida a amêndoa. Dessa forma, durante esse processo as amêndoas foram umidificadas para facilitar a retirada da película, sendo que devido ao tamanho variado das amêndoas, algumas retinham mais umidade do que outras e evaporavam essa umidade de forma mais lenta.

Ademais, as castanhas foram coletadas em período considerado chuvoso na região onde se localiza o BAG-Caju, sendo este período correspondente aos meses de janeiro a junho, caracterizado por pluviosidade elevada e extremamente irregular (BARROS, 2008). Assim sendo, este fator deve ser considerado relevante em análises de determinação da umidade em frutos.

A maior parte das amostras apresentaram valores de umidade que divergiram dos valores encontrados na literatura. Lima (2003) e Muniz (2004), analisando amêndoas de caju cruas, detectaram valores entre 3,00% a 5,50% e 2,39% a 4,01%, respectivamente. Todavia, as amêndoas usadas no trabalho foram submetidas a cozimento e depois secas em temperatura ambiente, o que justifica os valores mais expressivos de umidade.

Amêndoas com umidade elevada tendem a se tornar mais maleáveis com aspecto não apreciável pelo consumidor. Já baixos teores de umidade estão

relacionados a facilidade de conservação, por não favorecer o desenvolvimento de micro-organismos.

7.1.4 Cinzas

Os resultados obtidos na determinação do teor de cinzas das amêndoas dos 12 acessos de cajueiro estão mostrados na Figura 4.

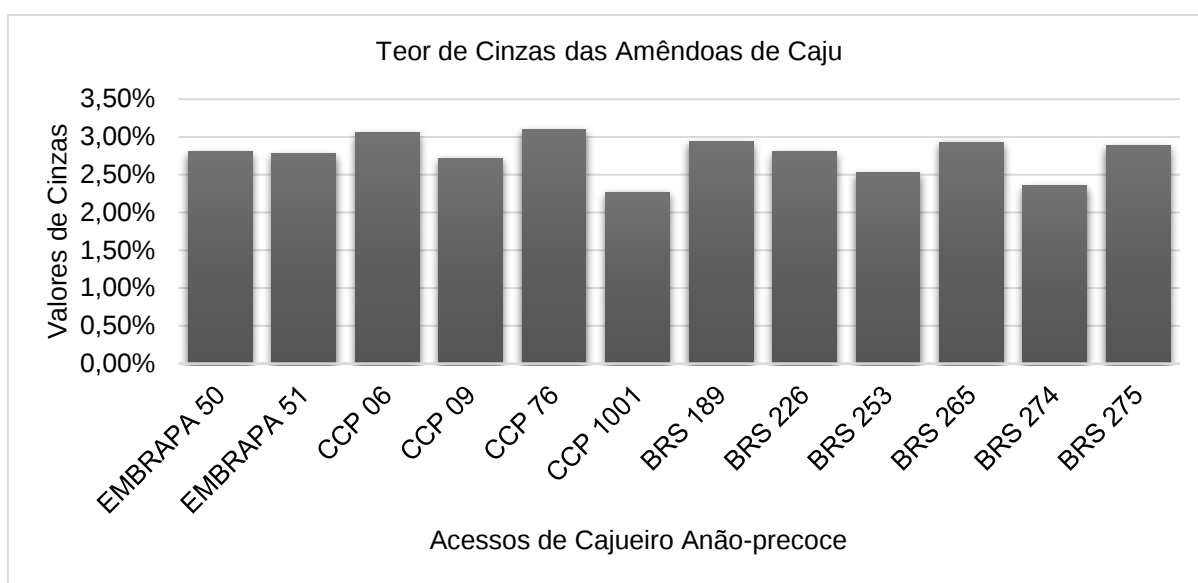


Figura 4 – Teor de cinzas das amêndoas dos 12 acessos de cajueiro anão-precoce.

Quanto ao teor de cinzas, observa-se uma média de 2,76%, com um desvio padrão de 0,002%. O valor mais expressivo foi encontrado no acesso CCP 76, com 3,09% e o menor para o acesso de CCP 1001, com 2,27%. Melo et al. (1998) encontraram um teor médio de cinzas de 2,40 para a amêndoa crua e Maia et al. (1971) observaram uma média de 2,43, próximos ao encontrado no estudo. As amostras de amêndoa apresentaram valores homogêneos quanto a esta característica, não apresentando significância a 5% pelo teste de Tukey.

A análise de cinzas é considerada como representativa da quantidade total de minerais presentes em um alimento. Os minerais são importantes para o funcionamento celular, em decorrência de sua atuação como cofatores nas reações catalisadas por enzimas (FREITAS; NAVES 2010).

7.1.5 Lipídeos

Os valores do teor de lipídeos para as amêndoas de caju dos 12 acessos estão representados na Figura 5.

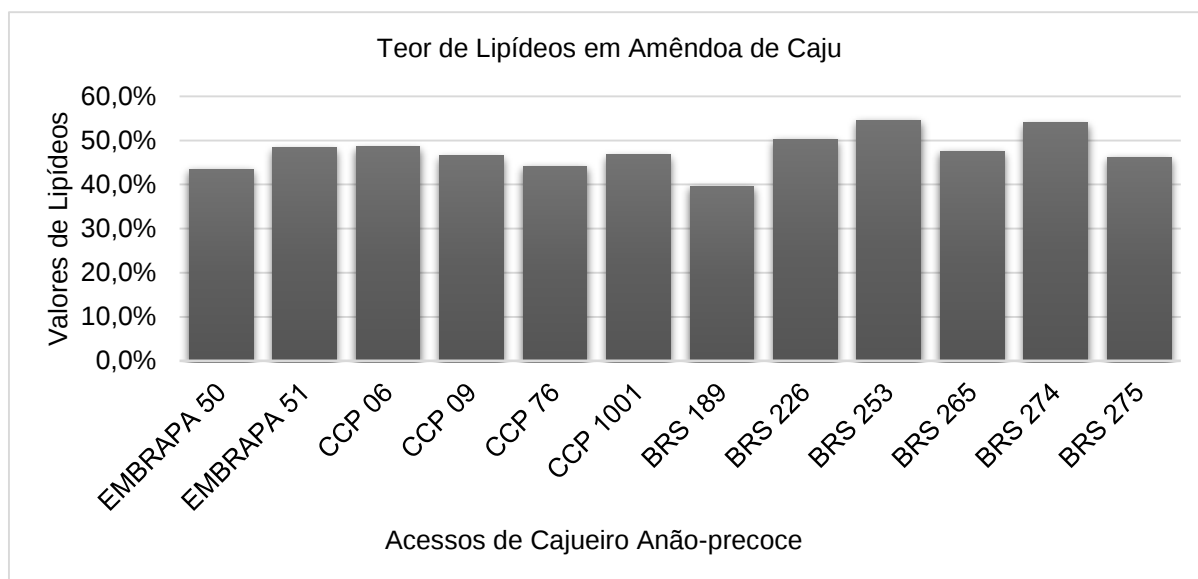


Figura 5 - Teor de lipídeos das amêndoas dos 12 acessos de cajueiro anão-precoce.

Em relação ao teor de lipídeos presente nas amêndoas, observou-se uma média de 47,25%, com um desvio padrão de 0,041. O menor valor foi observado no acesso BRS 189, com 39,7% e o maior valor para o acesso BRS 253, com 54,6%, sendo que não foi encontrado significância entre os valores à 5% de probabilidade. Melo et al. (1998) encontraram um valor médio de 46,28% e Costa et al. (2009) obtiveram uma média de 45,43 g/100 mL em castanhas procedentes de uma indústria de beneficiamento no estado do Ceará.

As amêndoas de caju são excelentes fontes de ácidos graxos oleico e linoleico numa proporção de 60% e 21%, respectivamente (LIMA, 2013). O ácido linoleico, principalmente, possui papel protetor contra doenças cardiovasculares, quanto consumido regularmente, sendo a amêndoa do caju uma escolha interessante para pessoas com doenças cardíacas e também aquelas com risco de desenvolvimento dessas doenças.

7.1.6 Proteínas

Os valores da análise da determinação de proteínas para as amêndoas de caju dos 12 acessos estão representados na Figura 6.

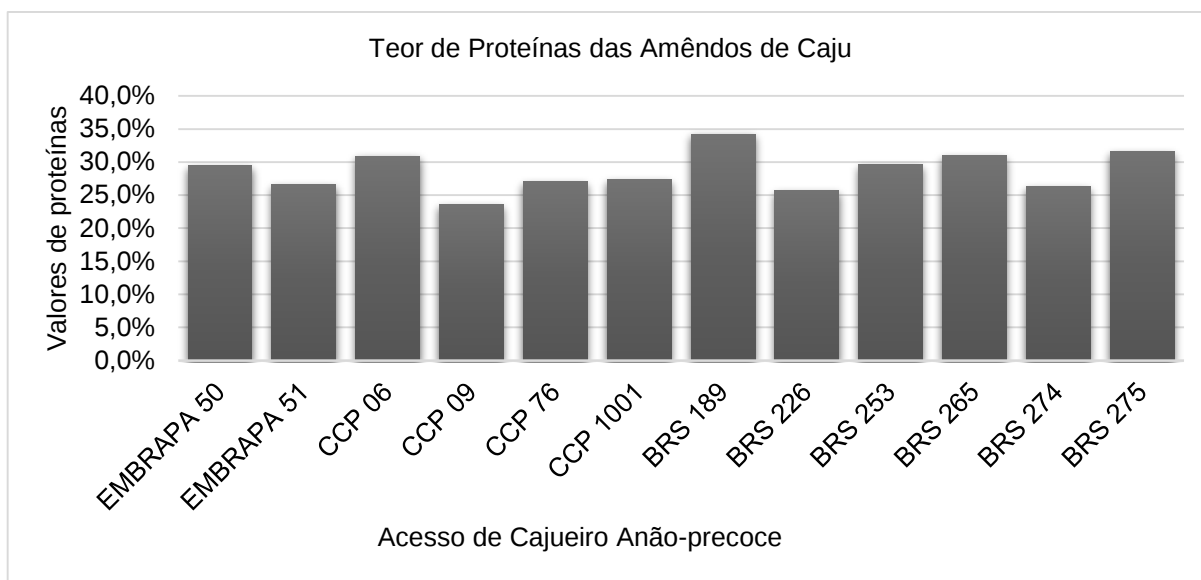


Figura 6 - Teor de proteínas das amêndoas dos 12 acessos de cajueiro anão-precoces.

Em relação ao teor de proteínas encontrado nas amêndoas de caju, obteve-se uma média de 28,6%, com um valor máximo para o acesso BRS 189 (34,2%) e um valor mínimo para o acesso CCP 09 (23,6%). O desvio padrão foi de 0,030. Nessa análise foi encontrada significância estatística a 5% pelo teste de Tukey.

Melo et al. (1998) encontraram uma média inferior ao resultado observado no estudo, sendo esta de 22,11% para a amêndoa crua, valor próximo encontrado por Cavalcanti (1983), de 22,30%.

A variação da quantidade proteica depende principalmente da interação genótipo-ambiente. Muitas vezes a depender do ambiente, as variações se tornam frequentemente vinculadas a este fator e não ao genótipo da planta. Condições tais como temperatura, precipitação pluvial e a radiação solar são os fatores que mais interferem neste parâmetro (FRANCESCHI et al., 2009).

Alguns acessos, tais como CCP 09, EMBRAPA 51 e BRS 226, apresentaram baixos teores de proteínas devido ao fato que estas plantas são recomendadas para cultivo em regime de sequeiro, onde a pluviosidade é um dos grandes fatores que interferem no conteúdo proteico de alimentos vegetais. Todavia, o acesso BRS 189, que apresentou o maior conteúdo proteico, é indicado para cultivos irrigados (VIDAL NETO et al., 2013).

7.2 ANÁLISE DA DIVERSIDADE GENÉTICA COM OS MARCADORES MOLECULARES RAPD E ISSR

A partir das análises moleculares realizadas com os marcadores ISSR e RAPD foi possível gerar um total de 163 bandas de DNA. Desse total, 159 bandas apresentaram padrão polimórfico. Sendo assim, a análise conjunta das duas técnicas mostrou 97,5% de polimorfismo. A média de bandas por *primer* foi de 8,13 bandas polimórficas para o marcador RAPD e 5,1 bandas polimórficas para o marcador ISSR. Segundo Colombo et al. (1998) cerca de 50 a 200 fragmentos polimórficos gerados numa análise deste tipo, são suficientes para estimar relações genéticas dentro e entre espécies.

Na análise realizada com o marcador ISSR, o *primer* mais informativo foi o ISSR 04, amplificando um total de oito bandas. Já na análise executada com o marcador RAPD, o *primer* OPA 02 foi o mais informativo produzindo quatorze bandas. A Figura 6 e a Figura 07, mostram o padrão de amplificação do *primer* ISSR 04 e do *primer* RAPD OPA 02, respectivamente.

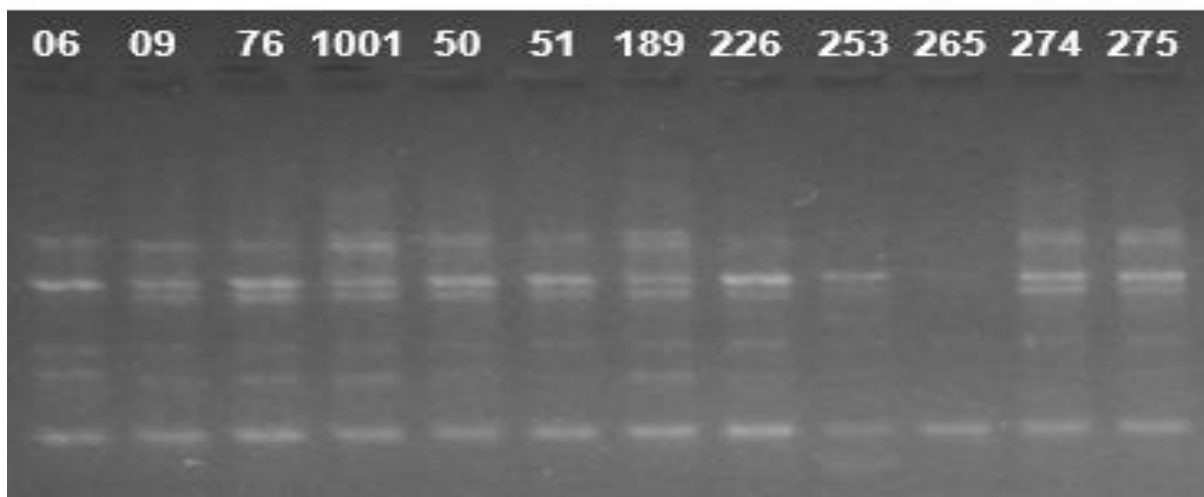


Figura 7 - Padrão de amplificação de 12 acessos de cajueiro anão-precoce utilizando o *primer* ISSR 04. Os números de 06 a 275 correspondem aos acessos de cajueiro anão-precoce estudados.

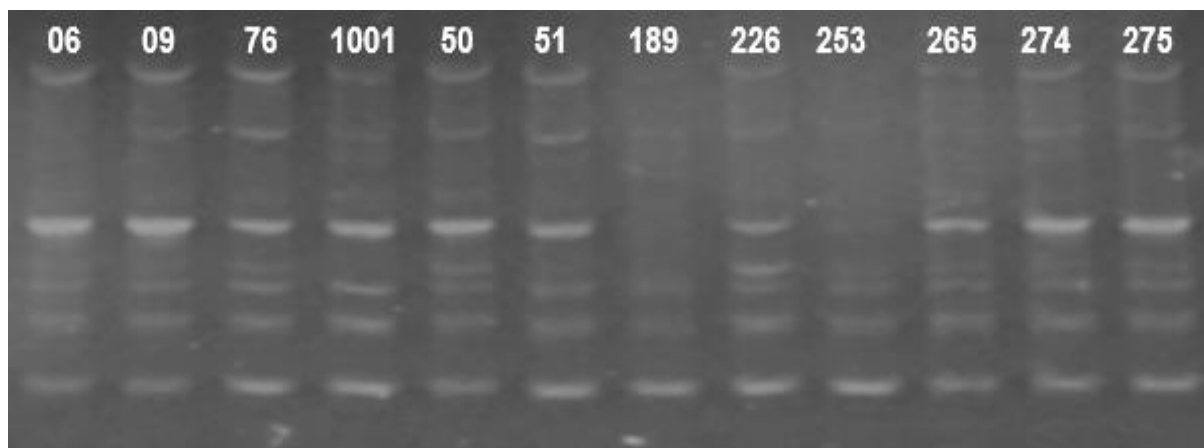


Figura 8 - Padrão de amplificação de 12 acessos de cajueiro anão-precoce utilizando o *primer* RAPD OPA 02. Os números de 06 a 275 correspondem aos acessos de cajueiro anão-precoce estudados.

Em estudos realizados por Shobha, Thimmappaiah e Jose (2013), avaliando a diversidade genética em 146 acessos de Cajueiro usando marcadores RAPD e ISSR, mostraram um total de 107 marcadores, com 96 bandas polimórficas e 89,8% de polimorfismo. Além disso, a pesquisa resultante da associação das duas técnicas demonstrou que o uso em conjunto das duas foi eficiente para avaliar a diversidade genética em germoplasma de cajueiro. Essa observação também foi constatada no presente trabalho.

Outros trabalhos também demonstraram boa eficiência na utilização das técnicas combinadas (ARCHAK et al., 2003a, 2003b; THIMMAPPAIAH et al., 2009). Além disso, o uso de um número maior de *primers* com sequências diferentes eleva a cobertura do genoma das plantas por permitir acessar diferentes regiões genômicas. Dessa forma, é essencial o uso de marcadores que gerem o maior número de bandas possíveis em análises de diversidade genética.

O dendograma de similaridade genética dos 12 acessos de cajueiro anão-precoce está representado na Figura 9.

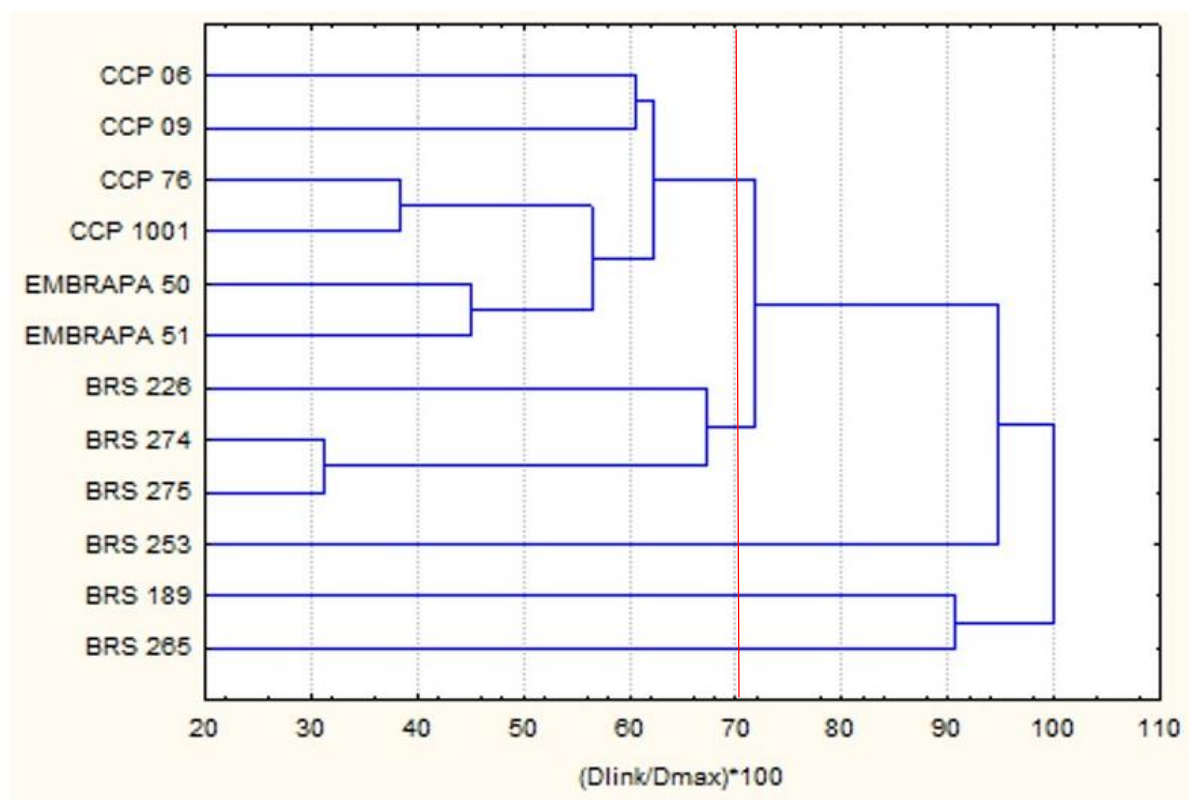


Figura 9 - Dendrograma resultante da análise de agrupamento de 12 acessos de cajueiro anão-precoce, obtido pelo método UPGMA, por meio do complemento do índice de similaridade de Jaccard obtido a partir dos marcadores RAPD e ISSR.

As similaridades genéticas entre os 12 acessos de Cajueiro, variaram de 0,20 a 0,871. Verificou-se que o maior grau de similaridade deu-se entre os genótipos BRS 274 e BRS 275 (0,20), enquanto os mais distantes (máxima dissimilaridade) foram entre CCP 1001 e BRS 275 (0,871). A partir de uma análise generalizada do dendrograma obtido, podemos perceber que os acessos de Cajueiro que apresentam os mesmos códigos iniciais estão situados próximos entre si. Considerando um ponto de corte de similaridade genética de 70%, observamos a presença de cinco subgrupos.

O **subgrupo I** é constituído pelos acessos CCP 06, CCP 09, CCP 76, CCP 1001, EMBRAPA 50 e EMBRAPA 51. Este resultado é explicado pelo fato de que as plantas CCP 09, CCP 76 e CCP 1001 terem sido obtidas a partir de seleção fenotípica individual do lote CCP 06. O genótipo EMBRAPA 50 foi gerado a partir do cruzamento entre o CCP 09 e CCP 76, sendo que o ramo do dendrograma que liga ambos é curto, mostrando proximidade genética entre elas. O acesso EMBRAPA 51, originou-se dentro de uma progênie policruzada do genótipo CCP 76, seguida de seleção clonal,

portanto estas últimos genótipos estão próximos do grupo onde está inserido o genótipo CCP76 (VIDAL NETO et al., 2013).

O **subgrupo II** foi formado pelos acessos BRS 226, BRS 274 e BRS 275. Todas os acessos deste grupo possuem origem diferente dos anteriores. O genótipo BRS 226 foi resultante de seleção fenotípica individual da planta matriz de Cajueiro anão-precoce MAP-42 (Fazenda CAPISA – Piauí) (PAIVA; BARROS, 2004). Já o acesso BRS 274 originou-se de uma seleção fenotípica individual de cajueiro Comum em população segregante (PAIVA, 2007a). O acesso BRS 275 foi obtido também pelo mesmo método de seleção dentro de uma progênie de polinização cruzada, oriunda de cruzamento de clone anão-precoce (CCP 1001) e uma planta matriz de cajueiro Comum (CP 12) (PAIVA, 2007b). Os acessos BRS 274 e BRS 275 possuem maior parentesco no dendograma em decorrência de ambos terem um genitor de cajueiro gigante.

O **subgrupo III** foi composto apenas por uma único acesso de cajueiro: BRS 253. A explicação para o isolamento desta planta em um único grupo, diferente das demais, reside na forma de obtenção da mesma. Este genótipo resultou de uma seleção fenotípica individual da planta matriz de Cajueiro anão-precoce P96D, oriunda de uma progênie policruzada (PAIVA, 2004).

O **subgrupo IV** também foi formado com um único acesso, o BRS 189. Para a obtenção desta planta foi realizado a seleção dentro de progênies oriundas do cruzamento entre os genótipos CCP 1001 e CCP 76. Observa-se que esta planta se apresentaram distante em relação a seus genitores. Ressalta-se que devido a aleatoriedade dos marcadores utilizados no estudo, regiões comuns entre os acessos em questão não puderam ter sido cobertas pela análise genética, o que explica a forma como essas plantas estão agrupadas (VIDAL NETO et al., 2013).

O **subgrupo V** foi composto pelo acesso BRS 265, oriundo de seleção fenotípica individual dentro de progênies de polinização livre do acesso da variedade anão precoce CCP 76. Para este resultado, presume-se que as sequências de DNA comuns entre os acessos CCP 76 e BRS 265 não tenham sido identificadas pelos marcadores (VIDAL NETO et al., 2013).

O estudo de diversidade genética com os 12 acessos mostrou que existe uma baixa variabilidade genética entre alguns genótipos, como entre as plantas BRS 274 e BRS 275. No entanto, há uma alta variabilidade entre outras plantas como CCP 1001 e BRS 275. As plantas com código BRS se apresentaram bem distantes em

relação as demais no dendograma, sendo que algumas plantas formaram grupos com um genótipo cada.

De acordo com Perssoni (2007) a maior variação genética em plantas de cajueiro está presente dentro das populações do gênero *Anacardium*, enquanto apenas uma pequena parte é resultante da diferença entre populações. Essa observação também é confirmada pelo trabalho de Carvalho (2011), que mostrou que 93,36% da variância molecular de cajuzinho-do-cerrado está presente dentro da população, sendo que apenas 6,64% se encontra em entre populações.

Os acessos de cajueiro estudados, embora sejam provenientes de um programa de melhoramento genético, e sejam em sua maioria resultado do cruzamento entre as próprias plantas contidas na amostra, elas ainda possuem uma elevada capacidade de recombinação. Ou seja, apesar das combinações entre as plantas, suas progênes ainda conservam uma certa heterogeneidade em relação aos pais.

Em decorrência do número reduzido de acessos avaliados, não há como inferir se a base atual existente no BAG-caju da Embrapa Agroindústria Tropical se encontra com elevado nível de diversidade genética, no entanto a observação da existência de variabilidade nessa amostra, à qual é composta pelas principais cultivares lançadas no mercado, demonstra a disponibilidade que há nesse grupo para possíveis combinações híbridas visando o lançamento de novos clones.

7.3 ANÁLISE DA DIVERSIDADE GENÉTICA COM BASE NOS CARACTERES FÍSICO-QUÍMICOS

O dendograma gerado a partir das dissimilaridades genéticas entre os 12 acessos de cajueiro anão-precoce está mostrado na Figura 10.

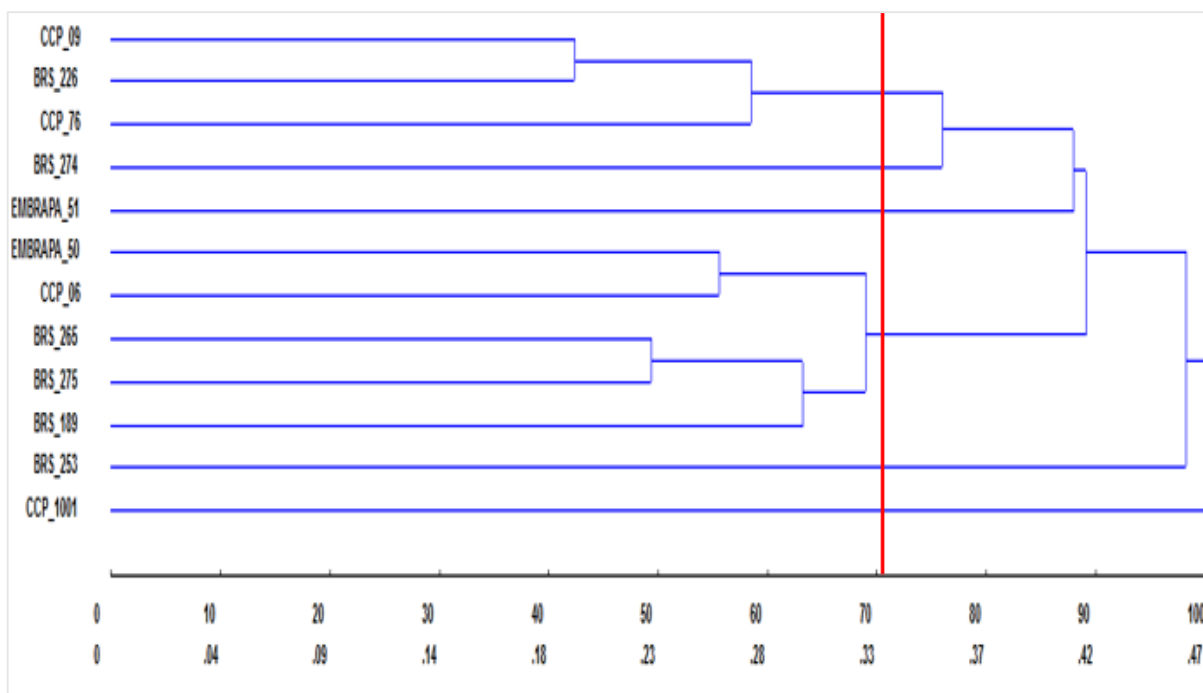


Figura 10 - Dendograma resultante da análise de agrupamento de 12 acessos de cajueiro anão-precoce, obtido pelo método UPGMA, a partir das dissimilaridades genéticas com base nas características físico-químicas.

As dissimilaridades genéticas entre os genótipos de Cajueiro variaram de 0,620 a 0,200, sendo os acessos BRS 189 e BRS 253 os mais distantes e os acessos CCP 09 e BRS 226 os mais próximos, respectivamente. Considerando um ponto de corte de similaridade genética de 70%, observamos a presença de seis subgrupos.

O **subgrupo I** é formado pelos acessos CCP 09, BRS 226 e CCP 76. O **subgrupo II** é constituído apenas pelo acesso BRS 274. O **subgrupo III** é formado pelo genótipo EMBRAPA 51. O **subgrupo IV** é constituído pelos acessos EMBRAPA 50, CCP 06, BRS 265, BRS 275 e BRS 189. O **subgrupo V** é formado pelo acesso BRS 253 e o **subgrupo VII** é constituído pelo genótipo CCP 1001.

Considerando o coeficiente de correlação (CCC) obtido entre a matriz de distância euclidiana e a matriz de distância cofenética, obtida a partir do dendograma, foi considerado de média magnitude e significativo, com valor de 0,63, evidenciando, consistência nos agrupamentos.

É possível observar que houve uma elevada variabilidade genética entre os acessos considerando o parâmetro físico-químico estudado. Como uma planta alógama, o cajueiro – principalmente o cajueiro do Brasil – possui grande variabilidade de caracteres de interesse agroindustrial, diferente de cajueiros provenientes de países como Índia, onde a introdução da espécie foi feita mais recentemente (CAVALCANTI; VIDAL NETO; BARROS, 2013).

Os clones de cajueiro anão-precoce lançados no mercado pela Embrapa geralmente são selecionados quanto à caracteres como altura da planta, diâmetro da copa, peso da castanha e da amêndoa, sendo que seleções referentes a parâmetros físico-químicos da amêndoa, com intuito de produzir clones com estas características de melhor aceite no mercado, ainda não foram estudados, sendo escassos os trabalhos na literatura relacionados a este tema.

Em um trabalho com germoplasma de castanheira-do-gurguéia (*Dipteryx lacunifera* DUCKE), Ribeiro, Souza e Lopes (2012), encontraram uma elevada diversidade genética avaliando parâmetros físico-químicos (gordura, proteína bruta, fibra bruta, cinzas, carboidratos totais, energia e minerais), sendo que os genótipos apresentaram variabilidade para a maioria das características analisadas. Chipojola (2009) analisando uma amostra de 45 acessos de *A. occidentale* L. a partir de características quantitativas, encontrou elevada variabilidade entre os acessos.

Em estudos de variabilidade genética com base em dados físico-químicos, possibilita a análise de poucos locos de uma vez, o que pode ocasionar em uma análise subestimada da variabilidade. Além do mais, é necessário um número elevado de parâmetros avaliados para se obter uma cobertura mais ampla do genoma (FERREIRA; GRATAPAGLIA, 1995).

A partir de informações descritas na literatura (VIDAL NETO et al., 2013; PAIVA, 2004; PAIVA, 2007a, 2007b) em relação a origem dos acessos estudados, formas de obtenção e seus respectivos genitores, observa-se que não há uma relação de concordância entre os dados. Além disso, não houve conservação dos subgrupos formados com os marcadores RAPD e ISSR na análise gerada com os caracteres físico-químicos.

Ademais, apesar da divergência nos agrupamentos gerados com base nos marcadores moleculares e nos caracteres físico-químicos, algumas considerações devem ser feitas. Através da observação dos valores gerados na caracterização físico-

química e na distribuição dos acessos no dendograma, algumas relações foram identificadas.

Os acessos mais distantes (BRS 189 e BRS 253) apresentaram os maiores valores de proteínas e lipídeos, com 34,2% e 54,6, respectivamente. No dendograma gerado com base na marcadores, esses acessos também se mostraram distantes. Essas plantas podem ser alvo de futuras combinações híbridas para se gerar amêndoas mais ricas em proteínas e lipídeos. Levando-se em consideração a proporção elevada de ácidos oleico e linoleico nas amêndoas, elas seriam uma ótima fonte de alimentação para pessoas com doenças cardiovasculares, pois esses ácidos graxos causam redução do risco de desenvolvimento dessas doenças.

Os acesso CCP 1001 apresentou a menor umidade (3,36%), pH próximo a neutralidade (6,92) e também um valor de acidez baixo (0,73%), os quais são parâmetros importantes para a indústria alimentícia, devido a facilidade de conservação e a um melhor sabor. Além disso, as amêndoas provenientes desses clones podem ser consumidas torradas sem no entanto, causar rejeição por parte do consumidor, já que elas apresentam uma acidez baixa. Esse acesso também se apresentou distante nos dois dendograma gerados em relação aos acessos BRS 189 e BRS 253, indicando que ambos possuem características desejáveis para o mercado e são distantes geneticamente. Ambos podem ser explorados para futuros cruzamentos em programas de melhoramento genético.

Todavia, o acesso BRS 189 é recomendado especialmente para o mercado de fruto de mesa, devido as características físico-químicas dos pedúnculos, apresentando um teor de sólidos solúveis totais ($^{\circ}$ Brix superior a 13) superior a todos os outros clones do mercado (VIDAL NETO et al., 2013).

Além do mais, cabe destacar que segundo Vidal Neto et al. (2013) o clone CCP 1001 é recomendado para o plantio em sequeiro ou irrigado, para o mercado de caju de mesa ou de amêndoa, sendo o mais produtivo em cultivo de sequeiro, chegando a 2,5 t ha⁻¹ de castanhas.

O acesso CCP 76 apresentou o valor mais elevado em cinzas (3,09%), assim como também se mostrou distante em relação aos genótipos BRS 189 e BRS 253, nos dois agrupamentos realizados, mostrando que ele pode ser usado em combinação com esses outros dois acessos, contribuindo com a produção de amêndoas mais nutritivas, com um teor mais elevado de minerais. Além disso, segundo Vidal Neto et al. (2013) este genótipo é adaptado para cultivo em diversas

regiões do Brasil, sendo o mais plantado atualmente, devido a atratividade e qualidade do pedúnculo.

7.4 ANÁLISE DE CORRELAÇÃO ENTRE OS MARCADORES MOLECULARES (RAPD E ISSR) E AS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS

No intuito de se verificar a existência de correlação entre os dados provenientes das análises físico-químicas e os dados das análises moleculares feitas, foram calculados coeficientes de Person entre as dissimilaridades genéticas com auxílio do Programa Genes. Em seguida, as correlações entre as matrizes foram submetidas ao teste de Mantel em 100 simulações com nível de significância de 1 a 5% de probabilidade.

Para a análise de correlação entre os marcadores moleculares RAPD e os dados físico-químicos foi encontrada uma correlação positiva de 0,02, não sendo significativa à 1 e 5% de probabilidade pelo teste de Mantel. Os resultados demonstram que não existe correlação entre os dados, visto que o valor de correlação é muito baixo e não é estatisticamente significativo. Silva et al. (2009) trabalhando com batata (*Solanum tuberosum* L.), analisando as características morfológicas das plantas em conjunto com análises moleculares através de marcadores AFLP, não encontrou correlação significativa entre os dados pelo teste de Mantel ($r = 0,20$).

Vieira et al. (2013) trabalhando com acessos de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) não encontrou nenhuma correlação entre os parâmetros avaliados, os quais foram: características qualitativas, quantitativas e moleculares. As correlações foram reduzidas ou nulas. Gonçalves (2008), estudando a associação de marcadores moleculares RAPD com características morfoagronômicas em tomateiro também encontrou baixa correlação ($r = 0,39$).

A ausência de associação entre os dois parâmetros avaliados no estudo demonstram as diferentes propriedades entre os marcadores moleculares e as caracteres físico-químicos.

A maior parte da variação detectada pelos marcadores moleculares é ao nível de DNA, sendo do tipo não adaptativa, dessa forma não está sujeita a seleção natural (VIEIRA et al., 2013). Além disso, os resultados obtidos pelo marcador RAPD são baseados em sequências aleatórias que podem estar distantes de regiões gênicas que controlam a expressão de proteínas relacionadas a determinação dos caracteres

físico-químicos. Podendo este ser um fator que tenha influenciado a ausência de correlação.

As características físico-químicas, assim como outras características quantitativas de interesse agrônomo, estão sujeitas a influência do ambiente que afeta diretamente sua expressão, e sofrem interferência de processos de seleção natural. Sendo assim, o ambiente determina as sequências de DNA que serão expressas. As plantas podem ser parecidas quando se analisa a composição de bases do DNA, contudo devido a interferência do ambiente, sequências podem ser expressas em níveis diferentes, tornando a existência de correlação entre os dados de difícil constatação.

Vieira et al. (2013) constataram em análise com germoplasma de mandioca, correlação significativa comparando as matrizes de distância/dissimilaridade estimadas entre dados quantitativos, qualitativos e moleculares (RAPD), todavia em ambos de forma comparada dois a dois, não foi encontrada nenhuma associação. Isso propõe que, será maior a associação entre ambos os tipos de dados, quanto maior o número de caracteres envolvidos (quantitativos e qualitativos) e o número de bandas de DNA avaliadas, pois aumentará a cobertura do genoma dos acessos.

A correlação estudada entre os marcadores ISSR e os caracteres físico-químicos apresentou um valor negativo de $r = 0,04$, sendo significativo a 1% de probabilidade pelo teste de Mantel. Dessa forma, também não há relação entre as matrizes de dissimilaridade geradas pelo marcador ISSR e as matrizes de dissimilaridade da físico-química.

Dasmohapatra, Rath e Rout (2013), utilizando marcadores ISSR e caracteres morfológicos com o intuito de estimar a variabilidade genética de 25 variedades de *A. occidentale* L., provenientes da Índia, obtiveram um valor de correlação baixo ($r = 0,005$) não significativo.

Archak et al. (2003a) realizaram um estudo comparativo usando três marcadores (AFLP, ISSR e RAPD) com o objetivo de se comparar a eficiência das três ferramentas em detectar variação em um conjunto aleatório de acessos de cajueiro. No total, 564 bandas foram geradas, sendo que os três marcadores discriminaram com eficiência os acessos, todavia não houve correlação entre os marcadores e os caracteres morfológicos avaliados.

Ghalmi et al. (2010) trabalhando com *Vigna unguiculata* (L.) Walp. e usando marcadores ISSR e RAPD para realizar uma análise de diversidade genética, obteve

valores de correlação de 0,33 e 0,37, respectivamente, ambas significativas a 1% de probabilidade pelo teste de Mantel, contudo não possuindo correlação com os marcadores morfológicos estudados.

A baixa correlação apresentada com o marcador RAPD neste estudo advém do fato de que este marcador cobre uma proporção maior do genoma. Além disso, é composto por sequências que podem ser codificadas ou não, dessa forma as marcas geradas são difíceis de serem correlatas com caracteres fenotípicos (GONÇALVES, 2008).

O marcador ISSR, diferente do RAPD, apresenta sequências baseadas em microssatélites, sendo que os *primers* usados na PCR são complementares a estas sequências. A amplificação ocorre internamente as sequências dos microssatélites (AGARWAL; SHRIVASTAVA; PADH, 2008). Devido a essa forma mais orientada de amplificação de uma sequência alvo no genoma, o resultado da análise com esta ferramenta tenha mostrado uma correlação que fosse significativa, no entanto desprezível.

Ademais, a matriz de dissimilaridade obtida para o marcador ISSR foi baseada numa quantidade de 41 bandas de DNA produzidas a partir de oito *primers*. Esse valor é pouco significativo para estimar relações genéticas dentro e entre as espécies, segundo relatam Colombo et al. (1998). Em decorrência da reduzida representatividade dos dados gerados pelo marcador ISSR, a análise de diversidade genética foi investigada com o uso em conjunto de ambas as ferramentas.

Além disso, a dificuldade de correlação também advém do uso poucos caracteres físico-químicos no estudo em comparação ao número de marcadores avaliados. Os marcadores moleculares propiciam uma amostragem mais ampla do genoma do que a análise com marcadores físico-químicos.

Contudo, a ausência de associação entre ambas as ferramentas usadas no estudo, não deve ser considerada como uma limitação no uso destas para estimar a diversidade genética, mas sim como um incentivo do emprego das duas metodologias em conjunto. A complementariedade de ambas deve ser explorada para melhor orientar as estratégia de conservação e uso de germoplasma (PIRES et al., 2015).

8.0 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Após a realização deste estudo foi encontrada uma elevada variabilidade entre os acessos de cajueiro analisados, a partir tanto das análises moleculares com os marcadores RAPD e ISSR, quanto com base nas características físico-químicas. A partir dessa constatação, rejeita-se a primeira hipótese sugerida no estudo.

A partir da caracterização feita com as amêndoas de caju dos diferentes genótipos, observou-se que estas apresentam baixos teores de acidez, baixo pH, teor considerável de umidade e cinzas e elevados teores de proteínas e lipídeos. Ademais, os únicos parâmetros onde foi detectada diferença significativa entre as amostras foram o teor de umidade e o teor de proteínas. Dessa forma, aceita-se a segunda hipótese proposta no estudo.

A análise de correlação feita não indicou relação entre os dados moleculares e físico-químicos. Vale ressaltar que em decorrência do baixo número de caracteres físico-químicos avaliados em relação ao número elevado de marcas de DNA produzidas, não foi possível gerar uma análise mais robusta de correlação, sendo esta uma limitação da pesquisa.

Ademais, foi possível selecionar acessos de cajueiro anão-precoce para possíveis combinações híbridas, gerando amêndoas com melhor qualidade nutricional. Os acessos BRS 189, BRS 253, CCP 76 e CCP 1001 se apresentaram distantes geneticamente nas dois dendogramas obtidos e mostraram os melhores valores de proteínas, lipídeos, cinzas, acidez e pH, respectivamente. Estes acessos podem ser alvo de futuros programas de melhoramento genético com o intuito de se produzir genótipos superiores de maior valor para o mercado.

REFERÊNCIAS

- AGARWAL, M.; SHRIVASTAVA, N.; PADH, H. Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. **Plant Cell Rep**, [S.l.], v. 27, n. 4, p. 617-631, fev. 2008.
- AQUINO, J. S.; SILVA, P. E. B. A.; MASCARENHAS, R. J.; ROCHA, C. V. S.; SANTOS, O. J.; SANTOS, H. M. L. R. Efeito do líquido da casca de amêndoa de caju sobre as características físico-químicas e sensoriais de amêndoas fritas. **Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 70, n. 3, p. 316-323, jul. 2011. Disponível em: <http://periodicos.ses.sp.bvs.br/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0073-98552011000300010&lng=pt&nrm=iso>. Acesso em: 24 jul. 2015.
- ARCHAK S.; GAIKWAD, A. B.; GAUTAM, D.; RAO, E. V. V. B.; SWAMY, K. R. M.; KARIHALOO, J. L. Comparative assessment of DNA fingerprinting techniques (RAPD, ISSR and AFLP) for genetic analysis of cashew (*Anacardium occidentale* L.) accessions of India. **Genome**, [S.l.], v. 46, n. 3, p.362-369, jun. 2003.
- ARCHAK S.; GAIKWAD, A. B.; GAUTAM, D.; RAO, E. V. V. B.; SWAMY, K. R. M.; KARIHALOO, J. L. DNA fingerprinting of Indian cashew (*Anacardium occidentale* L.) varieties using RAPD and ISSR techniques. **Euphytica**, Karnataka, v. [S.l.], n. 3, p.397-404, nov. 2003.
- BARROS, L. M. **Caracterização morfológica e isoenzimática do cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) tipos comum e anão-precoces, por meio de técnicas multivariadas**. Piracicaba, ESALQ, 1991. 256p. (Doutorado, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz).
- BRUCKNER, C. H. **Melhoramento de Fruteiras Tropicais**. Viçosa: UFV, 2008. 422 p.
- CARVALHO, M. G.; COSTA, J. M. C.; SOUZA, V. A. MAIA, G. A. B. Avaliação dos parâmetros físicos e nutricionais de amêndoas de chichá, sapucaia e amêndoa-do-gurguéia. **Ciência Agrônômica**, Fortaleza, v. 39, n. 4, p. 517-523, dez. 2008. Disponível em:<<http://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/70781/1/RCAv39n4p517.pdf>>. Acesso em: 20 jul. 2015.
- CARVALHO, R. S. **Estudos de Acessos de *Anacardium Humile* A. ST. Hill por meio da Caracterização Morfológica e de Marcadores RAPD**. 2011. 71 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Agronomia, Universidade Federal de Goiás, Jataí, 2011. Disponível em: <<https://posagronomia.jatai.ufg.br/up/217/o/Raquel.PDF?1348171055>>. Acesso em: 20 out. 2016.
- CASTRO, A. C. R. Introdução, coleta e conservação de recursos genéticos do cajueiro. In: VIDAL NETO, F. C.; CAVALCANTI, J. J. V. **Melhoramento Genético de Plantas no Nordeste**. Brasília: Embrapa, 2013. Cap. 1, p. 469-480. Disponível em: <http://www.ceinfo.cnpat.embrapa.br/arquivos/artigo_4158.pdf>. Acesso em: 05 maio 2015.
- CAVALCANTE, J. F. M. **Une contribution a l'etude de la valeur nutritive de la noix de cajou (*Anacardium occidentale* L.) an Bresil**. Bélgica, 1983. 61p. Dissertação (Mestrado em Sciences Naturelles Appliquees), Universite Catholique de Louvain.

- CAVALCANTI, J. J. V.; VIDAL NETO, F. C.; BARROS, L. M. Avanços, desafios e novas estratégias do melhoramento genético do cajueiro no Brasil. In: VIDAL NETO, F. C.; CAVALCANTI, J. J. V. **Melhoramento Genético de Plantas no Nordeste**. Brasília: Embrapa, 2013. Cap. 5, p. 151-174. Disponível em: <<http://www.alice.cnptia.embrapa.br/handle/doc/983841>>. Acesso em: 01 jun. 2015.
- CHIPOJOLA, F. M.; MWASE, W. F.; KWAPATA, M. B.; BOKOSI, J. M.; NJOLOMA, J. P.; MALIRO, M. F. Morphological characterization of cashew (*Anacardium occidentale* L.) in four populations in Malawi. **African Journal of Biotechnology**, Malawi, v. 8, n. 20, p.5173-5181, out. 2009.
- COLOMBO, C.; GÉRARD, S.; VALLE, T. L.; CHARRIER, A. Genetic diversity characterization of cassava cultivars (*Manihot esculenta* Crantz) with RAPD markers. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 21, n. 1, p. 105-113, 1998.
- CONAB – Companhia Nacional de abastecimento. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/15_06_15_08_37_52_amêndoa_de_caju_maio2015.pdf> Acesso em: 05 maio 2015
- COSTA, J. M. C.; GUERRA, K. T.; MAIA, G. A.; ROCHA É. M. F. F. Avaliação físico-química e microbiológica da amêndoa da Amêndoa de caju. **Publicatio Uepg Ciências Exatas e da Terra, Ciências Agrárias e Engenharias**, Ponta Grossa, v. 15, n. 3, p. 181-187, dez. 2009. Disponível em: <<http://www.revistas2.uepg.br/index.php/exatas/article/view/1102/1923>>. Acesso em: 01 abr. 2015.
- CRUZ, C. D. **Programa genes**: diversidade genética. Viçosa: UFV, 2008. 278p.
- DASMOHAPATRA, R.; RATH, S.; ROUT, G. R. Analysis of genetic relationships in cashew (*Anacardium occidentale* L.) varieties using morphological characters and ISSR markers. **Journal of Plantation Crops**, Odisha, v. 41, n. 3, p.321-329, set. 2013.
- FALERO, F. G. **Marcadores Genético-Moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2007. 99 p. Disponível em: <[http://www.cpac.embrapa.br/publicacoes/search_pbl/1?q=Marcador molecular](http://www.cpac.embrapa.br/publicacoes/search_pbl/1?q=Marcador+molecular)>. Acesso em: 23 jun. 2015.
- FERREIRA, M. E.; GRATAPLAGIA, D. **Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética**. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1995. 220 p.
- FRANCESCHI, L.; BENIN, G.; GUARIENTI, E.; MARCHIORO, V. S.; MARTIN, T. N. Fatores pré-colheita que afetam a qualidade tecnológica de trigo. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 5, p.1624-1631, ago. 2009. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/cr/v39n5/a166cr890.pdf>>. Acesso em: 26 out. 2016.
- FREITAS, J. B.; NAVES, M. M. V. Composição química de nozes e sementes comestíveis e sua relação com a nutrição e saúde. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 23, n. 2, p. 269-279, 2010. Disponível em: <<http://www.maxforma.com.br/artigos/amendoas.pdf>>. Acesso em: 02 abr. 2015.
- FROTA JÚNIOR, J. I.; LIMA, E. N.; ARAÚJO, M. E. B.; LIMA, I. B. Divergência genética entre progênies de meio-irmãos de cajueiro anão precoce utilizando marcadores ISSR. **Enciclopédia Biosfera**, Goiânia, v. 18, p. 1345-1356, 2014.

Disponível em: <http://www.conhecer.org.br/enciclop/2014a/AGRARIAS/divergencia_genetica.pdf>. Acesso em: 05 maio 2014.

GHALMI, N.; MALICE, M.; JACQUEMIN, J.; OUNANE, S.; MEKLCHE, L.; BAUDOIN, J. Morphological and molecular diversity within Algerian cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) landraces. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Gembloux, v. 57, n. 3, p.371-386, 11 set. 2009.

GONÇALVES, L. S. A.; RODRIGUES, R.; SUDRÉ, C.; BENTO, C. S.; MOULIN, M. M.; ARAÚJO, M. L.; DAHER, R.; PEREIRA, T. N.; PEREIRA, M. Divergência genética em tomate estimada por marcadores RAPD em comparação com descritores multicategóricos. **Horticultura Brasileira**, Campos dos Goytacazes, v. 26, n. 3, p.364-370, set. 2008. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/hb/v26n3/14.pdf>>. Acesso em: 22 out. 2016.

HAMMER; Harper, D. A.T.; Ryan, P. D. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. **Palaeontologia Electronica**, v. 4, n.1, p.1-9, 2001.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção Agrícola Municipal 2013**. Rio de Janeiro, IBGE: 2013. Disponível em: <<http://ibge.gov.br>> Acesso em: 06 maio 2015.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz: Métodos químicos e físicos para análise de alimentos**. 4. ed. São Paulo: Rev. Inst. Adolfo Lutz, 2008. 1020 p. Disponível em: <<http://www.ial.sp.gov.br/index.php>>. Acesso em: 04 abr. 2015.

LIMA, J. R. Valor nutricional da amêndoa da amêndoa-de-caju e seu processamento e embalagem. In: VIDAL NETO, F. C.; CAVALCANTI, J. J. V. **Melhoramento Genético de Plantas no Nordeste**. Brasília: Embrapa, 2013. Cap. 2, p. 389-394. Disponível em: <http://www.ceinfo.cnpat.embrapa.br/arquivos/artigo_4156.pdf>. Acesso em: 02 jun. 2015.

LIMA, T. O. L. Avaliação **Microbiológica físico-química das amêndoa de castanha de Caju inteiras cruas e das tostadas salgadas, nas linhas de beneficiamento industrial**. 2003. 155 f. Dissertação (Mestrado) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2004.

LUCENA, V. M. X. **Diversidade genética entre genótipos de cajueiros (*Anacardium occidentale* L.) e qualidade do fruto e pseudofruto**. 2006. 93 f. Dissertação (Mestrado em Recursos Naturais) - Universidade Federal de Roraima, Boa Vista, 2006. Disponível em: <https://www.google.com.br/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=0CCUQFjAAahUKEwj72sT29_fGAhWBhA0KHQQFAGM&url=https://www.ufrr.br/pronpr/index.php?option=com_phocadownload&view=category&download=107:vanja-xaudf&id=14:dissertacoes&Itemid=306&ei=A1VbvNNoGJNoSKgJgG&usg=AFQjCNEY3_3QyOMbq->> Acesso em: 07 ago. 2014.

MAIA, G. A, HOLANDA, L. F. F., MARTINS, C. B. Características químicas e físicas da castanha de caju (*Anacardium occidentale* L.). **Ciência Agrônômica**, Fortaleza, v. 1, n. 1, p. 39 46, jul. 1971.

MELO, M. L. P.; MAIA, G. A.; SILVA, A. P. V.; OLIVEIRA, G. S. F.; FIGUEIREDO, R. W. Caracterização físico-química da amêndoa da amêndoa de caju (*Anacardium*

occidentale L.) crua e tostada. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 18, p. 1-6, 1998. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20611998000200008>. Acesso em: 26 mar. 2015.

MENDONÇA, V.; MENDONÇA, L. F. M. **Fruticultura Tropical: Bananeira, Cajueiro e Mangueira**. Mossoró: EdUFERSA, 2013. 356 p.

MUNIZ, C. R. **Caracterização Microbiológica de Amêndoas de Castanha de Caju Cruas Processadas em Minifábricas do Estado do Ceará**. 2004. 91 f. Dissertação (Mestrado) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2004.

PAIVA, R. J. **Clone BRS 253 ou BRS Bahia 12**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2004. 2 p. Disponível em: <http://www.ceinfo.cnpat.embrapa.br/arquivos/artigo_3024.pdf> Acesso em: 17 maio 2016.

PAIVA, R. J. **Clone BRS 274 Cajueiro Comum (Cultivar BRS Jacaju)**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2007. 6 p. Disponível em: <http://www.ceinfo.cnpat.embrapa.br/arquivos/artigo_3260.pdf> Acesso em: 17 maio 2016.

PAIVA, R. J. **Clone BRS 275 Híbrido de Cajueiro Anão x Comum (Cultivar BRS Dão)**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2007. 6 p. Disponível em: <http://www.ceinfo.cnpat.embrapa.br/arquivos/artigo_3261.pdf> Acesso em: 17 maio 2016.

PESSONI, L. A. **Estratégias de análise da diversidade genética em germoplasma de cajueiro (*Anacardium spp. L.*)**. 2007. 174 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2007. Disponível em: <[http://www.researchgate.net/publication/29435946_Estratgias_de_anlise_da_diversidade_em_germoplasma_de_cajueiro_\(Anacardium_spp._L.\)](http://www.researchgate.net/publication/29435946_Estratgias_de_anlise_da_diversidade_em_germoplasma_de_cajueiro_(Anacardium_spp._L.))>. Acesso em: 07 jul. 2015.

PIRES, M. V. V.; FALEIRO, F. G.; SILVA, J. C. S.; MELO, J. T.; PEIXOTO, J. R. Características Morfológicas e Variabilidade Genética de Araticum Utilizando Marcadores RAPD e Microsatélites. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 37, n. 1, p.149-158, mar. 2015. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-29452015000100149>. Acesso em: 22 out. 2016.

RIBEIRO, F. S. C.; SOUZA, V. A. B.; LOPES, A. C. A. Diversidade Genética em Castanheira-do- Gurguéia (*Dipteryx lacunifera* DUCKE) com base em Características Físicas e Químico-nutricionais do Fruto. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 34, n. 1, p.190-199, mar. 2012. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbf/v34n1/v34n1a26.pdf>>. Acesso em: 24 out. 2016.

SANTANA, I. B. B.; Oliveira, E. J.; SOARES FILHO, W. S.; RITZINGER, R.; AMORIM, E. P.; COSTA, M. A. P. C.; MOREIRA, R. F. C. Variabilidade genética entre acessos de umbu-cajazeira mediante análise de marcadores ISSR. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 33, p. 868-876, set. 2011. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-29452011000300022&script=sci_arttext> Acesso em: 07 jul. 2015.

SHOBHA, D.; THIMMAPPAIAH; J. Molecular characterization and association analysis in cashew using RAPD and ISSR markers. **Journal of Plantation Crops**, Karnataka, v. 41, n. 3, p. 292-299, ago. 2013.

SILVA, E. E. **Geração de Renda e ocupações da cadeia agroindustrial de amêndoa de caju no Rio Grande do Norte: o caso do sertão de Apodi**. 2012. 99 f. Dissertação (Mestrado em Economia) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2012. Disponível em:

<<http://repositorio.ufrn.br/jspui/handle/123456789/14079> > Acesso em: 17 jun. 2015.

SILVA, G. O.; PEREIRA, A. S.; VELCI, Q. S.; CASTRO, C. M.; CARVALHO, F. I. F.; VIEIRA, E. A. Distâncias genéticas entre genótipos de batata a partir de dados morfológicos, moleculares e genealógicos. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 30, n. 1, p.983-992, jun. 2009. Disponível em:

<<http://www.uel.br/revistas/wrevojs248/index.php/semagrarias/article/view/4633>>.

Acesso em: 22 out. 2016.

THIMMAPPAIAH; SANTHOSH, W. G.; SHOBHA, D.; MELWYN, G. S. Assessment of genetic diversity in cashew germplasm using RAPD and ISSR markers. **Scientia Horticulturae**, [S.l.], v. 120, n. 3, p. 411-417, maio 2009. Disponível

em:<<http://api.elsevier.com/content/article/PII:S0304423808004767?httpAccept=text/xml>>. Acesso em: 27 out. 2015.

VIDAL NETO, F. C.; BARROS, L. M.; CAVALCANTI, J. J. V.; MELO, D. S.

Melhoramento genético e cultivares de cajueiro. In: VIDAL NETO, F. C.; CAVALCANTI, J. J. V. **Melhoramento Genético de Plantas no Nordeste**. Brasília: Embrapa, 2013. Cap. 2, p. 481-508. Disponível em:

<http://www.ceinfo.cnpat.embrapa.br/arquivos/artigo_4159.pdf>. Acesso em: 04 maio 2015.

VIEIRA, E. A.; FIALHO, J. F.; FALEIRO, F. G.; BELLON, G.; FONSECA, K. G.; SILVA, M. S.; PAULA-MORAES, S. V.; CARVALHO, L. J. C. B. Caracterização fenotípica e molecular de acessos de mandioca de indústria com potencial de adaptação às condições do Cerrado do Brasil Central. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 34, n. 2, p.567-582, 17 maio 2013. Disponível em:

<<http://www.uel.br/revistas/uel/index.php/semagrarias/article/view/9406>>. Acesso em: 22 out. 2016.

VIEIRA, R. F. **Frutas Nativas da Região Centro-oeste do Brasil**. Brasília:

Embrapa, 2006. 320 p. Disponível em:

<http://www.agabrasil.org.br/_Dinamicos/livro_frutas_nativas_Embrapa.pdf>. Acesso em: 17 jun. 2015.