

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

PROPRIEDADES QUÍMICAS, ANATÔMICAS,
BIOMECÂNICAS E COMPOSIÇÃO DA LIGNINA DO
CAPIM-TANZÂNIA ADUBADO COM NITROGÊNIO E/OU
PRÉ-TRATAMENTO COM FUNGO DA PODRIDÃO
BRANCA

Autor: Vinícius Valim Pereira
Orientador: Prof. Dr. Ulysses Cecato

MARINGÁ
Estado do Paraná
Novembro - 2014

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

PROPRIEDADES QUÍMICAS, ANATÔMICAS,
BIOMECÂNICAS E COMPOSIÇÃO DA LIGNINA DO
CAPIM-TANZÂNIA ADUBADO COM NITROGÊNIO E/OU
PRÉ-TRATAMENTO COM FUNGO DA PODRIDÃO
BRANCA

Autor: Vinícius Valim Pereira
Orientador: Prof. Dr. Ulysses Cecato
Coorientador: Prof. Dr. Júlio Cesar Damasceno

Tese apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de DOUTOR EM ZOOTECNIA, no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá - Área de concentração: Pastagens e Forragicultura".

MARINGÁ
Estado do Paraná
Novembro - 2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá, PR, Brasil)

P436p Pereira, Vinicius Valim
Propriedades químicas, anatômicas,
biomecânicas e composição da lignina do Capim-
Tanzânia adubado com nitrogênio e/ou pré-
tratamento com fungo da podridão branca /
Vinicius Valim Pereira. -- Maringá, 2014.
155 f. : il., figs., tabs.

Orientador: Prof. Dr. Ulysses Cecato.
Coorientador: Prof. Dr. Júlio César Damasceno.
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de
Maringá, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia,
2014.

1. Capim-Tanzânia - Adubação nitrogenada -
Anatomia. 2. Capim-Tanzânia - Manejo de pastagem -
Pleurotus ostreatus. 3. Características anatômicas e
biomecânicas - Digestibilidade. 4. Lignina -
Nitrogênio - Fungo - Composição. 5. Parede celular -
Celulose e hemicelulose. I. Cecato, Ulysses, orient.
II. Damasceno, Júlio César, coorient. III.
Universidade Estadual de Maringá. Programa de Pós-
Graduação em Zootecnia. Iv. Título.

CDD 21.ed.633.202

Zss-2015



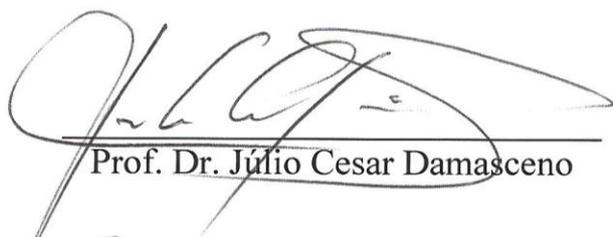
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

**PROPRIEDADES QUÍMICAS, ANATÔMICAS,
BIOMECÂNICAS E COMPOSIÇÃO DA LIGNINA DO
CAPIM-TANZÂNIA ADUBADO COM NITROGÊNIO E/OU
PRÉ-TRATADO COM FUNGO DA PODRIDÃO BRANCA**

Autor: Vinícius Valim Pereira
Orientador: Prof. Dr. Ulysses Cecato

TITULAÇÃO: Doutor em Zootecnia - Área de Concentração Pastagem e
Forragicultura

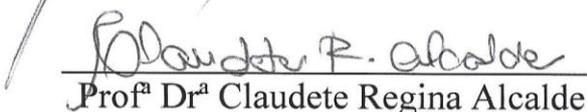
APROVADA em 24 de novembro de 2014.



Prof. Dr. Júlio Cesar Damasceno



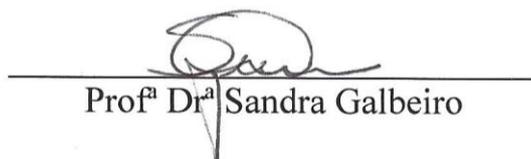
Prof. Dr. Osvaldo Ferrarese Filho



Prof. Dr.ª Claudete Regina Alcalde



Prof. Dr. Ciniro Costa



Prof. Dr.ª Sandra Galbeiro

“A habilidade de alcançar a vitória mudando e adaptando-se de acordo com o inimigo é chamada de genialidade.”

Sun Tzu – A Arte da Guerra

Aos meus pais, Maria de Fátima Moreira Valim Pereira e Luiz Antônio Pereira, pelo apoio, dedicação, criação e incentivo para finalizar mais uma grande etapa.

Ao meu irmão, Matheus Valim Pereira, por sempre proporcionar momentos de diversão, risadas e incentivo nos momentos de dificuldade e saudades.

A minha namorada, Rebeca Morato Mangualde que esteve acompanhando essa fase de perto e de longe e nunca deixou de incentivar a finalizar esta etapa, independente da dificuldade, da saudade e sempre estimulando a fazer o meu melhor.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, por mais um passo.

À Universidade Estadual de Maringá, pela oportunidade da realização do curso.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos para realização deste trabalho.

Ao meu orientador, professor Ulysses Cecato, pela oportunidade, amizade, paciência e incentivo.

Ao meu coorientador, professor Júlio Cesar Damasceno, pelas importantes e necessárias contribuições, o incentivo para realizar uma pesquisa inédita e pela amizade.

Ao amigo Bruno Lala Silva, por estar sempre presente nos momentos em que precisava de ajuda principalmente no laboratório onde passamos grande parte do tempo aprendendo e desenvolvendo este trabalho.

Ao amigo de orientação, Edmar Pauliqui Peluso, por ter realizado o trabalho na mesma área experimental compartilhando experiências e vencendo as dificuldades do dia a dia.

Ao grupo GEFORCE(Grupo de Estudos de Forragicultura Cecato), pelos momentos de descontração, reuniões e aprendizados.

Aos funcionários da FEI (Fazenda Experimental Iguatemi), pelo auxílio.

Ao Professor Luís Antônio de Souza do Departamento de Biologia, pela disponibilidade do laboratório e do microscópio para confecção e análise das lâminas.

À Professora Ana Carolina Muller Conti, pelo auxílio nas análises estatísticas.

Ao Professor Osvaldo Ferrarese Filho, pela disponibilidade do laboratório de bioquímica para realização das análises e também pelo auxílio da Professora Aline Finger Teixeira e Doutoranda Flavia Carolina Moreira Vilar, para realização das atividades no mesmo.

A Professora Rosane Marina Peralta, pela disponibilidade do laboratório de bioquímica e fisiologia de microrganismos e auxílio do Doutorando Rafael Castoldi, para realização dos experimentos.

BIOGRAFIA

VINÍCIUS VALIM PEREIRA, filho de Luiz Antônio Pereira e de Maria de Fátima Moreira Valim Pereira, irmão de Matheus Valim Pereira, nasceu em Piraí, Rio de Janeiro, em 21 de junho de 1982.

Até 2002 residiu em Volta Redonda, no Estado do Rio de Janeiro, onde concluiu o ensino médio no Colégio Macedo Soares e, posteriormente, o curso Técnico em Informática no Instituto de Cultura Técnica.

Em 2002, ingressou no curso superior de Zootecnia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, na cidade de Seropédica, no mesmo Estado.

Em 13 de maio de 2007, graduou-se em Zootecnia.

Em agosto de 2007, ingressou no Programa de Pós-Graduação do Departamento de Zootecnia, da Universidade Federal de Viçosa, na área de Forragicultura e Pastagens, defendendo a dissertação em julho de 2009.

Em março de 2011, ingressou no Programa de Pós-Graduação do Departamento de Zootecnia, da Universidade Estadual de Maringá, na área de Forragicultura e Pastagens defendendo a tese em novembro de 2014.

ÍNDICE

| | Página |
|--|--------|
| LISTA DE TABELAS..... | xii |
| LISTA DE FIGURAS..... | xvii |
| RESUMO GERAL | xx |
| GENERAL ABSTRACT | xxiv |
| INTRODUÇÃO..... | 1 |
| 1.1 <i>Panicum maximum</i> Jacq. cv. Tanzânia | 4 |
| 1.2 Nitrogênio | 4 |
| 1.3 Fatores ambientais e interceptação luminosa | 6 |
| 1.4 Qualidade nutricional | 7 |
| 1.5 Anatomia da forragem..... | 9 |
| 1.6 Variáveis biomecânicas..... | 10 |
| 1.7 Parede celular | 11 |
| 1.8 Caracterização monomérica da lignina | 14 |
| 1.9 Fungo da podridão branca: <i>Pleurotus ostreatus</i> | 16 |
| 1.9.1 Lacase | 17 |
| 1.9.2 Manganês peroxidase | 18 |
| 1.9.3 Celulase | 19 |
| 1.9.4 Xilanase | 20 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 20 |
| OBJETIVOS GERAIS..... | 32 |

| | |
|---|----|
| CAPÍTULO I - IMPORTÂNCIA DA PAREDE CELULAR NA DIGESTIBILIDADE <i>IN VITRO</i> DO CAPIM-TANZÂNIA FERTILIZADO COM NÍVEIS DE NITROGÊNIO..... | 33 |
| Resumo:..... | 33 |
| INTRODUÇÃO | 34 |
| MATERIAL E MÉTODOS | 35 |
| RESULTADOS..... | 38 |
| DISCUSSÃO..... | 41 |
| CONCLUSÕES..... | 48 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 48 |
| FIGURAS, TABELAS E GRÁFICOS. | 54 |
| CAPÍTULO II – INFLUÊNCIA DA ADUBAÇÃO NITROGENADA SOBRE AS PROPRIEDADES BIOMECÂNICAS DO CAPIM-TANZÂNIA..... | 61 |
| SUMÁRIO | 61 |
| INTRODUÇÃO | 62 |
| MATERIAL E MÉTODOS | 63 |
| Preparo do solo e delineamento experimental..... | 63 |
| Manejo do pasto | 64 |
| Análise das variáveis biomecânicas | 64 |
| Modelos estatísticos..... | 65 |
| RESULTADOS..... | 66 |
| DISCUSSÃO..... | 70 |
| CONCLUSÕES..... | 74 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 75 |
| FIGURAS, TABELAS E GRÁFICOS | 78 |
| CAPÍTULO III – ANATOMIA DO CAPIM-TANZÂNIA ADUBADO COM NÍVEIS DE NITROGÊNIO | 83 |
| SUMÁRIO | 83 |
| INTRODUÇÃO | 84 |
| MATERIAL E MÉTODOS | 85 |
| Preparo do solo e delineamento experimental..... | 85 |
| Manejo do Pasto | 86 |
| Análise das variáveis anatômicas | 86 |
| Modelos estatísticos..... | 88 |

| | |
|---|-----|
| RESULTADOS E DISCUSSÃO | 88 |
| CONCLUSÃO | 98 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 98 |
| FIGURAS E TABELAS | 102 |
| CAPÍTULO IV – UTILIZAÇÃO DE FUNGO COMO PRÉ-TRATAMENTO EM CAPIM-TANZÂNIA ADUBADO..... | 107 |
| RESUMO | 107 |
| INTRODUÇÃO | 108 |
| MATERIAL E MÉTODOS | 109 |
| RESULTADOS E DISCUSSÃO | 114 |
| DISCUSSÃO..... | 121 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 126 |
| FIGURAS E TABELAS | 131 |
| CAPÍTULO V – UTILIZAÇÃO DE NITROGÊNIO E FUNGO DA PODRIDÃO BRANCA NA COMPOSIÇÃO DOS MONÔMEROS DA LIGNINA EM CAPIM- TANZÂNIA..... | 138 |
| RESUMO | 138 |
| INTRODUÇÃO | 139 |
| MATERIAL E MÉTODOS | 140 |
| RESULTADOS..... | 143 |
| DISCUSSÃO..... | 147 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 149 |
| FIGURAS E TABELAS | 152 |
| CONSIDERAÇÕES FINAIS | 156 |
| ANEXO 1 - FORMATAÇÃO DA REVISTA SCIENTIA AGRICOLA JOURNAL | |
| ANEXO 2 - FORMATAÇÃO DA REVISTA AGRICULTURAL SCIENCE..... | |
| ANEXO 3 - FORMATAÇÃO DA REVISTA JOURNAL OF AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY | |

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

| | | |
|-----------|---|----|
| TABELA 1. | Componentes químicos do solo das pastagens de capim-Tanzânia no início do período experimental..... | 54 |
| TABELA 2. | Separação dos períodos chuvoso e seco de acordo com os cortes..... | 54 |
| TABELA 3. | Concentração de lignina, nitrogênio total, nitrogênio insolúvel em detergente neutro por nitrogênio total (NIDN/NT) e nitrogênio insolúvel em detergente ácido por nitrogênio total (NIDA/NT) da fração lâmina foliar e colmo+bainha e celulose da fração colmo+bainha de capim-tanzânia fertilizado com níveis nitrogênio nos cortes, sob pastejo, que obtiveram interação..... | 55 |
| TABELA 4. | Quantidade média na lâmina foliar de digestibilidade <i>in vitro</i> da matéria seca (DIVMS), celulose (CEL), hemicelulose (HEMI), fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA), e no colmo+bainha de digestibilidade <i>in vitro</i> da matéria seca (DIVMS), hemicelulose (HEMI), fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA) de capim-tanzânia fertilizado com níveis nitrogênio nos cortes, sob pastejo, que não obtiveram interação entre os níveis de N..... | 56 |

CAPÍTULO II

| | | |
|-----------|--|----|
| TABELA 1. | Componentes químicos do solo das pastagens de capim- | 78 |
|-----------|--|----|

| | | |
|--------------|---|-----|
| | tanzânia no início do período experimental..... | |
| TABELA 2. | Separação dos períodos chuvoso e seco de acordo com os cortes..... | 78 |
| TABELA 3. | Correlações lineares entre a tensão de ruptura e as variáveis físico-químicas de lâminas foliares (n=64), colmo+bainha (n=64) e lâmina foliar + colmo+bainha (n=128) nos níveis de N..... | 79 |
| TABELA 4. | Quantidade de resistência à tração (mJ/mm) e digestibilidade <i>in vitro</i> de matéria orgânica (DIVMO) (%) da fração colmo+bainha, de capim-tanzânia fertilizado com níveis nitrogênio, nos cortes, sob pastejo, que obtiveram interação..... | 79 |
| TABELA 5. | Média da TENSÃO (newtons), resistência à tração (RESTRACÃO) (mJ/mm), ÁREA (mm ²), ENERGIA (mJ/mm ²) e digestibilidade <i>in vitro</i> da matéria orgânica (DIVMO) (%), na lâmina foliar e TENSÃO (newtons), ÁREA (mm ²) e ENERGIA (mJ/mm ²) no colmo+bainha de capim-tanzânia adubado com níveis nitrogênio e diferentes cortes, sob pastejo..... | 80 |
| | | |
| CAPÍTULO III | | |
| TABELA 1. | Componentes químicos do solo das pastagens de capim-tanzânia no início do período experimental, para os tratamentos 1 (0 kg ha ⁻¹ de N), 2 (150 kg ha ⁻¹ de N), 3 (300 kg ha ⁻¹ de N) e 4 (450 kg ha ⁻¹ de N)..... | 103 |
| TABELA 2. | Equações de regressão ajustadas para as variáveis morfoanatômicas da lâmina foliar (epiderme adaxial, epiderme abaxial, esclerênquima, feixe vascular, bainha do feixe vascular e mesofilo) do capim-tanzânia sob níveis de nitrogênio, no verão e inverno..... | 104 |
| TABELA 3. | Equações de regressão ajustadas para as variáveis morfoanatômicas do colmo+bainha base e ápice (epiderme, esclerênquima, xilema, floema e mesofilo) do capim-tanzânia sob níveis de nitrogênio, no verão e | 104 |

| | | |
|-------------|---|-----|
| | inverno..... | |
| TABELA 4. | Médias para as variáveis morfoanatômicas da lâmina foliar (epiderme adaxial (EPAda), epiderme abaxial (EPAb), esclerênquima (ESC), feixe vascular (FV), bainha parenquimática do feixe vascular (BPFV) e mesofilo (MÊS)) do capim-tanzânia sob níveis de nitrogênio, no verão e inverno..... | 105 |
| TABELA 5. | Médias para as variáveis morfoanatômicas do colmo+bainha base (epiderme (EPI), esclerênquima (ESC), xilema (XIL), floema (FLO) e parênquima (PAR)) do capim-tanzânia sob níveis de nitrogênio, no verão e inverno..... | 105 |
| TABELA 6. | Médias para as variáveis morfoanatômicas do colmo+bainha ápice (epiderme (EPI), esclerênquima (ESC), xilema (XIL), floema (FLO) e parênquima (PAR)) do capim-tanzânia sob níveis de nitrogênio, no verão e inverno..... | 105 |
| TABELA 7. | Correlação entre a tensão de ruptura as variáveis morfoanatômicas da lâmina foliar (epiderme da face adaxial (EPAda) (%), epiderme da face abaxial (EPAb) (%), esclerênquima (ESC) (%), feixe vascular (FV) (%), bainha parenquimática do feixe vascular (BPFV) (%) e mesofilo (MÊS) (%)) do capim-tanzânia sob níveis de nitrogênio, no verão e inverno..... | 105 |
| TABELA 8. | Correlação entre a tensão de ruptura e as variáveis morfoanatômicas do colmo+bainha base e ápice (epiderme (EPI) (%), esclerênquima (ESC) (%), xilema (XIL) (%), floema (FLO) (%) e parênquima (PAR) (%)) do capim-tanzânia sob níveis de nitrogênio, no verão e inverno..... | 106 |
| | | |
| CAPÍTULO IV | | |
| TABELA 1. | Componentes químicos do solo das pastagens de capim-tanzânia no início do período experimental..... | 131 |
| TABELA 2. | Teor de açúcar redutor, lacase, manganês peroxidase, celulase, | 132 |

| | | |
|------------|---|-----|
| | xilanase, digestibilidade <i>in vitro</i> da matéria seca, digestibilidade <i>in vitro</i> da matéria orgânica, fibra em detergente neutro, fibra em detergente neutro ácido, celulose, hemicelulose e lignina na lâmina foliar, em função dos níveis de nitrogênio e tratamentos com e sem fungo, no verão..... | |
| TABELA 3. | Teor de açúcar redutor, lacase, manganês peroxidase, celulase, xilanase, digestibilidade <i>in vitro</i> da matéria seca, digestibilidade <i>in vitro</i> da matéria orgânica, fibra em detergente neutro, fibra em detergente neutro ácido, celulose, hemicelulose e lignina na lâmina foliar, em função dos níveis de nitrogênio e tratamentos com e sem fungo, no inverno..... | 133 |
| TABELA 4. | Teor de açúcar redutor, lacase, manganês peroxidase, celulase, xilanase, digestibilidade <i>in vitro</i> da matéria seca, digestibilidade <i>in vitro</i> da matéria orgânica, fibra em detergente neutro, fibra em detergente neutro ácido, celulose, hemicelulose e lignina na colmo+bainha em função dos níveis de nitrogênio e tratamentos com e sem fungo, no verão..... | 134 |
| TABELA 5. | Teor de açúcar redutor, lacase, manganês peroxidase, celulase, xilanase, digestibilidade <i>in vitro</i> da matéria seca, digestibilidade <i>in vitro</i> da matéria orgânica, fibra em detergente neutro, fibra em detergente neutro ácido, celulose, hemicelulose e lignina na colmo+bainha em função dos níveis de nitrogênio e tratamentos com e sem fungo, no inverno..... | 135 |
| CAPÍTULO V | | |
| TABELA 1. | Componentes químicos do solo das pastagens de capim-tanzânia no início do período experimental..... | 151 |
| TABELA 2. | Teor dos monômeros hidroxifenil (H), isovanilina (I), guaiacil (G), siringil (S), H+I+G+S e relação S/G na lâmina foliar, para os níveis de nitrogênio e tratamentos com e sem fungo, no | 152 |

| | | |
|-----------|---|-----|
| | verão..... | |
| TABELA 3. | Teor dos monômeros hidroxifenil (H), isovanilina (I), guaiacil (G),iringil (S), H+I+G+S e S/G na lâmina foliar, para os níveis de nitrogênio e tratamentos com e sem fungo, no inverno..... | 152 |
| TABELA 4. | Teor dos monômeros hidroxifenil (H), isovanilina (I), guaiacil (G),iringil (S), H+I+G+S e S/G no colmo+bainha, para os níveis de nitrogênio e tratamentos com e sem fungo, no verão..... | 153 |
| TABELA 5. | Teor dos monômeros hidroxifenil (H), isovanilina (I), guaiacil (G),iringil (S), H+I+G+S e S/G no colmo+bainha, para os níveis de nitrogênio e tratamentos com e sem fungo, no inverno..... | 153 |

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

- FIGURA 1. Representação do polímero de lignina, como previsto a partir da análise de lignina baseado RMN..... 13

CAPÍTULO I

- FIGURA 1. Dados climáticos de precipitação e temperatura: máxima, média e mínima durante o período experimental..... 54

- GRÁFICO 1. Equações de regressão ajustadas e coeficiente de determinação para lâmina foliar e colmo+bainha em plantas de capim-tanzânia, em função dos níveis de nitrogênio, na Primavera/Verão, na digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS) (A), lignina (LIG) (B), celulose (CEL) (C), hemicelulose (HEMI) (D), fibra em detergente neutro (FDN) (E), fibra em detergente ácido (FDA) (F), nitrogênio total (NT) (G), nitrogênio insolúvel em detergente neutro por nitrogênio total (NIDN/NT) (H) e nitrogênio insolúvel em detergente ácido por nitrogênio total (NIDA/NT) (I)..... 56

- GRÁFICO 2. Equações de regressão ajustadas e coeficiente de determinação para lâmina foliar e colmo+bainha em plantas de capim-tanzânia, em função dos níveis de nitrogênio, no outono e inverno, para digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DVIMS) (A), hemicelulose (HEMI) (B), fibra em detergente 58

neutro (FDN) (C), nitrogênio total (NT) (D), nitrogênio insolúvel em detergente neutro por nitrogênio total (NIDN/NT) (E) e nitrogênio insolúvel em detergente ácido por nitrogênio total (NIDA/NT) (F).....

CAPÍTULO II

| | | |
|------------|---|----|
| FIGURA 1. | Dados climáticos de precipitação e temperatura: máxima, média e mínima durante o período experimental..... | 77 |
| GRÁFICO 1. | Equações de regressão ajustadas e coeficiente de determinação para lâmina foliar e colmo+bainha em plantas de capim-tanzânia, em função dos níveis de nitrogênio, na primavera/verão, na Tensão (A), Resistência a Tração (B), Área (C), Energia (D) e DIVMO (E)..... | 79 |
| GRÁFICO 2. | Equações de regressão ajustadas e coeficiente de determinação para lâmina foliar e colmo+bainha em plantas de capim-tanzânia, em função dos níveis de nitrogênio, na outono/inverno, na Tensão (A), Resistência a Tração (B), Área (C), Energia (D) e DIVMO (E)..... | 80 |

CAPÍTULO III

| | | |
|-----------|---|-----|
| FIGURA 1. | Dados climáticos de precipitação e temperatura: máxima, média e mínima durante o período experimental..... | 102 |
| FIGURA 2. | Distribuição dos tecidos de lâminas foliares de capim-mombaça (EPAda – epiderme adaxial; EPAba - epiderme abaxial; ESQ - esclerênquima; BFV – bainha do feixe vascular; FV – feixe vascular; MES – mesofilo)..... | 102 |
| FIGURA 3. | Distribuição dos tecidos de colmo+bainha ápice de capim-tanzânia (XIL – xilema; FLO - floema; ESQ - esclerênquima; EPI – epiderme; MES – mesofilo)..... | 103 |
| FIGURA 4. | Distribuição dos tecidos de colmo+bainha base de capim-mombaça (XIL – xilema; FLO - floema; ESQ - esclerênquima; EPI – epiderme; MES – mesofilo)..... | 103 |

CAPÍTULO IV

| | | |
|------------|--|-----|
| FIGURA 1. | Dados climáticos de precipitação e temperatura: máxima, média e mínima durante o período experimental..... | 131 |
| GRÁFICO 1. | Teor de Glicosamina em 20 e 40 mg de amostra coletadas no verão (A) e inverno (B) nos níveis de adubação nitrogenada.... | 136 |

CAPÍTULO V

| | | |
|-----------|--|-----|
| FIGURA 1. | Dados climáticos de precipitação e temperatura: máxima, média e mínima durante o período experimental..... | 151 |
|-----------|--|-----|

RESUMO GERAL

O experimento foi realizado na Fazenda Experimental de Iguatemi (FEI) localizada na latitude de 23° 25' S; 51° 57' O, e 550 metros de altitude, da Universidade Estadual de Maringá (UEM), Maringá-PR. O período experimental foi de novembro de 2012 a setembro de 2013 conduzido em uma área de capim-tanzânia. A área experimental possui 800 m² de área total dividida em 16 parcelas, com 50 m² cada, nos quais foram alocados os tratamentos com aplicações de nitrogênio (N) e potássio (K₂O), parcelados de acordo com a quantidade total a ser aplicada, com início em novembro de 2012: ausência de nitrogênio; a menor dose (150 kg ha⁻¹ de N) em três aplicações com intervalos de 45 dias; 300 kg ha⁻¹ de N em seis aplicações com intervalos de 30 dias; e 450 kg ha⁻¹ de N em nove aplicações com intervalos de 15 dias, sendo utilizado como fonte de N o nitrato de amônio, e como fonte de K₂O o cloreto de potássio, que foi aplicado com intervalo de 45 dias em todas as parcelas, totalizando de 80 kg ha⁻¹ de K₂O. Para o acúmulo de massa verde, utilizou-se um quadrado de ferro com 1 m² de área, sendo colhidas três amostras por parcela, a 30 cm do nível do solo. Foi retirada uma subamostra para separação dos componentes morfológicos da forragem, obtendo-se as frações lâmina foliar (LF), colmo+bainha (CB) e material morto (MM), que foram pesadas verdes e colocadas em estufa a 55°C e posteriormente pesadas. Com exceção do MM, as frações LF e CB foram moídas e posteriormente foram realizadas as seguintes análises: fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA), nitrogênio total (NT), nitrogênio indigestível em detergente neutro por nitrogênio total (NIDN/NT) e nitrogênio indigestível em detergente ácido por nitrogênio total (NIDA/NT). A celulose (CEL) e hemicelulose (HEMI) foram estimadas por cálculo após as análises de FDN e FDA. As propriedades de ruptura (tensão, resistência à tração e energia de ruptura) de LF frescas e CB frescos foram mensurados em cinco perfis por parcela de cada tratamento, e medidos no Texturômetro TA.XT Plus, no qual a tensão de ruptura (Newton), resistência à tração (N mm⁻²) e energia de ruptura (mJ)

foram calculados. O efeito dos níveis de adubação nitrogenada foi avaliado por meio da equação de regressão. O efeito dos cortes, por sua vez, foi avaliado por meio do teste de Tukey ($P < 0,05$). Para análise dos componentes anatômicos foram coletadas três LF, cortadas em fragmentos em torno de 1 (um) cm na região mediana, e três CB divididos em CB base e ápice, depois acondicionados em vidros e fixados em formolaldeído+ácidoacético+álcool (FAA70%) e armazenados até o preparo histológico. Avaliou-se na LF a área da epiderme face adaxial (EPAda) e face abaxial (EPABA), esclerênquima (ESC), bainha parenquimática dos feixes vasculares (BPFV) e feixes vasculares (FV) e mesofilo (MES). No CB ápice e base, foram mensuradas as áreas da epiderme (EPI), xilema (XIL), floema (FLO), esclerênquima (ESC) e parênquima (PAR). Para anatomia foi analisado o efeito dos níveis de N por meio da equação de regressão, e foram considerados os valores médios de cada variável resposta no corte 1 (dezembro de 2012) e 5 (julho de 2013). O efeito dos cortes, por sua vez, foi avaliado através do teste de média. Também utilizou poster (ior tratamento com *Pleurotus ostreatus*, o fungo da podridão branca (FPB) no verão e inverno para avaliação do açúcar redutor (AR), da síntese de enzimas lignocelulósicas: manganês peroxidase (MnP), lacase (LAC) celulase (CEL) e xilanase (XIL) e monômeros da lignina: guaiacil (G), siringil (S) e hidroxifenil (H) e o aldeído fenólico isovanilina (I) tanto na LF e CB no verão e inverno. A ausência de nitrogênio e os três níveis de nitrogênio (150, 300 e 450 kg ha⁻¹ de N) representaram a parcela principal, e o pré tratamento com e sem fungo, as subparcelas com quatro repetições. O N, associado a fatores abióticos, pode ter efeitos positivos ou negativos na qualidade da forragem. Sendo que este propicia condições para a melhora da digestibilidade das plantas, por causa da possível alteração dos componentes formadores da parede celular. A lignina, FDN e FDA não devem ser avaliadas como componentes isolados para determinar a limitação da digestibilidade. A idade do corte aumenta ou diminui o efeito do nitrogênio no pasto, sendo mais acentuado nas estações em que os fatores abióticos são melhores. A adubação nitrogenada proporcionou condições para a redução da tração do capim-tanzânia, de forma correlacionada à composição da parede celular. O nitrogênio proporcionou aumento da área da planta, diminuindo com isso a sua rigidez, promovendo a melhoria da qualidade da forragem. Na anatomia do capim-tanzânia o nitrogênio ocasionou a diminuição das estruturas mais rígidas e de difícil digestão (XIL, ESC) tanto da lâmina foliar quanto do colmo+bainha. As características anatômicas se

correlacionam com a tensão de ruptura, principalmente as estruturas de lenta digestão. O efeito da época de corte é reduzido nas características anatômicas do capim-tanzânia quando se utiliza o manejo por interceptação luminosa. O nível de 450 kg ha⁻¹ de N apresentou resultados mais interessantes para melhora das propriedades do capim-tanzânia. A utilização de substratos que apresentaram maior teor de nitrogênio acelerou o seu crescimento e desenvolvimento, promovendo aumento do açúcar redutor (AR), da síntese de enzimas lignocelulósicas tanto na LF e CB, no verão e inverno. Menores teores do monômero G foram encontrados quando a adubação foi maior, na LF e no período do verão e com a utilização do fungo, tornando a hidrólise mais fácil e, portanto, liberando maior teor de celulose. O monômero I foi o que apresentou menores teores, em todos os tratamentos havendo, contudo a sua diminuição com os tratamentos com FPB tanto no CB quanto na LF. Unidades S tendem a ser mais raras que G, sendo que sua presença foi reduzida pela aplicação do N. O aumento dos níveis de nitrogênio promove maior desenvolvimento do FPB, ocasionando assim maior degradação do material lignocelulósico, por causa do aumento da produção das enzimas lignocelulósicas como manganês peroxidase e lacase. O aumento dos níveis de adubação nitrogenada ocasiona a diminuição dos monômeros, principalmente quando utilizado o FPB.

Palavras chave: adubação nitrogenada, anatomia, manejo de pastagem, monômeros da lignina, parede celular, *Pleurotus ostreatus*, propriedade de ruptura

GENERAL ABSTRACT

The experiment was carried out at the Iguatemi's Experimental Farm (FEI), located at latitude 23° 25 'S; 51 57 'O, and 550 meters, of the State University of Maringá (UEM), Maringá - PR. The experimental period was from November 2012 to September 2013, conducted in an area of Tanzania grass. The experimental area has a total of 800 m², divided into 16 paddocks with 50 m² each , in which it was allocated treatments with applications of nitrogen (N) and potassium (K₂O), placed according to the total amount to be applied, starting in November 2012, as: Absence of nitrogen; the lower dose (150 kg ha⁻¹ N) in three applications with 45 days interval each; 300 kg ha⁻¹ of N in 6 applications with 30 days interval each; and 450 kg ha⁻¹ N in 9 applications with 15 days interval each, being used as a source of N the ammonium nitrate, and a source of K₂O the potassium chloride, which was applied at 45 days interval on all plots, totaling 80 kg ha⁻¹ K₂O. For the accumulation of green mass it was use an iron square with 1 m², with three samples being taken per experimental unit at 30 cm from ground level. It was taken two forage samples to determinate the forage dry matter (DM), and to separate the foraging morphological components, obtaining the leaf blade fractions (LB), pseudostem (PS) and dead material (MM), which were weighed fresh and placed in an oven at 55 °C. Except for MM, the LB and PS fractions were milled. The following analyzes were performed: neutral detergent fiber (NDF), acid detergent fiber (ADF), total nitrogen (TN), neutral detergent insoluble nitrogen per total nitrogen (NDIN/TN) and acid detergent insoluble nitrogen per total nitrogen (NIDA/TN). The cellulose (CEL) and hemicellulose (HEMI) were obtained calculating the estimates of NDF and ADF. The properties of rupture (stress, tensile strength and rupture energy) of fresh leaf blade and fresh pseudostems were measured in five tillers per plot of each treatment, with the texturometer TA.XT Plus, in which the breaking strength (Newton), tensile strength (N mm⁻²) and rupture energy (mJ) were calculated. The effect of nitrogen

fertilization was evaluated using a regression equation. The effect of the cuts was evaluated using the Tukey test ($P < 0.05$). To analyze the anatomical components, it was cut three leaf blades into 1cm (one centimeter) pieces, in the middle region, and three pseudostems, divided into pseudostem base and apex, putted in glasses and fixed in FAA 70%, and stored until histological preparation. In leaf blade was evaluated the area of the adaxial epidermis (EPada) and abaxial (EPaba), sclerenchyma (SCL), vascular bundle sheath (VBS), vascular bundles (VB) and mesophyll (MES). In pseudostem apex and base were measured areas of the epidermis (EPI), xylem (XYL), phloem (PHL), sclerenchyma (SCL) and mesophyll (MES). To anatomy was evaluated the effect of the N by the regression equation in which it was considered the medium values of each variable response in the first (december of 2012) and fifth cut (july of 2013). The effect of the cuts was evaluated using the average test. Also it was used treatment with *P. ostreatus*, in summer and winter, to evaluate the reducer sugar (AR), the synthesis of lignocellulosic enzymes: manganese peroxidase (MnP), laccase (LAC) cellulase (CELA) and xylanase (XIL) and monomers of lignin: guaiacyl (G), syringyl (S) and hydroxyphenyl (H) and the phenolic isovanillin aldehyde (I) in the LF and CB. The absence of Nitrogen and the Nitrogen rates ($150, 300$ and 450 kg N ha^{-1}) represented the major plot, and pretreatment with and without fungus, subplots with four replications. Nitrogen when associated with abiotic factors, may have positive or negative effects on forage quality. The nitrogen provides conditions to improve the digestibility of plants due to a possible change of cell wall components. The lignin, NDF and ADF should not be evaluated isolate to determine the limitation of digestibility components. The age of the cut increases or decreases the effect of nitrogen on pasture, being more pronounced at stations where abiotic factors are better. Nitrogen fertilization provided conditions for reducing the traction of Tanzania grass, correlated to cell wall composition. Nitrogen increased the area of the plant, thereby decreasing its rigidity, further improving the quality of forage. In the anatomy of Tanzania grass, nitrogen reduced the most rigid and difficult to digest structures (XIL, ESC) both at the leaf blade as pseudostem. The anatomical characteristics correlated with the breaking strength, especially the structures of slowly digestion. The effect of cut age is reduced on the anatomical characteristics of Tanzania grass when using the light interception management. The amount of $450 \text{ kg ha}^{-1} \text{ N}$ had more interesting results to improved Tanzania grass properties. The use of substrates that showed higher nitrogen content accelerated its

growth and development, increasing the reducer sugar (AR) and the synthesis of lignocellulosic enzymes in both LF and CB, in summer and winter. Lower contents of the monomer G were found when the fertilizer was increased, in LF, in the summer period, and with the use of fungus, making it easier to hydrolysis and therefore freeing a higher content of cellulose. The monomer I showed the lowest concentrations in all treatments, and showed a decrease with treatments with FPB in CB and in LF. S units tend to be rarer than G, and its presence was reduced by N application. Increased levels of nitrogen promotes further development of the FPB, thus causing further degradation of lignocellulosic material, due to increased production of lignocellulosic enzymes as manganese peroxidase and laccase. Increased levels of nitrogen fertilization causes the decrease of monomers, especially when using the FPB.

Key words: anatomy, lignin monomers, nitrogen fertilization, pasture management, rupture properties, wall cell, white rot fungus.

INTRODUÇÃO

Na natureza, durante milhares de anos de convivência, herbívoros e plantas forrageiras passaram por um processo de coevolução, desenvolvendo múltiplas estratégias de sobrevivência, a ponto de serem mutuamente beneficiados com esse convívio. Assim, no que diz respeito às plantas, principalmente forrageiras, mudanças importantes em seus padrões de crescimento e alocação de recursos provém da resposta à presença dos animais, visando garantir sua sobrevivência e reprodução.

As pastagens constituem um dos principais ecossistemas do mundo, ocupando aproximadamente 25% da superfície terrestre e cerca de 70% de áreas agricultáveis (Dubeux Jr. et al., 2011). No Brasil, 200 milhões de hectares de áreas são cobertas por pastagens nativas e cultivadas, sob diferentes situações de clima e solo (Costa et al., 2010), destacando-se como importante sistema de produção do país.

Da mesma forma, por parte dos animais, alterações em seus padrões de deslocamento, preferência e ingestão surgem como resposta à espécie, estrutura, composição química e disponibilidade da forragem (Carvalho et al., 2009). Essas relações estão presentes na memória evolutiva dos animais, manifestando-se após milhares de anos e representando aos mesmos uma ferramenta essencial à sobrevivência da espécie.

A partir da presença dessa coevolução entre plantas e animais, observa-se também que essa interação pode acarretar em barreiras naturais, como observado por Carvalho et al. (2009), relacionadas à alimentação de bovinos com plantas forrageiras. Existem evidências na literatura de que não apenas a qualidade dessas plantas, mas também sua estrutura, possam representar a limitação ao consumo diário de forragem (Carvalho et al., 2009) ao influenciar a acessibilidade da mesma aos animais. No que diz respeito ao processo de ingestão de alimentos, é exigido pelo animal à manipulação da forragem

com o seu aparelho de corte (boca, dentes e língua), a fim de selecionar as partes mais nutritivas do pasto.

Portanto, as características biomecânicas como: a força de ruptura, resistência à tração e energia de ruptura, são variáveis que podem ser modificadas com a adubação nitrogenada, facilitando a colheita pelo animal em pastejo.

Um alto nível de seletividade geralmente resulta em maior qualidade de dieta do que a qualidade da forragem em oferta. Portanto, um importante fator de produção com forte impacto nas características estruturais, produção e qualidade da pastagem é a adubação nitrogenada.

Deve-se destacar também que os ruminantes podem utilizar a porção fibrosa de plantas forrageiras como fonte de energia. Porém, o aproveitamento da mesma como fonte de energia não pode ser considerado adequado caso significativa porção seja excretada pelo animal. Esta porção se atribui a lignina, um dos principais obstáculos a digestão da fibra, quando ligada aos carboidratos das paredes celulares (Jung et al., 1996).

O valor nutritivo e o desempenho animal, assim como a produção de forragem, são influenciados pela anatomia da folha. Os tecidos vegetais apresentam diferentes potenciais de digestão, relacionados à associação entre a proporção de tecidos, medida em seções transversais de lâminas foliares (LF) e colmo+bainha (CB), e o valor nutritivo de gramíneas forrageiras (Queiroz et al., 2000). O tipo de arranjo das células nos tecidos, a proporção de tecido e espessura da parede celular desempenham papel importante quando se trata da digestão de gramíneas forrageiras, podendo ser considerado ainda mais relevante que a composição da parede celular (Wilson e Mertens, 1995).

Ainda, deve-se analisar a estrutura da planta como fator de diferenciação para a apreensão tanto qualitativa e quantitativa de nutrientes. A qualidade da forragem é geralmente mais elevada em lâminas foliares do que em colmo+bainha e é geralmente aceito que os animais selecionam lâminas foliares e evitam colmos+bainha (Hodgson et al., 1994). A relação dos tecidos das plantas com a adubação nitrogenada se dá pelo incremento da densidade de plantas e redução da rigidez de colmo e lâminas foliares que o nitrogênio proporciona para o mesmo estágio fenológico de desenvolvimento em plantas de gramíneas tropicais.

Outro aspecto ainda pouco estudado, mas que pode contribuir para melhor aproveitamento da forragem pelo animal, aumentando a qualidade da forragem, é a utilização do fungo *Pleurotus ostreatus* (fungo da podridão branca) como agente degradante da lignina.

A lignina é um heteropolímero fenólico derivado principalmente de três monolignóis: *p*-cumaril, coniferil e sinapil, cuja quantidade e composição variam entre espécies de plantas, tipos celulares e pelas camadas da parede celular, podendo ser influenciadas pelo desenvolvimento das plantas e fatores abióticos. Os fungos utilizam alguns polímeros como fonte nutricional, a partir de mecanismos enzimáticos apropriados para transformar moléculas complexas em compostos simples pela sua habilidade de deslignificação seletiva.

Apesar da crescente busca pela utilização de fungos em resíduos agroindustriais, por causa da incessante demanda das atividades agrícolas, a utilização destes para melhoria da qualidade de alimentos utilizados na nutrição de ruminantes são limitados (Menezes et al., 2009). Sabe-se, contudo, que a utilização do fungo como pré-tratamento em forrageiras pode ser a alternativa sustentável para redução da proporção do material lignocelulósico na planta.

Portanto, objetivou-se com este trabalho estudar o efeito da adubação nitrogenada sobre a lâmina foliar e colmo+bainha do *Panicum maximum* cv. Tanzânia, nas estações primavera/verão e outono/inverno e sua influência direta e indireta na qualidade da forragem, pela modificação das características anatômicas, biomecânicas e nutritivas. Em outro trabalho separado, objetivou-se analisar a utilização do fungo *Pleurotus ostreatus* (fungo da podridão branca) como pré-tratamento para o *Panicum maximum* cv. Tanzânia, seu efeito na quantidade de material lignocelulósico, na caracterização monomérica da lignina e sua relação com a adubação nitrogenada.

Este trabalho demonstra sua importância por investigar além da adubação nitrogenada, incluindo nas análises o efeito do fungo em variáveis comumente utilizadas para avaliar a qualidade da forrageira, além da inserção de variáveis pouco estudadas (anatomia e biomecânicas). Sendo a lignina um dos maiores limitantes do valor nutritivo de forragens, a investigação da sua composição monomérica caracterização da influência dos níveis de nitrogênio e do fungo sobre os monômeros pode descortinar novas aplicações e possibilidades para aumento da qualidade nutricional do capim-tanzânia.

1.1 *Panicum maximum* Jacq. cv. Tanzânia

A espécie *Panicum maximum* é originária da África e foi introduzida nas Américas provavelmente no final do século XVIII, acidentalmente, quando era usada como cama nos navios negreiros que traziam escravos para o Brasil, vindos do Oeste do continente Africano (Jank, 1994). Posteriormente, ocorreu a dispersão pelo vento, pássaros e seres humanos em diversas regiões do país.

O capim-tanzânia (*Panicum maximum* Jacq. cv. Tanzânia-1) foi coletado pelo *Office de la Recherche Scientifique et Technique d'Outre-Mer* (ORSTOM) em Korogwe, na Tanzânia. Foi avaliado em diversas condições, após longo trabalho de seleção, coordenado pela Embrapa Gado de Corte, em Campo Grande/MS e lançado comercialmente em 1990 (Jank, 1994).

Trata-se de uma planta cespitosa com altura média de 1,3 m em crescimento livre e lâminas foliares curvadas com largura média de 2,6 cm. Os colmos são arroxeados com lâminas e bainhas glabras sem cerosidade. As inflorescências são do tipo panícula, com ramificações primárias longas, e secundárias longas apenas na base. As espiguetas são arroxeadas, glabras e uniformemente distribuídas e o vertículo glabro (Savidan et al., 1990).

Esta cultivar tem demonstrado grande aceitação por técnicos e produtores, decorrente do seu elevado potencial de produção (Penati, 2002) e qualidade da forragem, geralmente superior ao das braquiárias (Euclides et al., 1995). Estas características proporcionam altas taxas de lotação e altos ganhos de peso pelos animais em pastagens quando a fertilidade do solo e o manejo são adequados às exigências do cultivar.

1.2 Nitrogênio

É considerado o elemento mais abundante na atmosfera terrestre, na qual a maior quantidade está na litosfera e a menor nos solos terrestres na forma de matéria orgânica ou amônio (Stevenson, 1982).

A principal forma de nitrogênio disponível no solo é o nitrato (NO_3^-) (Raij, 1991). Os fatores abióticos (fertilidade do solo, fotoperíodo, luminosidade, precipitação e temperatura) influenciam diretamente na utilização do nitrogênio disponível.

Uma das principais causas da redução na produção vegetal de pastagens de gramíneas em monocultura, ao longo do tempo, é a baixa disponibilidade do nitrogênio para as plantas em virtude da alta razão carbono:nitrogênio (C:N) dos resíduos (palha e raízes) reciclados no solo. Ao se decompor, esses resíduos provocam imobilização do nitrogênio e produzem no solo compostos orgânicos mais recalcitrantes e de mineralização mais lenta.

Portanto, um fator decisivo na produtividade e na qualidade dos pastos é a adubação, principalmente a nitrogenada, diminuindo assim a razão C:N. Um manejo eficiente poderá aumentar o aporte de nitrogênio aos sistemas de produção de pastagens, equilibrando suas transformações nos diferentes compartimentos do elemento no solo e garantindo a sustentabilidade desses sistemas.

Segundo Pereira (2009), a não disponibilidade deste nutriente constitui um dos principais fatores limitantes do crescimento das plantas. Isto, pelo fato do nitrogênio ser o componente essencial de aminoácidos e proteínas, ácidos nucleicos, hormônios e clorofila, dentre outros compostos orgânicos essenciais à vida das plantas. Assim, o nitrogênio tem grande efeito pela estreita relação entre a sua disponibilidade e o aumento de biomassa.

O aumento do suprimento de nitrogênio no solo, por meio da fertilização, é uma forma de incrementar a produtividade das pastagens, principalmente quando a forrageira considerada, como é o caso do capim-tanzânia, responde eficientemente à aplicação de nitrogênio.

A ação do nitrogênio sobre o crescimento da gramínea ocorre por estimular a divisão celular (Costa et al., 1992), o perfilhamento e a formação de novas lâminas foliares (Gomide, 1989) gerando renovação das plantas, aumentando a porção de lâminas e colmos jovens. Isto sugere que há relação indireta entre a adubação nitrogenada e fatores como a resistência a tração e tensão da gramínea, visto que estas duas últimas variáveis tendem a diminuir em plantas mais jovens e menos lignificadas.

Conseqüentemente, plantas com maior amadurecimento possuem maior teor de lignina, fibra detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA), conforme

demonstrado por Devasena et al. (1994), quando avaliaram os efeitos do estágio de crescimento sobre a composição química e a digestibilidade do capim-colonião.

Diversas pesquisas demonstram que a ação do nitrogênio impacta especialmente a digestibilidade. Barros et al. (2002) e França et al. (2007), ambos trabalhando com o capim-tanzânia, observaram aumento da digestibilidade *in vitro* à medida que se aumentaram os níveis de nitrogênio.

1.3 Fatores ambientais e interceptação luminosa

Como a maioria das forrageiras tropicais, o capim-tanzânia apresenta estacionalidade de produção, tendo maior acúmulo de massa na época em que há disponibilidade hídrica, temperatura e luminosidade favoráveis, características de estações mais quentes. Segundo Marshal (1987), a produção de massa seca do dossel manejado intensivamente, com suprimentos adequados de água e nutrientes, é determinada pela eficiência com que as lâminas foliares interceptam a luz e a utilizam na assimilação de carbono.

A utilização ótima da luz solar incidente foi proposta por Warren Wilson (1961) como sendo aquela que ocorre quando as plantas do dossel fechado recebem luz de intensidade uniforme e relativamente baixa, com as lâminas foliares basais permanecendo no ponto de saturação luminosa. Essa situação hipotética poderia existir, ao menos teoricamente, por meio do arranjo espacial adequado de uma área foliar apropriada.

Silva e Pedreira (1997) relataram que o desenvolvimento do conceito de índice de área foliar (IAF) por Watson, em 1947, possibilitou a racionalização e melhor entendimento das relações entre interceptação luminosa (IL) e o acúmulo de matéria seca (MS) nas plantas. Em valor de IAF chamado “ótimo”, a interceptação de aproximadamente toda a luz incidente, com o mínimo de auto sombreamento, proporcionaria o máximo valor de taxa de acúmulo de forragem (acúmulo de massa seca por unidade de área, por unidade de tempo) (Rhodes, 1973). O valor de IAF que proporciona 95% de IL, no qual o valor da taxa de acúmulo de forragem está próximo do máximo, é definido como IAF crítico. Abaixo do IAF ótimo, as taxas de acúmulo são dependentes do IAF e são reduzidas quando a IL é incompleta, enquanto, acima do

IAF ótimo, a redução nas taxas de acúmulo é causada pelo aumento das perdas respiratórias, consequência do sombreamento excessivo, que resulta em balanço negativo de carbono (Hay e Walker, 1989).

Estudos têm demonstrado que plantas de clima tropical apresentam o mesmo padrão de acúmulo de forragem durante a rebrotação que aquelas de clima temperado e, nesse caso, com a IL de 95% se obtém forragem de melhor qualidade (Barbosa et al., 2007; Carnevalli et al., 2006). Assim, fica evidente a importância da estrutura do dossel como determinante e condicionante na otimização e utilização mais eficiente das forrageiras tropicais.

1.4 Qualidade nutricional

As forrageiras tropicais, em consequência da estacionalidade da produção, não fornecem quantidades homogêneas de nutrientes durante as estações do ano para a produção dos animais, observando na época da “seca” menor disponibilidade destes nutrientes e baixa qualidade nutricional (Euclides e Medeiros, 2003).

A determinação da composição bromatológica e da digestibilidade das frações que compõem a planta forrageira auxiliam na determinação do desempenho animal em sistemas de produção de ruminantes. As gramíneas forrageiras tropicais, como é o caso do capim-tanzânia, devem ser melhor avaliadas e detalhadas em relação às suas qualidades nutricionais, principalmente no que se diz respeito à composição bromatológica, como forma de encontrar alternativas para otimizar sua qualidade. Por causa das variações durante o ano e no estágio de desenvolvimento do capim-tanzânia, o estudo da qualidade da planta ao longo das estações do ano é importante.

Deve-se destacar que em pastejo, o efeito da seletividade também assume importância fundamental, pois influencia diretamente a qualidade da dieta do animal. Além disso, a composição de nutrientes da forrageira é muito mais variável do que qualquer outro alimento, porque esta é influenciada pela espécie e cultivar, pelas propriedades químicas e físicas do solo, pelas condições edafoclimáticas, pelo estágio fisiológico e pelo manejo que é aplicado. Assim, a produtividade da pastagem é determinada pela atuação concomitante dos fatores descritos acima, e a resposta irá variar para cada espécie a tais fatores (Euclides e Medeiros, 2003).

As gramíneas tropicais absorvem o CO₂ do meio via o ciclo C4. Essas plantas são caracterizadas por apresentarem altas taxas de crescimento. Assim, com o avanço da idade fisiológica, perdem qualidade mais rapidamente, quando comparadas às plantas que predominam em países de clima temperado que possuem o sistema absorção do CO₂ denominado C3 (Van Soest, 1982).

O objetivo de estudos sobre este tópico é maximizar o consumo de matéria seca no sistema de produção, e este consumo pelos animais em pastejo é o ponto chave para a definição do balanceamento de dietas visando o maior desempenho animal, uma vez que permite: formular rações, prever o desempenho e estimar a demanda de alimentos ou exigências (Mertens, 1994).

A utilização da adubação é uma das estratégias atualmente utilizadas para minimizar essas variações na qualidade e proporcionar aumento de produção e produtividade (Balsalobre et al., 2003) ao longo de todo o ano.

A adubação nitrogenada tem influência sobre o valor nutritivo das forrageiras, promovendo variações na composição química da massa seca das plantas (França et al., 2007). Para Cecato et al. (2001), o nitrogênio proporciona aumento nos teores de PB, e redução nos teores de FDN e FDA na MS da forragem produzida, porém nem sempre esse efeito ocorre, podendo variar com a época de aplicação do adubo nitrogenado.

Logo, a digestibilidade da fibra é importante fator que influencia o consumo de massa seca. A fibra indigestível pode ocupar o trato digestório tomando a capacidade do rúmen e, conseqüentemente, reduzindo o espaço ruminal e o consumo de massa seca (Thiago e Gill, 1990).

O valor energético da forragem pode ser determinado pela digestibilidade da matéria orgânica e depende principalmente do grau de lignificação da parede celular (Paulino et al., 2000). Com a maturidade da planta, ocorrem mudanças na sua composição química (Balsalobre et al., 2001).

A digestão das forragens em ruminantes está relacionada, portanto, com a distribuição da lignina nas células, a proporção entre carbono e nitrogênio e a população microbiana do rúmen. À medida que a planta amadurece, os componentes digestíveis como proteínas, carboidratos solúveis e o fósforo, tendem a decrescer e a proporção de lignina, celulose, hemicelulose, cutina e sílica aumentam, fazendo com que a digestibilidade seja reduzida (Euclides et al., 1995; Paulino et al., 2000). O estágio de

desenvolvimento da forragem influencia diretamente a composição química e a digestibilidade das mesmas (Reis e Rodrigues, 1993).

1.5 Anatomia da forragem

Estudos sobre a associação entre a proporção de tecidos de lâminas foliares e o valor nutritivo de gramíneas forrageiras datam da década de 1970 (Akin e Amos, 1975). Este valor nutritivo das gramíneas pode ser avaliado por meio de análises químico-bromatológicas. Nos últimos anos, estudos sobre o arranjo e a proporção dos tecidos têm se aliado às determinações do valor nutritivo para elucidar o potencial de digestibilidade das plantas (Queiroz et al., 2000; Paciullo et al., 2002; Alves de Brito et al., 2004).

Para Wilson (1997), a estrutura anatômica de gramíneas do tipo C4, que é composta por elevadas proporções de feixes vasculares, esclerênquima e bainha parenquimática dos feixes, compromete o valor nutritivo destas plantas.

Segundo Lempp (2007), tecidos que compõem as lâminas foliares apresentam digestibilidade diferentes entre si. As células do mesofilo e células do floema, que possuem parede celular delgada, são digeridas mais rapidamente (Akin et al., 1973; Chesson et al., 1986). Por outro lado, as células da epiderme e da bainha parenquimática dos feixes apresentam digestão lenta e parcial (Akin, 1989). Por fim, o esclerênquima e o xilema, que possuem parede celular espessa e lignificada, são pouco digeridos (Akin, 1989; Wilson, 1993). A degradação dos tecidos presentes nas diferentes estruturas diminui com a idade da planta, com exceção da bainha foliar. Isso se deve à presença do parênquima, que faz com que a bainha foliar tenha sua área de degradação aumentada (Brito et al. 1999).

A bainha do feixe vascular (BFV) exerce papel importante na nutrição de ruminantes, pois possui alto teor de proteína e amido, nas gramíneas tropicais que apresentam anatomia *Kranz*. Para Lempp et al. (2009), entretanto, a parede celular pode sofrer lignificação, e grande parte dessas células pode deixar o rúmen sem que ocorra a degradação. O envelhecimento das plantas acarreta em espessamento e lignificação das paredes celulares, principalmente na região dos feixes vasculares. Para Rodella (1982), maiores quantidades de tecidos vasculares lignificados e esclerenquimáticos proporcionam menores taxas de digestibilidade. Devido a isso, Paciullo et al. (2001)

defendem o estudo anatômico de lâminas foliares, por estas se relacionarem diretamente com o potencial nutritivo das forrageiras.

Paciullo et al. (2001) relataram correlações positivas entre características de valor nutritivo e a proporção de tecidos em lâminas foliares. Ainda, as observações da localização de compostos secundários e do arranjo dos tecidos auxiliam na explicação do desempenho animal (Gomes et al., 2009). Existe forte relação entre anatomia foliar e características morfofisiológicas nas lâminas foliares, como largura, área foliar e área foliar específica.

Técnicas de microscopia podem ser utilizadas para analisar as diferenças anatômicas das plantas, os sítios de lignificação e os fatores que influenciam a degradação dos tecidos vegetais pelos microrganismos do rúmen. Esta análise pode auxiliar na determinação do valor nutricional de plantas forrageiras (Akin et al., 1974; Van Der Heijden et al., 1995; Engels, 1996; Travis et al., 1997).

1.6 Variáveis biomecânicas

O consumo de matéria seca digestível é o principal fator que afeta o bom desempenho de ruminantes (Poppi et al., 1994; Illius, 1997). Da mesma forma, a ingestão de forrageiras está intimamente relacionada com suas propriedades mecânicas de fratura (Evans, 1964; Choong et al., 1992; O'reagain, 1993; Inoue et al., 1994). Estudos têm abordado as propriedades de fratura e tensão durante o estágio vegetativo de gramíneas, especialmente de clima temperado (Vincent, 1991; Greenberg et al., 1989; Wright e Illius, 1995; Zhang et al., 2004) e sua correlação com o consumo das mesmas.

Gramíneas C₄ apresentam alongamento contínuo de colmo em ambientes tropicais (Pedreira et al., 2005), resultando em relação lâmina:colmo relativamente baixas comparado com pastagens de clima temperado. Portanto, a força necessária para fraturar partes da planta é geralmente mais elevada em espécies de plantas tropicais que nas temperadas (Zhang et al., 2004).

Em pastos com a inferior dominada por colmo+bainha e a estrato superior dominada por lâminas foliares, o estrato inferior pode formar uma barreira vertical reduzindo a profundidade do bocado (Flores et al., 1993; Benvenuti et al., 2006). Quando as lâminas foliares e colmo+bainha são misturados dentro da estrato de pastejo,

o colmo+bainha pode atuar como barreira horizontal reduzindo a área do bocado com o aumento da densidade do colmo (Benvenuti et al., 2006; Drescher et al., 2006).

A qualidade da dieta aumenta quando a resistência é dividida entre lâminas foliares e colmo+bainha, visto que este último apresenta menor qualidade do que as lâminas foliares. Ainda, os animais buscam por colmo+bainha macios, e evitam colmo+bainha duros (Benvenuti et al., 2006), o que induz à teoria de que menor tensão resulta em maior consumo.

No entanto, estudos sobre pastos simulados com *Panicum maximum* têm mostrado que o comportamento seletivo dos animais varia, mais especificamente, de acordo com a resistência à tração do colmo+bainha (Benvenuti et al., 2006). Os estudos citados permitem novas perspectivas para o entendimento do processo de pastejo por bovinos em pastagens constituídas de espécies tropicais.

Jacobs et al. (2011) quantificaram e compararam as propriedades de fratura de tensão de colmos+bainhas e lâminas foliares de sete espécies de gramíneas tropicais (*Cenchrus ciliaris*, *Chloris gayana*, *Digitaria milaniana*, *Megathyrsus maximus* (*Panicum maximum*), *Setaria sphacelata* e *Setaria* e *Dichanthium sericeum*), em vários estágios fenológicos e concluíram que diferenças de tensão de ruptura e energia de ruptura entre as espécies foram resultado da área do corte transversal das plantas.

1.7 Parede celular

A parede celular vegetal é a estrutura altamente organizada, forte, rígida e quase impenetrável (Scheller e Ulvskov, 2010), disposta na parte externa da membrana plasmática das células vegetais, com função principal de proteger e estruturar as células e tecidos vegetais (Doblin et al., 2010).

Sua rigidez, decorrente da forma e arranjo arquitetural de microfibrilas de celulose, é uma importante adaptação ocorrida pela evolução das plantas terrestres, permitindo sua verticalização (Niklas, 1989). Entretanto, a parede celular é dinâmica e metabolicamente ativa, permitindo a troca de materiais e sinais entre as células (Scheller e Ulvskov, 2010).

É composta principalmente por polissacarídeos, proteínas e compostos como a lignina, celulose e hemicelulose (Showalter, 1993), cujas concentrações dependem da espécie, tipo, idade, órgão e região na parede celular em uma única célula (Carpita e

Gibeaut, 1993). A celulose e a lignina são os polímeros mais abundantemente distribuídos na terra, levando os estudos das características da parede celular a terem implicações mais amplas do que apenas relacionadas à boa nutrição animal (Wilson, 1994).

Grande parte da energia proveniente da fotossíntese é destinada à síntese, montagem e remodelamento da parede celular (Reiter, 2002; Scheible e Pauly, 2004). O crescimento da planta, os estresses bióticos e abióticos podem alterar a forma da parede celular, sua composição e propriedades (Peaucelle et al., 2012).

A parede celular é categorizada em dois grupos: a parede celular primária e secundária, cuja distinção se deve basicamente pelas suas composições químicas e período em que surgem no decorrer do desenvolvimento celular (Albersheim et al., 2010). A parede primária aparece ao longo da divisão celular e aumenta a área de superfície durante o crescimento da célula, enquanto a parede secundária surge na diferenciação celular, na parte interna da primária (Carpita e Maccann, 2002; Evert, 2006).

O espessamento da parede celular secundária é o processo decorrente da deposição de lignina, com aumento da resistência da parede. Contudo, esta característica, importante para a sobrevivência da planta, muitas vezes é responsável pela limitação de energia quando ingeridas por ruminantes (Wilson, 1994).

A celulose é o principal polissacarídeo componente estrutural da parede celular da planta, e serve como suporte para a ligação de outros componentes (Lerouxel, 2006), de fórmula geral $(C_6H_{10}O_5)_n$ (Fengel e Wegener, 1989). As cadeias de celulose formam ligações de hidrogênio intramoleculares e intermoleculares, responsáveis pela rigidez das cadeias, elevada resistência à tensão, insolubilidade em grande número de solventes e explicam, em parte, sua resistência à degradação microbiana (Ramos, 2003).

As microfibrilas de celulose são envoltas em uma matriz de polissacarídeos não celulósica, composta principalmente de hemicelulose e substâncias pécticas, que unem as microfibrilas, mantendo-as juntas lado a lado (Castro, 2005). As hemiceluloses são formadas por unidades monossacarídicas, como pentoses (D-xilose, L-arabinose e L-ramnose), hexoses (D-glicose, D-manose e D-galactose) e ácidos urônicos (ácido 4-O-metilglicurônico e ácido galacturônico) (Ramos, 2003).

A hemicelulose é mais susceptível à hidrólise ácida do que a celulose, por causa do caráter relativamente amorfo (Pitarelo, 2007). Ainda, são impedidas de formar

agregados fibrilares, como ocorre na celulose, em virtude das características estruturais (Castro, 2005).

A lignina é a macromolécula que está presente na parede celular e nos espaços intercelulares na forma de rede polimérica tridimensional não cristalina (Fengel e Wegner, 1989) (Figura 1).

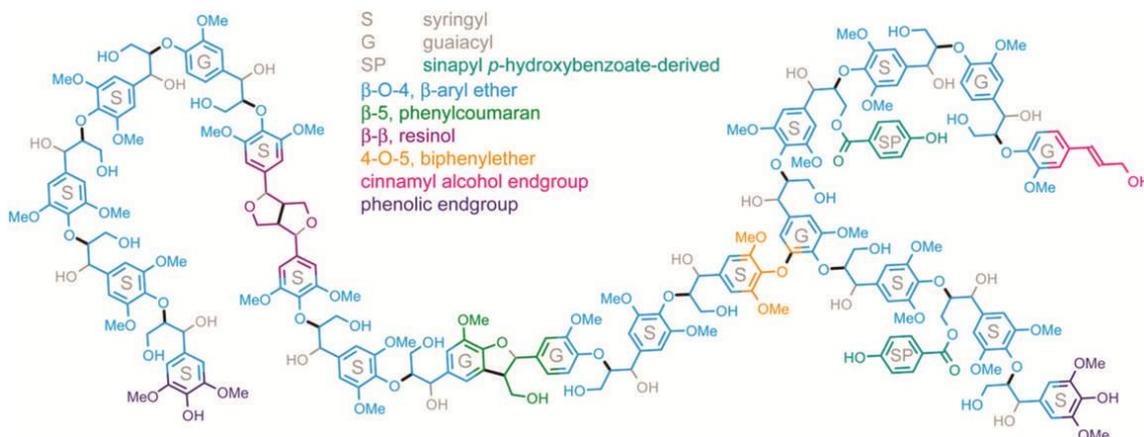


Figura 1. Representação de um polímero de lignina, como previsto a partir da análise de lignina baseado ressonância magnética nuclear (RMN) (adaptado de STEWART et al., 2009).

A lignina é o segundo material biológico mais abundante no planeta, superado apenas pela celulose, composta por 15-25% do peso seco de plantas lenhosas. Esta macromolécula desempenha papel vital no apoio mecânico e ligamento das fibras vegetais (Sjöström, 1993).

Está presente nos órgãos que necessitam de maior aporte de força, como o colmo. Portanto, a lignina é encontrada principalmente nos vasos condutores de seiva bruta, elaborada e no esclerênquima (Tronchet et al., 2010).

Logo que o desenvolvimento celular estabiliza se dá o início ao processo de lignificação, sendo iniciado pelos vértices da célula, prosseguindo através da lamela média, parede primária para a parede celular secundária (Wilson, 1994). Segundo Van Soest (1994), pode ocorrer variação no processo de lignificação nas plantas pela resposta ao estresse ambiental e nutricional.

Durante o desenvolvimento das células, ela é incorporada como último componente da parede, interpenetrando as fibrilas, garantindo a integridade estrutural, rigidez e resistência aos tecidos lignificados (Vanholme et al., 2010) processo que se denomina lignificação.

Para Sarkanen e Ludwig (1971), que apresentam a lignina do ponto de vista evolucionário, a capacidade de sintetizá-la fornecendo rigidez para o colmo e redução da transpiração para o ambiente, permitiu que os vegetais conquistassem o ambiente terrestre.

A lignina apresenta estreita relação com os carboidratos da parede celular e é considerada responsável por fornecer revestimento protetor da estrutura celulose-hemicelulose. Este fator promove forte barreira física contra a entrada de microrganismos (Boudet, 2007).

No entanto, em perspectiva botânica, a estrutura molecular deste polímero pode se diferenciar entre as células e até dentro da própria parede celular, respondendo aos fatores abióticos e bióticos do ambiente (Campbell e Sederoff, 1996; Tronchet et al., 2010). A lignina permite que a água e os sais minerais sejam transportados pelo xilema sob pressão negativa, sem que ocorra ruptura deste tecido, oferecendo ainda suporte mecânico para as plantas (Jones et al., 2001).

1.8 Caracterização monomérica da lignina

Lignina é heteropolímero fenólico, que é **derivada** principalmente de três álcoois hidroxicinamoil (monolignóis), diferentes entre si a partir do grau de metoxilação (*p*-cumaril, coniferil e sinapil). Os monolignóis produzem, respectivamente, as unidades *p*-hidroxifenil (H; não metoxilado), guaiacil (G; monometoxilado) e siringil (S; di-metoxilado), quando são incorporados ao polímero da lignina (Boerjan et al., 2003). A lignina pode variar na quantidade e composição por táxons, tipos celulares e pelas camadas da parede celular, sendo influenciada pelo desenvolvimento e por fatores ambientais.

A lignificação se dá pela junção combinatorial dos monolignóis oxidados/desidrogenados, mediadas por oxidases da parede celular que transformam os monolignóis (os álcoois *p*-coumaril, coniferil e sinapil) em radicais livres. As oxidases atuantes na lignificação podem ser independentes (lacases) ou dependentes (peroxidases) de H₂O₂ (Karlsson et al., 2005). Esta última catalisa a oxidação dos monolignóis, utilizando o H₂O₂ comoceptor de elétrons (Chen et al., 2002), sugerindo que a formação da lignina pode ser induzida pelo suprimento de H₂O₂.

Apesar de haver exceções, a lignina de plantas angiospermas consiste geralmente de unidades G e S, com traços de unidades H. No entanto, a lignina da gimnospermas é composta por mais de 90% por unidades G, e de pequenos níveis de H. As monocotiledôneas possuem unidades G e S em níveis semelhantes e maior quantidade de H, em comparação às dicotiledôneas (Boerjan et al., 2003).

Há uma vasta quantidade de ligações entre os monômeros de lignina, como 8-O-4, 8-5, 8-8, 4-O-5 e 5-5. A primeira é considerada estrutura não condensada, enquanto as outras são consideradas ligações condensadas. Nos processos de polpação e branqueamento na produção de papel, plantas com grande teor de unidades S sugerem ser mais interessantes que plantas com grande teor em unidades G, visto que as ligninas das angiospermas são menos condensadas e necessitam de menor quantidade de químicos, em relação às ligninas das gimnospermas (Higuchi, 2006).

Akin e Chesson (1989) verificaram melhor degradabilidade em lignina rica em unidades S (siringaldeído e o ácido siríngilico) em oposição àquelas ricas em unidades G (vanilina, ácido vanílico e ácido ferúlico). De forma semelhante, Saliba (1998) verificou que compostos guaiacílicos influenciaram mais na degradação da parede celular que os siríngílicos, quando na análise de palhas de milho e de soja. A vanilina e siringaldeído são compostos provenientes da oxidação de guaiacil (álcool coniferil) e siringil (álcool sinapil), respectivamente (Sun et al., 2001).

Lopez-Malo *et al.* (1997) identificaram que a vanilina pode ser utilizada como agente antimicrobiano, útil para a prevenção da degradação de alimentos por fungos, atividades que necessitem da preservação como a estocagem.

Fitzgerald *et al.*, (2003) também estudaram o efeito da vanilina sobre a deterioração de alimentos, constatando que o álcool vanilil é o principal produto formado durante a bioconversão de vanilina. Ainda, concluíram que o efeito antimicrobiano da vanilina pode estar relacionado aos processos vitais da célula, podendo ser diretamente pela inibição das enzimas oxi-redutases ou indiretamente pela inibição das vias que geram os cofatores reduzidos necessários para estas enzimas.

As expressões “*core*” e “*não core*” têm sido utilizadas para referenciar tipos de lignina (Jung e Deetz, 1993) cuja primeira corresponde aos polímeros fenilpropenoides da parede celular, muito condensados e extremamente resistentes à degradação, compostos de unidades H, G e S, em proporções diferentes de acordo com sua origem.

No entanto a lignina *não core* se trata de compostos de baixo peso molecular liberados da parede por hidrólise, composta pelos ácidos *p*-cumárico, ferúlico e seus oligômeros. Estes ácidos podem estar ligados à lignina *core*, aos polissacarídeos da parede ou aos dois simultaneamente (Jung, 1989).

1.9 Fungo da podridão branca: *Pleurotus ostreatus*

Entre os fungos basidiomicetos estão: *Pleurotus ostreatus*; *Panus tigrinus*; *Irpex lacteus*; *Bjerkendera adusta*; *Trametes versicolor*; *Fomes fomentarius*; *Ganoderma applanatum*; *Lepista nuda*; *Phanerochaete chrisosporium* e *Agaricus bisporus*. Os *Pleurotus ostreatus* são basidiomicetos heterotróficos, dependentes de fontes nutricionais extracelulares, como carbono e nitrogênio, necessitando se associar a plantas ou segregar enzimas extracelulares.

Os basidiomicetos contêm enzimas que degradam polissacáridos, lignina, amido, pectina, celulose e proteínas (Carlile e Watkinson, 1994), e possuem papel fundamental na degradação de resíduos lignocelulósicos. Segundo Zdražil et al., (1982), estes fungos já eram conhecidos tradicionalmente por tribos indígenas da América do Sul com o objetivo de aumentar o valor nutricional de alimentos lignocelulósicos.

A obtenção de elementos como carbono e nitrogênio, a partir da degradação de elementos pelo fungo, torna-os ferramentas na reciclagem de subprodutos energéticos, (Rabonato, 2013). Assim, é interessante a alternativa do emprego de fungos para a conversão de biomassa de derivação agrícola.

Por sua fácil disponibilidade e baixo valor comercial, o fungo *Pleurotus ostreatus* tem sido usado com o intuito de viabilizar o processo e torná-lo altamente econômico, como fonte potencial das enzimas lacase e manganês peroxidase (MnP).

Este fungo também tem sido estudado com a finalidade de ser degradador de diferentes tipos de substratos (Sales-Campos et al., 2010), por causa das enzimas celulase, ligninase, celobiase, lacase e hemicelulase, encontradas em seu metabolismo (Donini et al., 2006), que possibilita a utilização desse fungo em numerosas aplicações industriais (Alexandrino et al., 2007).

O *Pleurotus ostreatus*, conhecido como o fungo de podridão branca, evoluiu com a capacidade de quebrar lignina, que é o componente mais recalcitrante das paredes celulares de plantas, em CO₂ (Sanchez, 2009). Esta capacidade de degradação se deve a

forte atividade oxidativa e baixa especificidade de suas enzimas ligninolíticas com substrato.

1.9.1 Lacase

O grupo das lacases (benzenodiol: oxigênio oxidoredutase) é um dos mais antigos a ser citado na bibliografia (Yoshida, 1883), e pertence aos polifenóis oxidases que contêm cobre na sua estrutura e catalisam a oxidação de uma série de substâncias inorgânicas e aromáticas (particularmente fenóis) com a concomitante redução do oxigênio molecular (O_2) a água (H_2O) (Xu, 1997).

A lacase é abundante nos fungos basidiomicetos, capaz de degradar a lignina (Srebotnik *et al.*, 2000), possibilitando a oxidação de compostos por sua ação catalítica (Piontek *et al.*, 2002).

As lacases atuam na morfogênese fúngica (formação de carpóforos), conideogênese, cor e biossíntese de melanina (Thurston, 1994), além de serem associadas ainda ao desenvolvimento de algumas patogêneses, como se verifica em *Botrytis cinerea* e *Cryphonectria parasitica* (Thurston, 1994).

Esta enzima é uma polifenol oxidase caracterizada como multicobre-oxidases, por conter 4 átomos de cobre, que realiza a oxidação do substrato pela abstração do elétron do composto fenólico, gerando o radical fenoxila, agindo na clivagem das cadeias laterais e anéis aromáticos das porções fenólicas da lignina.

Não são dependentes de H_2O_2 , atuando com o íon cobre (Cu^{+2}) removendo o fenilpropano mais externo à cadeia, gerando radicais fenoloxila, que atuam em reações catalíticas.

Os mais eficientes produtores de lacase são os basidiomicetos, que possibilitam a degradação de madeira, além da possibilidade de oxidar diferentes substratos (SZKLARZ *et al.*, 1989). O seu pH ótimo de atividade pode variar entre 2,5 a 3,5 ou de 6 a 7.

Durante muitos anos a atuação da lacase na degradação da lignina foi entendida como limitada à oxidação de unidades fenólicas, mas foi demonstrado que a lacase também oxida unidades não fenólicas na presença de alguns compostos, conhecidos como mediadores, que incluem substratos artificiais e metabólitos fúngicos (Eggert *et al.*, 1996).

Por estes fatores as lacases têm sido fruto de pesquisas e vêm ganhando atenção em diversas aplicações industriais como a produção de etanol, modificação de fibras da madeira, clareamento de corantes em processos têxteis, síntese de produtos químicos/medicinais e remediação de solos e águas contaminadas (Ferreira, 2009).

1.9.2 Manganês peroxidase

A manganês peroxidase (MnP) é uma enzima extracelular que tem como substrato redutor o Mn^{+2} , que é oxidado a Mn^{+3} , que oxida estruturas fenólicas a radicais fenoxi (Gold, 1989). O oxalato e outros compostos dicarboxílicos formam quelatos, associados ao Mn^{+2} e Mn^{+3} , e possuem papel importante na oxidação dos compostos aromáticos (Moreira *et al.*, 1998).

Trata-se de uma glicoproteína dependente de peróxido de hidrogênio e da disponibilidade de íons de manganês para a oxidação de lignina. A MnP possui a capacidade de oxidar grande quantidade de compostos de lignina agindo, principalmente, em compostos fenólicos, embora a oxidação de substratos não fenólicos tenha sido verificada durante o processo conhecido como peroxidação lipídica (Bao *et al.*, 1994).

A MnP de fungos da podridão branca vem sendo empregada em estudos de biodegradação da lignina, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, ácidos húmicos, corantes sintéticos e poluentes clorados (Haas *et al.*, 2004).

Por possuir grande potencial degradativo, é uma enzima atrativa para atividades biotecnológicas, como o branqueamento de polpa “kraft”, celulose e remoção de resíduos poluentes, na descoloração de corantes sintéticos utilizados nas indústrias têxteis, e na produção de etanol de segunda geração.

Diversas pesquisas avaliaram a atividade de MnP em fungos, como Aguiar *et al.* (2010), que identificaram maior atividade da enzima nos fungos *P. sajor-caju*, *P. ostreatus* e *T. reesei* cultivados em vinhaça. Fujihara *et al.* (2010) em pesquisa, descreveram maior produção de MnP por fungos de podridão branca em meio de águas residuais de processamento de batata

Oliveira *et al.* (2012), também avaliaram a produção de MnP em *Bacillus pumilus* e *Paenibacillus sp* submetidos a cinco indutores: indulina AT, guaiacol, álcool

veratrílico, ácido lignocelulósico e ácido lignocelulósico dissulfonado, verificando que a indulina AT aumentou a atividade de MnP em *B. pumilus*.

1.9.3 Celulase

A celulose é o biopolímero mais abundante do mundo dentro dos materiais naturais e pode ser hidrolisada pela celulase, que se encontra como um complexo multienzimático (Bayer e Lamed, 1992).

Os sistemas de celulases são um conjunto de enzimas composto por endoglucanases, exoglucanases e β -glucosidase, com ou sem módulos de ligação a carboidratos (CBMs) que efetuam a hidrólise da celulose de maneira coordenada e eficiente (Lynd et al., 2002). CBMs são os domínios catalíticos e módulos de ligação a carboidratos, que se ligam à superfície do carboidrato para facilitar a sua hidrólise, colocando o domínio catalítico em íntima associação com o substrato.

Os fungos, através da celulase, são eficientes em penetrar substratos celulósicos por meio de extensões das hifas, colocando seus sistemas de celulases em regiões difíceis da celulose.

Nesses complexos, as celulases não formam um modelo estável de alto peso molecular e são chamadas de sistemas não complexados (Lynd et al., 2002). São enzimas que possuem habilidade de quebrar as ligações glicosídicas de microfibrilas da celulose, ocasionando a liberação de oligossacarídeos, celobiose e glicose (Dillon, 2004).

São classificadas em três grandes grupos: as endoglucanases, que clivam ligações internas da fibra celulósica; as exoglucanases, que atuam na região externa da celulose; e as glicosidases, que hidrolisam oligossacarídeos solúveis à glicose (Lynd *et al.*, 2002).

A celulase é utilizada na indústria da alimentação animal, como componente indutor de silagem e em ração para aves e suíno, com o objetivo de aumentar a digestibilidade de alimentos ricos em fibras de celulose.

A celulase tem sido um componente altamente estudado, pela sua habilidade em decompor biomassa celulósica em glicose, podendo ser convertida em produtos de valor agregado e energia. No entanto, as biomassas lignocelulósicas são recalcitrantes por conter de 20 a 25% de lignina, tornando mais complexa a conversão em açúcares monoméricos.

1.9.4 Xilanase

As xilanases são enzimas que degradam as xilanas, e que realizam a hidrólise da cadeia principal em xilooligossacarídeos de vários tamanhos. As endo- β -D-xilanases podem ser subdivididas em quatro tipos: endoxilanases que atuam nos resíduos L-arabinofuranosídeos, ocorrendo a xilobiase e xilose como produtos finais; endoxilanases que não atuam nas ramificações α -(1 \rightarrow 2) e α -(1 \rightarrow 3), produzindo moléculas de xilooligossacarídeos maiores do que xilobiase; endoxilanases que fazem a hidrólise da cadeia principal nos pontos de ramificações com formação principalmente de xilobiase, xilose e arabinose; endoxilanases que atuam nos pontos de ramificações, gerando arabinose e xilooligossacarídeos de tamanhos intermediários (Ferreira, 2004).

A atividade das endoxilanases é importante na atuação de outras enzimas xilanolíticas, hidrolisam partes internas da cadeia principal, liberando substrato para β -xilosidases que atuam sobre oligossacarídeos e nas extremidades não redutoras da xilana (Ferreira, 2004).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguiar, M. M.; et al. 2010. Use of vinasse and sugarcane bagasse for the production of enzymes by lignocellulolytic fungi. *Brazilian Archives Biology And Technology*, v. 53, n. 5, p. 1245-1254.
- Akin, D. E. 1989. Histological and physical factors affecting digestibility of forages. *Agronomy of Journal*, v. 81, n.1, p.17-25.
- Akin, D. E.; Burdick, D.; Amos, H. E. 1974. Comparative degradation of coastcross-1 bermudagrass, and pensacola bahiagrass by rumen microorganisms revealed by scanning electron microscopy. *Crop Science*, v. 14, p. 537-541.
- Akin, D. E.; Amos, H. E. 1975. Rumen bacterial degradation of forage cell walls investigated by electron microscopy. *Applied Microbiology*, v.29, p.692-701.

- Akin, D. E.; Amos, H. E.; Barton, F. E. et al. 1973. Rumen microbial degradation of grass tissue by scanning electron microscopy. *Journal of Agronomy*, v.65, n.5, p.825-828.
- Akin, D. C.; Chesson, A. 1989. Lignification as the major factor limiting forage feeding value specially in warm conditions. In: INTERNATIONAL GRASSLAND CONGRESS, Proceedings... v.16, p. 1753-1758.
- Albersheim, P. et al. 2010. *Plant cell walls: From Chemistry to Biology*. 1. New York: Garland Science, 430p.
- Alexandrino, A. M. et al. 2007. Aproveitamento do resíduo de laranja para a produção de enzimas lignocelulolíticas por *Pleurotus ostreatus* (Jack:Fr). *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 27, n. 2, p.364-368.
- Alves De Brito, C. J. F.; Rodella, R. A.; Deschamps, F. C. 2004. Anatomia quantitativa da folha e do colmo de *Brachiaria brizantha* (Hochst. ex A. Rich.) Stapf. e *B. humidicola* (Rendle) Schweick. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.33, n.3, p.519-528.
- Balsalobre, M. A. A.; Nussio, L. G.; Martha Júnior, G. B. 2001. Controle de perdas na produção de silagem de gramíneas tropicais. In: Mattos, W. R. S.; Faria, V. P.; Da Siolva, S. C. et al. (Ed.). *A produção animal na visão dos brasileiros*. Piracicaba: FEALQ, p.890-911.
- Balsalobre, M.A.A.; Corsi, M.; Santos, P.M.; Cárdenas, R.R. 2003. Composição química e fracionamento do nitrogênio e dos carboidratos do capim-tanzânia irrigado sob três níveis de resíduo pós pastejo. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.32, p.519-528.
- Bao, W.Y.; Fukushima, K.A.; Jensen, M.A.; Moen, K.E. Hammel. 1994. Oxidative degradation of non-phenolic lignin during lipid peroxidation by fungal manganese peroxidase. *FEBS Letters*, 354: 297-300.
- Barbosa, R. A.; Nascimento Junior, D.; Euclides, V. P. B. ; Silva, S. C.; Zimmer, A. H.; Torres JR, R.A.A. 2007. Capim-tanzânia submetido a combinações entre intensidade e frequência de pastejo. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 42, p. 329-340.
- Barros, C. O.; Pinto, J. C.; Evangelista, A. R. et al. 2002. Rendimento e composição química do capim-tanzânia estabelecido com milho sob níveis de nitrogênio. *Ciência e Agrotecnologia*, v. 26, n. 5, p. 1068-1075.

- Bayer, E.A., Lamed, R. 1992. The cellulose paradox: pollutant par excellence and/or a reclaimable natural resource? *Biodegradation*, v. 3, p. 171-188.
- Benvenuti, M. A.; Gordon, I. J.; Poppi, D. P. 2006. The effect of the density and physical properties of grass stems on the foraging behaviour and instantaneous intake rate by cattle grazing an artificial reproductive tropical sward. *Grass and Forage Science*, v.61, p.272–281.
- Boudet, A. M. 2007. Evolution and current status of research in phenolic compounds. *Phytochemistry*, v. 68, p. 2722-2735.
- Boerjan, W.; Ralph, J.; Baucher, M. 2003. Lignin biosynthesis. *Annual Review of Plant Biology*, v. 54, p. 519–546.
- Brito, C. J. F. A.; Rodella, R. A.; Deschamps; Alquini, Y. 1999. Anatomia quantitativa e degradação *in vitro* de tecidos em cultivares de capim-elefante. *Revista Brasileira de Zootecnia*. v.28, n.2, p. 223-229.
- Campbell, B.; Sederoff, R. 1996. Variation in lignin content and composition. Mechanisms of control and implications for the genetic improvement of plants. *Plant Physiology*, v.110, p. 3-13.
- Carlile, M.J.; S.C. Watkinson. 1994. *The Fungi*. Academic Press, 428 p.
- Carnevalli, R. A.; Silva, S. C.; Oliveira, A. A.; et al. 2006. Herbage production and grazing losses in *Panicum maximum* cv. Mombaça pastures under four grazing managements. *Tropical Grasslands*, v.40, n.3, p.165-176.
- Carpita, N. C.; Gibeaut, D. M. 1993. Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *The Plant Journal*, v.3, p. 1-30.
- Carpita, N. C.; Maccann, M. C. 2002. The functions of cell wall polysaccharides in composition and architecture revealed through mutations. *Plant and Soil*, v. 347, n. 71-80.
- Carvalho, P. C. F.; Trindade, J. K.; Mezzalira, J. C.; Poli, C. H. E. C.; Nabinger, C.; Genro, T. C. M.; Gonda, H. L. 2009. Do bocado ao pastoreio de precisão: compreendendo a interface planta animal para explorar a multi funcionalidade das pastagens. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 38, p. 109-122.
- Castro, P.R.C.; Kluge, R.A.; Peres, L.E.P. 2005. *Manual de fisiologia vegetal: teoria e prática*. Piracicaba: Editora Agronômica Ceres. 640p.

- Cecato, U.; Castro, C. R. C.; Canto, M.W.; Peternelli, M.; Almeida Junior, J.; Jobim, C.C.; Cano, C. C. P. 2001. Perdas de forragem em capim-tanzânia (*Panicum maximum* Jacq cv. Tanzânia-1) manejado sob diferentes alturas de pastejo. Revista Brasileira de Zootecnia, v.30, n.2, p.295-301.
- Costa, K. A. T.; Faquin, V.; Oliveira, I. P. 2010. Níveis e fontes de nitrogênio na recuperação de pastagens do capim-marandu. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v.62, p. 192-199.
- Costa, C.; et al. 1992. Variação na estrutura da vegetação de duas cultivares de *Panicum maximum* Jacq. (Colonião e Tobiata) submetidas a diferentes tipos de manejo. Composição em proteína bruta e digestibilidade *in vitro* da matéria seca. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, v. 27, n. 12, p. 1659-1670.
- Chen, K.; Lin, Y.; Chen, W.; Liu, Y. 2002. Degradation of phenol by PAA-immobilized *Candida tropicalis*. Enzyme and Microbial Technology, v. 31, p. 490-497.
- Chesson, A.; Stewart, C. S.; Dalgarno et al. 1986. Degradation of isolated grass mesophyll, epidermis and fibre cell wall in the rumen and by cellulolytic rumen bacteria in axenic culture. Journal Applied Bacteriology, v.60, n.4, p.327-336.
- Choong, M. F.; Lucas, P.W.; Ong, J. Y. S.; Pereira, B. P.; Tan, H. T. W.; Turner, I. M. 1992. Leaf fracture toughness and sclerophylly: their correlations and ecological implications. New Phytologist. v.121, n.4, p.597-610.
- Devasena, B. et al. 1994. Effect of stage of growth on chemical composition and in sacco degradability of colonial grass. Indian Journal of Animal Sciences, v. 64, n. 10, p. 1108-1110.
- Dillon, A. 2004. Celulases. In: Said, S.; Pietro, R.C.L. Enzimas como agentes biotecnológicos. Ribeirão Preto: Legis Summa, p. 243-270.
- Doblin, M. S.; Pettolino, F.; Bacic, A. 2010. Plant cell walls: the skeleton of the plant world. Functional Plant Biology, v. 37, p. 357-381.
- Donini, L. P.; Bernardi, E.; Nascimento, J. S. 2006. Colonização do substrato capim-elefante suplementado com farelos por *Pleurotus ostreatus*. Revista de Biologia e Ciências da Terra, Pelotas - RS, v. 6, n. 2, p.185-193.
- Drescher, M.; Heitkonig, I. M. A.; Raats, J. G.; Prins, H. H. T. 2006. The role of grass stems as structural foraging deterrents and their effects on the foraging behaviour of cattle. Applied Animal Behaviour Science, v.101, p.10-26.

- Dubeux Jr., J. C. B.; Muir, J. P.; Santos, M. V. F.; Vendramini, J. M. B.; Mello, A. C. L.; Lira, M. A. 2011. Improving grassland productivity in the face of economic, social, and environmental challenges. *Revista de Zootecnia*, v. 40, p. 280-290.
- Eggert, C.; et al. 1996. The ligninolytic system of the white rot fungus *P. cinnabarinus*: purification and characterization of laccase. *Applied Environmental and Microbiology*, New York, v. 62, p. 1151-1158.
- Engels, F. M. 1996. Developments in application of light and scanning electron microscopy techniques for cell wall degradation studies. *Netherlands Journal of Agricultural Science*, v.44, p.357-373.
- Euclides, V. P. B.; Macedo, M. C. M; Valle, L.C.S.; et al. 1995. Avaliação de acessos de *Panicum maximum* sob pastejo. Campo Grande: EMBRAPA, CNPQC, 7p.
- Euclides, V. P. B.; Medeiros, S. R. 2003. Valor nutritivo das principais gramíneas cultivadas no Brasil. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 43p. (Documentos, 139).
- Evans P. S. 1964. A study of leaf strength in four ryegrass varieties. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, v.7, p.508–513.
- Evert, R. F. 2006. *Esau's plant anatomy*. 3. John Wiley & Sons. 624p.
- Fengel, D.; Wegener, G. 1989. *Wood Chemistry, Ultra structure, Reactions*. Berlin: Walter de Gruyter, 613 p.
- Ferreira, L. F. R. 2009. Biodegradação de vinhaça proveniente do processo industrial de cana-de-açúcar por fungos. 134 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- Ferreira, E. X. F. 2004. Xilanase. In: SAID, S. & PIETROR. C. R. L. *Enzimas como agentes biotecnológicos*. Ribeirão Preto: Legis Summa, cap. 8, p. 137-148.
- Fitzgerald, D. J.; Stratford, M.; Narbad, A. 2003. Analysis of the inhibition of food spoilage yeasts by vanillin. *International Journal of Food Microbiology*, v. 2708, p. 1-10.
- Flores, E. R.; Laca, E. A; Griggs, T. C.; Demment, M. W. 1993. Sward height and vertical morphological-differentiation determine cattle bite dimensions. *Agronomy Journal*, n.85, p.527–532.
- França, A. F. S.; Borjas, A. L. R.; Oliveira, E. R.; Soares, T. V.; Miyagi, E. S.; Sousa, V. R. 2007. Parâmetros nutricionais do capim-tanzânia sob níveis crescentes de

- nitrogênio em diferentes idades de corte. *Ciência Animal Brasileira*, v.8, p. 695-703.
- Fujihara, S.; et al. 2010. Production of manganese peroxidase by white rot fungi from potato-processing wastewater: Role of amino acids on biosynthesis. *African Journal of Biotechnology*, v. 9, n. 5, p. 725-731.
- Gold, M.H. 1989. Manganese peroxidase from the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Journal of Inorganic Biochem.*, v. 36, p. 313.
- Gomes, J. A. F.; Leite, E. R.; Cavalcante, A. C. R.; Cândido, M. J. D.; Lempp, B.; Bomfim, M. A. D.; Rogério M. C. P. 2009. Resíduo agroindustrial da carnaúba como fonte de volumoso para a terminação de ovinos. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.44, p.58-67.
- Gomide, J. A. 1989. Aspectos biológicos e econômicos da adubação nitrogenada. In: *Simpósio sobre Ecossistemas de Pastagens*, 1., 1989. Jaboticabal. Anais... Jaboticabal: Funep, p. 237-270.
- Greenberg, A. R.; Mehling A.; Lee, M.; Boc, J. 1989. Tensile behavior of grass. *Journal of Math. Science*, v.24, p.2549-554.
- Haas, R.; Tsvunchyk, O.; Steinbach, K.; Löw, E. V.; Scheibner, K.; Hofrichter, M. 2004. Conversion of adamsite (phenarsarzin chloride) by fungal manganese peroxidase. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 63, p. 564-566.
- Hay, R. K. M.; Walker, A. J. 1989. *An introduction to the physiology of crop yield*. Essex: Longman Scientific and Technical, 292p.
- Higuchi, T. 2006. Look back over the studies of lignin biochemistry. *Journal of Wood Science*, v. 52, p. 2-8.
- Hodgson, J.; Clark, D. A.; Mitchell, R.J. 1994. Foraging behaviour in grazing animals and its impact on plant communities. In: Fahey, G.C. (Ed.), *Forage Quality, Evaluation, and Utilization*. Lincoln, USA, p. 796-827.
- Illi, A. W. 1997. Advances and retreats in specifying the constraints on intake in grazing ruminants. In: *International Grassland Congress*, 18., Winnipeg, 1997, Canada, Proceedings. Winnipeg, p. 39-44.
- Inoue, T.; Brookes, I. M.; John, A.; Kolver, E. S.; Barry, T. N. 1994. Effects of leaf shear breaking load on the feeding value of perennial ryegrass (*Lolium perenne*) for sheep. II. Effects on feed intake, particle breakdown, rumen digesta outflow

- and animal performance. *Journal of Agricultural Science, Cambridge*, v.123, p.137–147.
- Jank, L.; Savidan, Y.H.; Souza, M.V.T.; Costa, J.C.G. 1994. Avaliação do germoplasma de *Panicum maximum* introduzido da África: 1. Produção forrageira. *Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia, Viçosa*, v. 23, n.3, p. 433-440.
- Jones, L.; Ennos, A. R.; Turner, S. R. 2001. Cloning and characterization of irregular xylem4 (*irx4*): a severely lignin-deficient mutant of *Arabidopsis*. *The Plant Journal*. v.26, p.205-216.
- Jung, H. G.; Buxton, D.; Hatfield, R. et al. 1996. Improving forage fiber digestibility. *Feed Mix*, v.4, p.30.
- Jung, H. G. 1989. Forage lignins and their effects on fiber digestibility. *Journal of Agriculture*. v. 81, p. 33-38.
- Jung, H.G.; Deetz D. A. 1993. Cell wall lignification and degradability. In: Jung H.G., Buxton D.R., Hatfield R.D. et al. (Ed.) *Forage cell wall structure and digestibility*. Madison: American Society of Agronomy, p. 315-346.
- Karlsson, M.; Melzer, M.; Prokhorenko, I.; Johansson, T.; Wingsle, G. 2005. Hydrogen peroxide and expression of hspI-superoxide dismutase are associated with the development of secondary cell walls in *Zinnia elegans*. *Journal of Experimental Botany*, v. 56, p. 2085–2093.
- Lempp, B. 2007. Avanços metodológicos da microscopia na avaliação de alimentos. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.36, suplemento especial, p.315-329.
- Lempp, B.; Gomes, R. A.; Morais, M. da. G. 2009. Importância da anatomia vegetal na qualidade da forragem. In: Simpósio, 7.; Congresso de Forragicultura e Pastagens, 3., 2009, Lavras. Anais. Lavras: UFLA, p.1-16.
- Lerouxel, O.; et al. 2006. Biosynthesis of plant cell wall polysaccharides — a complex process. *Current Opinion in Plant Biology*, v. 9, p. 621–630.
- Lopez-Malo, A.; Alzamora S. M.; Argáiz, A. 1997. Effect of vanillin concentration, pH and incubation temperature on *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus ochraceus* and *Aspergillus parasiticus* growth. *Food Microbiology*, v. 14, p. 117-124.
- Lynd, L.R.; Weimer, P.J.; Van Zyl, W.H.; Pretorius, I.S. 2002. Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. *Microbiology and molecular biology reviews*. American Society for Microbiology., n.3, v.66., p.506-577.

- Marshall, C. 1987. Physiological aspects of pasture growth. In: Snaydon, R. W. (Ed.) Managed grasslands – Analytical studies ecosystems of the world. Amsterdam: Elsevier Science Publishers B.V., v.17-B, p.29-46.
- Menezes, C.R.; Silva, I.S.; Durrant, L.R. 2009. Bagaco de cana: fonte para produção de enzimas lignocelulolíticas. Estudos tecnológicos, v. 5, n. 1, p. 68-78.
- Mertens, D. R. 1994. Regulation of forage intake. In: Fahey, G. C. JR.; Collins, M.; Mertens, D. R.; Moser, L. E. (Ed). Forage quality, evaluation and utilization. Madison: ASA; CSSA; SSSA, cap.11, p.450-493.
- Moreira, M.T. G.; Feijoo, T.; Mester, P.; Mayorga, R.; Sierra-Alvarez, J.A. 1998. Role of organic acids in the manganese-independent biobleaching system of *Bjerkandera* sp. strain BOS55. Applied and Environmental Microbiology, v. 64, p. 2409-2417.
- Niklas, K. J. 1989. The cellular mechanics of plants. American Scientist, v.77, p.344-349.
- Oliveira, M.. 2012. Entre açúcares e genes: Aplicação do conhecimento científico da cana deverá servir ao desenvolvimento de novas ferramentas para a produção de etanol. Revista Pesquisa FAPESP, São Paulo - SP, outubro, p.86-91.
- O'reagain P. J. 1993. Plant structure and acceptability of different grasses to sheep. Journal of Range Management, v.46, p.232–236.
- Paciullo, D. S. C.; Gomide, J. A.; Queiroz, D. S. et al. 2001. Composição química e digestibilidade *in vitro* de lâminas foliares e pseudocolmos de gramíneas forrageiras, em função do nível de inserção no perfilho, da idade e da estação de crescimento. Revista Brasileira de Zootecnia, v.30, n.3, s.1, p.964-974.
- Paciullo, D. S. C.; Gomide, J. A.; Silva, E. A. M. da; Queiroz, D. S.; Gomide, C. A. M. 2002. Degradação *in vitro* de tecidos da lâmina foliar e do colmo de gramíneas forrageiras tropicais, em função do estágio de desenvolvimento. Revista Brasileira Zootecnia, v.31, p.900–907.
- Paulino, M. F.; Detman, E.; Zervoudakis, J. T. 2000. Suplementos Múltiplos para recria e engorda de bovinos em pastejo. In: Simpósio de Produção de Bovinos de Corte, 2, 2000. Anais... ViçosaMG: UFV, p. 187-232.
- Peaucelle, A.; Braybrook, S.; Höfte, H. 2012. Cell wall mechanics and growth control in plants: the role of pectins revisited. Frontiers in Plant Science, v. 3.

- Pedreira, C. G. S.; De Andrade, R. F. A.; Da Silva, S. C.; Nussio, L. G.; De Barros, M. L. S.; Pereira, L. M. L.; Leme, P. R. 2005. Forage yield and grazing efficiency on rotationally stocked pastures of “Tanzania-1” guineagrass and “Guacu” elephantgrass. *Scientia Agricola*, v.62, p.433–439.
- Penati, M. A. 2002. Estudo do desempenho animal e produção do capim-tanzânia (*Panicum maximum* Jacq.) em um sistema rotacionado de pastejo sob irrigação em três níveis de resíduo pós-pastejo. Piracicaba, 117p. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.
- Pereira, V. V. 2009. Características morfogênicas e estruturais e acúmulo de biomassa em capim-mombaça sob níveis de nitrogênio e densidades de plantas. Viçosa, 110p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- Piontek, K., M. Antorini, T. Choinowski. 2002. Crystal structure of a laccase from the fungus *Trametes versicolor* at 1.90-Å resolution containing a full complement of coppers. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 277, p. 37663-37669.
- Pitarelo, A. P. 2007. Avaliação da susceptibilidade do bagaço e da palha de cana-de-açúcar à bioconversão via pré-tratamento a vapor e hidrólise enzimática. 125p. Dissertação (mestrado). Universidade Federal do Paraná. Curitiba. Paraná.
- Poppi, D. P.; Gill, M.; France, J. 1994. Integration of theories of intake regulation in growing ruminants. *Journal of Theoretical Biology*, v. 167, p. 129-145.
- Queiroz, D. S.; Gomide, J. A.; Maria, J. 2000. Avaliação da folha e do colmo de topo e base de perfilhos de três gramíneas forrageiras. 2. Anatomia. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.29, n.1, p.61-68.
- Raij, B. V. 1991. Soil Fertility and Fertilization. Ed. Agronômica Ceres Ltda, Piracicaba, São Paulo, Brazil, 181 p.
- Rabonato, A. C. 2013. Linhagens fúngicas na hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual Paulista “Julio De Mesquita Filho”, Faculdade de Ciências Agronômicas, Botucatu, SP.
- Ramos, L.P. 2003. The chemistry involved in the steam treatment of lignocellulosic materials. *Química Nova*, v. 26, p. 863-871.
- Reis, R. A.; Rodrigues, L. R. A. 1993. Valor nutritivo de plantas forrageiras. Jaboticabal: FCAVJ-UNESP/FUNEP, 26p.
- Reiter, W. 2002. Biosynthesis and properties of the plant cell wall. *Current Opinion in Plant Biology*, v.5, n. 6, p. 536-542.

- Rhodes, I. 1973. Relationship between canopy structure and productivity in herbage grasses and its implication for plant breeding. *Herbage Abstracts*, v. 43, p. 129-133.
- Rodella, R. A.; Ishiy, C. M.; Maimoni, R.C.S. 1982. Estudo quantitativo de características anatômicas de folhas de duas espécies de *Brachiaria*. *Revista Agraciência*, v.2, n.2, p.21-30.
- Sales-Campos, C.; Minhoni, M. T. A.; Andrade, M. C. N. 2010. Produtividade de *Pleurotus ostreatus* em resíduos da Amazônia. *Revista Interciência*, v. 35, n. 3.
- Saliba, E.O.S. 1998. Caracterização química e microscópica das ligninas dos resíduos agrícolas de milho e soja submetidas a degradação ruminal e seu efeito sobre a digestibilidade dos carboidratos estruturais. 251f. Tese (Doutorado) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.
- Sanchez, S. 2009. Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnology Advances*, v. 27, p. 185–194.
- Sarkanen, K. V.; Luddwing, C. H. 1971. Lignins: occurrence, formation, structure and reactions. Wiley-Interscience, New York.
- Savidan, Y. H.; Jank, L.; Costa, J. C. G. 1990. Registro de 25 acessos selecionados de *Panicum maximum*. Campo Grande, EMBRAPA – CNPQC. 1990. 68p. II. (EMBRAPA-CNPQC. Documentos, 44).
- Scheller, H. V.; Ulvskov, P. 2010. Hemicelluloses. *Annual Review of Plant Biology*, v. 61, n. 1, p. 263-289.
- Showalter, A. M. 1993. Structure and function of plant cell wall proteins. *The Plant Cell*, v. 5, p. 9-23.
- Scheible, W.R.; Pauly, M. 2004. Glycosyltransferases and cell wall biosynthesis: novel players and insights. *Current Opinion in Plant Biology*, v. 7, n. 3, p. 285-295.
- Silva, S. C., Pedreira, C. G. S. 1997. Princípios de ecologia aplicados ao manejo da pastagem. In: Simpósio sobre Ecossistema de Pastagens, 3, 1997, Jaboticabal. Anais... Jaboticabal: FCAV/UNESP.
- Srebotnik, E., K. Hammel. 2000. Degradation of nonphenolic lignin by the laccase/1-hydroxybenzotriazole system. *Journal of Biotechnology*, 81: 179-188.
- Stevenson, F.J. 1982. Origin and distribution of nitrogen in soil. p. 1–42. In: Stevenson, F.J. (ed.) *Nitrogen in Agricultural Soils*. Agronomy Monograph no. 22. American Society of Agronomy, Madison, Wis.

- Sun, R.; Tomkinson, J.; Mao, F.C.; Sun, X.F. 2001. Physicochemical characterization of lignins from rice straw by hydrogen peroxide treatment. *Journal of Applied Polymer Science*, v. 79, p. 719-732.
- Sjöström, E. 1993. *Wood Chemistry: Fundamentals and Application*. Academic Press:Orlando, 293 p.
- Stewart, J.J.; Akiyama, T.; Chapple, C.; Ralph, J.; Mansfield, S. D. 2009. The effects on lignin structure of overexpression of ferulate 5-hydroxylase in hybrid poplar. *Plant Physiol*, v.150, p. 621–635.
- Szklarz, G. D.; et al. 1989. Production of phenol oxidases and peroxidases by wood-rotting fungi. *Mycologia*, v. 81, p. 234-240.
- Thiago, L. R. L. S.; GILL, M. 1990. Consumo voluntário de forragem por ruminantes: mecanismo físico ou fisiológico? In: *Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia*, 38., Campinas, 1990. Anais. Campinas: SBZ, p.853–871.
- Thurston, C.F. 1994. The structure and function of fungal laccases. *Microbiol.*, 140: 19-26.
- Travis, A. J.; Murison, S. D.; Perry, P. et al. 1997. Measurement of cell wall volume using confocal microscopy and its application to studies of forage degradation. *Annals of Botany*, v.80, p.1-11.
- Tronchet, M.; Balague´, C.; Kroj, T.; Jouanin, L.; Roby, D. 2010. Cinnamyl alcohol dehydrogenases C and D, key enzymes in lignin biosynthesis, play an essential role in disease resistance in Arabidopsis. *Molecular Plant Pathology*, v.11, p. 83–92.
- Van Der Heijden, G. W. A. M.; Van Der Vooren, J. G.; Van Der Wiel, C. C. M. 1995. Measuring cell wall dimensions using the distance transform. *Annals of Botany*, v.75, p.545-552.
- Vanholme, R.; Demedts, B.; Morreel, K.; Ralph, J.; Boerjan, W. 2010. Lignin Biosynthesis and Structure. *Plant Physiology*, v.153, p. 895–905.
- Van Soest, P. J. 1982. *Nutritional ecology of the ruminant*. Ithaca: Cornell University press, 374p.
- Van Soest, P. J. 1994. *Nutritional ecology of the ruminant*. 2. ed. Ithaca: Cornell University Press.
- Vincent, J. F. V. 1991. Strength and fracture of grasses. *Journal of Mathematical Science*, v.26, p.1947-1950.

- Warren Wilson, J. 1961. Stand Structure and Light Penetration. I. Analysis by Point Quadrats. *Journal of Applied Ecology*, v.2, n.2. p.383-390.
- Wilson, J. R. 1997. Structural and anatomical traits of forages influencing their nutritive value for ruminants. In: *Simpósio Internacional sobre Produção Animal em Pastejo, 1997, Viçosa, MG. Anais...* Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, p.173-208.
- Wilson, J. R.; Mertens, D. R. 1995. Cell wall accessibility and cell structure limitations microbial digestion of forage. *Crop Science*, v.35, p.251-259.
- Wilson, J.R. 1994. Cell wall characteristics in relation to forage digestion by ruminants. *Journal of Agricultural Science*, v.122, p.173-182.
- Wilson, J. R. 1993. Organization of forage plant tissues. In: Jung, H.G.; Buxton, D.R.; Hatfield, R.D. et al. *Forage cell wall structure and digestibility*. Madison: American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Soil Science Society of America, p.1-32.
- Wilson, J.R. 1994. Cell wall characteristics in relation to forage digestion by ruminants. *Journal of Agricultural Science, Cambridge*, v.122, p.173-182.
- Wright, W.; Illius, A. W. 1995. A comparative study of the fracture properties of five grasses. *Functional Ecology, Oxford*, v.9, p. 269-278.
- Xu, F. 1997. Effects of redox potential and hydroxide inhibition on the pH activity profile of fungal laccases. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 272, p. 924 - 928.
- Yoshida, H. 1883. Chemistry of lacquer (urushi). *Journal of the Chemical Society*, v. 43, p. 472-486.
- Zadrazil, F., J. Grinbergs, A. González. 1982. "Palo podrido"- decomposed wood used as feed. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 15, p. 167-171.
- Zhang, J. M.; Hongo, A.; Akimoto, M. 2004. Physical strength and its relation to leaf anatomical characteristics of nine forage grasses. *Australian Journal of Botany*, v.52, p.799-804.

OBJETIVOS GERAIS

Estudar o efeito da adubação nitrogenada na lâmina foliar e colmo+bainha do *Panicum maximum* cv. Tanzânia, em diferentes estações do ano, e sua influência direta e indireta na qualidade da forragem, pela modificação das características anatômicas, biomecânicas e nutricionais.

Analisar a utilização do fungo *Pleurotus ostreatus* (fungo da podridão branca) como pré-tratamento para o *Panicum maximum* cv. Tanzânia, seu efeito na quantidade de material lignocelulósico, na caracterização monomérica da lignina e sua relação com a adubação nitrogenada.

CAPÍTULO I - IMPORTÂNCIA DA PAREDE CELULAR NA DIGESTIBILIDADE *IN VITRO* DO CAPIM-TANZÂNIA FERTILIZADO COM NÍVEIS DE NITROGÊNIO

(Scientia Agricola Journal)

Resumo:

Objetivou-se analisar a influência dos componentes da parede celular sobre a digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS) utilizando com ausência de adubação e três diferentes níveis de nitrogênio (N), (150, 300 e 450 kg ha⁻¹ de N) na lâmina foliar (LF) e colmo+bainha (CB) de capim-tanzânia. O experimento foi realizado entre novembro de 2012 e setembro de 2013. O delineamento experimental foi em blocos ao acaso sendo parcelas subdivididas no tempo. A ausência de adubação e os níveis de nitrogênio (150, 300 e 450 kg ha⁻¹ de N) representaram a parcela principal, e os cortes representaram as subparcelas (1 a 5) com quatro repetições. Nos cortes (1, 2 e 3) primavera/verão houve efeito (P<0,05) do nitrogênio para celulose (CEL), hemicelulose (HEMI), fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA) e (DIVMS), tanto na LF quanto CB, porém a lignina (LIG) apresentou efeito somente para CB. Nos cortes (4 e 5) outono/inverno, houve efeito significativo somente para DIVMS na LF e CB, HEMI e FDN somente para LF. O nitrogênio aumentou a DIVMS por causa da alteração dos componentes formadores da parede celular. Verificou-se que a lignina, FDN e FDA não devem ser avaliadas como componentes isolados para determinar a limitação da digestibilidade de capim-tanzânia. A idade do corte diminuiu o efeito do nitrogênio no capim-tanzânia, ocasionando melhor resultado na primavera/verão para o nível de 450 kg ha⁻¹ de N.

Palavras-chave: adubação nitrogenada, celulose, hemicelulose, digestibilidade *in vitro* da matéria seca, lignina, valor nutricional.

INTRODUÇÃO

O valor nutritivo da forragem é formado pela sua composição química, ingestão e natureza dos produtos digeridos (Amakiri, 2011), influenciados pela espécie, fatores abióticos, características do solo, manejo e idade da planta.

A digestão das forragens em ruminantes está relacionada, portanto, com a distribuição da lignina nas células, a proporção entre carbono e nitrogênio e a população microbiana do rúmen. O valor energético da forragem pode ser determinado pela digestibilidade e depende principalmente do grau de lignificação da parede celular (Paulino et al., 2000). Com a maturidade da planta, ocorrem mudanças na sua composição química (Balsalobre et al., 2001).

A digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS) tem grande importância na análise qualitativa da forragem (Nagano, 2011). Ainda, estudos de alimentação em pastejo demonstram que mesmo pequenas mudanças na DIVMS tem impacto significativo no desempenho animal (Detmann et al., 2005).

Autores relatam a lignina como a mais importante limitação da digestibilidade (Buxton e Redfearn, 1997; Vogel e Jung, 2001, Maciel et al., 2012), pois seu acúmulo limita a energia digestível, gerando a utilização incompleta da celulose e hemicelulose pelos animais (Fukushima e Hatfield, 2004). Porém, pesquisas não observaram efeitos da adubação nitrogenada na lignina (Gomide, 1984; Collins et al., 1990; Costa et al., 1992 Sanz et al., 2005; Hollena et al., 2006).

Não apenas a lignina, mas também o compacto arranjo das células de alguns tecidos e a espessura da parede celular podem afetar a digestibilidade, em que a ligação dos carboidratos, celulose e hemicelulose, da parede celular com a lignina tem efeito marcante (Maciel et al., 2012). A celulose e hemicelulose podem ser completamente digeridas pela microflora do rúmen quando isoladas da parede. Compreender como as interações dos componentes da parede celular limitam a digestão microbiana é fundamental (Jung, 2011). A partir dessas informações, permanecem dúvidas sobre como a celulose e/ou hemicelulose podem variar com a adubação nitrogenada e se apenas a diminuição da lignina afeta a digestibilidade da forragem.

Objetivou-se analisar o efeito da adubação nitrogenada sobre os componentes da parede celular da lâmina foliar e colmo+bainha do capim-tanzânia nas estações do ano e como as variações destes componentes podem afetar a digestibilidade.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado na Fazenda Experimental de Iguatemi (FEI) localizada na latitude de 23° 25' S; 51° 57' O, e 550 metros de altitude, da Universidade Estadual de Maringá (UEM), Maringá-PR. O tipo climático predominante desta região é o Cfa subtropical úmido mesotérmico, segundo a classificação de Köppen, com temperatura média anual de 22°C. Este se caracteriza pela predominância de verões quentes, baixa frequência de geadas severas e tendência de concentração das chuvas no período do verão. O período experimental foi de novembro de 2012 a setembro de 2013, cujos dados climáticos foram coletados no posto meteorológico da FEI, campus da UEM (Figura 1).

O experimento foi conduzido em área de *Panicum maximum* Jacq. cv. Tanzânia-1, estabelecida em novembro de 2003 com área de Latossolo Vermelho distrófico (Embrapa, 1999).

No mês de agosto de 2012 (início do período experimental) foi realizada a coleta de amostras de solo na profundidade (0-20 cm) nos quatro tratamentos, para correção de acidez para elevação da saturação de bases a 60%, segundo Werner et al. (1996), além da aplicação de 40 kg ha⁻¹ de P₂O₅ na forma de superfosfato simples. Os resultados da análise de solo se encontram na Tabela 1, caracterizando solo com baixos valores de magnésio, potássio e baixa saturação por base, fatores estes que determinaram a necessidade de calagem.

A área experimental apresentava total de 800 m² dividida em 16 parcelas, sendo retângulos com 50 m² cada, nos quais foram alocados os tratamentos com aplicações de nitrogênio (N) e potássio (K₂O) que foram parceladas de acordo com a quantidade total a ser aplicada, com início no dia 21/11/2012. O nitrogênio teve como fonte o nitrato de amônio e foi aplicado de acordo com o tratamento, a menor dose (150 kg ha⁻¹ de N) em três aplicações com intervalos de 45 dias, 300 kg ha⁻¹ de N em seis aplicações com intervalos de 30 dias, e 450 kg ha⁻¹ de N em nove aplicações com intervalos de 15 dias. O K₂O teve como fonte o cloreto de potássio e foi aplicado com intervalo de 45 dias em todas as parcelas, totalizando de 80 kg ha⁻¹ de K₂O.

Cada parcela foi pastejada por uma novilha da raça holandesa de aproximadamente 250 kg, pelo método de pastejo intermitente, em que os animais permaneceram, aproximadamente, 1 a 2 dias com período de descanso variável em função da mensuração da interceptação luminosa. A entrada do animal ocorreu quando

se atingia 95% de interceptação luminosa, cuja mensuração foi realizada com analisador de dossel modelo *LAI. 2000* (LI-COR, Lincoln, Nebraska, EUA) a cada dois de intervalo e aproximando a 95% de IL essa mensuração passou a ser diária. A retirada dos animais das parcelas foi realizada quando o resíduo de pastejo chegou próximo de 30 cm de altura mensurado com auxílio de uma regua graduada.

O acúmulo de massa verde de forragem foi mensurado utilizando um quadrado de ferro com 1 m² de área, sendo colhidas três amostras por parcela, a 30 cm do nível do solo. Retirou uma subamostra de forragem, para separação dos componentes morfológicos da forragem, obtendo as frações lâmina foliar (LF), colmo+bainha (CB) e material morto (MM), que foram pesadas verdes e colocadas em estufa de circulação forçada de ar a 55°C, por 72 horas e, posteriormente, pesadas as frações secas.

Com exceção do MM, as frações LF e CB foram moídas em moinho tipo Willey com peneira de 1 mm, e analisados os teores de MS em estufa a 105°C A.O.A.C.(2012). Foram realizadas as seguintes análises: Matéria Seca (MS), Fibra em Detergente Neutro (FDN) e Fibra em Detergente Ácido (FDA). A FDN e FDA foram determinadas em aparelho autoclave (Pell e Schofield, 1993), e os valores de digestibilidade da matéria seca *in vitro* (DIVMS) de acordo com a metodologia de Tilley e Terry (1963), adaptada para a utilização do rúmen artificial, desenvolvida por Ankom, conforme descrito por Holden (1999). A celulose (CEL) e hemicelulose (HEMI) foram estimadas por cálculo após as análises de FDN e FDA.

Após a determinação de FDA, as amostras secas foram acondicionadas em *Daisy^{II}*, e se adicionou 500 mL de H₂SO₄ à 72%. Após 3 horas, retirou-se a solução H₂SO₄. As amostras foram secas em estufa de 105°C de 2-4 horas. Posteriormente, pesou os cadinhos calcinados e colocou-se os sacos dentro dos mesmos e levou a mufla a 525°C durante 3 horas e por diferença de peso se obteve a quantidade de lignina (Ankom, 2013).

Também foi determinado o NT (nitrogênio total), NIDN (nitrogênio insolúvel em detergente neutro) e NIDA (nitrogênio insolúvel em detergente ácido) segundo a A.O.A.C. (2012). Posteriormente, calculou-se o nitrogênio insolúvel em detergente neutro por nitrogênio total (NIDN/NT) e nitrogênio insolúvel em detergente ácido por nitrogênio total (NIDA/NT).

O delineamento experimental foi em blocos ao acaso em parcelas subdivididas no tempo. A ausência de nitrogênio e os três níveis de nitrogênio (150, 300 e 450 kg ha⁻¹

¹ de N) representaram a parcela principal, e os cortes representaram as subparcelas sendo: corte 1 a 3 (primavera/verão); corte 4 e 5 (outono/inverno) com quatro repetições.

O efeito dos níveis de nitrogênio foi avaliado pela equação de regressão, e foram considerados os valores médios de cada variável resposta, nos períodos primavera/verão, sendo realizada uma coleta para ausência de adubação e três coletas para 150, 300 e 450 kg ha⁻¹ de N e no outono/inverno, duas coletas para os níveis 150, 300 e 450 kg ha⁻¹ de N, respectivamente (Tabela 2).

Com ausência de adubação, obteve-se apenas um corte durante a primavera/verão e não ocorreu corte no outono/inverno, enquanto os outros tratamentos tiveram três cortes na primavera/verão e 2 cortes no outono/inverno.

Foram utilizados modelos estatísticos, que testaram regressões linear e quadrática para todas as variáveis, conforme abaixo:

$$y_{ijk} = t_{ij} + e_{ijk}, \text{ em que:}$$

y_{ijk} é a observação na k-ésima repetição;

t_{ij} é o efeito do nível i (0, 150, 300 e 450 kg ha⁻¹ de N) dentro de época j (primavera/verão e outono/inverno);

e_{ijk} é o erro aleatório associado à observação y_{ijk} .

O efeito dos cortes, por sua vez, foi avaliado por meio da análise de variância com teste de Tukey (0,05) considerando apenas os tratamentos que tiveram mais de um corte (150, 300 e 450 kg ha⁻¹ de N).

Para testar o efeito do tempo (cortes) nas variáveis, foi utilizada análise de variância, seguida de teste de médias a 5% de probabilidade, conforme abaixo:

$$y_{ijk} = t_i + época_j + t_i * época_j + e_{ijk}, \text{ em que:}$$

t_{ij} é o efeito do nível i (150, 300 e 450 kg ha⁻¹ de N);

$época_j$ é o efeito da época de corte j (primavera/verão e outono/inverno);

$t_i * época_j$ é a interação entre o nível i e época de corte j ;

e_{ijk} é o erro aleatório associado à observação y_{ijk} .

RESULTADOS

Nas estações primavera e verão (cortes 1, 2 e 3), houve efeito do nitrogênio para todas as variáveis estudadas: DIVMS, CEL, HEMI, FDN, FDA, NT, NIDN/NT e NIDA/NT. (Gráfico 1), com exceção à LIG na LF.

A adubação nitrogenada influenciou positivamente a DIVMS, com resposta linear ($P < 0,05$) tanto para a LF como para o CB (Gráfico 1A). Para a ausência de adubação, foi verificado 49% e 46% de DIVMS da LF e CB, respectivamente. Os valores aumentaram para 56% e 53% no nível de 150 kg ha^{-1} de N, 63% e 59%, no nível de 300 kg ha^{-1} de N e 70% e 66%, no nível de 450 kg ha^{-1} de N, respectivamente, totalizando o aumento de 21 pontos percentuais na lâmina foliar e 20 pontos percentuais no colmo+bainha na maior dose de N, em relação ao tratamento com ausência de N (Tabela 4).

A lignina, comumente associada à diminuição da digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS), não foi influenciada ($P > 0,05$) pela adubação nitrogenada na LF ($\bar{Y} = 36,70 \text{ g kg}^{-1}$ de MS), para a primavera/verão, porém apresentou efeito linear negativo ($P < 0,05$) para o CB no mesmo período (Gráfico 1B). Este, com ausência de adubação, apresentou teores de 50 g kg^{-1} de lignina, que decresceu com os níveis de N, sendo verificados valores para CB de 44 g kg^{-1} de MS no nível de 150 kg ha^{-1} , 37 g kg^{-1} de MS no nível de 300 kg ha^{-1} e, tendo o menor valor, de 31 g kg^{-1} de MS sido observado no nível de 450 kg ha^{-1} . Portanto, na maior dose de N, houve decréscimo de 38% nos teores de lignina, comparados com a ausência de adubação nitrogenada (Tabela 3).

Outro componente importante da parede celular, a celulose (CEL) apresentou efeito do nitrogênio ($P < 0,05$) na primavera/verão, sendo linear negativa para o CB e quadrática para LF (Gráfico 1C). Com ausência de adubação nitrogenada foram verificados valores de 261 g kg^{-1} de MS para lâmina foliar e 350 g kg^{-1} de MS para CB, que decresceram para 245 g kg^{-1} de MS no nível de 450 kg ha^{-1} de N na LF e 311 g kg^{-1} de MS no nível de 300 kg ha^{-1} de N no CB (Tabela 3).

Também componente da parede celular, a hemicelulose (HEMI) apresentou resposta inversa à celulose, sendo observado efeito linear positivo ($P < 0,05$) para adubação nitrogenada tanto na LF quanto no CB, na primavera/verão (Gráfico 1D).

Com ausência de adubação de N, os teores de HEMI foram de 288 g kg^{-1} de MS para LF e 274 g kg^{-1} de MS para CB. Estes valores atingiram os maiores valores no

nível de 450 kg ha⁻¹ de N, sendo de 310 g kg⁻¹ de MS para lâmina foliar e 292 g kg⁻¹ de MS para CB, significando o aumento de 7,63% e 6,62% respectivamente, na maior dose de N (Tabela 4).

Houve efeito quadrático ($P < 0,05$) para níveis de nitrogênio no teor de fibra em detergente neutro (FDN) (Gráfico 1E) e para fibra em detergente ácido (FDA) (Gráfico 1F), tanto para LF quanto para CB, na primavera/verão. Tanto FDN como FDA apresentaram leve redução com o aumento dos níveis de N, sendo observadas diferenças pequenas entre os teores de ambas, nos níveis de 300 kg ha⁻¹ de N e 450 kg ha⁻¹ de N.

Os menores resultados foram obtidos na FDN, na ausência de N apresentou 659 g kg⁻¹ de MS para lâmina foliar e 711 g kg⁻¹ de MS para CB, valores estes que foram reduzidos para 652 g kg⁻¹ de MS e 688 g kg⁻¹ de MS, ambos no nível de 450 kg ha⁻¹ de N, na primavera/verão, representando a redução de 1% e 3%, respectivamente.

Na variável FDA, os resultados obtidos na mesma época apresentaram reduções mais expressivas, de 8% para LF no nível de 450 kg ha⁻¹ de N, e 9% para CB no nível de 300 kg ha⁻¹ de N, quando comparados com os valores do capim-tanzânia sem adubação nitrogenada (Tabela 4).

Houve efeito linear positivo ($P < 0,05$) do nitrogênio no nitrogênio total (NT) (Gráfico 1G), tanto para a LF quanto para o CB, na primavera/verão. Na maior dose de adubação, foi observado 2,71 g kg⁻¹ para o NT da LF, significando o aumento de 1,24 g kg⁻¹ em relação à ausência de N. O CB também apresentou aumento do NT com o aumento dos níveis de nitrogênio, sendo observado o incremento de 0,55 g kg⁻¹ quando comparadas a ausência de N com a maior dose (Tabela 3).

Foi observado efeito quadrático para nitrogênio insolúvel em detergente neutro por nitrogênio total (NIDN/NT) na LF ($P < 0,05$), e não houve efeito dos níveis de nitrogênio para o CB ($\bar{Y} = 29,18\%$), na estação primavera/verão (Gráfico 1H). Na LF, foi verificada diminuição do NIDN/NT com o aumento dos níveis de N, sendo 58,66% na ausência de N e o menor valor de 40,01% no nível de 300 kg ha⁻¹ (Tabela 3).

Para o nitrogênio insolúvel em detergente ácido por nitrogênio total (NIDA/NT), também houve efeito do nitrogênio apenas na LF, sendo linear negativo ($P < 0,05$) na primavera/verão (Gráfico 1I). Não foi observado efeito para NIDA/NT no CB ($\bar{Y} = 20,83\%$), na primavera/verão. Foi observado que o aumento dos níveis de nitrogênio contribuiu para a diminuição da NIDA/NT, com a queda de 5,37 pontos percentuais entre a ausência de N e a maior dose de adubação (Tabela 3).

No outono/inverno (cortes 4 e 5), houve menor efeito da adubação nitrogenada nas variáveis estudadas (Gráfico 2), quando comparado com a primavera/verão (cortes 1, 2 e 3).

No outono/inverno, a DIVMS teve efeito do N, com resposta linear positiva ($P < 0,05$), tanto para LF quanto para CB (Gráfico 2A). No tratamento sem adubação, foram verificados valores de DIVMS de 49% para lâmina foliar e 51% para CB, inferiores aos 58% e 59% respectivamente, observados no nível de 450 kg ha^{-1} de N. Contudo, o aumento da DIVMS foi menor em 12 pontos percentuais para LF e 7 pontos percentuais para CB neste período e na maior dose de N, comparados aos valores na primavera/verão (Tabela 4).

Não houve efeito ($P > 0,05$) para lignina na LF ($\bar{Y} = 58,04 \text{ g kg}^{-1}$ de MS) e CB ($\bar{Y} = 60,91 \text{ g kg}^{-1}$ de MS) no outono/inverno. Também não houve efeito ($P > 0,05$) para celulose na LF ($\bar{Y} = 224,41 \text{ g kg}^{-1}$ de MS) e CB ($\bar{Y} = 333,25 \text{ g kg}^{-1}$ de MS).

Na HEMI, na LF, houve efeito linear negativo ($P < 0,05$) em função do aumento do nitrogênio, entretanto não foi observado efeito ($P > 0,05$) para o CB ($\bar{Y} = 274,00 \text{ g kg}^{-1}$ de MS), no período outono/inverno (Gráfico 2B). Para a LF, sem adubação nitrogenada, foi obtido 278 g kg^{-1} de MS, valores que decresceram nos níveis, sendo 263 g kg^{-1} , 249 g kg^{-1} e 235 g kg^{-1} de MS para 150 , 300 e 450 kg ha^{-1} de N, respectivamente (Tabela 4). Vale ressaltar, contudo, as diferenças entre os tratamentos na comparação entre período chuvoso e seco. Na ausência de adubação, houve queda da HEMI de 3% do período chuvoso para o seco. Esta diferença aumentou para 11% no nível de 150 , de 18% no nível de 300 kg ha^{-1} de N e 24% no nível de 450 kg ha^{-1} de N.

No outono/inverno, houve efeito linear negativo ($P < 0,05$) para os níveis de nitrogênio no teor de fibra em detergente neutro (FDN) apenas na LF ($P < 0,05$), não havendo efeito ($P > 0,05$) para CB ($\bar{Y} = 707,40 \text{ g kg}^{-1}$ de MS) (Gráfico 2C). Para fibra em detergente ácido (FDA), tanto para lâmina foliar ($\bar{Y} = 374,22 \text{ g kg}^{-1}$ de MS) quanto para CB ($\bar{Y} = 461,33 \text{ g kg}^{-1}$ de MS), não houve efeito dos níveis de N ($P > 0,05$). Na LF, na menor dose de N foi verificado 643 g kg^{-1} de MS de FDN, reduzindo para 627 g kg^{-1} de MS na maior dose de N (450 kg ha^{-1} de N) (Tabela 4).

Quando comparados estes resultados da LF com a primavera/verão, verificou-se que a FDN continuou decrescendo ao longo dos cortes. O valor médio da FDN entre os níveis de N, no outono e inverno (635 g kg^{-1} de MS), é inferior ao valor médio na primavera/verão (653 g kg^{-1} de MS). Contudo, o mesmo comportamento não ocorreu

para DIVMS, que apesar de aumentar com os níveis de N, independente dos cortes, apresentou média no outono/inverno (53%) inferior a média da primavera/verão (59%). Este resultado demonstra a necessidade de compreender que não apenas a FDN, a FDA e tão pouco a lignina isoladas, são responsáveis pelo aumento da DIVMS.

No outono/inverno, houve efeito linear positivo ($P < 0,05$) tanto para a LF quanto para o CB, quando avaliado o NT (Gráfico 2D). Foi observado o aumento do NT com os níveis de N, com incremento de $0,83 \text{ g kg}^{-1}$ de MS e $0,22 \text{ g kg}^{-1}$ de MS, para a LF e CB respectivamente, quando comparados a ausência de N com a maior dose de adubação.

Houve também efeito linear negativo ($P < 0,05$) para a variável NIDN/NT (Gráfico 2E) na LF e para a NIDA/NT (Gráfico 2F) no CB. Não houve efeito ($P > 0,05$) para a NIDN/NT no CB ($\bar{Y} = 37,44\%$) e para a NIDA/NT na LF ($\bar{Y} = 13,63\%$), nas estações outono/inverno (Tabela 3).

Para o NIDN/NT, houve decréscimo de 12,94 pontos percentuais na LF, quando comparada a ausência de N com o nível de 450 kg ha^{-1} de N. Para a NIDA/NT, o decréscimo foi de 11,95 pontos percentuais no CB, com os mesmos níveis.

DISCUSSÃO

Os resultados (Gráficos 1A; 2A) corroboram com França et al. (2007), em experimento com o capim-tanzânia, que verificaram aumento da DIVMS com o aumento do nível de N, trabalho em que se utilizou níveis de 200, 400 e 600 kg ha^{-1} de N em quatro idades de corte, sendo o menor valor de DIVMS na menor dose de N e maior idade de 112 dias.

Barros et al. (2002) descrevem valores de DIVMS para o capim-tanzânia, obtidos nas estações chuvosa e seca, com variação de 63,61% a 66,92%, e média de 65,23%. Wilson (1973), em pesquisa com capim “green-panic” (*P. maximum* var. *trichoglume*), descreveram que a aplicação de níveis baixas a moderadas de nitrogênio, propiciaram às plantas aumento da digestibilidade de 3 a 5 unidades percentuais.

Portanto, de acordo com Van Soest (1982), os fatores ligados ao manejo da planta forrageira, tal como a idade de corte, adubação, características morfológicas da planta e altura de corte, aos quais a planta é submetida, podem influenciar decisivamente no valor nutricional da planta forrageira. Ainda, fatores como a idade da

planta e a altura de corte mais baixos resultam em maior quantidade de conteúdo da parede celular e, conseqüentemente, em maiores valores de DIVMS.

Brâncio et al. (2002) explicam que o aumento do suprimento de nitrogênio reduz o conteúdo de açúcares, que provoca aumento na concentração de aminoácidos e proteínas que se acumulam principalmente no conteúdo celular, acarretando diluição da parede celular e aumento de digestibilidade.

A redução da lignina no CB pode, em parte, explicar o aumento da DIVMS. Estudos demonstraram que a adubação nitrogenada influencia a digestibilidade de cultivares, visto que estimula a divisão celular (Costa et al., 1992), o perfilhamento e a formação de lâminas foliares (Marschener, 1995). Uma vez que perfilhos novos possuem baixo teor de lignina, sugere-se que a adubação influencia a lignificação indiretamente (Parsons et al., 2011).

Contudo, este fator não pode ser analisado isoladamente, em função da não variação da lignina na lâmina foliar na primavera/verão e, contudo, no outono/inverno tanto na LF quanto no CB. Pesquisas demonstraram ausência de efeitos e até efeitos negativos da adubação no teor de lignina (Gomide, 1984), uma vez que, considerando mesma frequência de desfolhação, forragens adubadas podem apresentar maior acúmulo e alongamento de CB e redução do valor nutritivo (Costa et al., 1992). Na maioria dos casos, na maturação da planta, o teor de lignina é aumentado pela fertilização de nitrogênio (Collins et al., 1990), e, é atribuído à estimulação da biossíntese de fenilalanina.

O contraste entre o efeito do N na lignina entre CB e LF pode explicar porque alguns estudos relatam que a adubação nitrogenada não gera nenhum efeito sobre o teor de lignina da forragem (Sanz et al., 2005; Hollena et al., 2006).

Ainda, os valores de LIG não podem ser tomados como um fator único para o aumento da DIVMS. Harkin (1973) sugere que os polissacárideos (celulose e outros) de forrageiras não são simplesmente incrustados por lignina, mas ligados covalentemente, entendendo-se que o tipo e a extensão da ligação lignina-polissacarídeo podem influenciar a digestão mais do que a quantidade de lignina, por si só.

Os resultados da fração de CEL na maior dose de N para CB na primavera/verão apontam a presença de plantas mais jovens, proveniente da ação da adubação que promove o surgimento de novos perfilhos, que possuem parede celular menos espessa e, conseqüentemente, menor teor de lignina e celulose. Contudo, os resultados sugerem

para a LF que a maior adubação (450 kg ha^{-1} de N) promoveu ação de crescimento e amadurecimento, voltando assim a aumentar os valores de celulose nessa porção.

A estrutura da parede celular é incrementada nas plantas que apresentam maior período de crescimento (Brett e Waldron, 1996). Para Brett e Waldron (1996) isto ocorre em função do aumento no tamanho das células e da espessura da parede celular com a maturidade das células, como consequência do maior peso dos componentes morfológicos da planta e sua maior necessidade de sustentação. Isto pode ser observado no tratamento sem adubação nitrogenada, no período da primavera/verão, no qual os resultados apontam para um aumento dos componentes fibrosos da parede celular, tanto na LF quanto no CB.

No outono/inverno esse efeito é inverso, por causa dos fatores abióticos, como a precipitação e temperatura, que diminuem a ação do nitrogênio na pastagem, principalmente na lâmina foliar, que é a estrutura mais susceptível às ações de fatores ambientais, comparada ao CB.

A hemicelulose é a fração mais influenciada pela lignificação, porém, é também o carboidrato da parede celular que apresenta maior potencial de digestibilidade (Balsalobre et al., 2003). Ainda, a hemicelulose é a responsável pela maior taxa de fermentação ruminal e, portanto, é a que mais fornece energia para o crescimento microbiano (Balsalobre et al., 2003). Portanto, o aumento da HEMI, somada a redução da CEL, na primavera/verão, justifica o aumento da DIVMS do capim-tanzânia, quando utilizada adubação nitrogenada.

Bilal e Sindhu (2001) em experimento com a cultivar Mott (*Panicum maximum*), com diferentes níveis de N, descreveram o aumento da porcentagem de hemicelulose na folha de 18% para 30% e, no colmo, de 17% para 28%. Para os autores estes resultados ocorreram em virtude da adubação nitrogenada, associada à maturidade da planta.

No presente experimento, o capim-tanzânia já se encontra estabelecido, e analisando os valores individuais de cada corte, pode-se inferir também que a alta concentração de HEMI foi observada no primeiro corte, momento em que havia maior probabilidade de obter plantas com maior maturidade em virtude da estação anterior que foi o inverno, principalmente no CB que não foi renovado pelo corte de uniformização onde o resíduo ficou em torno de 30 cm de altura.

Apesar da FDN ser comumente relacionada à DIVMS, visto que teores acima de 550 a 600 g kg^{-1} na matéria seca podem se correlacionar negativamente com o consumo

da forragem (Van Soest, 1994), pesquisas não relataram efeitos da adubação nitrogenada nos capins Tanzânia, Tifton 85 e Mombaça (Ruggiero et al., 2006; França et al., 2007; Galzerano & Morgado, 2007, respectivamente). Contudo, não se pode afirmar que haja um consenso na literatura. Cecato et al. (2001) e Rocha et al. (2001) observaram redução nos teores de FDN em capins do gênero *Cynodon*.

Vale ainda ressaltar que diferenças de 1 e 3% na FDN, observadas ao longo desta pesquisa, podem não justificar o aumento da DIVMS em 21 e 20%. Com isso, demonstra a importância de aprofundar estudos sobre a composição da parede celular e os efeitos do N nesta.

Teores de FDA superiores a 400 g kg⁻¹ de MS são encontrados somente em plantas com idade fisiológica avançada. Os resultados verificados neste experimento demonstram que, em condições adequadas de clima e manejo e, contudo, com a influência do nitrogênio, no crescimento e aumento no aparecimento de lâminas foliares, com lâminas foliares mais jovens participando da massa seca, há menor presença de FDN e FDA (Vitor et al., 2009). O contraste entre as reduções destas variáveis se justifica pelo aumento na hemicelulose, obtida através da diferença entre a FDN e FDA.

Entretanto, também não é verificado um consenso na literatura sobre a influência do N na FDA. Brâncio et al. (2002) e Costa (2004), analisando o capim-Mombaça e Tanzânia respectivamente, descreveram que os valores de fibra em detergente ácido não foram influenciados pela adubação nitrogenada.

Contudo, o aumento da diferença entre FDN e FDA justifica o aumento da HEMI, carboidrato mais digerível da parede celular, ocasionando com isso o aumento da DIVMS, uma vez que houve diminuição, apenas no CB, da LIG, na primavera/verão.

A porção NIDN/NT avaliada se refere aos compostos nitrogenados, que estão presos à parede celular, significando digestibilidade lenta no rúmen. No entanto, a porção NIDA/NT avaliada se refere aos compostos nitrogenados que estão ligados à lignina, taninos e a produtos da reação de Maillard, que os torna resistentes às enzimas microbianas e intestinais (Sniffen et al., 1992).

Quando comparados os resultados de ambos os períodos (primavera/verão e outono/inverno), foi possível observar que o aumento dos níveis de N aumentou o NT e diminuiu as porções de NIDN/NT e NIDA/NT, tanto para lâmina foliar quanto para o colmo+bainha.

Contudo, vale ressaltar que apesar dos valores de NT serem maiores para a LF em ambos os períodos, do que no CB, a porcentagem de NIDN/NT e NIDA/NT não seguiu a mesma lógica. Pode-se observar, a partir da soma do NIDN/NT e NIDA/NT, subtraindo-se do NT, que houve maior concentração de NT solúvel no outono/inverno, para LF (2,24 g kg⁻¹) e CB (0,78 g kg⁻¹), do que na primavera/verão que apresentou 1,1 g kg⁻¹ na LF e 0,61 g kg⁻¹ no CB.

Acredita-se que os maiores valores para NT solúvel no outono/inverno podem ser pelo maior tempo entre os cortes destes períodos, fator que pode ter contribuído para maior absorção de N pela planta. Ainda, deve ser considerado que o corte 4 apresentou maior precipitação (Figura 1), e o grande intervalo entre cortes aumentou o número de adubações.

Ainda, a utilização de secagem em estufa, com temperaturas superiores a 55°C, pode superestimar a porção indigestível das amostras do capim. Sousa et al. (2010) descreveu menores valores de NIDN/NT e NIDA/NT na estação chuvosa, atribuindo este fato ao menor idade fisiológica da gramínea neste período.

De acordo com Ferolla et al. (2008), é importante produzir forragem com alto teor de nitrogênio total, que pode ser alcançado por meio de alta porcentagem de lâminas foliares e alta relação folha:colmo em plantas produzidas em manejo com boas condições abióticas e fertilização adequada. Valadares Filho et al. (2006), em experimento com capim-tanzânia, atingiram teores de NIDN/NT e NIDA/NT, respectivamente, 41,1% e 16,6%.

Quando avaliada a influência do tempo (cortes) no efeito do nitrogênio no capim-tanzânia, houve interação para CEL (CB), LIG (LF e CB), NT (LF e CB), NIDN/NT (LF e CB) e NIDA/NT (LF e CB) (Tabela 3). Para as demais variáveis não houve interação com os níveis de N.

Nos cortes 1 e 3 (Tabela 3), observa-se menor quantidade de LIG, com pequenas variações entre os níveis de N, com médias de 27,49 a 32,27 g kg⁻¹ de MS na LF e 35,59 a 40,09 g kg⁻¹ de MS no CB, sendo os menores valores de lignina no nível de 450 kg ha⁻¹. Estes valores baixos se devem, principalmente, às melhores condições climáticas, favoráveis para crescimento e desenvolvimento da planta, reduzindo assim seu intervalo de colheita e, portanto, o tempo de vida, e que reduz o acúmulo de fibras e lignina.

Contudo, no mês de janeiro (corte 2) houve diminuição de atividade pluviométrica (Figura 1), assim como os cortes 4 e 5, que correspondem às estações

com menor temperatura, com limitação de fatores abióticos, que ocasionou o aumento nos teores de lignina em todas os níveis de nitrogênio estudadas. Isso pois a lignina é um composto secundário produzido pela planta em situação de estresse, na qual praticamente é cessado o crescimento e aparecimento de novas lâminas foliares preservando sua estrutura já formada. Isso, somado à adubação nitrogenada, que induz o amadurecimento da planta, favorecendo o espessamento da parede celular e aumentando a quantidade de lignina.

Devasena et al. (1994), quando avaliou os efeitos do estágio de crescimento sobre a composição química e a digestibilidade do capim-colonião, observaram aumento na FDN, FDA e lignina com o avançar da idade, com valores de 646,3, 505,3 e 63 g kg⁻¹ de MS, respectivamente, aos 30 dias de idade.

Os resultados observados corroboram também com Balsalobre et al. (2003), que indica que a variação no valor nutritivo do capim-tanzânia, ao longo do tempo, esteve dentro do padrão encontrado em outros trabalhos com a mesma gramínea.

Destaca-se que a lignina se concentra nas gramíneas em vários tecidos, como na bainha vascular, esclerênquima e parênquima, e que provavelmente aumenta seu acúmulo em todos os componentes da forrageira. Ainda, deve ser considerado que o manejo utilizado neste trabalho foi a interceptação luminosa, e que o efeito do N foi maior na estação com maior disponibilidade de fatores abióticos, mesmo no manejo através da IL, demonstrando que o mesmo varia de acordo com as variáveis climáticas.

Na Tabela 3, observa-se o efeito dos cortes e da adubação nitrogenada na CEL do CB, no qual o efeito do N somente foi evidenciado no nível de 300 kg ha⁻¹ de N.

A quantidade de CEL contida na parede primária é limitada, bem como polioses (hemiceluloses). As fibrilas de celulose são alocadas na parede primária, em camadas delgadas intercaladas em uma espécie de rede, contendo ainda pectina e proteínas imersas numa matriz de lignina. Entende-se por parede primária a primeira camada depositada durante o desenvolvimento da célula, permitindo a expansão da célula jovem. A parede secundária é a camada espessante da célula, alocada sobre a parede primária, após o crescimento superficial completo, promovendo maior rigidez e acúmulo de celulose, hemicelulose e lignina. Segundo Aguiar et al. (2010), a quantidade de celulose na parede celular varia de acordo com o estágio de desenvolvimento e o tipo da célula.

Com isso, evidencia-se que os valores de celulose decresçam com o nitrogênio considerando fatores abióticos adequados, pois em plantas jovens há menos espaçamento da parede celular. Para Black (1968), o suprimento de N e outros fatores permitem o crescimento da planta, portanto, intui-se que a mesma utilize os carboidratos disponíveis na formação de células e protoplasma.

O declínio dos valores da celulose para LF, no entanto, é mais lento do que para o CB. Taxas de declínio mais rápidas ocorrem durante a primavera em função do crescimento das gramíneas durante o período reprodutivo (Buxton, 1996).

Cabe ainda pontuar os maiores valores de CEL (CB), NT (LF e CB) e NIDA/NT (CB) no corte 5 (Tabela 3), período que houve maior espaçamento entre os cortes e limitação de fatores abióticos (Tabela 1), corroborando a justificativa de que houve tempo maior para amadurecimento da planta e, conseqüentemente, espessamento da parede celular.

Sá et al. (2010) verificaram, em pesquisa com capim tifton 85 (*Cynodon dactylon* cv Tiffon 85), braquiária (*Brachiaria brizantha* cv Marandu) e tanzânia (*Panicum maximum* Jacq. cv Tanzânia), que em todas as gramíneas, os teores de NIDN/NT aumentaram linearmente com o avanço da idade de corte. Castro et al. (2010) não verificou efeito significativo dos cortes no teor de NIDA/NT e NIDN/NT de capim-tanzânia.

Acredita-se que com o aumento da idade ao corte do capim-tanzânia, ocorre maior associação entre compostos nitrogenados e a parede celular, e, com isso, há diminuição da disponibilidade desses compostos pela formação de complexos que são resistentes à ação das enzimas microbianas e intestinais (Castro et al., 2010).

Na Tabela 4, observam-se as médias das variáveis que não obtiveram interação entre os cortes e a adubação nitrogenada. Uma vez que não houve interação para as variáveis apresentadas na Tabela 4, destacam-se os resultados dos cortes 1 e 5, que apresentaram valores com maior divergência em relação ao restante dos cortes.

No corte 1 (primavera), foi obtido o maior teor de DIVMS, tanto para a LF (67,17 g kg⁻¹ de MS) quanto para o CB (66,17 g kg⁻¹ de MS). Como comentado anteriormente, na primavera, em função do período reprodutivo e da alta disponibilidade de fatores abióticos, ocorre acelerado crescimento das gramíneas e, conseqüentemente, declínio da CEL, FDN e FDA (Buxton, 1996).

O inverso pode ser observado no corte 5 (inverno), estação na qual a diminuição de fatores abióticos, e com baixas temperaturas, aumentou o espaçamento entrecortes, possibilitando o amadurecimento da planta, ao invés do seu crescimento. Com isso, a DIVMS teve redução expressiva com valores de 48,14% para lâmina foliar e 49,42% no CB, sendo observados também valores altos para FDN e FDA. Contudo, salienta-se que, neste corte, a HEMI, já associada neste trabalho de forma positiva com a DIVMS, também apresentou valores baixos, sendo 257,91 g kg⁻¹ de MS para lâmina foliar e 226,33 g kg⁻¹ de MS no colmo+bainha.

CONCLUSÕES

Apesar de grande foco em estudos, foi observado a partir deste trabalho que a lignina, a FDN e a FDA não devem ser avaliadas como componentes isolados para determinar a limitação da DIVMS do capim-tanzânia, uma vez que houve efeitos relevantes na celulose e hemicelulose.

O aumento dos níveis de nitrogênio, associado a fatores abióticos favoráveis, promove a redução dos componentes da parede celular (celulose e lignina) que diminuem a digestibilidade *in vitro* da matéria seca. Ainda, níveis elevados de nitrogênio aumentaram a hemicelulose, parcela mais digestiva da parede celular, significando melhora da qualidade da gramínea.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguiar, M. M.; Ferreira, L. F. R.; Monteiro, R. T. R. 2010. Use of vinasse and sugarcane bagasse for the production of enzymes by lignocellulolytic fungi. Brazilian Archives of Biology and Technology (Impresso), v. 53, p. 1245-1254.
- Ankom. 2013. Method 9 – determining acid detergent lignin in daisy^{II} Incubator. Disponível em: <http://www.ankom.com/media/documents/Method_9_Lignin_in_Daisy_5_7_13.pdf> Acesso em Mar. 2014.
- Amakiri, A. O.; Owen, O. J.; Udenze, C. N. 2011. Comparative Study of Nutritional Value of Two Pasture Grasses using Weaner Rabbits. New Clues in Sciences, v. 1, p. 88-91.

- A.O.A.C. - ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. 2012. Official methods of analysis of the AOAC International. 19th edition. Washington: AOAC.
- Balsalobre, M. A. A.; Corsi, M.; Santos, P. M.; Cárdenas, R. R. 2003. Composição química e fracionamento do nitrogênio e dos carboidratos do capim-tanzânia irrigado sob três níveis de resíduo pós pastejo. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 32, p. 519-528.
- Barros, C. O; Pinto, J. C.; Evangelista, A. R. et al. 2002. Rendimento e composição química do capim-tanzânia estabelecido com milheto sob níveis de nitrogênio. *Ciência e Agrotecnologia, Lavras*, v. 26, n. 5, p. 1068-1075.
- Bilau, M. Q.; Sindhu, A. A. 2001. Hemi-cellulose and Cellulose contents of Mott Grass as affected by nitrogen fertilizer and stage of maturity. *Online Journal of Biological Sciences*, v. 1, n. 6, p. 436-437.
- Black, C.A. 1968. *Soil-plant relationship*. New York: John Wiley, p. 507-557.
- Brâncio, P.A.; Nascimento Jr., D.; Euclides, V. P. B. et al. 2002. Avaliação de três cultivares de *Panicum maximum* Jacq. sob pastejo, composição química e digestibilidade da forragem. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.31, n.4, p.1605-1613.
- Brett. C.; Waldron, K. 1996. *Physiology and Biochemistry of Plant Cells Walls*. 2 ed. London: Chapman & Hall, p. 76-111.
- Buxton, D. R. 1996. Quality-related characteristics of forages as influenced by plant environment and agronomic factors. *Animal Feed Science Technology*, v. 59, p. 37-49.
- Buxton, D. R.; Redfearn, D. D. 1997. Plant limitations to fiber digestion and utilization. *Journal of Nutrition*, v. 127, p. S814-S818.
- Castro, G. H. F., Rodriguez, N. M., Gonçalves, L. C., Mauricio, R. M. 2010. Características produtivas, agronômicas e nutricionais do capim-tanzânia em cinco diferentes idades ao corte. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 62, n.3.
- Cecato, U.; Santos, G. T.; Machado, M. A. 2001. Avaliação de cultivares do gênero *Cynodon* com e sem nitrogênio. *Acta Scientiarum, Maringá*, v. 23, n. 4, p. 781-788.

- Collins, M.; Brinkman, M. A.; Salman, A. A. 1990. Forage yield and quality of oat cultivars with increasing rates of nitrogen fertilization. *Agronomy Journal*, v. 82, p. 724–728.
- Costa, C.; Favoretto, V.; Malheiros, E. B. 1992. Variação na estrutura da vegetação de duas cultivares de *Panicum maximum* Jacq. (Colonião e Tobiatã) submetidas a diferentes tipos de manejo. Composição em proteína bruta e digestibilidade *in vitro* da matéria seca. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 27, n. 12, p. 1659-1670.
- Costa, K. A. P.; França, A. F. S.; Oliveira, I.P.; Monteiro, F. A.; Barigossi, J. A. F. 2004. Composição química-bromatologia do capim-tanzânia em função de níveis de nitrogênio, potássio e enxofre. *Ciência Animal Brasileira (UFG)*, Goiânia, v. 5, n. 2, p. 83-91.
- Detmann, E.; Paulino, M. F.; Cecon, P. R.; Valadares Filho, S. C.; Zervoudakis, J. T.; Cabral, L. S.; Leao, M. I.; Lana, R. P.; Ponciano, N. J. 2005. Níveis de proteína bruta em suplementos para terminação de bovinos em pastejo durante o período de transição seca-águas: Consumo voluntário e trânsito de partículas. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.34, n.4, p.1380-1391.
- Devasena, B.; Krishna, N.; Rama, P. J.; et al. 1994. Effect of stage of growth on chemical composition and in sacco degradability of colonial grass. *Indian Journal of Animal Sciences*, v. 64, n. 10, p. 1108-1110.
- Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA. 1999. Sistema brasileiro de classificação de solos. Rio de Janeiro, Ministério da Agricultura e do Abastecimento, 412p.
- Ferolla, F. S.; Vásquez, H. M.; Silva, J. F. C.; Viana, A.P.; Domingues, F. N.; Lista, F. N. 2008. Composição bromatológica e fracionamento de carboidratos e proteínas de aveia-preta e triticale sob corte e pastejo. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 37, n. 2, p. 197-204.
- França, A. F. S.; Borjas, A. L. R.; Oliveira, E. R.; Soares, T. V.; Miyagi, E. S.; Souza, V. R. 2007. Parâmetros nutricionais do capim-tanzânia sob níveis crescentes de nitrogênio em diferentes idades de corte. *Ciência Animal Brasileira*, v. 8, p. 695-703.
- Fukushima, R. S.; Hatfield, R. D. 2004. Comparison of the acetyl bromide spectrophotometric method with other analytical lignin methods for determining

- lignin concentration in forage samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 52, p. 3713-3720.
- Galzerano, L.; Morgado, E. 2007. Influência do nitrogênio na produção e qualidade do capim Tifton 85 (*Cynodon spp.*). *Revista Electrónica de Veterinária*, 13. Disponível em: <<http://www.redvet.es>>. Acesso em: 01 fev 2014.
- Gomide, J. A.; Costa, G. G. 1984. Adubação nitrogenada e consorciação de capim-colômbio e capim jaraguá. III Efeitos de níveis de nitrogênio sobre a composição mineral e digestibilidade da matéria seca das gramíneas. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 13, n. 2, p. 215-224.
- Harkin, J. M. 1973. *Lignin in Chemistry and Biochemistry of Herbage*, v. 1, Academic Press, New York, N.Y., Chapter 7.
- Holden, L. A. 1999. Comparison of methods of in vitro dry matter digestibility for ten feeds. *Journal of Dairy Science*, v. 82, n. 8, p. 1791-1794.
- Hollena, N.; Ridzwan Abdul, H.; Mohd Fauzi, R. 2006. The effects of nitrogen fertilization levels on the straw nutritive quality of Malaysian rice varieties. *Agronomy Journal*, v. 5, p. 482-491.
- Jung, H. G. 2011. Forage digestibility: the intersection of cell wall lignification and plant tissue anatomy. In: III International Symposium Advances on Research Techniques for Ruminant Nutrition, March 24-25, 2011, Pirassununga, Brazil. p. 137-160.
- Lima Junior, D. M.; Monteiro, P. B. S.; Rangel, A. H. N.; et al. 2010. Fatores anti-nutricionais para ruminantes. *Acta Veterinaria Brasilica*, v. 3, n. 4, p. 132-143.
- Maciel, R. P.; Neiva, J. N. M.; Araujo, V. L.; Cunha, O. F. R.; Paiva, J.; Restle, J.; Mendes, C. Q.; Lôbo, R. N. B. 2012. Consumo, digestibilidade e desempenho de novilhas leiteiras alimentadas com dietas contendo torta de dendê. *Revista Brasileira de Zootecnia.*, v. 41, n. 3, p. 698-706.
- Marschener, H. 1995. *Mineral nutrition of higher plants*. 2.ed. London: Academic Press, 889p.
- Nagano, N. R.; Zanet, C.; Tiritan, C. S.; Santos, D. H. 2011. Efeito da adubação nitrogenada e altura de corte sobre o capim-tanzânia. *Revista Scientia Agraria Paranaensis*, v. 10, n. 1, p. 100-112.
- Parsons, A.; Rowarth, J.; Thornley, J. And Newton, P. 2011. Primary production of grasslands, herbage accumulation and use, and impacts of climate change. In:

- Lemaire, G.; Hodgson, J. e Chabbi, A. (Eds.). Grassland productivity and ecosystem services. CABI. Wallingford, p. 3-18.
- Pell, A. N.; Schofield, P. 1993. Computerized monitoring of gas production to measure forage digestion in vitro. *Journal of Dairy Science*, v. 76, n. 9, p. 1063-1073.
- Rocha, G. P.; Evangelista, A. R.; Paiva, P. C. A.; Freitas, R. T. F.; Souza, A. F.; Garcia, R. 2001. Digestibilidade e fração fibrosa de três gramíneas do gênero *Cynodon*. *Ciência e Agrotecnologia*, v. 25, p. 396-407.
- Ruggiero, J. A.; Rosa, B.; Freitas, K. R.; Nascimento, J. L. 2006. Avaliação de lâminas de água e de níveis de nitrogênio na composição bromatológica do capim-mombaça. *Bioscience Journal*, v. 22, p. 9-19.
- Sá, J. F.; Pedreira, M. S.; Silva, S. S.; et al. 2010. Fracionamento de carboidratos e proteínas de gramíneas tropicais cortadas em três idades. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.62, n.3, p. 667-676.
- Sanz, J.; Muntifering, R. B.; Bermejo, V.; Gimeno, B. S.; Elvira, S. 2005. Ozone and increased nitrogen supply effects on the yield and nutritive quality of *Trifolium subterraneum*. *Atmospheric Environment*, v. 39, p. 5899–5907.
- Sniffen, C. J.; O'Connor, J. D.; Van Soest, P. J. 1992. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: II. Carbohydrate and protein availability. *Journal of Animal Science*., v. 70, p. 3562-3577.
- Sousa, L. F.; Maurício, R. M.; Moreira, G. R.; Gonçalves, L.C.; Borges, I.; Pereira, L. G. R. 2010. Nutritional evaluation of Braquiaraõ grass in association with Aroeira trees in a silvopastoral system. *Agroforestry Systems*, v. 79, n. 2, p. 189-199.
- Tilley, J. M. A.; Terry, R. A. 1963. A two stage technique for the in vitro digestion of forage crop. *Journal of Britain Grassland Society*, v. 18, p. 104-111.
- Valadares Filho, S. C.; Magalhaes, K .A.; Rocha Jr, V. R.; et al. Tabelas brasileiras de composição de alimentos para bovinos. 2.ed. Viçosa: UFV, 2006, 329p.
- Van Soest, P. J. 1982. Nutritional ecology of the ruminant. Corvallis: O&B Books Incorporated, 170 p.
- Van Soest, P. J. 1994. Nutritional ecology of the ruminant. Ithaca: Cornell University, 476p.

- Vitor, C. M. T.; Fonseca, D. M. Da.; Cóser, A.C.; et al. 2009. Produção de matéria seca e valor nutritivo de pastagem de capim-elefante sob irrigação e adubação nitrogenada. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 38, n. 3, p. 435-442.
- Vogel, K. P.; Jung, H. J. G. 2001. Genetic modification of herbaceous plants for feed and fuel. *Critical Reviews in Plant Sciences*, v. 20, p. 15-49.
- Werner, J. C.; Paulino, V. T.; Cantarella, H.; et al. 1996. Forrageiras: recomendações de adubação e calagem para o estado de São Paulo, 2 ed. Campinas, Instituto Agrônômico e Fundação IAC, (Boletim técnico, 100), p. 263.
- Wilson, J. R. 1973. The influence of aerial environment, nitrogen supply, and ontogenetical changes on the chemical composition and digestibility of *Panicum maximum* Jacq. var. *trichoglume* Eyles. *Australian Journal of Agricultural Research*, v. 24, n. 4, p. 543-556.

FIGURAS, TABELAS E GRÁFICOS.

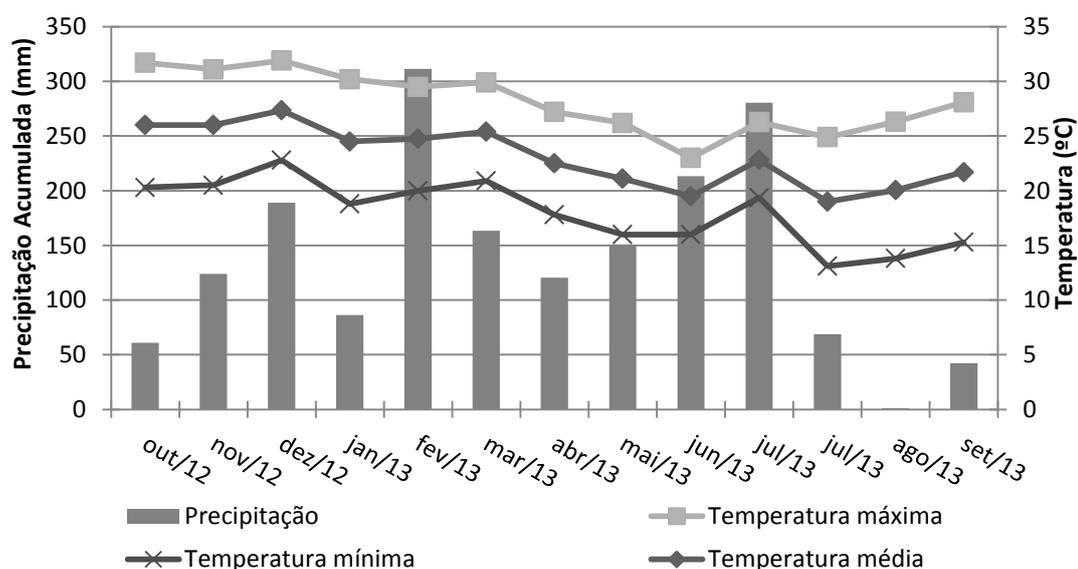


Fig. 1. Dados climáticos de precipitação e temperatura: máxima, média e mínima durante o período experimental.

Fonte: Laboratório de Sementes da Fazenda Experimental de Iguatemi – UEM

Tabela 1 – Componentes químicos do solo das pastagens de capim-tanzânia no início do período experimental.

| Trat. | Prof. cm | P ¹ mg/dm ³ | C g/dm ³ | pH H ₂ O | H+Al | -----cmol _c /dm ³ ----- | | | | | V ⁵ % |
|-------|----------|-----------------------------------|---------------------|---------------------|------|---|-----------------|----------------|-----------------|------------------|------------------|
| | | | | | | Ca ² | Mg ² | K ¹ | SB ³ | CTC ⁴ | |
| 1 | 0-20 | 10,23 | 13,33 | 6,00 | 2,27 | 1,89 | 0,60 | 0,12 | 2,60 | 4,87 | 53,41 |
| 2 | 0-20 | 8,09 | 11,32 | 5,90 | 2,45 | 1,20 | 0,47 | 0,08 | 1,75 | 4,20 | 41,61 |
| 3 | 0-20 | 5,34 | 10,12 | 5,70 | 2,45 | 1,38 | 0,43 | 0,07 | 1,87 | 4,32 | 43,31 |
| 4 | 0-20 | 4,89 | 9,02 | 5,80 | 2,36 | 1,89 | 0,64 | 0,04 | 2,56 | 4,92 | 52,08 |

Fonte: Laboratório Rural de Maringá. ¹Extraído por Melich; ²Ca e Mg - extraídos com KC 1mol L⁻¹; ³Soma de Bases; ⁴Capacidade de troca de cátions; ⁵Porcentagem de saturação por bases.

Tabela 2 - Separação dos períodos chuvoso e seco de acordo com os cortes.

| Estações | Corte | Dose de Nitrogênio (kg N ha ⁻¹) |
|----------|-------|---|
|----------|-------|---|

| | | 0 | 150 | 300 | 450 |
|-----------------|---|----------|----------|----------|----------|
| Primavera/Verão | 1 | | 28/12/12 | 28/12/12 | 28/12/12 |
| | 1 | | 04/01/13 | 04/01/13 | 04/01/13 |
| | 1 | 22/03/13 | 07/01/13 | 07/01/13 | 07/01/13 |
| | 2 | | 28/01/13 | 28/01/13 | 28/01/13 |
| | 3 | | 05/03/13 | 05/03/13 | 05/03/13 |
| Outono/Inverno | 4 | | 09/04/13 | 09/04/13 | 09/04/13 |
| | 5 | - | 24/07/13 | 24/07/13 | 24/07/13 |

Tabela 3 – Concentração de lignina, nitrogênio total, nitrogênio insolúvel em detergente neutro por nitrogênio total (NIDN/NT) e nitrogênio insolúvel em detergente ácido por nitrogênio total (NIDA/NT) da fração lâmina foliar e colmo+bainha e celulose da fração colmo+bainha de capim-tanzânia fertilizado com níveis nitrogênio nos cortes, sob pastejo, que obtiveram interação.

| Cortes | Níveis de nitrogênio (kg ha ⁻¹ ano ⁻¹) | | | Médias |
|--------|---|----------|-----------|----------|
| | 150 | 300 | 450 | |
| | Lignina Lâmina Foliar (g kg ⁻¹) | | | |
| 1 | 27,28 A | 26,74 A | 28,45 A | 27,49 A |
| 2 | 43,69 AB | 50,64 AB | 39,58 AB | 44,64 AB |
| 3 | 27,56 A | 33,54 AB | 35,71 AB | 32,27 A |
| 4 | 60,17 B | 58,51 B | 58,81 AB | 59,16 B |
| 5 | 62,11 B | 44,80 AB | 63,27 B | 56,73 B |
| | Lignina Colmo+bainha (g kg ⁻¹) | | | |
| 1 | 46,32 AB | 38,19 A | 22,25 A | 35,59 AB |
| 2 | 33,25 A | 34,52 A | 33,23 AB | 33,67 A |
| 3 | 39,17 A | 42,14 A | 38,97 ABC | 40,09 AB |
| 4 | 69,15 B | 42,69 A | 64,32 C | 62,61 C |
| 5 | 55,39 AB | 54,37 A | 51,52 BC | 49,87 BC |
| | Celulose Colmo+bainha (g kg ⁻¹) | | | |
| 1 | 289,25 A | 214,25 A | 307,50 A | 270,33 A |
| 2 | 326,50 A | 325,25 B | 315,00 A | 322,25 B |
| 3 | 353,50 A | 387,25 B | 350,25 A | 363,66 B |
| 4 | 313,00 A | 350,00 B | 349,75 A | 337,58 B |
| 5 | 359,50 A | 359,25 B | 349,75 A | 356,16 B |
| | Nitrogênio Total Lâmina Foliar (g kg ⁻¹) | | | |
| 1 | 2,59 C | 1,89 A | 2,00 A | 2,16 A |
| 2 | 2,91 E | 2,64 D | 2,98 C | 2,84 D |
| 3 | 2,01 A | 2,47 B | 2,54 B | 2,34 B |
| 4 | 2,70 D | 3,26 E | 3,54 E | 3,17 E |
| 5 | 2,22 B | 2,60 C | 3,04 D | 2,62 C |
| | Nitrogênio Total Colmo+bainha (g kg ⁻¹) | | | |
| 1 | 1,49 B | 1,09 A | 1,07 A | 1,21 AB |
| 2 | 1,18 AB | 1,17 A | 1,22 A | 1,19 AB |
| 3 | 0,90 A | 1,15 A | 1,24 A | 1,09 A |
| 4 | 1,46 B | 2,10 B | 1,94 B | 1,83 C |
| 5 | 1,45 B | 1,42 A | 1,42 A | 1,43 A |
| | NIDN / NT Lâmina Foliar (%) | | | |
| 1 | 39,69 AB | 46,45 B | 45,48 CD | 43,88 C |
| 2 | 32,20 A | 37,30 B | 34,63 BC | 34,71 B |

| | | | | |
|-----------------------------|-----------|----------|----------|----------|
| 3 | 49,14 B | 43,60 B | 51,22 D | 47,99 C |
| 4 | 31,90 A | 19,84 A | 28,79 AB | 26,84 AB |
| 5 | 40,40 AB | 19,24 A | 17,63 A | 25,76 A |
| NIDN / NT Colmo+bainha (%) | | | | |
| 1 | 38,15 A | 41,13 A | 36,59 AB | 38,62 A |
| 2 | 47,97 AB | 37,40 A | 33,07 A | 39,48 A |
| 3 | 68,60 B | 39,39 A | 43,19 AB | 50,39 A |
| 4 | 46,60 A | 36,73 A | 36,02 AB | 39,78 A |
| 5 | 38,19 A | 33,06 A | 56,13 B | 42,46 A |
| NIDA / NT Lâmina Foliar (%) | | | | |
| 1 | 14,97 A | 15,41 AB | 9,90 A | 13,42 A |
| 2 | 13,30 A | 17,98 AB | 14,88 A | 15,39 A |
| 3 | 27,54 B | 19,54 B | 20,64 B | 22,57 B |
| 4 | 12,25 A | 16,72 AB | 12,36 A | 13,78 A |
| 5 | 13,07 A | 11,01 A | 11,25 A | 11,78 A |
| NIDA / NT Colmo+bainha (%) | | | | |
| 1 | 12,20 A | 12,48 A | 13,47 A | 12,71 A |
| 2 | 16,74 AB | 15,91 A | 16,48 A | 16,38 AB |
| 3 | 20,96 ABC | 32,50 B | 12,04 A | 21,83 B |
| 4 | 26,10BC | 11,80 A | 14,82 A | 17,57 AB |
| 5 | 30,79 C | 14,67 A | 14,65 A | 20,04 B |

*Médias seguidas de letras diferentes na coluna, diferem para os cortes, pelo Teste Tukey ($p < 0,05$).

Tabela 4 – Quantidade média na lâmina foliar de digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS), celulose (CEL), hemicelulose (HEMI), fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA), e no colmo+bainha de digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS), hemicelulose (HEMI), fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA) de capim-tanzânia fertilizado com níveis nitrogênio nos cortes, sob pastejo, que não obtiveram interação entre os níveis de N.

Valores Médios dos níveis de nitrogênio nos cortes para Lâmina Foliar

| Cortes | DIVMS | CEL | HEMI | FDN | FDA |
|--------|----------|-----------|----------|-----------|----------|
| 1 | 67,17 C | 231,83 A | 337,16 B | 652,79 B | 315,72 A |
| 2 | 64,91 BC | 216,91 A | 286,25 A | 621,45 A | 335,27 A |
| 3 | 62,42 BC | 303,66 B | 285,58 A | 680,61 C | 394,92 B |
| 4 | 61,91 B | 253,91 AB | 240,00 A | 628,20 AB | 388,19 B |
| 5 | 48,14 A | 246,83 A | 257,91 A | 642,40 AB | 384,49 B |

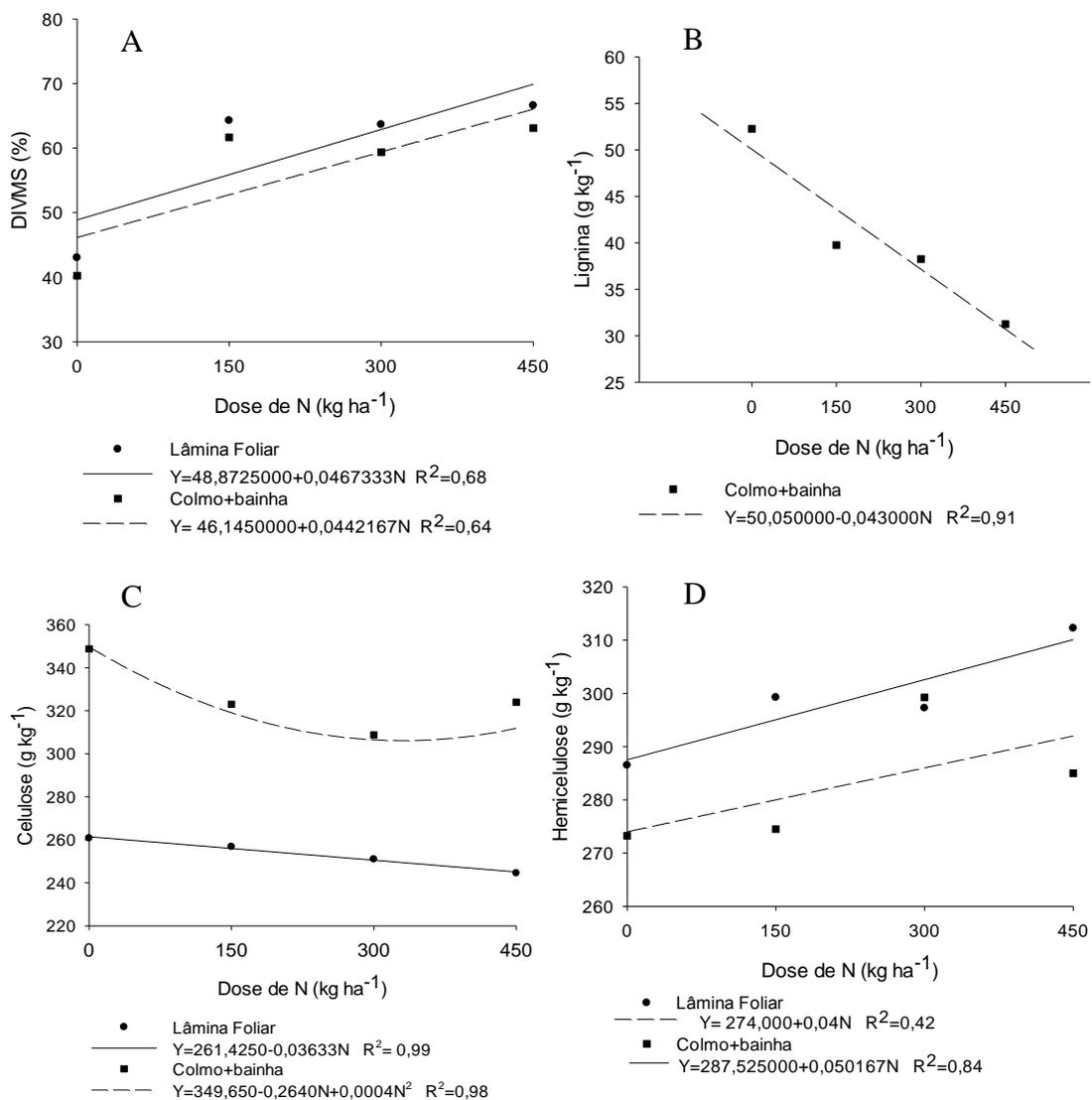
Valores Médios dos níveis de nitrogênio nos cortes para Colmo+bainha

| Cortes | DIVMS | HEMI | FDN | FDA |
|--------|----------|------|-----------|-----------|
| 1 | 66,17 D | - | 294,25 B | 653,44 A |
| 2 | 58,02 B | - | 280,66 AB | 686,70 AB |
| 3 | 59,95 BC | - | 283,83 B | 732,21 B |
| 4 | 63,93 CD | - | 241,50 AB | 696,71 B |
| 5 | 49,42 A | - | 226,33 A | 695,67 B |

*Médias seguidas de letras diferentes na coluna, diferem para os cortes, pelo Teste Tukey ($p < 0,05$).

Gráfico 1 – Equações de regressão ajustadas e coeficiente de determinação para lâmina foliar e colmo+bainha em plantas de capim-tanzânia, em função dos níveis de nitrogênio, na Primavera/Verão, na digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS) (A), lignina (LIG) (B), celulose (CEL) (C), hemicelulose (HEMI) (D), fibra em

detergente neutro (FDN) (E), fibra em detergente ácido (FDA) (F), nitrogênio total (NT) (G), nitrogênio insolúvel em detergente neutro por nitrogênio total (NIDN/NT) (H) e nitrogênio insolúvel em detergente ácido por nitrogênio total (NIDA/NT) (I).



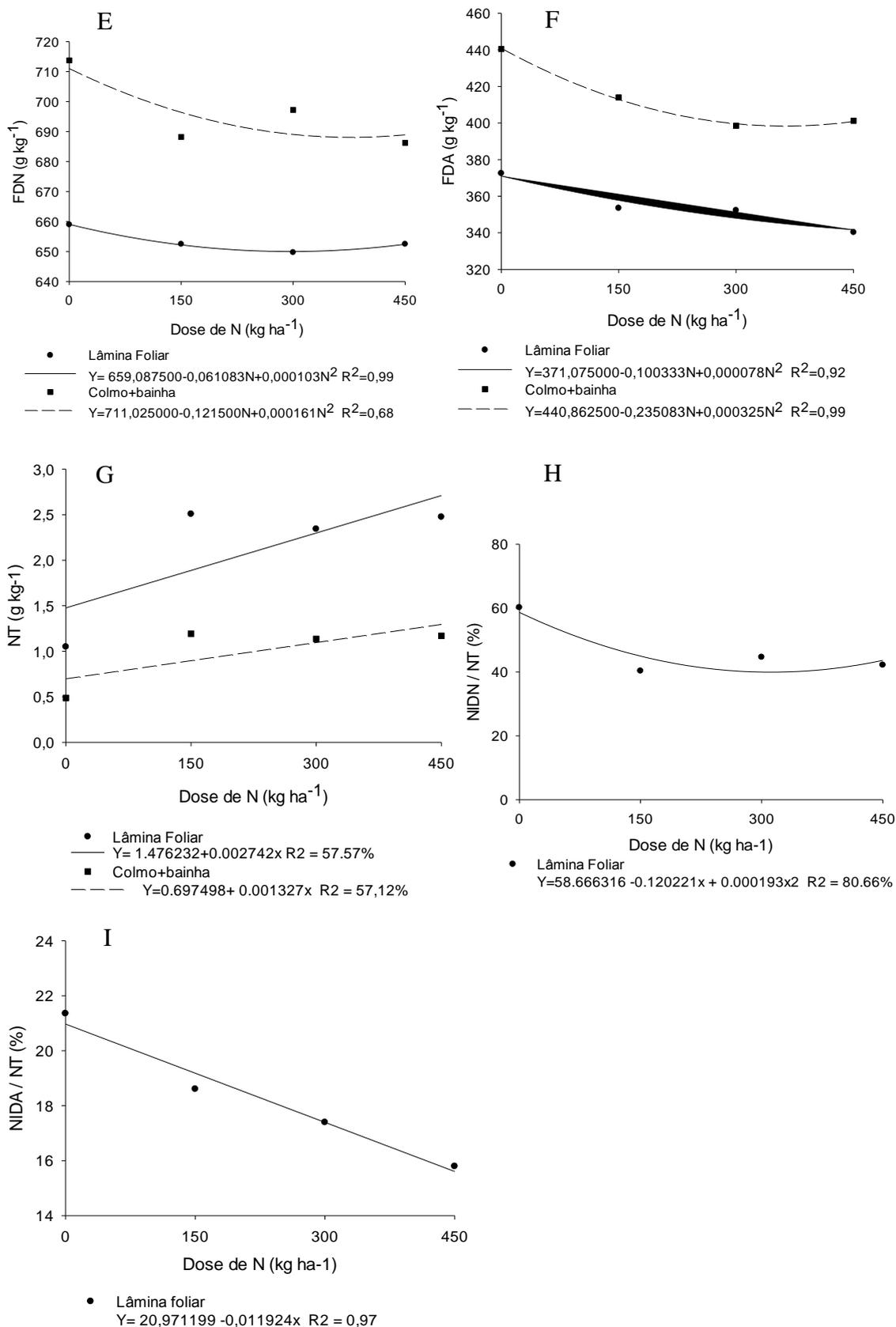
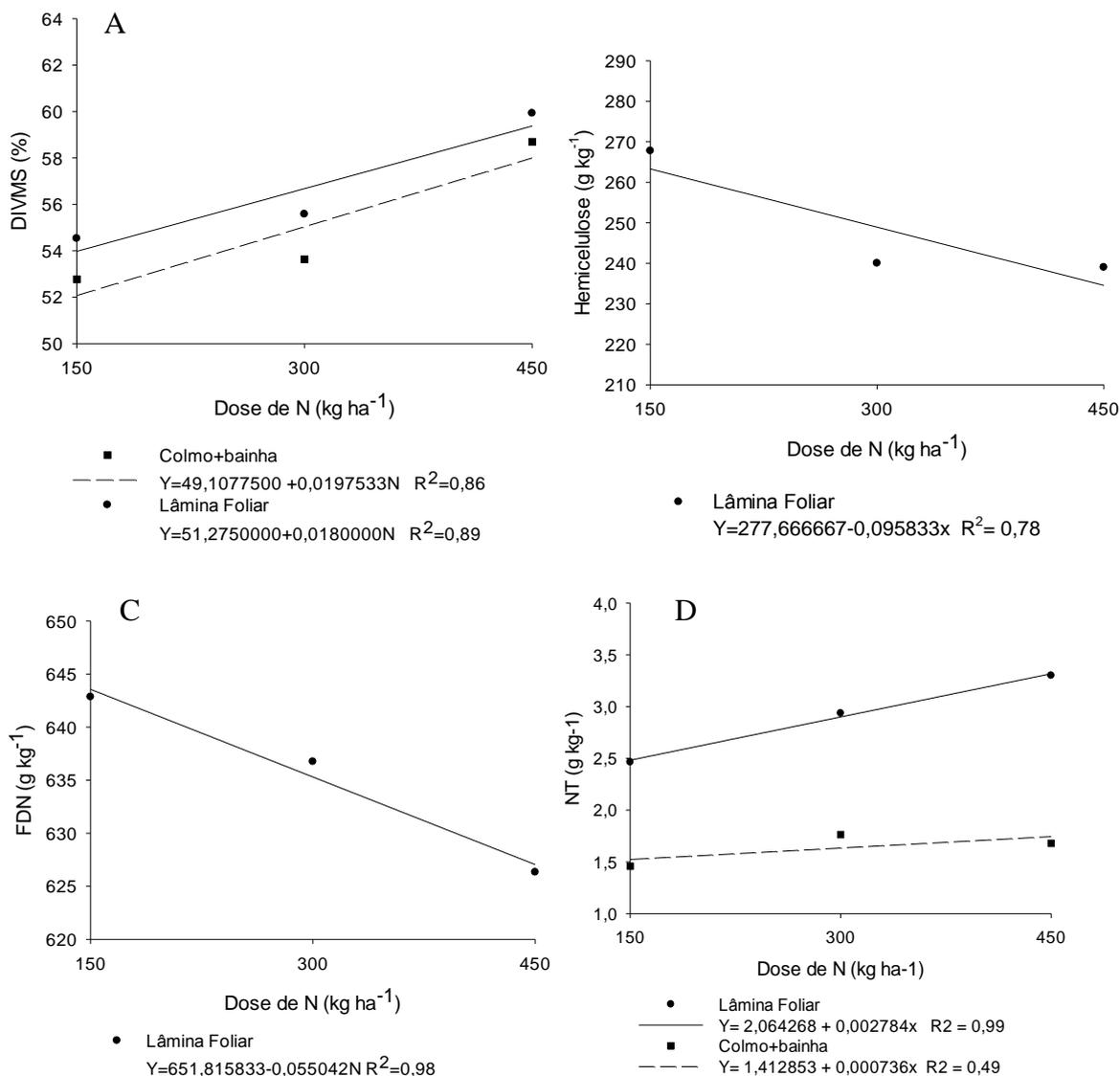
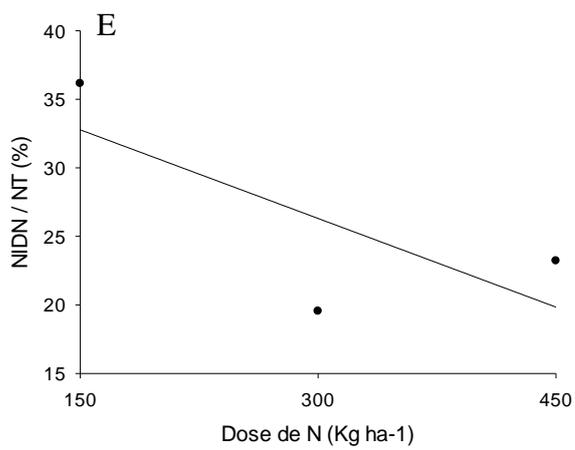
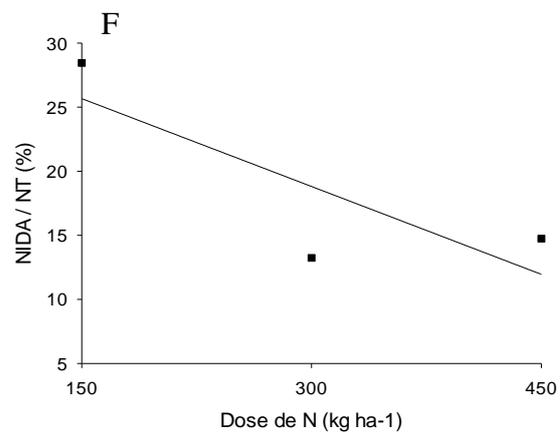


Grafico 2 – Equações de regressão ajustadas e coeficiente de determinação para lâmina foliar e colmo+bainha em plantas de capim-tanzânia, em função dos níveis de nitrogênio, no outono e inverno, para digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS) (A), hemicelulose (HEMI) (B), fibra em detergente neutro (FDN) (C), nitrogênio total (NT) (D), nitrogênio insolúvel em detergente neutro por nitrogênio total (NIDN/NT) (E) e nitrogênio insolúvel em detergente ácido por nitrogênio total (NIDA/NT) (F).





• Lâmina Foliar
 $Y=39,239020-0,043111x$ $R^2 = 0,55$



■ Colmo+bainha
 $Y= 32,520128 - 0,045699x$ $R^2 = 0,67$

CAPÍTULO II – INFLUÊNCIA DA ADUBAÇÃO NITROGENADA
SOBRE AS PROPRIEDADES BIOMECÂNICAS DO CAPIM-
TANZÂNIA
(Agricultural Science)

SUMÁRIO

Objetivou avaliar diferentes níveis de adubação nitrogenada sobre as características biomecânicas (tensão, resistência à tração e energia de ruptura) da lâmina foliar (LF) e colmo+bainha (CB), e se estas características influenciam a digestibilidade *in vitro* da matéria orgânica (DIVMO), em diferentes épocas de corte, em pastos de *Panicum Maximum* cv. Tanzânia e a correlação da tensão com fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA), celulose (CEL), hemicelulose (HEMI), lignina (LIG) e área da LF e CB. O experimento foi realizado entre novembro de 2012 e setembro de 2013. O delineamento experimental foi em blocos ao acaso em parcelas subdivididas no tempo. A ausência de adubação e os três diferentes níveis de nitrogênio (N), (150, 300 e 450 kg ha⁻¹ de N) representaram a parcela principal, e os cortes representaram as subparcelas (1 a 5) com quatro repetições. Na LF, o menor valor de tensão foi observado no nível de 450 kg/ha de nitrogênio (N) no outono/inverno, de 43,5 newtons, inferior ao valor obtido na mesmo nível na primavera/verão (47,6 newtons). Houve, nesse nível, decréscimo de 46%, quando comparado ao capim-tanzânia sem adubação nitrogenada (81 newtons). O CB apresentou valores acima da média geral no período outono/inverno, sendo observados 286,75 newtons na ausência de adubação nitrogenada e 136,36 newtons no nível de 450 kg/ha de N, significando a redução de 52%. A resistência à tração e energia de ruptura diminuiu também com os níveis de nitrogênio. A DIVMO aumentou com os níveis de nitrogênio assim como a área da LF e CB. Observou-se, portanto, forte correlação e significativa principalmente na FDN, FDA, e

área da LF e CB, sendo esta última com correlação negativa. A adubação nitrogenada diminuiu os componentes de tração do capim-tanzânia, de forma correlacionada à composição da parede celular, sobretudo FDN e FDA. Portanto as propriedades biomecânicas, como a resistência a tração e a energia de ruptura, são parâmetros relevantes que podem determinar a qualidade da forragem.

INTRODUÇÃO

Durante milhares de anos, herbívoros e plantas forrageiras passaram por um processo de coevolução, desenvolvendo estratégias de sobrevivência, a ponto de serem mutuamente beneficiados. Plantas passaram por mudanças em seus padrões de crescimento e alocação de recursos, enquanto animais alteraram seus padrões de deslocamento, preferência e ingestão, como resposta à espécie, estrutura, composição química e disponibilidade da forragem (Carvalho et al. 2002).

No processo de ingestão de alimentos, é exigida pelo animal a manipulação da forragem com o seu aparelho de colheita (boca, dentes e língua), a fim de selecionar as partes mais nutritivas do pasto. Um alto nível de seletividade geralmente resulta em maior qualidade de dieta do que a qualidade da forragem em oferta (Benvenuti et al. 2009).

No entanto, também leva a bocados menores, que levam mais tempo para apreender a quantidade de forrageira desejada. Estudos recentes em pastagens artificiais têm mostrado que este comportamento seletivo varia de acordo com a resistência à tração dos colmos+bainha (Benvenuti et al. 2006, 2008).

Gramíneas C4 apresentam alongamento contínuo de colmo em ambientes tropicais (Pedreira et al., 2005). Portanto, a força necessária para romper partes da planta é geralmente mais elevada (Zhang et al., 2004). A qualidade da dieta aumenta quando a resistência é dividida entre lâminas foliares e colmo+bainha.

Ainda, os animais buscam por colmo+bainha macios, e evitam colmo+bainha duros (Benvenuti et al., 2006), sugerindo a teoria de que menor tensão resulta em maior consumo.

Um importante fator de produção com forte impacto nas características estruturais das plantas é a adubação nitrogenada. Há evidências de que o nitrogênio incrementa a densidade de plantas, tornando a lâmina foliar e o colmo+bainha mais tenros, para o mesmo estágio de desenvolvimento em gramíneas tropicais. Contudo,

inexistem pesquisas que relacionem o incremento de níveis de nitrogênio com as características biomecânicas (tensão de ruptura, resistência à tração e energia de ruptura).

Uma vez que o nitrogênio comprovadamente reduz a rigidez de gramíneas, acredita-se que o mesmo pode afetar diretamente os parâmetros de força de colheita pelos bovinos em pastejo, possibilitando que estas características sejam parâmetros interessantes para avaliar a qualidade do pasto.

O objetivo para realização do presente estudo foi avaliar a influência de níveis crescentes de adubação nitrogenada sobre as características biomecânicas da lâmina foliar e colmo+bainha, e se estas características se correlacionam com a digestibilidade *in vitro* da matéria orgânica, em diferentes estações do ano, em pastos de capim-tanzânia.

MATERIAL E MÉTODOS

Preparo do solo e delineamento experimental

O experimento foi realizado na Fazenda Experimental de Iguatemi (FEI) localizada na latitude de 23° 25' S; 51° 57' O, e 550 metros de altitude, da Universidade Estadual de Maringá (UEM), Maringá-PR. O tipo climático predominante de Köppen, com temperatura média anual de 22°C. Este se caracteriza pela predominância de verões quentes, baixa frequência de geadas severas e a tendência de concentração das chuvas no período do verão. O período experimental foi de novembro de 2012 a setembro de 2013, cujos dados climáticos foram coletados no posto meteorológico da FEI, campus da UEM (Figura 1).

O experimento foi conduzido em área de *Panicum maximum* Jacq. cv. Tanzânia, estabelecida em novembro de 2003 com área de Latossolo Vermelho distrófico (Embrapa 1999).

No mês de agosto de 2012 foi realizada a coleta de amostras de solo na profundidade (0-20 cm) nos quatro blocos, para correção de acidez para elevação da saturação de bases a 60%, segundo Werner et al. (1996), além da aplicação de 40 kg/ha de fósforo (P₂O₅) na forma de superfosfato simples. Os resultados da análise de solo se encontram na Tabela 1.

A área experimental apresentava total de 800 m² dividida em 16 parcelas, com 50 m² cada, nos quais foram alocados os tratamentos com aplicações de nitrogênio (N) e potássio (K₂O) que foram parcelados de acordo com a quantidade total a ser aplicada, com início no dia 21/11/2012. O nitrogênio teve como fonte o nitrato de amônio e foi aplicado de acordo com o tratamento, a menor dose (150 kg/ha de N) em três aplicações com intervalos de 45 dias, 300 kg/ha de N em seis aplicações com intervalos de 30 dias, e 450 kg/ha de N em nove aplicações com intervalos de 15 dias. O K₂O teve como fonte o cloreto de potássio e foi aplicado com intervalo de 45 dias em todas as parcelas, totalizando de 80 kg/ha de K₂O.

O delineamento experimental foi em blocos ao acaso em parcelas subdivididas no tempo. A ausência de nitrogênio e os três níveis de nitrogênio (150, 300 e 450 kg/ha de N) representaram a parcela principal, e os cortes representaram as subparcelas (1 a 5).

Manejo do pasto

Cada parcela foi pastejada por uma novilha da raça holandês de aproximadamente 250 kg, pelo método de pastejo intermitente, em que os animais permaneceram, aproximadamente, 1 a 2 dias com período de descanso variável em função da mensuração da interceptação luminosa. A entrada do animal ocorreu quando as plantas atingiam 95% de interceptação luminosa, cuja mensuração foi realizada com analisador de dossel modelo LAI 2000 (LI-COR, Lincoln, Nebraska, EUA). A retirada dos animais das parcelas foi realizada quando o resíduo do pasto chegou próximo de 30 cm de altura.

Análise das variáveis biomecânicas

As propriedades de ruptura (tensão, resistência à tração e energia de ruptura) da lâmina foliar e colmo+bainha frescos foram mensurados em cinco perfilhos aleatórios coletados nas parcelas de cada tratamento quando atingiu 95% de IL, e, se retirou a terceira folha expandida de cada perfilho, sendo medidos 20 cm de comprimento a partir da região mediana para lâmina foliar e também colmo+bainha. Posteriormente, para as medidas das propriedades de ruptura, foi utilizado o Texturômetro TA.XT Plus, Texture Technologies Corp, Hamilton-MA, localizado no Complexo de Centrais de Apoio as Pesquisas (COMCAP-UEM) a partir da metodologia descrita por Benvenuti

et al. (2006). As lâminas foliares foram afixadas no texturômetro, utilizando a probe de “garras” mecânicas. A largura da folha e o diâmetro do colmo foram medidos utilizando paquímetro para se determinar a **Área da LF e CB (mm²)**.

Testes em que as amostras escorregaram das garras ou quando houve fratura de grampos foram considerados inválidos. A curva de força-deslocamento foi plotada para cada teste válido, em que a tensão de ruptura (Newton), resistência à tração (mJ/mm) e energia de ruptura (mJ) foram calculados. A tensão de ruptura é definida como a força máxima necessária para produzir a ruptura de parte da planta em tensão, resistência à tração como a força de fratura em tensão, por unidade de área transversal da parte da planta (Griffiths & Gordon 2003) e a energia de ruptura é a área sob a curva força-deslocamento (Wright & Illius 1995).

Com exceção do MM, as frações LF e CB foram moídas em moinho tipo Willey com peneira de 1 mm, e analisados os teores de MS em estufa a 105°C A.O.A.C.(2012). Foram realizadas as seguintes análises: Matéria Seca (MS), Fibra em Detergente Neutro (FDN) e Fibra em Detergente Ácido (FDA). A FDN e FDA foram determinadas em aparelho autoclave (Pell e Schofield, 1993), e os valores de digestibilidade da matéria seca *in vitro* (DIVMS) de acordo com a metodologia de Tilley e Terry (1963), adaptada para a utilização do rúmen artificial, desenvolvida por Ankom, conforme descrito por Holden (1999). A celulose (CEL) e hemicelulose (HEMI) foram estimadas por cálculo após as análises de FDN e FDA.

Modelos estatísticos

O delineamento experimental blocos ao acaso em parcelas subdivididas no tempo. A ausência de nitrogênio e os três níveis de nitrogênio (150, 300 e 450 kg/ha de N) representaram a parcela principal, e os cortes representaram as subparcelas (1 a 5) com quatro repetições.

O efeito dos níveis de nitrogênio foi avaliado pela equação de regressão, e foram considerados os valores médios de cada variável resposta nos períodos chuvoso e seco, relacionados às estações primavera/verão e outono/inverno, respectivamente (Tabela 2).

O nível zero teve apenas um corte durante a primavera/verão e não ocorreu corte no outono/inverno, enquanto os outros tratamentos tiveram três cortes na primavera/verão e dois cortes no outono/inverno.

Foram utilizados modelos estatísticos, que testaram regressões linear e quadrática para todas as variáveis, conforme abaixo:

$$y_{ijk} = t_{ij} + e_{ijk}, \text{ em que:}$$

y_{ijk} é a observação na k-ésima repetição;

t_{ij} é o efeito do nível i dentro de época j (chuvoso e seca);

e_{ijk} é o erro aleatório associado à observação y_{ijk}

O efeito dos cortes, por sua vez, foi avaliado por meio da análise de variância com teste de Tukey (0,05) considerando apenas os tratamentos que tiveram mais de um corte (150, 300 e 450 kg/ha de N).

Para testar o efeito do tempo (cortes) nas variáveis, foi utilizada análise de variância, seguida de teste de médias a 5% de probabilidade, conforme abaixo:

$$y_{ijk} = t_i + época_j + t_i * época_j + e_{ijk}, \text{ em que:}$$

t_i é o efeito do nível i

$época_j$ é o efeito da época de corte j ;

$t_i * época_j$ é a interação entre o nível i e época de corte j ;

e_{ijk} é o erro aleatório associado à observação y_{ijk}

Foram determinadas as correlações lineares entre Área da LF e CB, FDN, FDA, CEL, HEMI e LIG com a tensão em cada nível de nitrogênio. Foram utilizadas para a LF e CB 64 observações e para o agrupamento dos dados das duas frações 128 observações.

RESULTADOS

Na primavera/verão (cortes 1, 2 e 3), houve efeito linear negativo ($P < 0,05$) da adubação nitrogenada para a tensão de ruptura na LF e quadrático ($P < 0,05$) para o CB, (Gráfico 1A).

Os menores valores foram observados no nível de 450 kg/ha de N, de 47,6 newtons e 72,16 newtons, para LF e CB, respectivamente (Gráfico 1A). No capim-tanzânia sem adubação nitrogenada, obteve-se 71,15 newtons para LF e 132,86 newtons para CB, havendo, portanto a diminuição de 33% e 46% na tensão respectivamente, com o aumento da adubação nitrogenada, entre a ausência e a maior dose de N.

Assim como na tensão, houve efeito da adubação nitrogenada também para a resistência à tração, que decresceu com o aumento dos níveis de N, na primavera/verão (Gráfico 1B), sendo observado efeito linear negativo ($P < 0,05$) tanto para LF quanto para o CB.

A LF teve resistência à tração de 5,35 mJ/mm na ausência de adubação de nitrogenada e 2,56 mJ/mm no nível de 450 kg/ha de N, a redução de 52%. O CB apresentou maiores valores de resistência à tração que a LF, sendo 40,97 mJ/mm na ausência de adubação nitrogenada e 16,9 mJ/mm no nível de 450 kg/ha de N, a diminuição de 41%.

A área da LF e do CB teve influência linear positiva ($P < 0,05$) da adubação nitrogenada na primavera/verão (Gráfico 1C). A lâmina foliar apresentou o aumento de área de 94% entre a ausência da adubação nitrogenada e a maior dose de N (450 kg/ha de N), com valores de 12,75 mm² e 24,75 mm², respectivamente. Por outro lado, o CB apresentou aumento de área de 36%, quando comparado à ausência da adubação nitrogenada (com área de 10,52 mm²) e o nível de 450 kg/ha de N (com área de 14.35 mm²).

Houve efeito da adubação nitrogenada também para a energia de ruptura na primavera/verão, sendo linear negativo ($P < 0,05$) na LF e quadrático ($P < 0,05$) no CB (Gráfico 1D). A energia de ruptura apresentou a redução expressiva, de 82% na LF no nível de 450 kg/ha de N e 86% no CB no nível de 300 kg/ha de N, ambos comparados ao capim-tanzânia sem adubação nitrogenada. Contudo, houve pequeno aumento da energia no CB no nível de 450 kg/ha de N, com valores de 22,26 mJ/mm², em contraposição com o menor valor encontrado, de 19,26 mJ/mm² no nível de 300 kg/ha de N.

Por fim, foi observado que a adubação nitrogenada influenciou a digestibilidade *in vitro* da matéria orgânica (DIVMO) positivamente na primavera/verão (Gráfico 1E), levando ao aumento da mesma com os níveis de N. Houve efeito quadrático ($P < 0,05$) tanto para lâmina foliar quanto para CB. O maior teor de DIVMO foi verificado no nível de 300 kg/ha de N, de 65% para lâmina foliar e 62% para o CB. Na maior dose (450 kg/ha de N) houve leve redução, com 62% de DIVMO para LF e 61% para CB. No entanto, os valores nos níveis de N supracitadas foram superiores aos obtidos no capim-tanzânia sem adubação nitrogenada, de 42% para LF e 48% para CB.

No período outono/inverno (cortes 4 e 5), houve efeito linear negativo ($P < 0,05$) da adubação nitrogenada para a tensão de ruptura, tanto na LF quanto no CB (Gráfico 2A).

Na LF, o menor valor foi encontrado no nível de 450 kg/ha de N, de 43,5 newtons, levemente inferior ao valor encontrado no mesmo nível na primavera/verão (47,6 newtons). Houve, nesse nível, decréscimo de 46%, quando comparada ao capim-tanzânia sem adubação nitrogenada (81 newtons).

O CB apresentou valores acima da média geral no período outono/inverno, sendo observados 286,75 newtons na ausência de adubação nitrogenada e 136,36 newtons no nível de 450 kg/ha de N, significando a redução de 52%.

Houve efeito ($P < 0,05$) da adubação nitrogenada para a resistência à tração, com efeito linear negativo para LF e CB, na primavera/verão (Gráfico 2B).

A LF teve resistência à tração de 6 mJ/mm na ausência de adubação nitrogenada e 2,25 mJ/mm no nível de 450 kg/ha de N, a diminuição de 62,5%. O CB apresentou valores de 79,25 mJ/mm na ausência de adubação nitrogenada e 30,87 mJ/mm no nível de 450 kg/ha de N, a diminuição de 61%.

Assim como na primavera/verão, houve efeito linear positivo ($P < 0,05$) da adubação nitrogenada para a área da LF e do CB no outono/inverno (Gráfico 2C).

Na ausência de adubação nitrogenada, foram verificados valores de 11,75 mm² para LF e 10,75 mm² para CB, e na maior dose de N (450 kg/ha de N) 25,25 mm² e 14,12 mm², respectivamente.

Não houve efeito da adubação nitrogenada ($P > 0,05$) no CB ($\bar{Y} = 39,75$ mJ/mm²), para energia no outono/inverno. Na LF, houve efeito linear negativo ($P < 0,05$), no mesmo período (Gráfico 2D), sendo verificados valores de 142,58 mJ/mm² na ausência de adubação nitrogenada, decrescendo para 22,66 mJ/mm² no nível de 450 kg/ha de N. Houve portanto a redução de 84% de energia na maior dose de N, valor que corresponde ao resultado obtido na primavera/verão, para a LF.

A DIVMO, no outono/inverno, teve efeito ($P < 0,05$) para o nitrogênio na LF. Para o CB não houve efeito ($P > 0,05$), ($\bar{Y} = 54\%$). Na LF no outono/inverno, houve efeito linear positivo da adubação nitrogenada (Gráfico 2E), com incremento na ausência de adubação nitrogenada (48%) para o nível de 300 kg/ha de N e 450 kg/ha de N (62%). Os valores encontrados são semelhantes ao da primavera/verão, que apresentou resposta

quadrática da adubação nitrogenada na LF, também com aumento da DIVMO com o aumento dos níveis de N.

Quando correlacionadas as variáveis FDN, FDA, Área, CEL, HEMI e LIG com os resultados obtidos para tensão (Tabela 3), observou correlação significativa entre a tensão e as variáveis FDN, FDA e Área, com utilização de adubação nitrogenada, em todos os níveis avaliadas na LF + CB. A tensão se correlacionou de forma positiva à FDN e FDA, e de forma negativa à Área. Ainda, houve correlação significativa para LIG, apenas no nível de 150 kg/ha de N.

O número de correlações significativas no CB (Tabela 3) foi, em geral, maior que na LF. A LF apresentou correlação significativa somente entre a tensão e a Área ($P < 0,01$) no nível de 300 kg/ha de N e FDA ($P < 0,05$) no nível 450 kg/ha de N.

O CB apresentou correlação entre a tensão com FDN ($P < 0,001$) no nível 300 kg/ha de N, FDA ($P < 0,001$) no nível de 150 e 450 kg/ha de N e ($P < 0,01$) no nível de 300 kg/ha de N e LIG no nível de 150 kg/ha de N ($P < 0,05$) e no nível de 450 kg/ha de N ($P < 0,001$).

Ao correlacionar (LF + CB), observa-se correlação significativa em todas os níveis de N, para as variáveis FDN, FDA, Área e CEL. Ainda, houve correlação significativa para a LIG e HEMI no nível de 150 kg/ha. A análise feita com a LF + CB foi a que mais apresentou correlação com as variáveis biomecânicas, o que pode ser explicado pelo maior número de pares de observações.

Manteve-se a correlação negativa entre tensão de ruptura e as variáveis, Área e HEMI. No entanto para as variáveis FDN, FDA, LIG e CEL a correlação foi positiva (Tabela 3).

Analisando a influência dos cortes (tempo) no efeito do nitrogênio no capim-tanzânia, ocorreu interação para resistência à tração e DIVMO do CB (Tabela 4). Para as demais variáveis e frações não houve interação.

Observa-se na Tabela 4, que a resistência à tração do CB decresceu com os níveis de N, contudo aumentou ao longo dos cortes para 150 e 300 kg/ha/ano de N. Os menores valores foram observados no corte 2 de 10,25 mJ/mm no nível de 450 kg/ha e de 9 mJ/mm no nível de 300 kg/ha, respectivamente.

Houve efeito do corte na DIVMO do CB, associado à adubação nitrogenada (Tabela 4), com redução com os cortes e aumento da adubação nitrogenada. No corte 1 e 2, período em que apresentou maior disponibilidade de fatores abióticos, e que há

maior precipitação, luminosidade e temperatura ocorrendo aumento da DIVMO para todos os níveis, com valor médio de 65%. No corte 5, período de inverno, o valor médio da DIVMO foi de 49%. Na Tabela 5, podem ser observadas as médias das variáveis que não obtiveram interação entre os cortes e a adubação nitrogenada.

DISCUSSÃO

Os resultados para tensão, que diminuiu com a maior dose de N (450 kg/ha), na primavera/verão e outono/inverno, tanto para LF quanto para CB, corroboram com Onoda et al. (2008) em avaliação das propriedades mecânicas de *Plantago major* sem utilização de adubo e com NPK (7:7:7), que observou a diminuição da tensão com utilização de nutrientes.

Uma vez que a tensão de gramíneas é a relação entre o conteúdo e distribuição de células de fibras, valores baixos de tensão implicam em redução da fibra em relação ao teor de mesofilo, que é altamente digerível. Portanto, a correlação negativa entre a preferência de ruminantes com a tensão da LF e CB pode realmente indicar uma preferência por gramíneas com maior proporção de mesofilo (MacAdam & Mayland, 2003).

Quando o animal tem a oportunidade de escolher entre forragens, animais a pasto tendem a responder a combinação de propriedades físicas e químicas que resultam na sua preferência (Balsamo et al. 2006). Um fator frequentemente relacionado a essa preferência é a resistência à tração (Balsamo et al. 2006), que é a força por unidade de área em corte transversal exercida pela força longitudinal, necessária para romper a LF ou CB.

A resistência à tração é equiparada à resistência ao movimento do animal no ato de quebrar porções da planta no momento do pastejo, ou seja, o ato de puxar que o animal utiliza quando pasteja (MacAdam & Mayland 2003).

Com a adubação nitrogenada, houve redução na resistência à tração e aumento da área, na LF e no CB, para ambos os períodos. Uma correlação negativa entre a força necessária para romper as lâminas foliares e a largura da mesma, como sugerido por MacAdam & Mayland (2003) em estudo com festuca, deve-se ao fato de que lâminas foliares mais largas muitas vezes implicam em maior distanciamento entre as veias esclerenquimáticas, tendo maior proporção de mesofilo. Isto explica porque menores

concentrações de FDN e lâminas foliares mais largas exigem menor força para o rompimento das LF.

Ressalta-se ainda, a diferença entre CB e LF, na tensão, resistência à tração e área, na primavera/verão e outono/inverno, atribuída ao fato do CB ser tipicamente estrutural, uma vez que mantém o perfilho verticalmente para maximizar a captação de luz. Portanto apresenta maior tensão e resistência, e menor área. Deve-se destacar também a anatomia da LF, em que ocorre menor presença de feixes vasculares e menor proporção de esclerênquima que no CB, que é uma estrutura de sustentação.

Observa-se, contudo, que o CB apresentou alterações mais significativas na maior dose de adubação nitrogenada, visto que apresentou valores muito superiores aos que a LF, permanecendo, ainda, com maior tensão e resistência à tração que a LF, independente do nível de N.

Benvenuti et al. (2006) constataram que CB de *Panicum maximum* com baixa resistência à tração não afetaram o comportamento de pastejo, mas que CB de maior resistência foram evitados. Isto sugere que o bovino é sensível a diferenças na força de tração. Também se pode especular que, se a diferença da tensão de ruptura entre as LF e o CB é expressivo, animais evitarão a apreensão de tecidos que requerem maior força para manter a taxa constante de bocados (Bryant et al. 2007).

Em pesquisa com azevém perene, Inoue *et al.* (1994) observaram que porções com menor resistência à tração foram mastigadas menos por ovelhas, em detrimento às porções com maior resistência à tração.

Inoue et al. (1994) observaram em ovinos maior consumo de forragem quando alimentados com azevém perene selecionados com LF de menor resistência à tração, observaram ainda a taxa de digestibilidade também maior. Alta resistência à tração é relacionada com a resistência à mastigação, e gramíneas com menor resistência devem fracionar mais rápido durante a mastigação, permitindo aos ruminantes maior consumo de MS (MacAdam & Mayland 2003).

A energia de ruptura, obtida através da área e da curva força-deslocamento, também apresentou redução que corrobora com os resultados para tensão e resistência à tração, visto que estruturas mais rígidas exigem maior energia para ocasionar a ruptura.

Contudo, a não reposta à adubação nitrogenada para energia, no CB, quando avaliado o período outono/inverno, sugere que a diminuição dos fatores abióticos somados à adubação nitrogenada incentivou a maturação da planta. É possível que este

fator tenha ocasionado maior acúmulo e alongamento do CB. Em grande parte dos casos, o teor de lignina é aumentado pela adubação nitrogenada na maturação da planta (Collins et al. 1990).

A DIVMO aumentou em função do incremento do nitrogênio, uma vez que este favorece a renovação celular de LF e CB, com parede celular reduzida melhorando a digestibilidade da gramínea.

Ainda, pode-se dizer que menor resistência e tensão de colmos+bainhas e lâminas foliares significam plantas mais tenras e menos resistentes, facilitando inclusive no processo de colheita e mastigação e, posterior ação dos microrganismos nos componentes estruturais da planta no ambiente ruminal.

A ausência de efeito significativo da adubação nitrogenada na DIVMO, no outono/inverno, para o CB, sugere que, assim como para a energia, a planta possa ter tido influência dos fatores abióticos, resultando na maturação da planta significando também aumento da composição da parede celular, afetando os resultados, reduzindo assim o efeito do N na forrageira.

Mudanças na composição da parede celular podem alterar a força de tensão e resistência à tração tanto da LF quanto do CB. Compreende-se que o nitrogênio provoca aumento na concentração de aminoácidos e proteínas que acumulam principalmente no conteúdo celular, acarretando diluição da parede celular e aumento de digestibilidade (Van Soest 1994).

Bryant et al. (2007), em pesquisa com oito diferentes gramíneas, observaram que plantas com maior concentração de tecido estrutural possuem maior tensão e resistência à tração, e que esta concentração pode estar ligada ao estágio de maturidade da planta.

O nitrogênio estimula a divisão celular, o perfilhamento e a formação de lâminas foliares, ocasionando a renovação de plantas com o surgimento de LF e CB mais jovens. Isto sugere que o N possui influência importante na redução da tensão e resistência da gramínea, proporcionando melhor ingestão e aceitação pelo animal.

Estudos sobre as propriedades de tração de gramíneas forrageiras evidenciaram que a quantidade de fibras e o grau de lignificação (De Sousa et al. 1982, Vincent 1982, Benvenuti et al. 2006) em tecidos foliares desempenham papel importante na resistência mecânica da LF. Esta relação pode ser verificada a partir da correlação observada entre tensão, FDN e FDA, no presente estudo (Tabela 3).

Alguns estudos associaram a preferência de ruminantes aos fatores que contribuem para o aumento da taxa de consumo. Falkner & Casler (1998) observaram a preferência maior por gramíneas que apresentaram maior DIVMO e menor FDN. Essa preferência também foi positivamente correlacionada à concentração de carboidratos não estruturais totais (Mayland et al. 2000).

Os baixos valores para o CB no corte 1 e 2 podem ser atribuídos à disponibilidade de condições favoráveis ao crescimento e surgimento de novos perfilhos. Uma vez que no corte 2 (janeiro) houve diminuição da atividade pluviométrica, acredita-se que este fator tenha influenciado o aumento da resistência à tração do CB a partir do corte 3, pôde-se observar que a redução da temperatura e dos fatores abióticos influenciaram negativamente os cortes 4 e 5 (Figura 1).

Deve-se destacar que os valores da DIVMO têm tendência inversa próxima ou semelhante à resistência a tração, tornando um parâmetro interessante para avaliar a qualidade da forragem apreendida e a possibilidade de seletividade do animal na pastagem, principalmente quando analisado o CB, que é uma barreira vertical para profundidade do bocado.

O restante das variáveis e frações não apresentou interação entre adubação nitrogenada e cortes (Tabela 5). Para a LF, não houve efeito do corte para tensão, resistência à tração e área, podendo ser observados valores estatísticos semelhantes. Ainda, o mesmo comportamento foi observado para a energia no CB.

Houve influência dos cortes para a energia de ruptura na lâmina foliar, que apresentou o menor valor no corte 2 (9,04 mJ/mm²) e maior valor no corte 5 (26,12 mJ/mm²). De forma inversa, a DIVMO na LF diminuiu com os cortes, sendo o maior valor de 65,83% no corte 1, e o menor valor de 42,75% no corte 5.

Como explicado acima, o corte 5 (inverno) se refere ao período de diminuição de fatores abióticos, que apresentou maior espaçamento entre cortes, possibilitando o amadurecimento da planta, ao invés do seu crescimento. Isso explica o aumento da energia de ruptura e diminuição da DIVMO na lâmina foliar, que se tornou mais rígida com o amadurecimento da planta.

No CB, houve aumento expressivo da média da tensão ao longo dos cortes, sendo 59,33 newtons no corte 1 e 187,86 newtons no corte 5, o aumento de 216%. Houve ainda aumento na média da energia de ruptura, sendo 24,75 mJ/mm² no corte 1 e 58,51 mJ/mm² no corte 5.

Desta forma, observou-se que a tensão teve o aumento expressivo nas estações outono/inverno conferindo menor qualidade ao capim, uma vez que há preferência comprovada dos animais por CB mais tenros.

É de suma importância compreender como os fatores abióticos e estações do ano podem se relacionar ou não com aspectos de manejo, para melhor compreensão e oferta aos animais de forragem com melhor qualidade.

A seletividade dos animais pode ser diretamente influenciada por características relacionadas à capacidade de apreensão da forragem, um indicador para o animal do grau de facilidade da ação do bocado (Carvalho et al. 2002). Essas características incluem aspectos estruturais do pasto, como a acessibilidade e a densidade volumétrica da forragem, a fibrosidade das lâminas foliares, a disposição espacial dos tecidos vegetais preferidos, a presença de barreiras à desfolhação, como bainhas e colmos, e o teor de MS (Palhano et al. 2007).

Fahey & Hussein (1999) demonstraram, em análise geral, a importância da qualidade da forragem, nutrição de ruminantes, e no processo de seleção de plantas pelos animais. Estudos para os critérios de seleção adequados têm sido realizados de forma escassa, incluindo a tração e resistência de folha (Wheeler & Corbett 1989, Smith et al. 1997, Benvenuti et al. 2006), contudo ainda não foram bem disseminados.

Estudos sobre a biomecânica de gramíneas têm se baseado em variáveis como a relação da resistência à tração e palatabilidade (De Sousa et al. 1982, Easton 1989, O'Reagain 1993) e resistência ao pisoteio (Sun & Liddle 1993). Estudos sobre as propriedades de tensão de gramíneas forrageiras comuns de regiões semiáridas têm sugerido que a variabilidade de resultados entre lâminas foliares, dentro e entre as espécies, deve-se a idade e fase de crescimento (Sun & Liddle 1993).

CONCLUSÕES

A utilização de níveis crescentes de adubação nitrogenada propiciou condições para a redução da tração do capim-tanzânia, de forma correlacionada à composição da parede celular, sobretudo FDN e FDA, e aumentou a área da lâmina foliar e colmo+bainha, diminuindo com isso a sua rigidez.

Maiores efeitos foram observados no colmo+bainha, tanto no verão quanto no inverno. Uma vez que esta estrutura apresenta propriedades biomecânicas menos

favoráveis à colheita do animal, a adubação nitrogenada demonstrou ser interessante para o aumento da colheita e ingestão de forragem.

O nitrogênio promove a diminuição das propriedades biomecânicas que causam maior rigidez no capim-tanzânia, facilitando a colheita pelo animal, e aumenta a digestibilidade, demonstrando que estas propriedades biomecânicas são parâmetros que podem estimar a qualidade da forragem.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BALSAMO, R.A., WILLIGEN, C.V., BAUER, A.M. & FARRANT, J. (2006). Drought Tolerance of Selected Eragrostis Species Correlates with Leaf Tensile Properties. *Annals of Botany* **97**, 985–991.
- BENVENUTTI, M.A., GORDON, I.J., POPPI, D.P., CROWTHER, R., SPINKS, W. & MORENO, F. (2009). The horizontal barrier effect of stems on the foraging behaviour of cattle grazing five tropical grasses. *Livestock Science* **126**, 229–238.
- BENVENUTTI, M.A., GORDON, I.J. & POPPI, D.P. (2008). The effect of animal age and sward stem density on the foraging behaviour of cattle grazing tropical pastures. *Grass and Forage Science* **63**, 1–8.
- BENVENUTTI, M.A., GORDON, I.J. & POPPI, D.P. (2006). The effect of the density and physical properties of grass stems on the foraging behaviour and instantaneous intake rate by cattle grazing an artificial reproductive tropical sward. *Grass and Forage Science* **61**, 272–281.
- BRYANT, R.H., NICOL, A. M., WILSON, F. E. & SEDCOLE, J. R. (2007). Between-cultivar variability in breaking force of components of perennial ryegrass (*Lolium perenne*). *Grass and Forage Science* **63**, 350–359.
- CARVALHO, P.C.F., POLI, C.H.E.C., DITTRICH, J.R., MORAES, A. & NABINGER, C. (2002). Grazing ecology research in south Brazil: towards a comprehension of the underlying processes. *Contribuciones Del Macn*, **1**(1), 161-164.
- COLLINS, M., BRINKMAN, M. A. & SALMAN, A. A. (1990). Forage Yield and Quality of Oat Cultivars with Increasing Rates of Nitrogen Fertilization. *Agronomy Journal* **82**, 724–728.
- DE SOUSA, F.B., SLEPER, D.A., BELYEA, R.L. & MATCHES, A.G. (1982). Leaf tensile strength, in vitro digestibility, and fiber component relationships in tall fescue. *Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuaria* **17**, 1497–1504.

- EASTON, HS. (1989). Variability of leaf shear strength in perennial ryegrass. *New Zealand Journal of Agricultural Research* **32**, 1–6.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. 1999. *Sistema brasileiro de classificação de solos*. Rio de Janeiro, Ministério da Agricultura e do Abastecimento, 412p.
- FAHEY, G.C. & HUSSEIN H.S. (1999). Forty years of forage quality research: accomplishments and impact from an animal nutrition perspective. *Crop Science* **39**, 4–12.
- FALKNER, L.K., & M.D. CASLER. (1998). Preference for smooth bromegrass clones is affected by divergent selection for nutritive value. *Crop Science* **38**, 690-695.
- GRIFFITHS, W.M. & GORDON, I.J. (2003). Sward structural resistance and biting effort in grazing ruminants. *Animal Research* **52**, 145–160.
- HOLDEN, L.A. (1999). Comparison of methods of in vitro dry matter digestibility for ten feeds. *Journal of Dairy Science* **82**(8), 1791-1794.
- INOUE, T., BROOKES, I. M., JOHN, A., KOLVER, E. S. & BARRY, T. N. (1994). Effects of leaf shear breaking load on the feeding value of perennial ryegrass (*Lolium perenne*) for sheep. II. Effects on feed intake, particle breakdown, rumen digesta outflow and animal performance. *Journal of Agricultural Science*. **123**, 137-147.
- JACOBS, A.A.A., SCHEPER, J. A., BENVENUTI, M.A., GORDON, I.J., POPPI, D.P. & ELGERSMA, A. (2011). Tensile fracture properties of seven tropical grasses at different phenological stages. *Grass and Forage Science* **66**(4), 551-559.
- MACADAM J.W. & MAYLAND H.F. (2003). The relationship of leaf strength to cattle preference in tall fescue cultivars. *Agronomy Journal* **95**, 414–419.
- MAYLAND, H.F., SHEWMAKER, G.E., HARRISON, P.A., & CHATTERTON, N.J. (2000). Nonstructural carbohydrates in tall fescue cultivars: Relationship to animal preference. *Agronomy Journal* **92**, 1203-1206.
- ONODA, Y., SCHIEVING, F. & ANTEN, N.P.R. (2008). Effects of Light and Nutrient Availability on Leaf Mechanical Properties of *Plantago major*: A Conceptual Approach. *Annals of Botany* **101**(5): 727–736.
- O'REAGAN, P.J. (1993). Plant structure and the acceptability of different grasses to sheep. *Journal of Range Management* **46**, 232–236.
- PALHANO, A.L., CARVALHO, P.C.F., DITTRICH, J.R., MORAES, A., SILVA, S.C. & MONTEIRO, A.L. (2007). Características do processo de ingestão de forragem por

- novilhas holandesas em pastagem de capim mombaça. *Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia* **36**, 1014-1021.
- PELL, A. N. & SCHOFIELD, P. (1993). Computerized monitoring of gas production to measure forage digestion in vitro. *Journal of Dairy Science*, **76**(9), 1063-1073.
- SMITH K.F., REED K.F.M. & FOOT J.Z. (1997). An assessment of the relative importance of specific traits for the genetic improvement of nutritive value in dairy pasture. *Grass and Forage Science* **52**, 167–175.
- SUN, D. & LIDDLE M.J. (1993). Trampling resistance, stem flexibility and leaf strength in nine Australian grasses and herbs. *Biological Conservation* **65**, 35–41.
- TILLEY, J. M. A.; TERRY, R. A. (1963). A two stage technique for the in vitro digestion of forage crop. *Journal of Britain Grassland Society*, **18**, 104-111.
- VAN SOEST, P.J. (1994). *Nutritional ecology of the ruminant*. Ithaca: Cornell University, 476p.
- VINCENT, F.V. (1982). The mechanical design of grass. *Journal of Materials Science* **17**, 856–860.
- WERNER, J. C.; PAULINO, V. T.; CANTARELLA, H., QUAGGIO, J. A & ANDRADE, N. O. (1996). Forrageiras: recomendações de adubação e calagem para o estado de São Paulo, 2 ed. Campinas, Instituto Agrônômico e Fundação IAC, (Boletim técnico, 100), 263.
- WHEELER J.L. & CORBETT J.L. (1989). Criteria for breeding forages of improved feeding value: results of a delphi survey. *Grass and Forage Science* **44**, 77–83.
- WRIGHT, W. & ILLIUS, A.W. (1995). A comparative study of the fracture properties of five grasses. *Functional Ecology* **9**, 269–278.

FIGURAS, TABELAS E GRÁFICOS

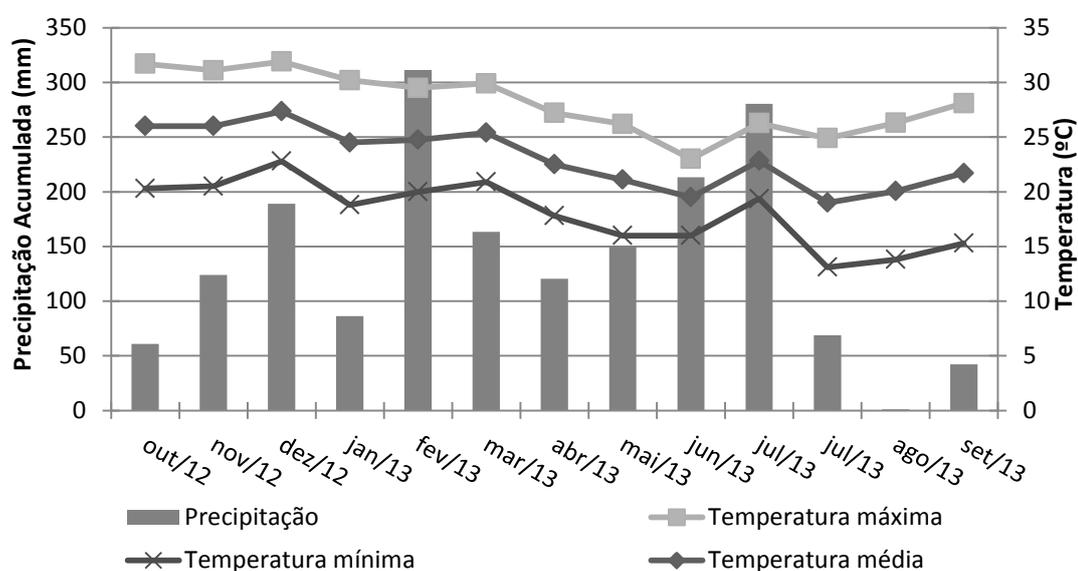


Fig. 1. Dados climáticos de precipitação e temperatura: máxima, média e mínima durante o período experimental.

Fonte: Laboratório de Sementes da Fazenda Experimental de Iguatemi – UEM

Tabela 1. Componentes químicos do solo das pastagens de capim-tanzânia no início do período experimental

| Trat. | Prof. cm | P ¹ mg/dm ³ | C g/dm ³ | pH H ₂ O | H+Al | Ca ² | Mg ² | K ¹ | SB ³ | CTC ⁴ | V ⁵ % |
|-------|----------|-----------------------------------|---------------------|---------------------|--|-----------------|-----------------|----------------|-----------------|------------------|------------------|
| | | | | | -----cmol _c /dm ⁻³ ----- | | | | | | |
| 1 | 0-20 | 10,23 | 13,33 | 6,00 | 2,27 | 1,89 | 0,60 | 0,12 | 2,60 | 4,87 | 53,41 |
| 2 | 0-20 | 8,09 | 11,32 | 5,90 | 2,45 | 1,20 | 0,47 | 0,08 | 1,75 | 4,20 | 41,61 |
| 3 | 0-20 | 5,34 | 10,12 | 5,70 | 2,45 | 1,38 | 0,43 | 0,07 | 1,87 | 4,32 | 43,31 |
| 4 | 0-20 | 4,89 | 9,02 | 5,80 | 2,36 | 1,89 | 0,64 | 0,04 | 2,56 | 4,92 | 52,08 |

Fonte: Laboratório Rural de Maringá. ¹Extraído por Melich; ²Ca e Mg - extraídos com KC 1mol L⁻¹; ³Soma de Bases; ⁴Capacidade de troca de cátions; ⁵Porcentagem de saturação por bases.

Tabela 2. Separação dos períodos chuvosos e secos de acordo com os cortes

| Período | Corte | Dose de Nitrogênio (kg/ha de N) | | | |
|---------|-------|---------------------------------|----------|----------|----------|
| | | 0 | 150 | 300 | 450 |
| Chuvoso | 1 | | 28/12/12 | 28/12/12 | 28/12/12 |
| | 1 | | 04/01/13 | 04/01/13 | 04/01/13 |
| | 1 | 22/03/13 | 07/01/13 | 07/01/13 | 07/01/13 |
| | 2 | | 28/01/13 | 28/01/13 | 28/01/13 |
| | 3 | | 05/03/13 | 05/03/13 | 05/03/13 |
| Seco | 4 | - | 09/04/13 | 09/04/13 | 09/04/13 |
| | 5 | | 24/07/13 | 24/07/13 | 24/07/13 |

Tabela 3. Correlações lineares entre a tensão de ruptura e as variáveis físico-químicas de lâminas foliares (n=64), colmo+bainha (n=64) e lâmina foliar + colmo+bainha (n=128) nos níveis de nitrogênio

| Componente | Níveis de N | Variáveis físico-químicas | | | | | |
|----------------|-------------|---------------------------|----------|----------|-----------|----------|---------|
| | | FDN | FDA | LIG | Área | CEL | HEMI |
| Lâmina foliar | 0 | -0,139 | -0,210 | 0,942 | -0,724 | 0,754 | 0,346 |
| | 150 | 0,246 | 0,097 | -0,074 | 0,132 | -0,017 | 0,056 |
| | 300 | 0,169 | 0,324 | 0,222 | -0,517** | 0,156 | -0,178 |
| | 450 | 0,193 | -0,498* | -0,443 | 0,098 | -0,387* | 0,517* |
| Colmo+bainha a | 0 | -0,126 | -0,442 | 0,622 | -0,664 | -0,492 | 0,757 |
| | 150 | 0,304 | 0,575*** | 0,462* | -0,258 | 0,309 | -0,141 |
| | 300 | 0,588** | 0,584** | 0,391 | -0,278 | 0,494* | -0,395* |
| | 450 | 0,247 | 0,81*** | 0,677*** | -0,120 | 0,692*** | -0,383 |
| Lâmina foliar+ | 0 | 0,370 | 0,370 | 0,347 | -0,706* | 0,261 | 0,273 |
| | 150 | 0,622** | 0,457*** | 0,317* | -0,555*** | 0,483* | -0,276* |
| Colmo+bainha a | 300 | 0,685*** | 0,651*** | 0,182 | -0,552*** | 0,604* | -0,216 |
| | 450 | 0,422** | 0,596*** | 0,252 | -0,625*** | 0,577* | -0,232 |

FDN - Fibra Detergente Neutro, FDA-Fibra detergente ácido. LIG-Lignina. CEL-Celulose. HEMI-Hemicelulose. * ($P < 0,05$), ** ($P < 0,01$), *** ($P < 0,001$).

Tabela 4. Quantidade de resistência à tração (mJ/mm) e digestibilidade in vitro de matéria orgânica (DIVMO) (%) da fração colmo+bainha, de capim-tanzânia fertilizado com níveis nitrogênio, nos cortes, sob pastejo, que obtiveram interação

| Corte | Níveis de nitrogênio (kg/ha/ano) | | | Média |
|-------|-----------------------------------|---------|----------|----------|
| | 150 | 300 | 450 | |
| | Resistência à tração colmo+bainha | | | |
| 1 | 17,50 A | 16,00 A | 10,75 A | 14,75 A |
| 2 | 19,25 A | 9,00 A | 10,25 A | 12,83 A |
| 3 | 59,00 B | 54,75 B | 27,00 A | 46,91 B |
| 4 | 60,25 B | 53,00 B | 26,75 A | 46,66 B |
| 5 | 59,00 B | 55,46 B | 27,50 A | 47,32 B |
| | DIVMO colmo+bainha | | | |
| 1 | 65,50 B | 62,25 B | 68,25 C | 65,33 C |
| 2 | 57,75 AB | 55,00 B | 60,00 BC | 57,58 B |
| 3 | 58,25 AB | 56,75 B | 58,50 B | 57,83 B |
| 4 | 57,00 AB | 60,25 B | 67,75 C | 61,66 BC |
| 5 | 56,75 A | 43,00 A | 47,75 A | 49,16 A |

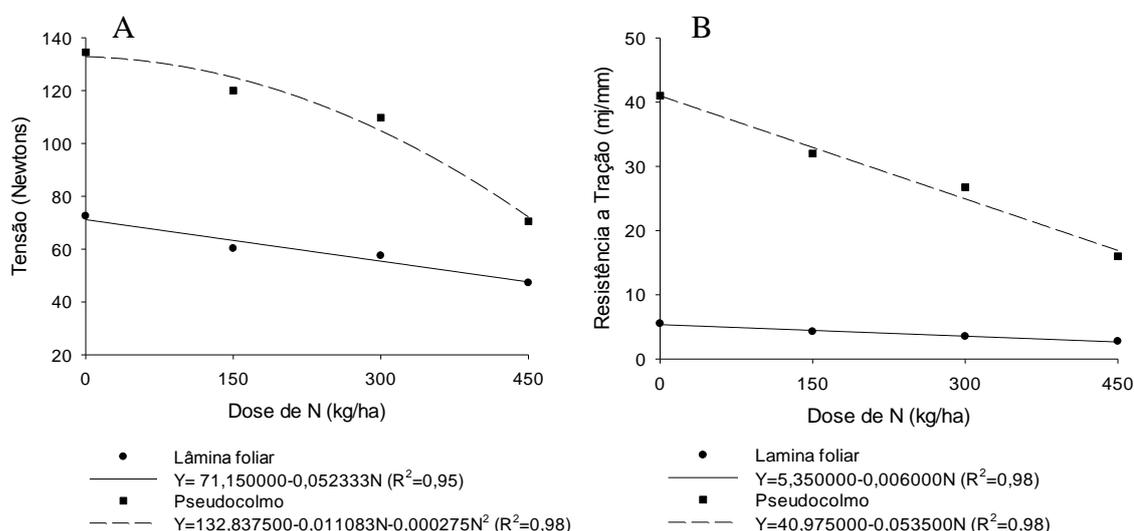
*Médias seguidas de letras diferentes, diferem para os cortes, pelo Teste Tukey ($p < 0,05$).

Tabela 5. Média da TENSÃO (newtons), resistência à tração (RESTRACÃO) (mJ/mm), ÁREA (mm²), ENERGIA (mJ/mm²) e digestibilidade in vitro da matéria orgânica (DIVMO) (%), na lâmina foliar e TENSÃO (newtons), ÁREA (mm²) e ENERGIA (mJ/mm²) no colmo+bainha de capim-tanzânia adubado com níveis nitrogênio e diferentes cortes, sob pastejo

| Valores Médios dos níveis de nitrogênio nos cortes para Lâmina Foliar | | | | | |
|---|----------|-----------|----------|---------|----------|
| Cortes | TENSÃO | RESTRACÃO | ÁREA | ENERGIA | DIVMO |
| 1 | 55,08 A | 3,41 A | 21,29 A | 9,43 A | 65,83 C |
| 2 | 53,83 A | 3,41 A | 19,78 A | 9,04 A | 60,00 BC |
| 3 | 56,33 A | 3,41 A | 21,09 A | 9,56 A | 60,33 BC |
| 4 | 55,83 A | 3,56 A | 20,32 A | 25,25 B | 59,08 B |
| 5 | 56,15 A | 3,50 A | 21,03 A | 26,12 B | 42,75 A |
| Valores Médios dos níveis de nitrogênio nos cortes para Colmo+bainha | | | | | |
| Cortes | TENSÃO | RESTRACÃO | ÁREA | ENERGIA | DIVMO |
| 1 | 59,33 A | - | 13,07 AB | 24,75 A | - |
| 2 | 53,91 A | - | 13,77 B | 24,62 A | - |
| 3 | 186,75 B | - | 12,74 A | 46,35 A | - |
| 4 | 185,08 B | - | 12,91 AB | 37,46 A | - |
| 5 | 187,86 B | - | 12,91 AB | 58,51 A | - |

*Médias seguidas de letras diferentes, diferem para os cortes, pelo Teste Tukey ($p < 0,05$).

Gráfico 1. Equações de regressão ajustadas e coeficiente de determinação para lâmina foliar e colmo+bainha em plantas de capim-tanzânia, em função dos níveis de nitrogênio, na primavera/verão, na Tensão (A), Resistência a Tração (B), Área (C), Energia (D) e digestibilidade in vitro da matéria orgânica (DIVMO) (E)



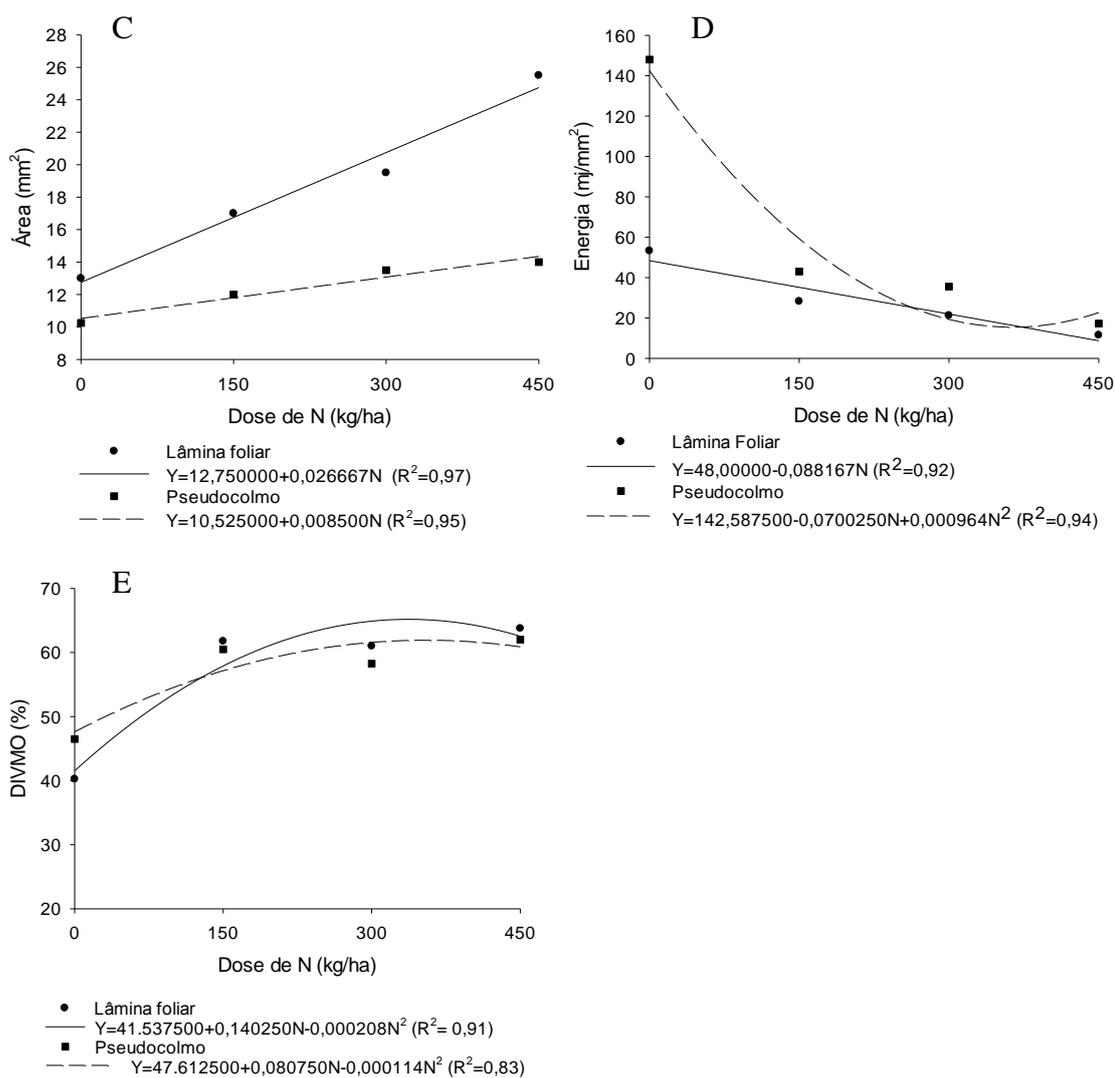
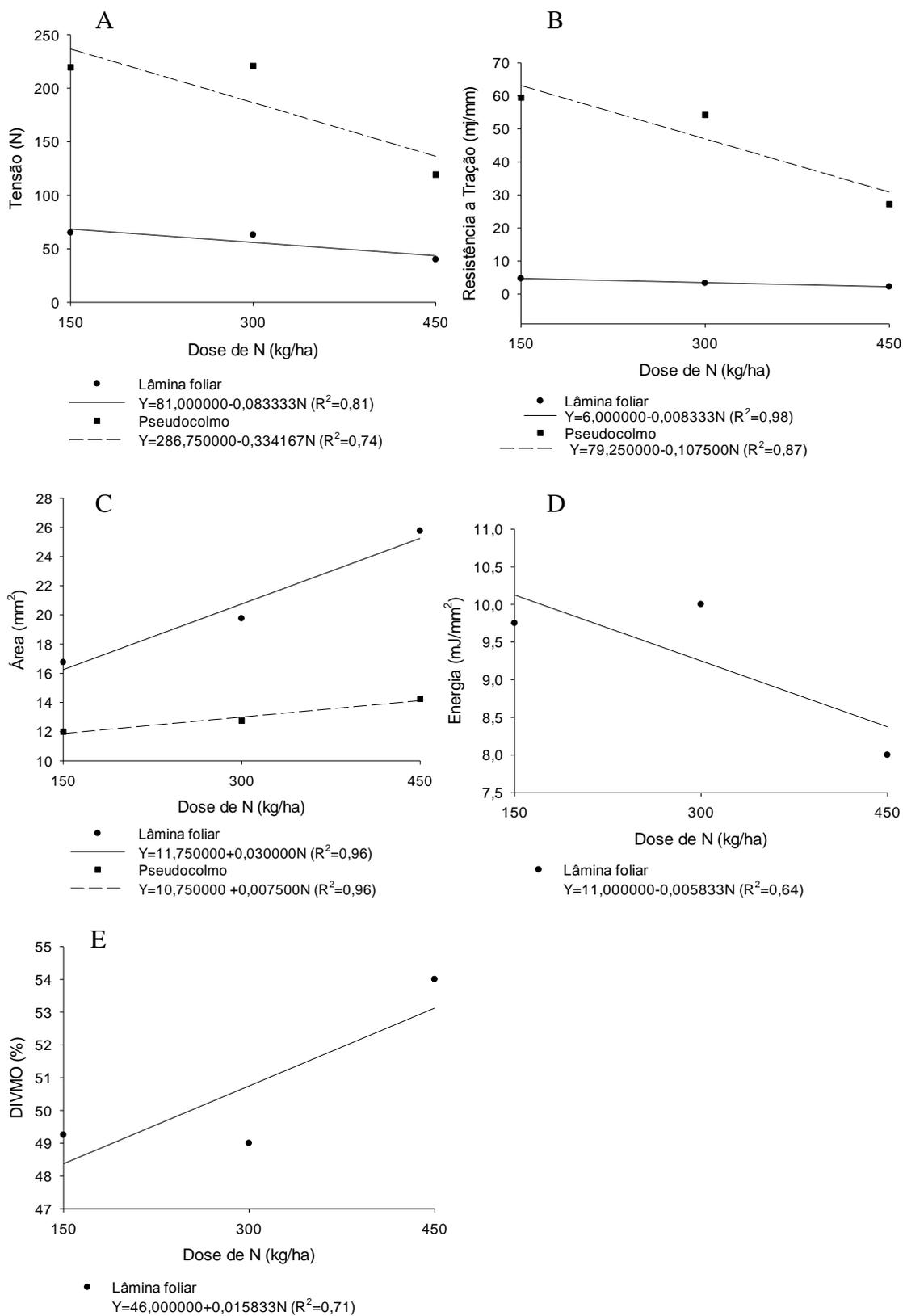


Gráfico 2. Equações de regressão ajustadas e coeficiente de determinação para lâmina foliar e colmo+bainha em plantas de capim-tanzânia, em função dos níveis de nitrogênio (N), na outono/inverno, na Tensão (A), Resistência a Tração (B), Área (C), Energia (D) e digestibilidade in vitro da matéria orgânica (DIVMO) (E)



CAPÍTULO III – ANATOMIA DO CAPIM-TANZÂNIA ADUBADO COM NÍVEIS DE NITROGÊNIO

(Agricultural Science)

SUMÁRIO

Objetivou-se avaliar se as características anatômicas da lâmina foliar (LF) e colmo+bainha (CB) (ápice e base) de *Panicum maximum* cv. Tanzânia podem ser influenciadas pelo nitrogênio, e a relação destas com tensão de ruptura. O experimento foi realizado entre outubro de 2012 e setembro de 2013. O delineamento experimental em blocos ao acaso em parcelas subdivididas no tempo. A ausência de nitrogênio e os três níveis de nitrogênio (150, 300 e 450 kg/ha de N) representaram a parcela principal, e os cortes as subparcelas (1 e 5) com quatro repetições. Na lâmina foliar, houve efeito do nitrogênio na porcentagem de epiderme da face adaxial (EPIada), epiderme da face abaxial (EPIaba), esclerênquima (ESC), floema (FV), bainha parenquimática do feixe vascular (BPFV) e mesófilo (MES) nos cortes 1 e 5. Houve redução no verão dos tecidos resistentes a digestão, de 1%, para soma entre epiderme (EPI), xilema (XIL) e esclerênquima (ESC) no CB base, e aumento de 5% no CB ápice para as mesmas estruturas, quando avaliado a ausência de N e o nível de 450 kg/ha. O nitrogênio promove a diminuição das estruturas mais rígidas e de difícil digestão (XIL, ESC), na LF. O CB base apresenta arquitetura anatômica que dificulta o processo de colheita pelos animais e digestão do capim-tanzânia se correlacionando positivamente com a tensão de ruptura. A época de corte tem pouco efeito nas características anatômicas do capim-tanzânia quando se utiliza o manejo de 95% interceptação luminosa.

INTRODUÇÃO

Panicum maximum é uma forrageira muito utilizada no Brasil em sistemas de produção animal, pois possui boa adaptação a climas tropicais e subtropicais e apresenta elevada produtividade.

Entretanto, as poucas cultivares comercializadas são apomíticas, diminuindo a variabilidade genética e dificultando o desenvolvimento de novas cultivares (Gomes 2011). Por isso, esta cultivar vem sendo constantemente estudada, com o propósito de melhorar a oferta de forragem ao animal, compondo sua dieta com maior proporção de folhas, em vez de colmo+bainha e material morto (Nascimento Júnior & Adese 2004).

Os tecidos vegetais apresentam potencial de digestão diferenciado (Brito et al. 1999). Células do mesofilo e do floema são rapidamente digeridas (Akin et al. 1973), enquanto células da epiderme e da bainha parenquimática do feixe vascular são reconhecidas como de digestão lenta e parcial. Tecidos como esclerênquima e xilema, que apresentam parede celular espessa e lignificada, são muito pouco digeridos (Akin 1989).

Além dos aspectos nutricionais, o comportamento de apreensão do animal pode influenciar na ingestão de nutrientes. Os animais buscam por colmo+bainha macios, e evitam colmo+bainha duros (Benvenuti et al., 2006), induzindo a teoria de que menor tensão resulta em maior consumo.

O nitrogênio é o nutriente que influencia diretamente os aspectos morfoanatômicos, alterando as proporções dos tecidos das folhas e da composição química (Carvalho & Pires 2008), contribuindo para a organização estrutural da lâmina foliar e servindo como constituinte de muitos componentes da célula vegetal, incluindo aminoácidos e ácidos nucleicos (Taiz & Zeiger 2013).

Uma vez que as proporções de tecidos e da espessura da parede celular podem promover não só melhoria na produção da forragem, no desempenho animal, mas também no valor nutritivo (Paciullo et al. 2002), questiona-se se estes componentes morfoanatômicos podem se relacionar com a tensão de ruptura de folha e colmo+bainha, tornando parâmetros viáveis para analisar tanto a qualidade da forragem, como o processo de aumento de ingestão de nutrientes.

Objetivou-se, portanto, avaliar a influência de níveis crescentes de nitrogênio sobre as características anatômicas da lâmina foliar e colmo+bainha da cultivar

Panicum maximum cv. Tanzânia, e a correlação destas características com a tensão de ruptura.

MATERIAL E MÉTODOS

Preparo do solo e delineamento experimental

O experimento foi realizado na Fazenda Experimental de Iguatemi (FEI) localizada na latitude de 23° 25' S; 51° 57' O, e 550 metros de altitude, da Universidade Estadual de Maringá (UEM), Maringá-PR. O tipo climático predominante desta região é o Cfa subtropical úmido mesotérmico, segundo a classificação de Köppen, com temperatura média anual de 22°C. Este se caracteriza pela predominância de verões quentes, baixa frequência de geadas severas e a tendência de concentração das chuvas no período do verão (Ometto 1981). O período experimental foi de novembro de 2012 a setembro de 2013, cujos dados climáticos foram coletados na Estação Meteorológica da FEI (Figura 1).

O experimento foi conduzido em uma área de *Panicum maximum* Jacq. cv. Tanzânia, estabelecida em novembro de 2003 em uma área de Latossolo Vermelho distrófico (Embrapa 1999).

No mês de agosto de 2012 foi realizada a coleta de amostras de solo na profundidade de 0-20 cm nos quatro blocos, para correção de acidez e elevação da saturação de bases a 60%, segundo Werner et al. (1996), além da aplicação de 40 kg/ha de P₂O₅ na forma de superfosfato simples. Os resultados da análise de solo se encontram na Tabela 1.

A área experimental apresentava total de 800 m² dividida em 16 parcelas (parcela), com 50 m² cada, nos quais foram alocados os tratamentos com aplicações de nitrogênio (N) e potássio (K₂O) que foram parceladas de acordo com a quantidade total a ser aplicada, com início no dia 21/11/2012. O nitrogênio teve como fonte o nitrato de amônio e foi aplicado de acordo com o tratamento, ou seja, 150 kg/ha de N em três aplicações com intervalos de 45 dias, 300 kg/ha de N em seis aplicações com intervalos de 30 dias, e 450 kg/ha de N em nove aplicações com intervalos de 15 dias. O K₂O teve como fonte o cloreto de potássio e foi aplicado com intervalo de 45 dias em todas as parcelas, totalizando de 80 kg/ha de K₂O.

O delineamento experimental foi em parcelas subdivididas no tempo. A ausência de nitrogênio e os três níveis de nitrogênio (150, 300 e 450 kg/ha de N) representaram a

parcela principal, e os cortes representaram as subparcelas (1 e 5) com quatro repetições, sendo o verão o corte 1 (dezembro e janeiro) e o inverno o corte 2 (junho e julho).

Manejo do Pasto

Cada parcela foi pastejada por uma novilha da raça holandês de aproximadamente 250 kg, pelo método de pastejo intermitente, em que os animais permaneceram, aproximadamente, 1 a 2 dias com período de descanso variável em função da mensuração da interceptação luminosa. A entrada do animal nas parcelas ocorreu quando o dossel atingia 95% de interceptação luminosa (IL), cuja mensuração foi realizada com analisador de dossel modelo *LAI. 2000* (LI-COR, Lincoln, Nebraska, EUA). A retirada dos animais das parcelas foi realizada quando o resíduo de pastejo chegou próximo de 30 cm de altura.

Análise das variáveis anatômicas

No verão (corte 1) e no inverno (corte 5) foram coletadas três LF, sendo considerada a terceira LF expandida, e três CB, que foram divididos nas porções base e ápice (de cada parcela), cortados em fragmentos de 1 (um) centímetro (medido com o auxílio do paquímetro) na região mediana, acondicionados em vidros e fixados em formaldeído + ácido acético + álcool (FAA 70), sendo armazenados até o preparo histológico (Johansen 1940), no laboratório de botânica do Departamento de Biologia da UEM.

Para o laminário permanente, as amostras foram desidratadas em série etílica, infiltradas e incluídas em (2-hidroxil-etil)-metacrilato Leica®, segundo o protocolo do fabricante, seccionadas em micrótomo rotativo, coradas com azul de toluidina 0,05%, pH 4,7 (modificado de O'Brien et al. 1964) e montadas em resina sintética.

As proporções diferentes dos tecidos foram avaliadas por meio de microscópio óptico acoplado ao *Software* de Análise de Imagens, modelo Motic Images Plus, versão 2.0. A mensuração da área total da secção transversal da lâmina foi projetada em vídeo e, posteriormente, foi feita a foto da área seccionada de forma padrão, estabelecida como segue: padronizou-se o lado direito da imagem e então, após a nervura central, foram contabilizadas duas bainhas do feixe vascular e, assim, toda a imagem projetada em vídeo foi medida. A medição das proporções dos tecidos das LF foi realizada

sempre na mesma sequência, sendo a primeira aferição da área total (AT), em seguida a área da epiderme da face adaxial (EPada) e da face abaxial (EPaba), o esclerênquima (ESC), a bainha parenquimática dos feixes vasculares (BPFV) e os feixes vasculares (FV). O mesofilo (MES) da LF foi calculado por meio da diferença da área total (AT) e a somatória dos demais tecidos da secção transversal, como pode ser visualizada por meio da seguinte equação:

$$MES = AT - \Sigma (EPada + EPaba + ESC + BPFV + FV) \text{ em que:}$$

MES: Mesofilo;

AT: Área total;

EPada: Epiderme da face abaxial;

EPaba: Epiderme da face abaxial;

ESC: Esclerênquima;

BPFV: Bainha parenquimática do feixe vascular;

FV: Feixe vascular.

Os tecidos da LF foram diferenciados conforme a Figura 2. A medição das proporções dos tecidos do CB foi realizada sempre na mesma sequência, sendo aferida a área total (AT), em seguida área da epiderme (EPI), esclerênquima (ESC), xilema (XIL) e floema (FLO). O parênquima (PAR) do CB (ápice e base) foi calculado por meio da diferença da área total (AT) e a somatória dos demais tecidos da secção transversal, como pode ser visualizada por meio da seguinte equação:

$$PAR = AT - \Sigma (EPI + ESC + XIL + FLO)$$

PAR: Parênquima;

AT: Área total;

EPI: Epiderme;

ESC: Esclerênquima;

XIL: Xilema;

FLO: Floema.

Os tecidos do CB ápice foram diferenciados conforme a Figura 3. Os tecidos do CB ápice foram diferenciados conforme a Figura 4.

Modelos estatísticos

O efeito dos níveis de nitrogênio foi avaliado pela de equação de regressão, no qual foram considerados os valores médios de cada variável resposta no verão e inverno.

Foram utilizados modelos estatísticos, que testaram regressões linear e quadrática para todas as variáveis, conforme abaixo:

$$y_{ijk} = t_{ij} + e_{ijk} , \text{ em que:}$$

y_{ijk} é a observação na k-ésima repetição;

t_{ij} é o efeito do nível i dentro de época j (chuvoso e seca);

e_{ijk} é o erro aleatório associado à observação y_{ijk}

Para testar o efeito do tempo (cortes) nas variáveis, foi utilizada análise de variância, seguida de teste de médias a 5% de probabilidade, conforme abaixo:

$$y_{ijk} = t_i + época_j + t_i * época_j + e_{ijk} , \text{ em que:}$$

t_{ij} é o efeito do nível i ;

$época_j$ é o efeito da época de corte j ;

$t_i * época_j$ é a interação entre o nível i e época de corte j ;

e_{ijk} é o erro aleatório associado à observação y_{ijk} .

Foram determinadas as correlações lineares entre EPAda, EPAb, ESC, FV, BPFV, MES na lâmina foliar e EPI, ESC, FLO, XIL, MES no CB ápice e base com a tensão de ruptura (Pereira 2014b dados não publicados) em cada nível de nitrogênio. Foram utilizados 28 pares de observações para a LF e CB.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na LF houve efeito do nitrogênio ($P < 0,05$) na porcentagem de EPAda, sendo quadrático no verão (corte 1), e linear negativo no inverno (corte 5) (Tabela 2). No verão, o menor valor foi observado no nível de 300 kg/ha de N, de 13,67%, sendo o maior valor sem dose de nitrogênio, de 20,26%. No inverno, o menor valor para a epiderme adaxial foi encontrado no nível de 450 kg/ha de N de 14,35%.

Na EPAb na LF foi observado efeito quadrático ($P < 0,05$) no verão e efeito linear negativo ($P < 0,05$) no inverno (Tabela 2). Foi verificado que a EPAb decresceu com o aumento dos níveis de nitrogênio, sendo os maiores valores no nível de 150

kg/ha de N, de 8,18% no verão e 8,63% no inverno. No entanto os menores valores foram encontrados no nível de 450 kg/ha de N, com 6,33% no verão e 6,88% no inverno.

No ESC da LF houve efeito quadrático ($P<0,05$) do nitrogênio no verão, porém não foi observado efeito significativo no inverno (Tabela 2). No verão, o maior valor de ESC foi observado com ausência de adubação nitrogenada, de 1,25%, e o menor valor no nível de 450 kg/ha de N, de 0,77%.

Houve efeito da adubação nitrogenada no FV da LF ($P<0,05$), sendo quadrático para o verão e linear positivo para o inverno (Tabela 2). Foi observado que a quantidade de FV aumentou com o incremento de níveis de N, sendo os menores valores no nível de 150 kg/ha de N, de 6,08% no verão e 6,36% no inverno, e os maiores valores no nível de 450 kg/ha de N, de 7,25% e 9,57%, respectivamente.

Também foi verificado efeito do nitrogênio na BPFV da LF ($P<0,05$), sendo quadrático no verão e linear positivo no inverno (Tabela 2). No verão, o maior valor foi observado no nível de 300 kg/ha de N, de 35,49%. No entanto no inverno, o maior valor foi encontrado no nível de 450 kg/ha de N, com 34,91%.

Por fim, houve efeito do nitrogênio no MES da LF ($P<0,05$), sendo quadrático para o verão e linear negativo para o inverno (Tabela 2). Nesta variável tanto o verão quanto o inverno apresentaram efeito inverso, sendo o menor valor do verão, de 33,7%, verificado na ausência de adubação, enquanto no inverno foi observado no nível de 450 kg/ha de N, de 33,11%. No verão, o maior valor de MES foi verificado no nível de 450 kg/ha de N (36,25%), enquanto no inverno foi no nível de 150 kg/ha de N (36,36%).

Houve maior variação na EPAdA, com diminuição de 4,61 pontos percentuais no verão e 2,55 pontos percentuais no inverno, entre a ausência de N e a maior dose, quando comparada com a face abaxial, com diminuição de 1,85 e 1,75 pontos percentuais respectivamente. Estes resultados corroboram com Mauseth (1988), que explicou que as maiores variações da epiderme ocorrem na parte adaxial, por causa da ocorrência de células buliformes, que são células epidérmicas de grande dimensão e que, de acordo com Lempp et al. (2009), são células mais digestíveis que as demais.

À medida que a planta se desenvolve, a parede periclinal externa das células da epiderme se torna mais lignificada e espessa, cobrindo-se com uma porção de cutícula e cera (Wilson et. al 1983). Sugere-se que a aplicação de níveis elevados de nitrogênio

estímulo o crescimento de novas gramíneas, colhendo-se lâminas foliares com menor lignificação das epidermes e tornando os tecidos mais digeríveis.

Observa-se maior variação e efeito do nitrogênio no verão, comparado ao inverno, pela disponibilidade hídrica e luminosidade no período do verão, e aumenta a ação do nitrogênio nas estruturas anatômicas avaliadas.

O ESC, presente na LF em menor quantidade, apresentou variações no verão, também com redução à medida que se aumentaram os níveis de nitrogênio. Isto pode ser considerado positivo para a digestibilidade da gramínea, visto que Greenberg et al. (1989) demonstraram que o ESC oferece resistência ao tecido foliar, podendo influenciar no comportamento de pastejo do animal.

Esta porção da LF é formada por células longas com parede celular espessa, que ocorre acima e abaixo dos feixes vasculares, e apresenta lignificação com a maturidade da planta. Por apresentar pontos de ligação entre a epiderme e a bainha do feixe vascular e lignificação, o aumento de esclerênquima tem efeitos negativos sobre a mastigação, fragmentação, taxa e extensão de digestão, taxa de passagem e consumo de forragem (Carvalho & Pires 2008).

Houve aumento da porcentagem do FV em ambos os cortes com o aumento da adubação nitrogenada, contrariando a expectativa para esta estrutura. Os feixes vasculares da LF são constituídos pelas células do xilema e células do floema. Estas fazem parte do tecido de condução e, com o crescimento acelerado da planta induzido pelo nitrogênio, podem aumentar em função da demanda de nutrientes.

Piotto (2013), em experimento com capim-mombaça com diferentes níveis de adubação nitrogenada, não verificou influência da adubação no feixe vascular. Respostas diferentes foram encontradas por Basso et al. (2014) ao trabalhar com capim-milênio, no qual as proporções de FV responderam de modo linear decrescente com o aumento dos níveis de N empregadas. Basso et al. (2014) verificou em média 17% da composição total de FV em capim-milênio, e Piotto (2013) observou valores médios de 10%, valores que foram superiores às médias encontradas neste experimento.

Houve pouca variação na porcentagem da BPFV, que teve média de 33%, para os cortes de verão e inverno. Esta porção da planta é rica em enzimas fotossintéticas e carboidratos não estruturais, contribuindo na composição química e na produtividade da gramínea. Por isso, quanto maior a área da BPFV, maior seu valor nutricional. A área

ocupada BPFV pode sugerir cultivares de maior valor nutricional e níveis de nitrogênio que proporcionam melhor digestibilidade (Basso et al. 2014).

Apesar de importante, os nutrientes da BPFV não chegam aos microrganismos do rúmen em sua maioria. Este componente é passível de lignificação, que limita a digestão destas células, dificultando acesso dos microrganismos (Akin & Chesson 1989). Por isto, avalia-se o potencial do nitrogênio em acelerar o crescimento de novas gramíneas, ofertando sempre novas lâminas com estágio reduzido de lignificação, que ocorre com a maturação da planta.

O MES é uma porção altamente digestível, assim como as células do floema de parede celular delgada (Akin et al. 1973). Esta porção apresentou aumento com os níveis de N no verão, porém decréscimo no inverno.

O nitrogênio auxilia no aumento da porcentagem de MES, também rica em enzimas fotossintéticas e carboidratos não estruturais, sugerindo melhor gramínea em termos nutricionais. No entanto, apesar do aumento observado no verão, o decréscimo ocorrido no inverno pode ser atribuído a diminuição dos fatores abióticos no período, característico da seca, que diminui a ação positiva do nitrogênio. Isto, pois esta adubação favorece o crescimento e amadurecimento da planta, que pode ter seu amadurecimento acelerado quando na ausência de condições favoráveis.

No verão para a EPI, foi observado efeito quadrático ($P < 0,05$) do nitrogênio tanto para o CB base quanto para o CB ápice (Tabela 3). No inverno foi observado efeito linear positivo ($P < 0,05$) do nitrogênio apenas para o CB base, não sendo observado efeito significativo para o CB ápice (Tabela 3).

As porções base e ápice apresentaram resultados inversos de EPI quando adubados com nitrogênio, sendo os maiores valores do verão de 2,67% no nível de 150 kg/ha de N e de 1,86% no nível de 450 kg/ha de N, respectivamente. Da mesma forma, os menores valores foram de 2,17% no nível de 450 kg/ha de N e de 1,36% no nível de 150 kg/ha de N, respectivamente para CB base e ápice. No inverno houve efeito apenas para o CB base, sendo o menor valor de 1,75% no nível de 150 kg/ha de N, e o maior valor de 2,58% no nível de 450 kg/ha de N.

No verão houve efeito quadrático ($P < 0,05$) do nitrogênio na quantidade de ESC, tanto do CB base quanto do ápice (Tabela 3). No inverno também não houve efeito ($P > 0,05$) para o CB ápice, e foi observado efeito linear positivo ($P < 0,05$) para o CB base.

O CB base teve pequena alteração da porcentagem de ESC no verão, considerando o menor valor de 16,59% na ausência de adubação nitrogenada e o maior valor de 17,8% no nível de 450 kg/ha de N. Ainda no verão, houve efeito para o ESC no CB ápice, com menor valor de 4,93% na ausência de adubação e o maior valor de 9,86% no nível de 450 kg/ha de N. No inverno houve significância apenas para o CB base, que apresentou diminuição de 1,71 pontos percentuais na quantidade de ESC entre a menor e a maior dose de nitrogênio.

No verão houve efeito quadrático ($P < 0,05$) do nitrogênio para o XIL do CB base, e não houve efeito ($P > 0,05$) para o CB ápice no mesmo período (Tabela 3). No inverno houve efeito linear negativo ($P < 0,05$) para o XIL do CB base e linear positivo ($P < 0,05$) para o XIL do CB ápice (Tabela 3).

A quantidade de XIL decresceu no CB base com o aumento dos níveis de nitrogênio no verão, passando de 11,34% no nível de 150 kg/ha de N, para 6,56% no nível de 450 kg/ha de N, a diminuição de 4,78 pontos percentuais. O mesmo ocorreu no inverno para o CB base, com a diminuição de 1,71 pontos percentuais. O CB ápice registrou significância do nitrogênio no XIL apenas para o inverno, com aumento de 2,54 pontos percentuais entre a menor e a maior dose de nitrogênio.

Houve efeito quadrático ($P < 0,05$) do nitrogênio na quantidade de FLO, tanto do CB base quanto do ápice (Tabela 3), para o verão. No FLO no período do inverno, houve efeito linear positivo ($P < 0,05$) para o CB ápice, e não foi observado efeito significativo ($P > 0,05$) para o CB base.

No verão, o maior valor de FLO no CB base, de 3,23%, foi encontrado no nível de 300 kg/ha de N, enquanto o menor valor, de 1,5%, foi verificado na ausência de adubação. No CB ápice no mesmo período, verificou-se que a porcentagem de FLO aumentou com os níveis de N, sendo 0,6% na ausência de adubação e 1,06% no nível de 450 kg/ha de N. No inverno, houve também aumento da porcentagem de FLO com o aumento dos níveis de N para o CB ápice, de 0,81% entre a menor e a maior dose.

Por fim, houve efeito ($P < 0,05$) do nitrogênio para o MES para o CB base e ápice no verão e para o CB base no inverno. No verão, foi verificado efeito quadrático para o CB base e ápice, e no inverno, efeito linear negativo para o CB base (Tabela 3). Não houve efeito significativo ($P > 0,05$) para o CB ápice no inverno.

No CB base, no período do verão, verificou-se aumento de 11,7 pontos percentuais entre a menor e a maior dose de nitrogênio. Porém no inverno, para a

mesma porção, houve pouca variação no mesofilo, com decréscimo de 0,65% entre a menor e a maior dose de nitrogênio. Para a porção CB ápice, houve também decréscimo de 3,15 pontos percentuais do MES, entre os níveis de 150 kg/ha de N e 450 kg/ha de N.

Entre os tecidos do CB, o PAR e o FLO são de rápida digestão. No entanto, como mencionado, o PAR sofre lignificação, e sua digestibilidade decresce à medida que a planta se desenvolve (Akin 1989). Os outros tecidos, XIL, epiderme e o ESC são praticamente indigestíveis.

No verão, os tecidos resistentes à digestão representaram 24% da seção transversal do segmento de CB base na ausência de adubação, considerando os valores médios das proporções de EPI (2,0%), XIL (8,7%) e ESC (13,13%). No mesmo segmento, com a maior dose de N (450 kg/ha de N) o valor foi de 23%, considerando as proporções de EPI (2,2%), XIL (6,7%) e ESC (14 %).

No mesmo corte, no CB ápice, no segmento transversal, na ausência de adubação, os tecidos resistentes à digestão representaram 11%, com valores médios das proporções de EPI (1,2%), XIL (4,8%) e ESC (4,9%). Com 450 kg/ha de N, os mesmos tecidos representaram 16%, com valores médios das proporções de EPI (1,9%), XIL (4,4%) e ESC (9,9%).

A variação entre CB ápice e base pode ser explicada pela natureza acrópeta (crescimento ascendente) de seu desenvolvimento, amplamente documentada em gramíneas forrageiras (Wilson et al. 1991, Wilson 1994). Apesar do aumento da proporção na parte apical, o efeito da adubação nitrogenada manteve ainda a porção apical inferior a porção basal. Este é um dos fatores que determinam a profundidade do bocado do animal, tornando estas variáveis determinantes para o consumo do animal em pastejo.

No inverno, os tecidos resistentes à digestão representaram 26% da seção transversal do segmento de CB base dose de 150 kg/ha de N, considerando os valores médios das proporções de EPI (1,75%), XIL (9,1%) e ESC (15,15%). No mesmo segmento, com o nível de 450 kg/ha de N o valor foi de 26,5%, considerando as proporções de EPI (2,6%), XIL (7,3%) e ESC (16,6 %).

Para o CB ápice, no qual não houve significância para o nitrogênio para EPI e ESC, o XIL apresentou valores médios de 5,5% e 8%, no nível de 150 kg/ha de N e 450 kg/ha de N respectivamente.

Brito et al. (1999) em pesquisa com três cultivares de capim-elefante, avaliaram o crescimento, com o objetivo de determinar a porcentagem dos tecidos de LF e CB e avaliar a sequência de degradação dos mesmos, após a incubação *in vitro* em líquido ruminal de bovinos. Foi constatado que a área ocupada pelo tecido lignificado aumentou com o crescimento das plantas, tanto nas LF quanto no CB.

O aumento, portanto, da proporção dos tecidos EPI, ESC e XIL na maior dose de nitrogênio ocorreu provavelmente pelo efeito de crescimento acelerado da planta, somado aos fatores abióticos favoráveis, que aumentou a área do CB (Pereira 2014b dados não publicados), somado a maior altura de colheita neste nível de adubação. Proporcionalmente, ocorreu a porcentagem maior destes tecidos, contudo de acordo com Pereira (2014a dados não publicados), as mesmas amostras possuem parede celular com menor teor de lignificação, em relação à ausência de adubação refletindo o efeito da idade de corte.

A proporção de tecidos lignificados pode, como observado, comprometer a digestibilidade de forrageiras, e este aspecto é amplamente descrito em pesquisas com forrageiras. No entanto, alguns trabalhos (Jung & Bunton 1994, Jung & Allen 1995, Jung & Ni 1998, Deschamps 1999, Hatfield et al. 1999a, 1999b) expõem que a **composição** química da parede celular, com atenção aos compostos da lignina, **pode** determinar graus diferentes de digestibilidade, mesmo de tecidos com proporção de lignificação semelhante. Isso se deve a componentes como os ácidos ferúlico e p_cumárico, que estão altamente associados à lignina e interferem na digestibilidade (Hatfield et al. 1999a).

A epiderme apresenta, em todas as regiões, células longas, e células curtas, que podem ser suberosas ou silicificadas e, geralmente, ocorrem aos pares. Neste trabalho, houve aumento da epiderme com os níveis de nitrogênio em todos os cortes para o colmo+bainha, e diminuição da mesma na lâmina foliar. Para Chesson et al. (1986) e Hanna et al. (1973), apesar da epiderme ser resistente à digestão, por sua parede periclinal externa ser cutinizada e lignificada, a composição da parede interna possui composição semelhante ao mesofilo, apresentando rápida digestão. Wilson et al. (1991) também verificaram essa equivalência, observando intensidade de digestão semelhante entre EPI e MES em seções transversais de *Panicum maximum* e *Cynodon dactylon* incubadas *in vitro*.

O PAR, tecido considerado desejável em termos de degradação ou digestibilidade, além de ocupar grande parte da área total de todas as frações da planta, revelou-se mais abundante na região do ápice do CB (Tabela 3) para ambos os cortes.

A proporção desta estrutura se relaciona positivamente com a digestibilidade e negativamente com o teor de parede celular (Queiroz et al. 2000). Estes resultados corroboram Wilson (1976) e Akin et al. (1977), cujos valores chegaram a representar quase 85% da área do CB ápice para o capim-elefante.

Portanto, uma vez que a região apical do CB também é consumida pelo animal em pastejo, observa-se que o MES tende a reduzir sua proporção à medida que se aproxima da base do perfilho, demonstrando que as estruturas anatômicas também podem ser barreira física para o consumo.

Avaliando o efeito dos cortes no efeito do nitrogênio no capim-tanzânia, foi verificado que não houve interação entre cortes e níveis de adubação (Tabelas 4, 5 e 6).

Para a lâmina LF, não houve diferença estatística entre as médias de nenhuma variável anatômica (Tabela 4).

Manarin & Monteiro (2002), em pesquisa com *Panicum maximum* Jacq. cv. Mombaça com diferentes níveis de adubação nitrogenada e dois períodos de crescimento, verificou resultados distintos ao desta pesquisa, constatando que a área foliar foi influenciada ($P < 0,05$) pelos cortes. Contudo, Paciullo (2002) também não verificou efeito significativo das estações para as variáveis anatômicas.

Piotto (2013), em pesquisa com capim-mombaça, verificou que os resultados percentuais das características anatômicas foram semelhantes para os níveis de N nas estações do ano, não sendo observados efeitos significativos para o MES, ESC e EPAda e EPAb.

A falta de efeito significativo dos cortes (tempo) nas características anatômicas da lâmina foliar de forrageiras corroboram com a literatura, na qual os efeitos da idade ou fatores climáticos são pequenos ou inconsistentes, quando analisados sobre a ótica da alteração de proporção dos tecidos das lâminas foliares (Wilson et al. 1991, Paciullo et al. 1999, Queiroz et al. 2000).

No CB base, houve variação estatística entre os cortes apenas para o ESC e PAR (Tabela 5). Para o ESC, o verão apresentou 18,7%, enquanto o inverno, 15,8%, representando a diminuição de 2,9 pontos percentuais. O inverso ocorreu para o PAR,

que teve o menor valor médio no verão, de 66,9%, enquanto no inverno apresentou 71,5% de PAR, significando aumento de 4,6 pontos percentuais.

Conforme resultados obtidos, Paciullo (2002) em trabalho com três cultivares trabalho (capim-braquiária, capim-gordura e capim-tifton 85) também não verificou resultados da influência das estações do ano para o CB, para as porções FLO, XIL e EPI.

Contudo, os resultados observados para o ESC e o PAR corroboram com Paciullo (2002), que obteve maior valor da porção ESC, para as duas idades avaliadas (jovem, velha), no verão (4,2%, 11,6% respectivamente) do que no outono (4,0%, 8,7% respectivamente). O mesmo autor também verificou variação para o PAR, sendo o valor do verão (70%) inferior ao do outono (74,8 %) para o capim-tifton 85. Este resultado é semelhante ao obtido com o capim-tanzânia neste trabalho, que teve a proporção de PAR no verão, verão (66,9%) inferior ao do inverno, inverno (71,5%).

Na porção apical do CB, houve variação estatística entre os cortes para o XIL e FLO (Tabela 6). Para o XIL, houve aumento da porcentagem com o decorrer dos cortes, sendo no verão verificado 4,6% de xilema, e no inverno, 6,8%, o aumento de 2,4% para esta porção. No FLO também houve aumento do percentual com os cortes, sendo 0,9% no verão e 1,5% no inverno, o aumento de 0,6%.

O FLO é um tecido susceptível à lignificação, que pode espessar sua parede celular com o amadurecimento da planta. Acredita-se que, no inverno, em função das condições climáticas desfavoráveis, a adubação tenha proporcionado acelerado amadurecimento da gramínea, incentivando o processo de lignificação.

Ainda, observa-se aumento dos tecidos estruturais, provavelmente em função do intervalo entre cortes que foi maior no inverno. Este fato proporcionou a coleta de CB com maior amadurecimento, paredes mais espessas e com mais tecido estrutural.

Em sua pesquisa, Paciullo (2002) observou que o CB teve influência da idade, porém não apresentou variações significativas com as estações, sugerindo que a lignificação seja o fator crucial e impactante na digestibilidade das gramíneas, e não necessariamente as condições climáticas.

Wilson et al. (1991) descrevem a lignificação da parede celular como sendo o principal fator que influencia negativamente na digestibilidade de gramíneas forrageiras de temperaturas tropicais. Com estas observações, e pelos resultados obtidos, as

alterações da proporção de tecidos das plantas não devem ser responsabilizadas por alterações na digestibilidade por si só, quando avaliadas as variações climáticas.

Foram avaliadas concomitantemente, ao longo do estudo com capim-tanzânia, propriedades biomecânicas da forrageira, com as mesmas amostras (Pereira 2014b dados não publicados). Neste estudo, verificou-se que o aumento de níveis de nitrogênio influenciou negativamente estas propriedades biomecânicas da forrageira, diminuindo os componentes de tração, o que auxilia no processo de colheita do animal.

Para todas as variáveis anatômicas da LF a correlação com a tensão de ruptura não foi significativa ($P>0,05$) (Tabela 7). Contudo, as maiores correlações foram encontradas no nível de 450 kg/ha e na ausência de N.

As porções ESC, FV e BPFV, na maior dose de adubação, apresentaram correlação negativa com a tensão de ruptura, resultado contrario a ausência de N, na qual estas variáveis apresentaram correlação positiva.

O EPAb e o MES apresentaram correlação negativa na ausência de N, e correlação positiva no nível de 450 kg/ha. O EPAb foi o único componente que manteve a correlação negativa para ambos os níveis, no entanto houve aumento da correlação, sendo a maior encontrada no nível de 450 kg/ha.

O CB apresentou quantidade de correlação significativa com a tensão de ruptura maior que a LF, no geral. Foram observadas quatro correlações significativas para a porção basal e sete para a porção apical (Tabela 8).

No CB base, foi verificada alta correlação significativa para o FLO, nos níveis 300 kg/ha (correlação negativa) e 450 kg/ha (correlação positiva). O PAR apresentou alta correlação positiva nos níveis de 150 kg/ha e 300 kg/ha.

No CB base, houve alta correlação significativa positiva para a EPI, o FLO e o XIL, no nível de 450 kg/ha, e para o mesofilo no nível de 300 kg/ha. Houve alta correlação significativa negativa para o ESC e o FLO no nível de 300 kg/ha e para o MES no nível de 450 kg/ha.

Pode-se observar que houve maior significância nos níveis mais elevadas de nitrogênio que corrobora com a afirmação de que níveis elevadas de adubação nitrogenada promovem melhora nas propriedades de ruptura, diminuindo a lignificação e a espessura da parede celular e, contudo, no potencial nutritivo da forrageira (Pereira 2014b dados não publicados).

As estruturas anatômicas separadas tiveram pouca significância correlacionada com a tensão de ruptura, demonstrando que o conjunto das mesmas atua na resistência à colheita do animal. No entanto, pode-se destacar que, na LF, o ESC e o FV foram os que apresentaram maior correlação, independente do nível de N utilizada. Como apresentado anteriormente, a lignina se acumula principalmente nos tecido supracitados, promovendo maior rigidez na lâmina foliar.

No CB, tanto no ápice quanto na base, observam-se maiores correlações na EPI e no ESC. Verificou-se que as estruturas anatômicas podem não apresentar sozinhas, tanto efeito de resistência à colheita do animal em pastejo, porém podem, em conjunto, ser impactantes no processo de ingestão da forragem. Assim, a organização e a arquitetura desses tecidos trabalham de maneira conjunta para dificultar a herbivoria.

CONCLUSÃO

Níveis elevados de nitrogênio promovem a diminuição das estruturas mais rígidas e de difícil digestão, o xilema e o esclerênquima, tanto da lâmina foliar quanto do colmo+bainha ápice e base, e estes resultados são correlacionados com a tensão de ruptura da forragem.

O menor efeito da adubação nitrogenada ocorreu no colmo+bainha base, que apresenta arquitetura anatômica que dificulta o processo de colheita e digestão do capim-tanzânia.

O efeito da época de corte é muito pequeno nas características anatômicas do capim-tanzânia quando se utiliza o manejo de interceptação luminosa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKIN, D.E. (1989). Histological and physical affecting digestibility of forages. *Agronomy Journal* **21**, 17-25.
- AKIN, D.E., ROBINSON, E.L., BARTON, F.E. II & HIMMELSBACH, D.S. (1977). Changes with maturity in anatomy, histochemistry, chemistry, and tissue digestibility of bermudagrass plant parts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **25**(1), 179-186.
- AKIN, D.E. & CHESSON, A. (1989). Lignification as the major factor limiting forage feeding value especially in warm conditions. In: *International Grassland*

- Congress*, **16**, Nice. Proceedings. Nice: Association Française pour la Production Fourragère, 1753-1760.
- AKIN, D.E., AMOS, H. E, BARTON, F.E. & BURDICK, D. (1973). Rumen microbial degradation of grass tissue revealed by scanning electronmicroscopy. *Agromony Journal* **65**, 825-828.
- BASSO, K. C., CECATO, U., BARBERO, L.M., LEMPP, B., GOMES, J.A.N. & LUGÃO, S.M.B. (2014). Influence of nitrogen levels on leaf anatomy of Millennium grass. *Bioscience Journal (Online)* **30**, 792-802.
- BENVENUTTI, M.A., GORDON, I. J., POPPI, D. P. (2006). The effect of the density and physical properties of grass stems on the foraging behaviour and instantaneous intake rate by cattle grazing an artificial reproductive tropical sward. *Grass and Forage Science* **61**, 272-281.
- BRITO, C.J.F.A, RODELLA, R.A., DESCHAMPS & ALQUINI, Y. (1999). Anatomia quantitativa e degradação *in vitro* de tecidos em cultivares de capim-elefante. *Revista Brasileira de Zootecnia* **28** (2), 223-229.
- CARVALHO, G.G.P. & PIRES, A.J.V. (2008). Organização dos tecidos de plantas forrageiras e suas implicações para os ruminantes. *Archivos Zootecnia* **57**, 13-28.
- CHESSON, A., STEWART, C.S. & DALGARNO, K. et al. (1986). Degradation of isolated grass mesophyll, epidermis and fibre cell wall in the rumen and by cellulotic rumen bacteria in axenic culture. *Journal of Applied Bacteriology* **60**(4), 327-336.
- EMBRAPA, (1999). *Sistema brasileiro de classificação de solos*. Brasília.
- DESCHAMPS, F.C. (1999). Implicações do período de crescimento na composição química e digestão dos tecidos de cultivares de capim-elefante. *Revista Brasileira de Zootecnia* **28** (6), 1358-1369.
- GREENBERG, A. R., MEHLING, A., LEE, M. & BOCK, J. H. (1989). Tensile behavior of grass. *Journal of Materials Science* **24**, 2549-2554.
- GOMES, R.A., LEMPP, B., JANK, LIANA, CARPEJANI, G.C. & MORAIS, M.G. (2011). Características anatômicas e morfofisiológicas de lâminas foliares de genótipos de *Panicum maximum*. *Pesquisa agropecuária brasileira* **46**(2), 205-211.
- HANNA, W.W., MONSON, W.G. & BURTON, G.W. (1973). Histological examination of fresh forage leaves after *in vitro* digestion. *Crop Science* **13**(1), 98-102.

- HATFIELD, R.D., RALPH, J. & GRABBER, J.H. (1999a). Cell wall cross- linking by ferulates and diferulates in grasses. *Journal of Science Food Agriculture* **79**, 403-407.
- HATFIELD, R.D., RALPH, J. & GRABBER, J.H. (1999b). Cell wall structural foundations: molecular basis for improving forage digestibility. *Crop Science* **39**, 27-37.
- JOHANSEN, D.A. (1940). *Plant microtechnique*. New York: McGraw-Hill. 523p.
- JUNG, H.G. & ALLEN, M.S. (1995). Characteristics of plant cell walls affecting intake and digestibility of forages by ruminants. *Journal of Animal Science* **73**, 2774-2790.
- JUNG, H.G. & BUNTON, D.R. (1994). Forage quality variation among maize inbreds: relationships of cell-wall composition and in-vitro degradability for stem internodes. *Journal of Science Food Agriculture* **66**, 313-322.
- JUNG, H.G. & NI, W. (1998). Lignification of plant cell walls: impact of genetic manipulation. *Proceedings of the National Academy of Science* **95**, 12742-12743.
- LEMPPE, B., GOMES, R.A. & MORAIS, M. DA. G. (2009). Importância da anatomia vegetal na qualidade da forragem. In: Simpósio, 7., Congresso de Forragicultura e Pastagens, **3**, Lavras. *Anais*. Lavras: UFLA, p.1-16. Jaboticabal. Unesp. 148p.
- MANARIN, C.A. & MONTEIRO, F.A. (2002). Nitrogênio na produção e diagnose foliar do capim-Mombaça. *Boletim de Indústria Animal* **59**, 115-123.
- MAUSETH, J.D. (1988). *Plant anatomy*. California: The Benjamin/ Cummings Publishing Company, 560p.
- NASCIMENTO JÚNIOR, D. & ADESE, B. (2004). Acúmulo de biomassa na pastagem. In: simpósio sobre manejo estratégico da pastagem, Viçosa. *Anais...* Viçosa, 2004. p. 289-346.
- O'BRIEN, T.P., FEDER, N. & MCCULLY, M.E. (1964). Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue. *Protoplasma* **59**(2): 368-373.
- OMETTO, J.C. (1981). *Bioclimatologia Vegetal*. São Paulo: Ed. Agronômica Ceres, p.440.
- PACIULLO, D.S.C., MATTOS, J.L.S., GOMIDE, J.A., QUEIROZ, D. S. & SILVA, E. A. M. (1999). Proporção de tecidos e espessura da parede celular em espécies de braquiária, cultivadas sob diferentes níveis de umidade no solo. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, **36.**, 1999, Porto Alegre. *Anais...*

- São Paulo: Sociedade Brasileira de Zootecnia/Gmosis, [1999]. CD-ROM. Forragicultura.
- PACIULLO, D.S.C., GOMIDE, J.A., SILVA, E.A.M. DA, QUEIROZ, D.S. & GOMIDE, C.A.M. (2002). Degradação *in vitro* de tecidos da lâmina foliar e do colmo de gramíneas forrageiras tropicais, em função do estágio de desenvolvimento. *Revista Brasileira Zootecnia* **31**, 900-907.
- PEREIRA, V. V. (2014a). *Importância da parede celular na digestibilidade do capim-tanzânia fertilizado com crescentes níveis de nitrogênio sob pastejo*. Dados não publicados.
- PEREIRA, V. V. (2014b). *Propriedades biomecânicas do capim-tanzânia sob níveis crescentes de nitrogênio*. Dados não publicados.
- PIOTTO, V.C. (2013). *Perfilhamento e anatomia foliar do capim-mombaça adubado com nitrogênio e irrigado sob pastejo*. 76 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Paraná.
- QUEIROZ, D.S., GOMIDE, J.A., MARIA, J. (2000). Avaliação da folha e do colmo de topo e base de perfilhos de três gramíneas forrageiras. 2. Anatomia. *Revista Brasileira de Zootecnia* **29**(1), 61-68.
- TAIZ, L., ZEIGER, E. (2013). *Fisiologia vegetal*. Porto Alegre: Artimed, 918p.
- WERNER, J. C., PAULINO, V. T., CANTARELLA, H., ANDRADE, N. O. & QUAGGIO, J. A. (1996). In: *Forrageiras: recomendações de adubação e calagem para o estado de São Paulo*, 2 ed. Campinas, Instituto Agrônomo e Fundação IAC, (Boletim técnico, 100) p. 263.
- WILSON, J.R., BROWN, R.H. & WINDHAM, W.R. (1983). Influence of leaf anatomy on the dry matter digestibility of C3, C4, and C3/C4 intermediate types of Panicum species. *Crop Science* **23**(1), 142-146,
- WILSON, J.R. (1994). Cell wall characteristics in relation to forage digestion by ruminants. *Journal of Agricultural Science* **122**(2), 173-182.
- WILSON, J.R., DEINUM, B. & ENGELS, F.M. (1991). Temperature effects on anatomy and digestibility of leaf and stem of tropical and temperate forage species. *Netherlands Journal of Agricultural Science* **39**(1), 31-48.
- WILSON, J.R. (1976). Variation of leaf characteristics with level of insertion on a grass tiller. II. Anatomy. *Australian Journal of Agricultural Research* **27**(3), 355-364.

FIGURAS E TABELAS

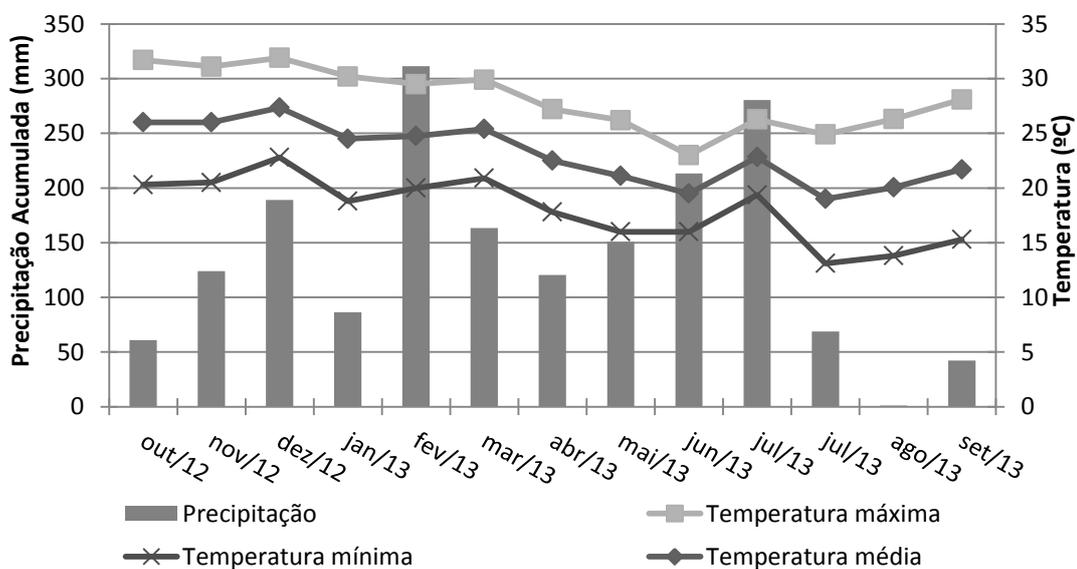


Fig. 1. Dados climáticos de precipitação e temperatura: máxima, média e mínima durante o período experimental.

Fonte: Laboratório de Sementes da Fazenda Experimental de Iguatemi – UEM

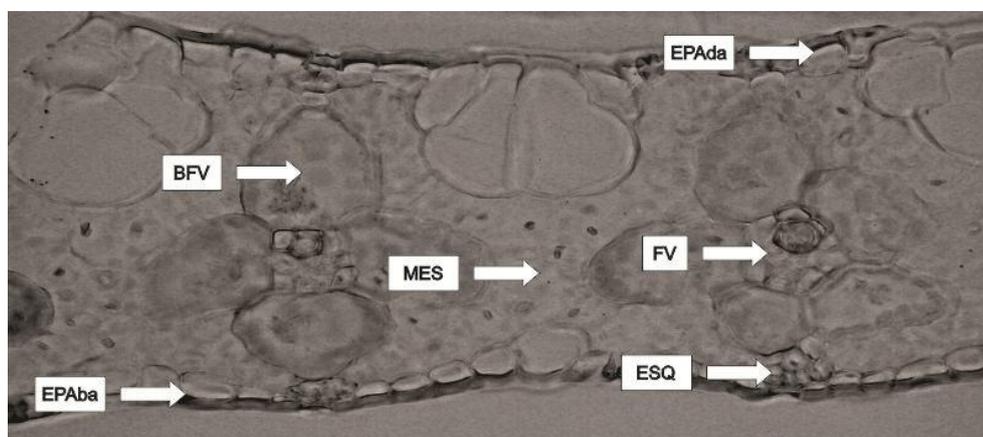


Fig. 2. Distribuição dos tecidos de lâminas foliares de capim-tanzânia (EPAda – epiderme da face adaxial; EPABA – epiderme da face abaxial; ESQ - esclerênquima; BFV – bainha parenquimática do feixe vascular; FV – feixe vascular; MES – mesofilo).

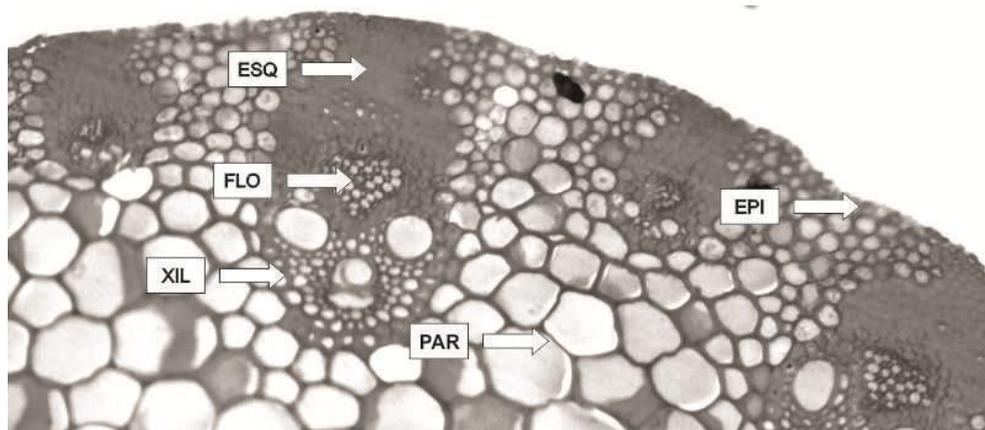


Fig. 3. Distribuição dos tecidos de colmo+bainha ápice de capim-tanzânia (XIL – xilema; FLO - floema; ESQ - esclerênquima; EPI – epiderme; PAR – parênquima).

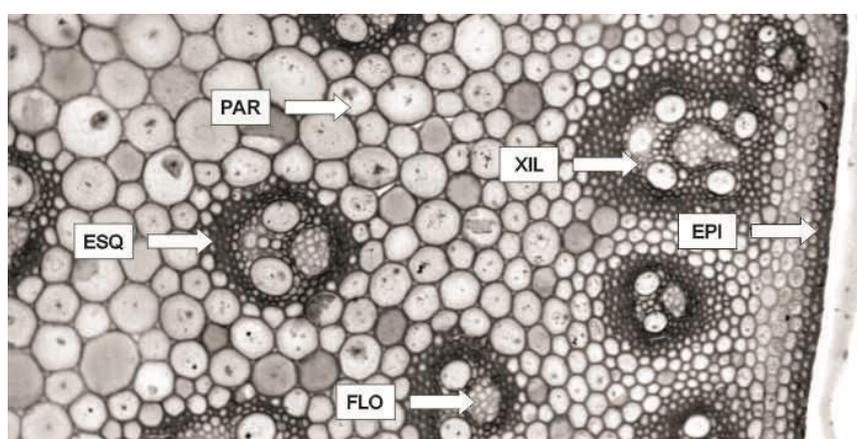


Fig. 4. Distribuição dos tecidos de colmo+bainha base de capim-tanzânia (XIL – xilema; FLO - floema; ESQ - esclerênquima; EPI – epiderme; PAR – parênquima).

Tabela 1. Componentes químicos do solo das pastagens de capim-tanzânia no início do período experimental, para os tratamentos 1 (0 kg ha⁻¹ de nitrogênio), 2 (150 kg ha⁻¹ de nitrogênio), 3 (300 kg ha⁻¹ de nitrogênio) e 4 (450 kg ha⁻¹ de nitrogênio).

| Trat. | P ¹ mg/dm ³ | C ⁷ g/dm ³ | pH H ₂ O | H+Al ⁶ | Ca ² | Mg ² | K ¹ | SB ³ | CTC ⁴ | V ⁵ % |
|-------|--------------------------------------|-------------------------------------|------------------------|-------------------|-----------------|-----------------|----------------|-----------------|------------------|---------------------|
| | | | | | | | | | | |
| 1 | 10.23 | 13.33 | 6.00 | 2.27 | 1.89 | 0.60 | 0.12 | 2.60 | 4.87 | 53.41 |
| 2 | 8.09 | 11.32 | 5.90 | 2.45 | 1.20 | 0.47 | 0.08 | 1.75 | 4.20 | 41.61 |
| 3 | 5.34 | 10.12 | 5.70 | 2.45 | 1.38 | 0.43 | 0.07 | 1.87 | 4.32 | 43.31 |
| 4 | 4.89 | 9.02 | 5.80 | 2.36 | 1.89 | 0.64 | 0.04 | 2.56 | 4.92 | 52.08 |

Fonte: Laboratório Rural de Maringá. ¹Fósforo (P) e Potássio (K)- Extraído por Melich; ²Cálcio (Ca) e Magnésio (Mg) - extraídos com KC 1mol L⁻¹; ³Soma de Bases; ⁴Capacidade de troca de cátions; ⁵Porcentagem de saturação por bases; ⁶Hidrogênio+Alumínio; ⁷Carbono.

Tabela 2. Equações de regressão ajustadas para as variáveis morfoanatômicas da lâmina foliar (epiderme da face adaxial, epiderme da face abaxial, esclerênquima, feixe vascular, bainha parenquimática do feixe vascular e mesofilo) do capim-tanzânia sob níveis de nitrogênio, no verão e inverno.

| Corte | Equação de Regressão | R ² |
|--|-------------------------------------|----------------|
| Epiderme da Face Adaxial (%) | | |
| verão | $Y=20.264125-0.045339N+0.000078N^2$ | 0,92 |
| inverno | $Y=18.181667-0.008508N$ | 0,20 |
| Epiderme da Face Abaxial (%) | | |
| verão | $Y=7.474125+0.008352N-0.000024N^2$ | 0,81 |
| inverno | $Y=9.509167-0.005842N$ | 0,56 |
| Esclerênquima (%) | | |
| verão | $Y=1.251000-0.000435N-0.000001N^2$ | 0,98 |
| inverno | $Y=1.077500$ | n.s |
| Feixe Vascular (%) | | |
| verão | $Y=6.230000-0.002617N+0.000011N^2$ | 0,34 |
| inverno | $Y=4.755833+0.010708N$ | 0,34 |
| Bainha Parenquimática do Feixe Vascular (%) | | |
| verão | $Y=31.082625+0.032326N-0.000059N^2$ | 0,84 |
| inverno | $Y=28.484167+0.014292N$ | 0,84 |
| Mesofilo (%) | | |
| verão | $Y=33.701000+0.007673N-0.000004N^2$ | 0,48 |
| inverno | $Y=37.985000-0.010833N$ | 0,49 |

R² = Coeficiente de determinação; N = 0, 15, 300 e 450 kg ha⁻¹ de N; ns= não significativo.

Tabela 3. Equações de regressão ajustadas para as variáveis morfoanatômicas do colmo+bainha base e ápice (epiderme, esclerênquima, xilema, floema e parênquima) do capim-tanzânia sob níveis de nitrogênio, no verão e inverno

| Estrutura | Corte | Equação de Regressão | R ² |
|--------------------------|---------|-------------------------------------|----------------|
| Epiderme (%) | | | |
| Colmo+bainha Base | Verão | $Y=1.983500+0.006748N-0.000014N^2$ | 0,70 |
| Colmo+bainha Ápice | Verão | $Y=1.196375+0.000951N+0.000001N^2$ | 0,84 |
| Colmo+bainha Base | Inverno | $Y=1.342500+0.002767N$ | 0,90 |
| Colmo+bainha Ápice | Inverno | $Y=1.814167$ | n.s |
| Esclerênquima (%) | | | |
| Colmo+bainha Base | Verão | $Y=13.129625+0.071948N-0.000154N^2$ | 0,91 |
| Colmo+bainha Ápice | Verão | $Y=4.938625+0.012957N-0.000004N^2$ | 0,43 |
| Colmo+bainha Base | Inverno | $Y=14.446667+0.004750N$ | 0,44 |
| Colmo+bainha Ápice | Inverno | $Y=8.598333$ | n.s |
| Xilema (%) | | | |
| Colmo+bainha Base | Verão | $Y=8.684375+0.029004N-0.000075N^2$ | 0,59 |
| Colmo+bainha Ápice | Verão | $Y=4.826250$ | n.s |
| Colmo+bainha Base | Inverno | $Y=9.951667-0.005675N$ | 0,60 |
| Colmo+bainha Ápice | Inverno | $Y=4.296667+0.008350N$ | 0,46 |

| Floema (%) | | | |
|-----------------------|---------|---|------|
| Colmo+bainha Base | Verão | $Y = 1.500375 + 0.015886N - 0.000034N^2$ | 0,36 |
| Colmo+bainha Ápice | Verão | $Y = 0.602500 + 0.001383N - 0.000001N^2$ | 0,44 |
| Colmo+bainha Base | Inverno | $Y = 2.066667$ | n.s |
| Colmo+bainha Ápice | Inverno | $Y = 0.665000 + 0.002692N$ | 0,30 |
| Parênquima (%) | | | |
| Colmo+bainha Base | Verão | $Y = 74.706375 - 0.123649N + 0.000277N^2$ | 0,93 |
| Colmo+bainha Ápice | Verão | $Y = 88.442375 - 0.018576N + 0.000013N^2$ | 0,24 |
| Colmo+bainha Base | Inverno | $Y = 72.194167 - 0.002158N$ | 0,72 |
| Colmo+bainha Ápice | Inverno | $Y = 84.623333$ | n.s. |

R^2 = Coeficiente de determinação; N = 0, 15, 300 e 450 kg ha⁻¹ de N; ns= não significativo.

Tabela 4. Médias para as variáveis morfoanatômicas da lâmina foliar (epiderme adaxial (EPAda), epiderme abaxial (EPAb), esclerênquima (ESC), feixe vascular (FV), bainha parenquimática do feixe vascular (BPFV) e mesofilo (MÉS)) do capim-tanzânia sob níveis de nitrogênio, no verão e inverno.

| Lâmina Foliar | | | | | | |
|----------------------|-----------|----------|---------|--------|----------|---------|
| Corte | EPAda (%) | EPAb (%) | ESC (%) | FV (%) | BPFV (%) | MES (%) |
| Verão | 14,74* | 7,38* | 0,97* | 6,49* | 34,71* | 35,68* |
| Inverno | 15,62* | 7,75* | 1,13* | 7,96* | 32,77* | 34,73* |

*($P > 0,05$)

Tabela 5. Médias para as variáveis morfoanatômicas do colmo+bainha base (epiderme (EPI), esclerênquima (ESC), xilema (XIL), floema (FLO) e parênquima (PAR)) do capim-tanzânia sob níveis de nitrogênio, no verão e inverno

| Colmo+bainha Base | | | | | |
|--------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|
| Corte | EPI (%) | ESC (%) | XIL (%) | FLO (%) | PAR (%) |
| Verão | 2,50* | 18,71 B | 9,28* | 2,58* | 66,90 A |
| Inverno | 2,17* | 15,87 A | 8,24* | 2,16* | 71,54 B |

*($P > 0,05$); médias seguidas de letras diferem entre si nas linhas ($P < 0,05$).

Tabela 6. Médias para as variáveis morfoanatômicas do colmo+bainha ápice (epiderme (EPI), esclerênquima (ESC), xilema (XIL), floema (FLO) e parênquima (PAR)) do capim-tanzânia sob níveis de nitrogênio, no verão e inverno

| Colmo+bainha Ápice | | | | | |
|---------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|
| Corte | EPI (%) | ESC (%) | XIL (%) | FLO (%) | PAR (%) |
| Verão | 1,59* | 8,04* | 4,62 A | 0,90 A | 84,84* |
| Inverno | 2,04* | 8,92* | 6,80 B | 1,47 B | 80,75* |

*($P > 0,05$); médias seguidas de letras diferem entre si nas linhas ($P < 0,05$).

Tabela 7. Correlação entre a tensão de ruptura as variáveis morfoanatômicas da lâmina foliar (epiderme da face adaxial (EPAda) (%), epiderme da face abaxial (EPAb) (%), esclerênquima (ESC) (%), feixe vascular (FV) (%), bainha

parenquimática do feixe vascular (BPFV) (%) e mesofilo (MÊS) (%) do capim-tanzânia sob níveis de nitrogênio, no verão e inverno

| Componente | Níveis de N | Variáveis morfoanatômicas | | | | | |
|---------------|-------------|---------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|
| | | EPAda | EPAbA | ESQ | FV | BPFV | MES |
| Lâmina foliar | 0 | -0,5368 | -0,2688 | 0,7467 | 0,9042 | 0,7049 | -0,7723 |
| | 150 | 0,1715 | 0,5104 | 0,1917 | 0,2098 | -0,6534 | 0,0548 |
| | 300 | 0,177 | -0,3418 | 0,3678 | -0,0091 | 0,1441 | -0,0696 |
| | 450 | 0,1355 | -0,5505 | -0,7012 | -0,3964 | -0,2636 | 0,4823 |

Tabela 8. Correlação entre a tensão de ruptura e as variáveis morfoanatômicas do colmo+bainha base e ápice (epiderme (EPI) (%), esclerênquima (ESC) (%), xilema (XIL) (%), floema (FLO) (%) e parênquima (PAR) (%)) do capim-tanzânia sob níveis de nitrogênio, no verão e inverno

| Componente | Níveis de N | Variáveis morfoanatômicas | | | | |
|--------------------|-------------|---------------------------|----------|---------|----------|----------|
| | | EPI | ESC | XIL | FLO | PAR |
| Colmo+bainha Base | 0 | 0,5331 | -0,1986 | -0,286 | 0,312 | 0,0819 |
| | 150 | -0,3412 | -0,6877 | -0,1821 | 0,1912 | 0,748* |
| | 300 | -0,4768 | -0,6014 | -0,6957 | -0,7422* | 0,7393* |
| | 450 | 0,3797 | 0,4114 | 0,3529 | 0,8287* | -0,4885 |
| Colmo+bainha Ápice | 0 | 0,609 | 0,7459 | -0,813 | 0,0462 | 0,2172 |
| | 150 | 0,3093 | 0,5184 | 0,3416 | 0,4441 | -0,4463 |
| | 300 | -0,0474 | -0,7266* | -0,5445 | -0,8257* | 0,7636* |
| | 450 | 0,7231* | 0,4539 | 0,9427* | 0,8738* | -0,9005* |

* ($P < 0,05$).

CAPÍTULO IV – UTILIZAÇÃO DE FUNGO COMO PRÉ- TRATAMENTO EM CAPIM-TANZÂNIA ADUBADO

(Journal of Agricultural and Food Chemistry)

RESUMO

Objetivou-se avaliar a composição química das lâminas foliares e colmo + bainha de capim-tanzânia, na ausência de nitrogênio e adubado com três níveis crescentes de nitrogênio (150, 300 e 450 kg/ha de N) e posterior tratamento com *Pleurotus ostreatus* no verão e inverno. O experimento foi realizado entre novembro de 2012 e setembro de 2013. O delineamento experimental em blocos ao acaso, em parcelas subdivididas. A ausência de nitrogênio e os três níveis de nitrogênio (150, 300 e 450 kg/ha de N) representaram a parcela principal, e o pré-tratamento com e sem fungo, as subparcelas com quatro repetições. A utilização de substratos que apresentaram maior teor de nitrogênio acelerou o seu crescimento e desenvolvimento, promovendo aumento do açúcar redutor, da síntese de enzimas lignocelulósicas: manganês peroxidase, lacase, celulase e xilanase tanto na LF e CB no verão e inverno. A digestibilidade *in vitro* da matéria seca e matéria orgânica também aumentaram com o tratamento com fungo da prodrisão branca (FPB) e aumento dos níveis de nitrogênio, principalmente, no colmo+bainha, tanto no verão como no inverno, pela diminuição da lignina pela ação das enzimas manganês peroxidase e lacase, além da redução da celulose nos tratamentos avaliados. O tratamento com o fungo aumentou a DIVMS da forrageira, e o nitrogênio promoveu maior desenvolvimento do FPB e maior produção de enzimas lignocelulósicas.

Palavras-chave: adubação nitrogenada, digestibilidade *in vitro*, lignina, *Panicum maximum*, parede celular, *Pleurotus ostreatus*

INTRODUÇÃO

Na pesquisa, ocorrem esforços para aperfeiçoar a utilização dos recursos forrageiros disponíveis, para aumentar a conversão de nutrientes e energia da forragem em produto animal, sem prejudicar a sustentabilidade do ecossistema de pastagem. Atualmente no Brasil, o gênero *Panicum* é uma das forrageiras mais utilizadas para produção animal, pela sua boa adaptação a climas tropicais e subtropicais e alta produtividade e qualidade nutricional.

A fibra (parede celular) da forragem é um dos componentes energéticos da dieta de ruminantes, contendo polímeros de carboidratos (polissacarídeos) como celulose, hemicelulose, pectina, e lignina, um polímero não carboidrato. Mesmo sendo a maior parte da matéria seca das forrageiras e constituindo maior fonte de energia para ruminantes, menos de 50% da parede é prontamente digestível e utilizada pelo animal (1).

Alguns autores analisam a hipótese de limitações físicas à digestão, porém altos teores de lignina na parede celular podem comprometer a digestibilidade da matéria seca e o consumo dos bovinos. Ligninas são onipresentes em plantas terrestres, e essenciais por suas funções estruturais e de defesa (2).

O impacto do aumento no fornecimento do nitrogênio (N) na lignificação tem sido documentado em gramíneas forrageiras principalmente em relação ao seu valor nutricional. Na maioria dos casos, o teor de lignina é aumentado pelo N (3-4) pela estimulação da biossíntese de fenilalanina.

No entanto, alto nível de N promove também o crescimento de perfilhos e folhas novos com baixo teor de lignina (5). Os componentes contrastantes da resposta ocorrem porque alguns estudos relataram que a adubação não tem efeito sobre o teor de lignina na forragem (6-7).

A experimentação com os fungos basidiomicetos, que degradam o componente lignocelulósico de forma eficiente tem sido estudada em madeira, feno e outros componentes, como possibilidade para o pré-tratamento de fibras. Estes são causadores da podridão branca da madeira por meio do sistema enzimático não específico, composto principalmente pelas enzimas oxidativas lacases e peroxidases (lignina

peroxidase e peroxidase dependente de manganês) (8), além dos complexos celulase e xilanase, e são os únicos organismos que degradam eficientemente a lignina e a utilizam como fonte de energia (9).

Utilização solução contendo celulasas e xilanasas direto ao feno, para avaliar a digestão de dieta à base de forragem, Lewis et al. (10) não identificou aumento da digestibilidade. Schmidt et al. (11), em estudo sobre o efeito da aplicação do FPB em feno de *Brachiaria decumbens*, verificou resultados favoráveis sobre a hemicelulose, porém não observou efeito de tratamento no teor de FDA.

Giraldo et al. (12), avaliando dois métodos de incubação para investigar os efeitos de dois compostos de celulasas sobre o crescimento microbiano ruminal e a fermentação do feno, e observou que o tratamento do alimento com a celulase teve efeito estimulador sobre atividade fermentativa ruminal e a colonização microbiana, além de diminuir o teor de FDN e aumentar a degradação da fibra.

Contudo, não há trabalhos que evidenciam a utilização deste fungo lignocelulósico como pré-tratamento em capim-tanzânia adubado com diferentes níveis de nitrogênio na composição química. Como o nitrogênio sabidamente influencia a digestibilidade de gramíneas há a possibilidade de que o mesmo possa ser utilizado associado ao FPB para aumentar o potencial de digestibilidade da forragem.

Objetivou-se com este trabalho avaliar a influência de níveis crescentes de nitrogênio na composição química das lâminas foliares e colmo+bainha do capim-tanzânia, com a utilização ou não de pré-tratamento com *Pleurotus ostreatus*, no verão e inverno.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado na Fazenda Experimental de Iguatemi (FEI) localizada na latitude de 23° 25' S; 51° 57' O, e 550 metros de altitude, da Universidade Estadual de Maringá (UEM), Maringá-PR. O tipo climático predominante desta região é o Cfa subtropical úmido mesotérmico, segundo a classificação de Köppen, com temperatura média anual de 22°C. Este se caracteriza pela predominância de verões quentes, baixa frequência de geadas severas e tendência de concentração das chuvas no período do verão. O período experimental foi de novembro de 2012 a setembro de 2013, cujos dados climáticos foram coletados no posto meteorológico da FEI, campus da UEM (Figura 1).

O experimento foi conduzido em área de *Panicum maximum* Jacq. cv. Tanzânia-1, estabelecida em novembro de 2003 em área de Latossolo Vermelho distrófico (Embrapa, 1999).

No mês de agosto de 2012 (início do período experimental) foi realizada a coleta de amostras de solo na profundidade (0-20 cm) nos quatro tratamentos, para correção de acidez para elevação da saturação de bases a 60%, segundo Werner et al. (1996), além da aplicação de 40 kg ha⁻¹ de P₂O₅ na forma de superfosfato simples. Os resultados da análise de solo se encontram na Tabela 1, caracterizando solo com baixos valores de magnésio, potássio e baixa saturação por base, fatores estes que determinaram a necessidade de calagem.

A área experimental apresentava total de 800 m² dividida em 16 parcelas, sendo retângulos com 50 m² cada, nos quais foram alocados os tratamentos com aplicações de nitrogênio (N) e potássio (K₂O) que foram parceladas de acordo com a quantidade total a ser aplicada, com início no dia 21/11/2012. O nitrogênio teve como fonte o nitrato de amônio e foi aplicado de acordo com o tratamento, a menor dose (150 kg ha⁻¹ de N) em três aplicações com intervalos de 45 dias, 300 kg ha⁻¹ de N em seis aplicações com intervalos de 30 dias, e 450 kg ha⁻¹ de N em nove aplicações com intervalos de 15 dias. O K₂O teve como fonte o cloreto de potássio e foi aplicado com intervalo de 45 dias em todas as parcelas, totalizando de 80 kg ha⁻¹ de K₂O.

Cada parcela foi pastejada por uma novilha da raça holandesa de aproximadamente 250 kg, pelo método de pastejo intermitente, em que os animais permaneceram, aproximadamente, 1 a 2 dias com período de descanso variável em função da mensuração da interceptação luminosa. A entrada do animal ocorreu quando se atingia 95% de interceptação luminosa, cuja mensuração foi realizada com analisador de dossel modelo LAI. 2000 (LI-COR, Lincoln, Nebraska, EUA) a cada dois de intervalo e aproximando a 95% de IL essa mensuração passou a ser diária. A retirada dos animais das parcelas foi realizada quando o resíduo de pastejo chegou próximo de 30 cm de altura mensurado com auxílio de regua graduada.

O acúmulo de massa verde de forragem foi mensurado utilizando um quadrado de ferro com 1 m² de área, sendo colhidas três amostras por parcela, a 30 cm do nível do solo. Retirou uma subamostra de forragem, para separação dos componentes morfológicos da forragem, obtendo-se as frações lâmina foliar (LF), colmo+bainha (CB) e material morto (MM), que foram pesadas verdes e colocadas em estufa de

circulação forçada de ar a 55°C, por 72 horas e, posteriormente, pesadas as frações secas.

Foi utilizado o fungo da podridão branca (FPB), *Pleurotus ostreatus*, como pré-tratamento no capim-tanzânia, obtido da coleção de culturas da Embrapa Florestas, Colombo-PR. Os basidiomicetos foram mantidos em laboratório através de repiques sucessivos em batata-dextrose-ágar (BDA). Para obtenção dos micélios, um disco com 10 mm foi inoculado em BDA e cultivado em estufa a 28°C por até 10 dias. As biomassas lignocelulósicas de capim-tanzânia, após secas a 40° C em estufa de circulação forçada até peso constante, foram trituradas em tela de 60 mesh.

Para o pré-tratamento, os resíduos (10g) foram acondicionados em frascos Erlenmeyer de 250 ml. Os resíduos foram suplementados com solução mineral de Vogel (15) e água destilada para obtenção de umidade final variando de 70% no início do cultivo. Foram suplementados com glicose 0,5% (p/p) e extrato de levedura 0,2% (p/p). Os materiais foram embalados e autoclavados por 15 min. Quatro discos de 10 mm de BDA colonizados com cada um dos fungos foram introduzidos nos meios de cultivos. Os materiais foram mantidos por 20 dias a 28° C em condições estáticas e no escuro. Após 20 dias o material foi separado na parte sólida (material insolúvel) e parte líquida (material solúvel).

Os materiais insolúveis foram secos a temperatura de 40°C em estufa de circulação forçada até peso constante para seguintes análises: fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA). A FDN e FDA foram determinadas em aparelho autoclave (16), e os valores de digestibilidade da matéria seca *in vitro* (DIVMS) de acordo com a metodologia de Tilley e Terry (17), adaptada para a utilização do rúmen artificial, desenvolvida por Ankon, conforme descrito por Holden (18). A celulose (CEL) e hemicelulose (HEMI) foram obtidas por cálculo após as estimativas de FDN e FDA.

Após a determinação de FDA, as amostras secas em *Daisy*^{II}, Adicionou 500 ml de 72% H₂SO₄. Após de 3 horas retirou H₂SO₄. As amostras foram secas em estufa de 105 °C de 2-4 horas. Posteriormente, pesou os cadinhos calcinados e se colocou os sacos dentro dos mesmos e foram levados a mufla a 525 °C durante 3 horas e por diferença de peso, para se obter a quantidade de lignina (19).

O material solúvel foi utilizado para determinação dos açúcares redutores (AR), as enzimas manganese peroxidase (MnP), lacase (LAC), xilanase (XIL) e celulase (CELa) e o biopolímero glicosamina (GLI).

As fibras pré e pós-tratadas foram submetidas à sacarificação utilizando celulase de *Trichoderma reesei* ATCC 26921 (Sigma-Aldrich, C 8546). Uma quantidade de 0,5 g de cada um dos resíduos foi adicionada a um frasco Erlenmeyer com capacidade de 50 mL. Um volume de 10 mL de tampão citrato 50 mM, pH 5,0 foi adicionado a cada um dos frascos. A concentração da enzima foi de 1mg/mL, que correspondendo a atividade final na mistura reacional de 5 U/ml. Os frascos foram mantidos em agitador de culturas por 48 h a 37 ° C. Após este tempo, as misturas foram filtradas a vácuo. Os açúcares redutores presentes nos filtrados foram estimados pelo método do ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS), utilizando glicose como padrão (20).

Para determinação da quantidade de MnP a mistura de reação continha 0,2 mL de MnSO₄ 10mM, 0,2 mL de H₂O₂ 0,5 mM e 0,2 mL do extrato enzimático em tampão malonato 50mM, pH 4,5. Os íons manganícos gerados pela ação da enzima formam um complexo com o malonato que absorve em 270 nm que foram mensurados por espectrofotometria (21).

A atividade da LAC foi realizada a 40° C usando ABTS como substrato. A mistura de reação continha 200 µl de ABTS (10mM), 100 µl do filtrado em 1,7 mL de tampão acetato de sódio 50mM (pH 4,0). O aumento da absorbância foi monitorado a 420 nm (22). Para a XIL e CELa foram determinadas utilizando os substratos xilano e carboximetilcelulose, respectivamente pelo surgimento de açúcares redutores utilizando o método do ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS) (20).

Para a hidrólise de quitina de fungos em N-acetil glicosamina, a biomassa seca 20mg foi incubado com 2 mL de H₂SO₄ (72 %) em um tubo de ensaio . Depois de repousar num agitador rotativo (130rpm) durante 60 min a 25 ° C, foi diluída com 3 mL de água destilada e autoclavada a 121 ° C durante 2h. O hidrolisado foi neutralizado até pH 7,0 com 10 mL, em seguida, NaOH a 0,5 M utilizando um medidor de pH , e diluiu-se para 100 mL. Finalmente, a glicosamina foi ensaiada pelo método colorimétrico método descrito por Tsuji et al. (23) e modificado por Ride e Drysdale (24). 1 mL diluída foi hidrolisado misturado com 1 mL de NaNO₂ (5%) e 1 ml de KHSO₄ (5%) em tubo de centrífuga. Depois de agitar ocasionalmente por 15 min, foi centrifugado a 3500 rpm durante 5 min, 2 mL de sobrenadante foi misturado com 0,67 mL de NH₄SO₃NH₂

(12,5 %) e se agitou durante 3 min . À mistura foi adicionada 0,67 mL de 3-metil-2-benzotiazolinona hidrazona cloridrato (MBTH, 0,5%, preparado diariamente), em seguida, a mistura foi mantida em ebulição durante 3 min e imediatamente arrefecida à temperatura ambiente; 0,67 mL de FeCl₃ (0,5%, preparado no prazo de 3 dias) foi adicionado. Depois de repousar durante 30 minutos, a absorvância a 650 nm foi medida por espectrofotometria.

O teor foi calculado como a glicosamina mensurada em miligramas por grama de biomassa de fungos de acordo com a curva padrão.

O delineamento experimental blocos ao acaso em parcelas subdivididas. A ausência de nitrogênio e os três níveis de nitrogênio (150, 300 e 450 kg/ha de N) representaram a parcela principal, e a ausência ou presença do tratamento com fungo representaram as subparcelas com quatro repetições. Para testar o efeito nitrogênio e tratamento com fungo nas variáveis, foi utilizada análise de variância, seguida de teste de médias a 5% de probabilidade, conforme abaixo:

$$y_{ijk} = \mu + A_i + b_j + Ab_{ij} + B_k + AB_{ik} + e_{ijk}$$

y_{ijk} é o valor observado na i -ésimo nível de nitrogênio, no j -ésimo bloco e a presença ou ausência de fungo ($k=0$ ou 1)

μ é a constante inerente a todas observações;

A_i é o efeito do i -ésimo nível de dose de nitrogênio;

b_j é o efeito do j -ésimo bloco experimental;

B_k é o efeito da presença ou ausência de fungo;

Ab_{ij} é o erro experimental em nível de parcelas;

AB_{ik} é o efeito da interação entre a i -ésimo nível de nitrogênio e a presença ou ausência de fungo;

e_{ijk} é o erro experimental em nível de subparcelas.

Havendo interação entre níveis de nitrogênio e o fungo foi utilizado modelos estatísticos, que testaram regressões linear e quadrática uma para ausência de fungo e outra com fungo para todas as variáveis, conforme abaixo:

$$y_{ijk} = \mu + A_i + b_j + e_{ijk}$$

y_{ijk} é a média dos cortes observada na i -ésimo nível de nitrogênio e no j -ésimo bloco

μ é a constante inerente à todas observações;

A_i é o efeito do i -ésimo nível de dose de nitrogênio (linear ou quadrático);

b_j é o efeito do j -ésimo bloco experimental;

e_{ijk} é o erro experimental associado à observação y_{ijk} .

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na análise da LF coletada no verão, houve efeito do N e do FPB ($P < 0,05$) com interação para o AR, LAC e DIVMS (Tabela 2), sendo linear positivo ($P < 0,05$) para os tratamentos com e sem FPB no AR e DIVMS, e linear positivo ($P < 0,05$) para o tratamento com FPB para LAC.

Na ausência de adubação, foi observado valores de AR 83% inferior para o tratamento com FPB, em relação ao tratamento sem o FPB. No nível de 450 kg/ha de N, o valor de AR foi 48% maior no tratamento com FPB, em relação ao sem FPB. No tratamento com o FPB, o incremento de N aumentou o AR, sendo 7,1; 20,6; 34,1 e 47,7 $\mu\text{mol/ml}$ de AR nos níveis 0, 150, 300 e 450 kg/ha de N, respectivamente, na equação de regressão. No entanto no tratamento sem o FPB, foram observados 26; 26,4; 26,8 e 27,2 $\mu\text{mol/ml}$ de AR nos níveis 0, 150, 300 e 450 kg/ha de N, respectivamente, na equação de regressão.

No tratamento com o FPB, foram observados 59,7; 67,2 74,7 e 82,2 U/L de LAC nos níveis 0, 150, 300 e 450 kg/ha de N, respectivamente, na equação de regressão.

A DIVMS apresentou melhora com os níveis de N e tratamento com o FPB. Na ausência de N, a DIVMS foi 19% maior no tratamento com o FPB. No nível de 450 kg/ha de N, a DIVMS foi 6% maior no tratamento com FPB, comparado ao sem FPB.

No tratamento sem o FPB, para a equação de regressão, foram observados 49%, 57%, 65% e 72% de DIVMS para os níveis 0, 150, 300 e 450 kg/ha de N, respectivamente. Entretanto no tratamento com o FPB, a DIVMS apresentou 51%, 56%, 60% e 65% nos níveis 0, 150, 300 e 450 kg/ha de N, respectivamente.

Houve efeito do N e do FPB ($P < 0,05$) para CELa, XIL e FDA (Tabela 2), não havendo interação. Foi observado efeito apenas do FPB ($P < 0,05$) no MnP, FDN, CEL e LIG, havendo interação para o FDN, sendo linear negativo ($P < 0,05$) apenas para o tratamento com FPB.

No tratamento com FPB, foram observados aumentos de 102% da CELa, 83% da XIL, e de apenas 1% da MnP, comparando os níveis de 0 e 450 kg/ha de N. No

mesmo tratamento, a FDA apresentou redução de 16%, e no tratamento sem o FPB, redução de 26%, comparando os níveis de 0 e 450 kg/ha de N.

Na ausência de adubação, houve aumento de 10% de FDA entre os tratamentos sem e com FPB. No nível de 450 kg/ha de N, a FDA apresentou aumento de 20%, no tratamento sem o FPB em relação ao tratamento com FPB.

Foi observado aumento da FDN para o tratamento com FPB (Tabela 2), em comparação ao sem FPB, nos níveis. Na ausência de N, foi observado valor 9% maior de FDN no tratamento com FPB, em relação ao sem FPB. No nível de 450 kg/ha, o valor foi 5% maior para o tratamento com FPB, em relação ao sem FPB.

No tratamento com FPB, houve diminuição da FDN com o aumento dos níveis de N, sendo 740, 724, 708 e 692 g/kgde MS nos níveis 0, 150, 300 e 450 kg/ha de N, respectivamente, na equação de regressão.

A celulose (CEL) apresentou redução com o tratamento com FPB em relação ao sem FPB, nos níveis de N. Na ausência de N, foi observado valor 60% menor de CEL, e no nível de 450 kg/ha de N valor 58% menor de CEL, ambos no tratamento com o FPB, em comparação ao tratamento sem o FPB. Na ausência de N, a LIG no tratamento com fungo foi 21% maior e no nível de 450 kg/ha de N, 10% maior, ambos comparados ao tratamento sem fungo.

Ainda, houve efeito apenas do N ($P < 0,05$) para a DIVMO (Tabela 2), havendo interação, sendo linear positiva ($P < 0,05$) para os tratamentos com e sem FPB. A HEMI não apresentou efeito para o N e FPB ($P > 0,05$).

No tratamento sem o FPB, para a equação de regressão, foram observados 47%, 55%, 63% e 71% de DIVMO para os níveis 0, 150, 300 e 450 kg/ha de N, respectivamente. No tratamento com o FPB, a DIVMO apresentou 53%, 58%, 62% e 66% nos níveis 0, 150, 300 e 450 kg/ha de N, respectivamente.

Na análise da LF coletada no inverno, houve efeito do N e do FPB ($P < 0,05$) no AR, LAC, MnP e FDN (Tabela 3) havendo interação, sendo linear negativo ($P < 0,05$) para os tratamentos com FPB para o AR, LAC e MnP, linear positivo ($P < 0,05$) para o tratamento sem FPB para AR e FDN, e não significativo ($P > 0,05$) para a FDN no tratamento com FPB.

Observou-se no nível de 150 kg/ha que o AR foi 19,6% menor no tratamento com o FPB, comparado ao sem o FPB. Nos níveis de 300 e 450 kg/ha de N, os valores

de AR para o tratamento com FPB foram 161% e 146% maiores, em relação ao tratamento sem FPB.

No tratamento sem o FPB, o aumento do N diminuiu o AR, sendo 22,43, 19,43 e 16,43 $\mu\text{mol/ml}$ de AR nos níveis 150, 300 e 450 kg/ha de N, respectivamente, na equação de regressão. Para o tratamento com FPB, foram observados 21,01, 34,55 e 48,10 $\mu\text{mol/ml}$ de AR nos níveis 150, 300 e 450 kg/ha de N, respectivamente, na equação de regressão, demonstrando aumento do AR com o aumento do N, neste tratamento.

Foi verificado para a LAC que o aumento dos níveis de N promoveu aumento desta com o tratamento com FPB, sendo verificados valores na equação de regressão de 87,01, 111,76 e 136,51 U/L nos níveis 150, 300 e 450 kg/ha de N, respectivamente. O mesmo foi observado para o MnP, com valores de 98,89; 161,49 e 224,08 U/L nos níveis 150, 300 e 450 kg/ha de N, respectivamente, na equação de regressão.

Observou-se para a FDN, na menor dose de N, que o resultado no tratamento com FPB foi 11,2% maior que no tratamento sem FPB. O mesmo foi verificado nos outros níveis de N, com resultados 5,6% e 14,5% maiores no tratamento com FPB em relação ao sem FPB, para os níveis 300 e 450 kg/ha, respectivamente.

No tratamento sem o FPB, o aumento dos níveis de N diminuiu a FDN, sendo observados valores de 655,2; 642,4 e 629,6 g/kgde MS nos níveis 150, 300 e 450 kg/ha de N, respectivamente, na equação de regressão.

Houve efeito do N e do FPB ($P < 0,05$) para a XIL, DIVMS e HEMI (Tabela 3), não havendo interação. No tratamento com FPB, a XIL apresentou aumento em 40% no nível de 300 kg/ha de N e redução em 3% no nível de 450 kg/ha de N, comparadas ao valor observado na menor dose de N (150 kg/ha de N). No mesmo tratamento, a CELa apresentou valores 35% e 46% maiores nos níveis 300 e 450 kg/ha de N, em comparação à dose 150 kg/ha de N.

Foram observados valores 33%; 30% e 33% maiores de DIVMS nos tratamentos com FPB, em relação ao sem FPB, nos níveis 150, 300 e 450 kg/ha de N, respectivamente. Em avaliação do efeito dos níveis de N em cada tratamento de FPB, observou-se que a DIVMS aumentou com o aumento dos níveis de N, em ambos os tratamentos com e sem FPB. Para o tratamento sem FPB, a DIVMS apresentou resultado 9,57% maior no nível de 450 kg/ha de N, e para o tratamento com FPB, 9% maior no nível de 450 kg/ha de N, ambos comparados a menor dose de N (150 kg/ha).

A HEMI foi influenciada pelo tratamento com FPB, sendo observados valores 35%; 44% e 58% maiores nos tratamentos com FPB, em relação ao sem FPB, nos níveis 150, 300 e 450 kg/ha de N, respectivamente. Observou-se ainda que, avaliando os níveis de N nos tratamentos com e sem FPB, o aumento da adubação diminuiu a HEMI. No tratamento sem o FPB, a HEMI apresentou resultado 17% menor no nível de 450 kg/ha de N, e para o tratamento com FPB, 3,5% menor no nível de 450 kg/ha de N, ambos comparados a menor dose de N (150 kg/ha).

Para as variáveis CELa, DIVMO, FDA, CEL e LIG (Tabela 3) houve efeito apenas do FPB ($P < 0,05$), não sendo observado efeito do N. Ainda, houve interação para FDA e LIG, sendo linear positivo ($P < 0,05$) para FDA no tratamento sem FPB e não significativo ($P > 0,05$) para o tratamento com FPB, e linear negativa ($P < 0,05$) para LIG no tratamento com FPB e não significativo ($P > 0,05$) para o tratamento sem FPB.

Foi observado que a DIVMO apresentou valores maiores com o FPB, em relação ao tratamento sem o FPB, sendo verificados resultados 71%; 53% e 58% maiores, nos níveis 150, 300 e 450 kg/ha de N, respectivamente.

A FDA diminuiu com a utilização do FPB comparado ao tratamento sem FPB, com resultados 2,5%, 22% e 2,5% menores, nos níveis 150, 300 e 450 kg/ha de N, respectivamente.

A CEL apresentou valores inferiores com o tratamento com FPB, sendo 64%, 71% e 72% menores nos níveis 150, 300 e 450 kg/ha de N, respectivamente, comparados ao tratamento sem o fungo.

Também foram observados valores inferiores de LIG no tratamento com o FPB, em relação ao sem FPB, com resultados 57%, 4,4% e 70% menores nos níveis 150, 300 e 450 kg/ha de N, respectivamente.

Na análise do CB coletado no verão (corte 1), houve efeito do N e do FPB ($P < 0,05$) (Tabela 4), havendo interação para o MnP, DIVMS e DIVMO, sendo linear positivo ($P < 0,05$) para os tratamentos com e sem FPB.

Foi observado aumento do MnP com o aumento dos níveis de N, sendo 83,4; 96,9; 110,3 e 123,8 U/L nos níveis de 0, 150, 300 e 450 kg/ha de N, respectivamente, na equação de regressão.

Para a DIVMS, observou-se que os valores para o tratamento com FPB foram maiores que no tratamento sem FPB, em todos os níveis. Na ausência de adubação, a

DIVMS foi 24% maior no tratamento com FPB, e na maior dose de N (450 kg/ha), 25% maior, ambos em comparação com os resultados obtidos no tratamento sem o FPB.

No tratamento sem FPB, o aumento dos níveis de N promoveu aumento da DIVMS. Foram observados resultados de 42,3%, 61,6%, 71,9% e 73,3% de DIVMS nos níveis 0, 150, 300 e 450 kg/ha de N, respectivamente, na equação de regressão. O mesmo foi observado no tratamento com o FPB, com valores de 48,3%, 60,8%, 73,2% e 85,7% nos níveis 0, 150, 300 e 450 kg/ha de N, respectivamente, na equação de regressão.

Foram observados para a DIVMO valores 10,8% e 27,8% maiores no tratamento com FPB, em comparação ao sem FPB, na ausência de N e maior dose de N (450 kg/ha), respectivamente. No tratamento sem o FPB, houve aumento da DIVMO com o aumento dos níveis de N, sendo 51,3%, 57,5%, 63,7% e 69,9% de DIVMO nos níveis 0, 150, 300 e 450 kg/ha de N, respectivamente, na equação de regressão. No tratamento com o FPB foram observados 51,1%, 63,8%, 76,5% e 89,2% de DIVMO nos níveis 0, 150, 300 e 450 kg/ha de N, respectivamente, na equação de regressão.

Houve efeito do N e do FPB ($P < 0,05$) para o AR, LAC e XIL (Tabela 4), não havendo interação. O AR apresentou resultados 86% e 191% superiores no tratamento com FPB, em relação ao sem FPB, na ausência de N e no nível de 450 kg/ha de N, respectivamente.

No tratamento sem o FPB, o aumento do nível de N, entre a ausência de N e a maior dose, ocasionou redução de 22% no AR. No tratamento com FPB o resultado foi inverso, havendo aumento de 22% do AR entre a menor e maior dose de N.

A LAC apresentou aumento de 13% com o incremento dos níveis de N, entre a ausência de N e a maior dose. O mesmo ocorreu com a XIL, com aumento de 4,5% entre a menor e a maior dose.

No CB avaliado no verão, houve efeito ($P < 0,05$) apenas do tratamento com FPB para as variáveis CELa, FDN, FDA e CEL (Tabela 4), não sendo observado efeito para o N ($P > 0,05$) e não havendo interação. A CELa apresentou 10,2; 7,9; 8,7 e 11,2 U/L nos níveis 0, 150, 300 e 450 kg/ha de N, respectivamente.

Houve aumento da FDN nos níveis para o tratamento com FPB, em relação ao sem FPB, sendo de 0,98% na ausência de N e 12,3% na maior dose de N. A FDA apresentou valor 9,57% inferior e 14% superior, respectivamente para os níveis 0 e 450 kg/ha, quando comparados os tratamentos com FPB em relação ao sem FPB. A CEL

apresentou valores inferiores para o tratamento com FPB em todos os níveis, sendo observados para a ausência de N, 70% a menos de CEL, e no nível de 450 kg/ha, 55% menos de CEL, comparados aos resultados da CEL no tratamento sem FPB.

A LIG apresentou efeito apenas para os níveis de N ($P < 0,05$), não sendo observado efeito para o FPB ($P > 0,05$), havendo interação, sendo linear negativa ($P < 0,05$) para os tratamentos com e sem FPB.

Houve redução da lignina com o aumento dos níveis de N nos tratamentos com e sem FPB. No tratamento sem FPB, foram observados valores de 54,63; 44,76; 34,89 e 25,02 g/kgde MS de LIG, nos níveis 0, 150, 300 e 450 kg/ha de N, respectivamente, na equação de regressão. No tratamento com fungo, foram obtidos os valores de 66,63; 46,26; 25,89 e 5,52 g/kgde MS de LIG nos níveis 0, 150, 300 e 450 kg/ha de N, respectivamente, na equação de regressão. Contudo, não houve efeito do N e do FPB ($P > 0,05$) para a HEMI (Tabela 4).

Na análise do CB coletado no inverno (corte 5), houve efeito do N e do FPB ($P < 0,05$) (Tabela 5), havendo interação também para o MnP, DIVMS e DIVMO, semelhante ao resultado obtido nas amostras do verão (corte 1), sendo linear positivo ($P < 0,05$) para os tratamentos com e sem FPB.

No inverno, foi observado aumento do MnP do CB com o aumento dos níveis de N, no tratamento com FPB, sendo 212,09; 265,58 e 319,07 U/L nos níveis de 150, 300 e 450 kg/ha de N, respectivamente, na equação de regressão.

Foi observado na DIVMS que os valores para o tratamento com FPB, em todos os níveis, foram expressivamente maiores que no tratamento sem FPB. A diferença entre os tratamentos foi de 33%, 54% e 78%, nos níveis 150, 300 e 450 kg/ha de N, respectivamente.

Avaliando os resultados da adubação em cada tratamento de FPB, observou-se também aumento da DIVMS com o aumento do N. No tratamento sem o FPB, foram observados 47%, 49,4% e 52% de DIVMS nos níveis 150, 300 e 450 kg/ha de N, respectivamente, na equação de regressão. No tratamento com o FPB, foram verificados 62%, 76,6% e 91% nos níveis 150, 300 e 450 kg/ha de N, respectivamente, na equação de regressão.

Na DIVMO, foram verificados valores 16,6% e 97,4% maiores no tratamento com FPB, se comparado ao sem FPB, nos níveis 0 e 450 kg/ha de N, respectivamente. No tratamento sem o FPB, houve aumento da DIVMO com o aumento dos níveis de N,

sendo 62,8%, 67,4% e 71,9% de DIVMO nos níveis 150, 300 e 450 kg/ha de N, respectivamente, na equação de regressão. No tratamento com o FPB houve 65,2%, 79,2% e 93,1% de DIVMO nos níveis 150, 300 e 450 kg/ha de N, respectivamente, na equação de regressão.

Houve efeito do N e FPB ($P < 0,05$) para AR, CELa e FDA (Tabela 5), não havendo interação. O AR apresentou valores maiores no tratamento com FPB, na razão de 483% e 156%, na menor e maior dose de N, respectivamente, comparados ao tratamento sem FPB. Também foi verificado aumento do AR com o aumento dos níveis em cada tratamento do FPB, com aumento de 251% no tratamento sem FPB e 54% no tratamento com FPB, comparados a menor e a maior dose de N.

A CELa apresentou valor 67% maior no nível de 450 kg/ha, em relação a menor dose de N, no tratamento com FPB.

A FDA apresentou resultados 24,4% e 27,8% menores no tratamento com FPB, comparado ao sem FPB, para os níveis de 150 e 450 kg/ha. Houve também redução da FDA com o aumento dos níveis de N nos tratamentos sem e com FPB, sendo de 5,1% e 9,4% respectivamente, entre a menor e a maior dose de N.

Houve efeito apenas do FPB ($P < 0,05$) para a LAC, XIL, HEMI, CEL e LIG (Tabela 5), não sendo observado efeito do N ($P > 0,05$). Houve interação apenas para a LIG, sendo não significativa ($P > 0,05$) para o tratamento sem FPB e linear negativa ($P < 0,05$) para o tratamento com o FPB. A LAC apresentou valores de 117,3; 126,2 e 130,1 U/L, e a XIL apresentou 5,6; 6,5 e 6,9 U/L, nos níveis de 150, 300 e 450 kg/ha de N, respectivamente.

Foi observado para a HEMI resultados de 80%, 17% e 69% superiores para o tratamento com o FPB, em relação ao sem FPB, nos níveis de 150, 300 e 450 kg/ha de N, respectivamente. Para a CEL o resultado foi inverso, sendo os resultados do tratamento com FPB inferiores em 67,6%, 73,4% e 74,4% aos do tratamento sem FPB, nos níveis de 150, 300 e 450 kg/ha de N. O mesmo foi observado para a LIG, com 49%, 24,8% e 91% a menos de LIG para o tratamento com FPB, em relação ao sem FPB, nos níveis de 150, 300 e 450 kg/ha de N, respectivamente.

Para o CB avaliado no inverno (corte 5) (Tabela 5), não houve efeito do N e do FPB ($P > 0,05$) para a FDN, não havendo também interação.

DISCUSSÃO

Os fungos possuem a capacidade de degradar uma série de compostos orgânicos, proliferando através da obtenção de carbono e nitrogênio, entre outros elementos, necessários para o seu crescimento (25). A utilização de substratos que possuam maior teor de nitrogênio, portanto, aceleram o seu crescimento e desenvolvimento, promovendo aumento da síntese de enzimas lignocelulósicas. (25). Essa capacidade viabiliza a utilização de fungos como ativos para melhoria da qualidade de alimentos na alimentação animal.

Foi observado neste trabalho que o nitrogênio teve interação com o FPB em várias amostras analisadas, aumentando a ação FPB e influenciando o resultado das enzimas e das variáveis bromatológicas. Poucos estudos têm sido realizados sobre a demanda de N para o crescimento micelial de *P. ostreatus*, contudo Manu-Tawiah e Martin (26) já haviam constatado que o crescimento micelial de *P. ostreatus* é pobre em meio de cultura sem suplementação com nitrogênio. Stajic et al. (27) observou também que o FPB pode ser influenciado pelas condições de cultivo e a composição do substrato. Estas evidências abrem discussões sobre a necessidade do nitrogênio estar presente no meio de cultura em concentrações específicas.

Portanto, a quantidade de nitrogênio pode ser determinante para o crescimento de micélios do fungo, e a quantidade de massa do fungo será fator fundamental para a quantidade de enzimas produzidas para degradação do meio, nesse caso o capim-tanzânia. De acordo com o Gráfico 1, pode-se observar que o crescimento do FPB é linear em função do nível nitrogênio utilizada, tanto na LF e CB.

Foi observado que a presença do FPB, no geral, aumentou o conteúdo do AR da LF e CB, tanto quando observado o aumento dos níveis de N, quanto em comparação ao material sem o FPB. Os açúcares redutores são monossacarídeos de rápido aproveitamento e que aumentam a atividade microbiana no rúmen do animal, presentes na parede celular. A hidrólise enzimática promovida pelo FPB promove a liberação de maiores quantidades de AR, e por isso, sua presença em maior quantidade demonstra a melhora da degradação nas porções LF e CB no capim-tanzânia, uma vez que a presença de AR está também inversamente relacionada à recalcitrância do material lignocelulósico.

A concentração e a composição da parede celular afeta a digestibilidade da massa seca da forrageira (1) e a recalcitrância lignocelulósica (28). A presença dos

açúcares redutores armazenados na parede celular é limitada pela presença de lignina e, a redução desta é uma alternativa interessante para melhoria no aproveitamento da massa de forragem (29). Estudos apontam que há correlação inversa também entre o conteúdo de lignina e a eficiência da hidrólise da celulose (30-31-32).

Na LF coletada no verão, houve redução do AR com o aumento dos níveis de N. O nitrogênio, quando aplicado em condições abióticas favoráveis, acelera o crescimento da gramínea, propiciando o corte a IL de 95% de uma forragem mais jovem. A quantidade de AR é um indicativo do grau de maturação da planta (33) e o nitrogênio em excesso pode diminuir a quantidade de AR, visto que promove crescimento vegetativo exagerado, diminuindo o acúmulo de açúcares (34).

O FPB produz uma variedade de enzimas extracelulares lignocelulolíticas, também conhecidas como enzimas fibrolíticas, como as XIL, MnP, CELa, e LAC (35). Alguns FPBs produzem todas ou algumas das três principais enzimas de degradação da lignina (lacase, manganês peroxidase e lignina peroxidase) (36), duas destas (MnP e LAC) avaliadas neste trabalho.

Estas enzimas trabalham na degradação dos componentes da parede celular (35, 37), e são influenciadas pela adubação (27), o que foi observado no capim-tanzânia, visto que os valores de XIL, MnP, CELa e LAC aumentaram nas maiores níveis de N, tanto na porção LF quanto na CB.

Stajic' et al. (27), avaliando *P. eryngii* com diferentes fontes de N orgânico e inorgânico, verificou que a produção de LAC aumentou em todos os meios de cultivo utilizados. Em pesquisa com *Aspergillus awamori*, cultivado em bagaço de cana, Lemos et al. (38) verificaram a repressão gradual da atividade de endoxilanase na presença de concentrações crescentes de glicose e xilose (1, 2, 4, 6 e 8 g do carboidrato/4 g de bagaço de cana).

De acordo com Nsereko et al. (39), a adição de enzimas fibrolíticas à forragem antes de ser oferecida ao animal promove alterações em sua estrutura, tornando-a mais susceptível à hidrólise ruminal. Estas enzimas melhoram a degradação inicial dos carboidratos estruturais das plantas e complementam as atividades enzimáticas associadas aos micro-organismos ruminais (40).

Enzimas fibrolíticas estão relacionadas com sua capacidade de melhorar a degradação inicial dos carboidratos estruturais das plantas e complementar as atividades enzimáticas associadas aos micro-organismos ruminais. É provável que enzimas

exógenas ajam no rúmen logo após a ingestão do alimento e durante um período curto de tempo, antes da colonização bacteriana do alimento e início da digestão.

Como resultado, enzimas fibrolíticas exógenas podem complementar as atividades enzimáticas dos micro-organismos no rúmen e permitir maior digestão de substratos durante as fases preliminares críticas da digestão (40). A melhoria promovida pelo FPB na sacarificação enzimática pode ser atribuída à degradação da lignina parcial, que pode ser responsável por impedir a penetração de celulases.

Observou-se aumento na DIVMS e DIVMO com o aumento dos níveis de N e utilização do FPB, assim como redução da CEL e LIG, em comparação com o tratamento sem o FPB. Dawson e Tricarico (40), em estudos *in vitro*, demonstraram que é possível usar preparações específicas de enzimas fibrolíticas para melhorar os processos ligados a digestão do alimento no rúmen. Giraldo et al. (12), em trabalho com aplicação de duas celulases produzidas por *Aspergillus niger* e *Trichoderma longibrachiatum*, no nível de 30 U/g de substrato, com 70% de feno de gramínea e 30% de concentrado, verificaram maior desaparecimento da matéria seca após 6 h e 24 h, mas não relataram efeitos após 48 h.

A DIVMS e DIVMO são geralmente menores no período de inverno, quando comparadas às outras estações, por causa da redução de fatores abióticos, que diminuem o crescimento da gramínea, estimulando sua maturação e, com isso, sua lignificação, conforme ocorreu neste trabalho.

Apesar dos resultados terem sido maiores também para o verão, neste trabalho o FPB induziu maiores valores de DIVMS e DIVMO no inverno. Estes resultados indicam aumento na LF de 19 e 26 pontos percentuais para a DIVMS e DIVMO, respectivamente, e no CB de 41 e 47 pontos percentuais para DIVMS e DIVMO, respectivamente, para esta estação. Deve-se destacar ainda que os valores de DIVMS e DIVMO se referem ao material avaliado composto de capim-tanzânia, somado ao fungo *P. ostreatus*. Resultados igualmente expressivos foram relatados também por Bento et al. (41) em avaliação com o fungo *P. ostreatus*.

Estes resultados podem ser explicados pelo fato da LIG e da CEL possuírem maiores teores no inverno, promovendo assim maior quantidade de substrato para a hidrólise enzimática. Estas variáveis apresentaram também menores valores no inverno com a utilização do FPB. Observa-se ainda que o FPB proporcionou maiores resultados

para a porção CB, que geralmente apresenta maior resistência à digestão, explicado também pela maior disponibilidade de substrato para hidrólise nesta porção.

O FPB parece ser um dos melhores microrganismos capazes degradar lignina, celulose e hemicelulose em moléculas menores até CO₂ e água. Esta degradação ocorre por meio de reações intermediadas, que inicia com a subtração de um elétron de seu núcleo aromático, que formam radicais catiônicos instáveis e, subsequente, formam produtos de reações não enzimáticas, de radicais catiônicos com água e outros nucleófilos (42). A melhoria na hidrólise enzimática também pode ser pelo aumento da porosidade da parede celular, fato que ocorre através do tratamento com FPB, que aumenta a adsorção de celulose em celulase (43).

Conforme foi observado, o fungo degradou a lignina e a celulose, especialmente no inverno. Estes resultados corroboram com Bento et al. (41), também em avaliação com *P. ostreatus*, que relata resultados de até 16% de redução do teor de lignina. Nesta pesquisa, resultados superiores foram obtidos no CB, na maior dose de N, que obteve redução da lignina de aproximadamente 61% no verão e 91% no inverno.

Bento et al. (41) verificou ainda que o FPB reduziu os teores de FDN, FDA, assim como Elisashvili et al. (44), em pesquisa com *L. edodes* e *Pleurotus spp*, relacionando o aumento da biomassa fúngica com a degradação dos componentes fibrosos do substrato. Contudo, neste trabalho, houve diminuição da FDN e FDA apenas em alguns tratamentos. De acordo com Beauchemin et al. (45), existem evidências de que enzimas exógenas promovem a liberação de carboidratos solúveis e, apenas em alguns casos, a solubilização parcial da FDN e FDA durante a fase de pré-incubação ruminal.

Baldrian e Valášková (46) relataram que diferentes espécies de fungos de podridão branca podem produzir enzimas hidrolíticas com propriedades cinéticas distintas e a eficiência da degradação dos componentes da parede celular pode variar. A conexão entre os resultados obtidos para LIG e CEL podem ser explicada por Kilpatrick et al. (47), que descreveram que a lignina está muitas vezes associada com celulose em uma matriz 3-D, que impede o acesso de enzimas extracelulares microbianos para a celulose na parede celular vegetal. Portanto, sugere-se que a ação do FPB na LIG e CEL afeta diretamente a DIVMS do capim-tanzânia, o que é altamente desejável para a utilização de substratos para alimentação do animal ruminante (41-48-49).

Os fungos apresentam potencial para degradar materiais à base de celulose, com a produção de enzimas lignocelulíticas, conforme explicitado por Schmidt et al. (11). Os autores, em trabalho com *Pleurotus spp.*, ao avaliar sua ação enzimática em feno de *Brachiaria decumbens*, verificaram que o fungo diminuiu o teor de hemicelulose do substrato. Este resultado foi diferente do observado neste trabalho, no qual a HEMI aumentou com a atividade do FPB. Acredita-se que variedades diferentes de fungos podem ocasionar resultados diferentes, conforme colocado por Baldrian e Valášková (46). Ainda, a HEMI é um componente de mais fácil digestão, indicando que seu aumento não é prejudicial, uma vez que houve redução da CEL e LIG.

A degradação da lignina por fungos basidiomicetos pode ser compreendida como um processo multienzimático, resultado da ação coordenada entre uma variedade de enzimas intra e extracelulares, como as peroxidases, lacases e outras oxidases produtoras de peróxido de hidrogênio, e de metabólitos intermediários de baixa massa molecular (50). Uma vez que o aumento dos níveis de nitrogênio aumentou a ação do FPB, estas informações explicam a relação entre o aumento das enzimas com a diminuição da LIG e CEL, e consequente aumento da DIVMS e DIVMO, obtidos neste trabalho.

Contudo, foi observado aumento da LIG na LF coletada no verão, apenas no tratamento com o FPB. A determinação da lignina em vegetais não lenhosos pode apresentar alguns problemas, em função da alta concentração de proteínas e constante aparecimento de ceras, no momento em que materiais folhosos são analisados (51).

Seus resultados também suportam a conclusão de que a lignina sozinha na parede celular de gramíneas pode não ser, em si, o mais importante fator regulador da digestibilidade *in vitro*.

Portanto o FPB (*P. ostreatus*) melhorou a digestibilidade do capim-tanzânia principalmente no CB, que é a estrutura de maior lignificação, mais rejeitada e de menor digestibilidade, tornando-o assim um alimento de boa qualidade para alimentação de bovinos.

O FPB melhorou também no inverno, e a qualidade da forrageira é inferior por causa da limitação de fatores abióticos, em função da diminuição da digestibilidade e alto teor de material lignocelulósico. Estes resultados indicam que o FPB é grande utilidade no pré-tratamento do capim-tanzânia.

O nitrogênio promoveu também melhora no crescimento e atuação do FPB, principalmente na produção de enzimas lignocelulósicas (LAC, MnP, CELa, XIL), tanto na LF como CB quando comparado sem a utilização do fungo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) Hatfield, R.D.; Ralph, J.; Grabber, J.H. Cell wall structural foundations: molecular basis for improving forage digestibilities. *Crop Science* **1999**, 39, 27-37.
- (2) Amthor, J. S. Efficiency of lignin biosynthesis: a quantitative analysis. *Annals of Botany* **2003**, 91, 673–95.
- (3) Kaltofen, H.; Knabe, B.; Lorey, H. G. Effect of nitrogen fertilizer on the lignin content of forage grasses and relevance for the evaluation of feeds. *Arch. Tierernaehr* **1979**, 29, 399–409.
- (4) Collins, M.; Brinkman, M. A.; Salman, A. A. Forage yield and quality of oat cultivars with increasing rates of nitrogen fertilization. *Agronomy Journal* **1990**, 82, 724–728.
- (5) Kaltofen, H. Why does nitrogen fertilization often increase the lignin content of grasses. *Arch. Acker- Pflanzenbau Bodenkd.* **1988**, 32, 255–260.
- (6) Sanz, J.; Muntifering, R. B.; Bermejo, V.; Gimeno, B. S.; Elvira, S. Ozone and increased nitrogen supply effects on the yield and nutritive quality of *Trifolium subterraneum*. *Atmospheric Environment* **2005**, 39, 5899–5907.
- (7) Hollena, N.; Abdul, H. R.; Fauzi, R. M. The effects of nitrogen fertilization levels on the straw nutritive quality of Malaysian rice varieties. *Agronomy Journal* **2006**, 5, 482–491.
- (8) Vicuña, R. Ligninolysis: a very peculiar microbial process. *Molecular Biotechnology* **2000**, 14, 173-176.
- (9) Akin, D. E.; Morrison, W.H.; Rigsby, L.L.; Gamble, G.R.; Sethuraman, A.; Eriksson, K. E. L. Biological delignification of plant components by the white rot fungi *Ceriporiopsis subvermisporea* and *Cyathus stercoreus*. *Animal Feed Science Technology* **1996**, 63, 305-321.
- (10) Lewis, G.E., Hunt, C.W., Sanchez, W.K., Treacher, R., Pritchard, G.T., and Feng, P. Effect of direct-fed fibrolytic enzymes on the digestive characteristics of a forage-based diet fed to beef steers. *Journal of Animal Science* **1996**, 74, 3020–3028.

- (11) Schmidt, P.; Wechsler, F. S.; Nascimento, J. S.; Vargas Junior, F. M. Tratamento do feno de braquiária pelo fungo *Pleurotus ostreatus*. *Revista Brasileira de Zootecnia* **2003**, 32, 6, 1866-1871.
- (12) Giraldo, L.A.; Tejido, M.L.; Ranilla, J.M.; Carro, M.D. Effects of exogenous cellulase supplementation on microbial growth and ruminal fermentation of a high-forage diet in rusitec fermenters. *Journal Animal Science*, **2007**, 85, 1962-1970.
- (13) Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA. *Sistema brasileiro de classificação de solos*. Rio de Janeiro, Ministério da Agricultura e do Abastecimento, **1999**, 412p.
- (14) Werner, J. C.; Paulino, V. T.; Cantarella, H. In: *Forrageiras: recomendações de adubação e calagem para o estado de São Paulo*. 2 ed. Campinas, Instituto Agrônômico e Fundação IAC, **1996**. (Boletim técnico, 100) p. 263.
- (15) Vogel, H.J., A convenient growth medium for *Neurospora* (Medium N). *Microbial Genetics Bulletin*, **1956**, 13, 42-43.
- (16) Pell, A. N.; Schofield, P. Computerized monitoring of gas production to measure forage digestion in vitro. *Journal of Dairy Science*, **1993**, 76, 9, 1063-1073.
- (17) Tilley, J. M. A.; Terry, R. A. A two stage technique for the in vitro digestion of forage crop. *Journal of Britain Grassland Society*, **1963**, 18, 104-111.
- (18) Holden, L.A. Comparison of methods of in vitro dry matter digestibility for ten feeds. *Journal of Dairy Science* 1999, 82, 8, 1791-1794.
- (19) Ankon. *Method 9 – determining Acid Detergent Lignin in DaisyII Incubator*. **2013**. Disponível em: <http://www.ankom.com/media/documents/Method_9_Lignin_in_Daisy_5_7_13.pdf> Acesso em Mar. 2014.
- (20) Miller, G. L. Dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Analytical Chemistry* **1959**, 31, 426-428.
- (21) Wariishi, H., Valli, K., Gold, M.H. Manganese (II) oxidation by manganese peroxidase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Journal of Biological Chemistry* **1992**, 267, 23688–23695.
- (22) Shin, K.S.; Lee, Y.J. Purification and characterization of new member of the laccase family from the White – rot basidiomycete *Coriolus hirsutus*. *Archives Biochemistry and Biophysics* **2000**, 384, 109-115.

- (23) Tsuji, A.; Kinoshita, T.; Hoshino, M. Analytical chemical studies on amino sugar. II. Determination of hexosamines using 3-methyl-2-benzothiazolone hydrazone hydrochloride. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. **1969**, 17, 1505-1510.
- (24) Ride, J.P.; Drysdale, R.B. A rapid method for the chemical estimation of filamentous fungi in plant tissue. *Physiological Plant Pathology* **1972**, 2, 7-15.
- (25) Rabonato, A. C. *Linhagens fúngicas na hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar*. **2013**. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual Paulista “Julio De Mesquita Filho”, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, SP.
- (26) Manu-Tawiah, W.; Martin, A.M. Use of nitrogen supplemented peat extracts for the cultivation of *Pleurotus ostreatus* mushroom mycelium. *Presented at the 13th Int. Congress on the Science and Cultivation of Edible Fungi*. Braunschweig, Germany. **1987**, 20-26.
- (27) Stajic', M., Persky, L., Friesem, D., Hadar, Y., Wasser, S.P., Nevo, E., Vukojević, J. Effect of different carbon and nitrogen sources on laccase and peroxidases production by selected *Pleurotus* species. *Enzyme and Microbial Technology* **2006**, 38, 65–73.
- (28) Ding, S.Y.; Liu, Y.S.; Zeng, Y.; Himmel, M.E.; Baker, J. O.; Bayer, E.A. How does plant cell wall nano scale architecture correlate with enzymatic digestibility. *Science* **2012**, 338, 1055–1060.
- (29) Li, X.; Weng, J. K.; Chapple, C. Improvement of biomass through lignin modification. *The Plant Journal* **2008**, 54, 569–581.
- (30) Masarin, F.; Gurpilhares, D.B.; Baffa, D.C.F.; Barbosa, M.H.P.; Carvalho, W.; Ferraz, A.; Milagres, A.M.F. Chemical composition and enzymatic digestibility of sugarcane clones selected for varied lignin contents. *Biotechnol Biofuels* **2011**, 4, 55.
- (31) Siqueira, G.; Milagres, A.M.F.; Carvalho, W.; Koch, G.; Ferraz, A. Topochemical distribution of lignin and hydroxycinnamic acids in sugar-cane cell walls and its correlation with the enzymatic hydrolysis of polysaccharides. *Biotechnology for Biofuels* **2011**, 4, 1-9.
- (32) Siqueira, G.; Várnai, A.; Ferraz, A.; Milagres, A.M.F. Enhancement of cellulose hydrolysis in sugarcane bagasse by the selective removal of lignin with sodium chlorite. *Applied Energy* **2013**, 102, 399–402.

- (33) Chiba, M. K.; Mattiazzo, M. E.; Oliveira, F. C. Cultivo de Cana-de-Açúcar em Argissolo tratado com lodo de esgoto. I - disponibilidade de nitrogênio no solo e componentes de produção. *Revista Brasileira de Ciência do Solo* **2008**, 32, 643-65.
- (34) Rodrigues, J. D. *Fisiologia da cana-de-açúcar*. Botucatu: Instituto de Biociências. **1995**, 69p.
- (35) Sun, X., Zhang, R., Zhang, Y. Production of lignocellulolytic enzymes by *Trametes gallica* and detection of polysaccharide hydrolase and laccase activities in polyacrylamide gels. *Journal of Basic Microbiology* **2004**, 44, 220–231.
- (36) Hatakka, A. Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi: production and role in lignin degradation. *FEMS Microbiology Reviews* **1994**, 13, 125-135.
- (37) Membrillo, I. A.; Sa´nchez, C. B.; Meneses, M.D.; Favela, E. C.; Loera, O. Effect of substrate particle size and additional nitrogen source on production of lignocellulolytic enzymes by *Pleurotus ostreatus* strains. *Bioresource Technology* **2008**, 99, 7842–7847.
- (38) Lemos, J. L. S.; Fontes, M.C.A.; Pereira, N.J. Xylanase production by *Aspergillus awamori* in solid-state fermentation and influence of different nitrogen sources. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **2001**, 91, 681-689.
- (39) Nsereko, V.L.; Morgavi, D.P.; Rode, L.M.; Beauchemin, K.A.; Mcallister, T.A. Effects of fungal enzyme preparations on hydrolysis and subsequent degradation of alfalfa hay fiber by mixed rumen microorganisms in vitro. *Animal Feed Science and Technology* **2000**, 88, 153-170.
- (40) Dawson, K.A.; Tricarico, J.M. *The use of exogenous fibrolytic enzymes to enhance microbial activities in the rumen and the performance of ruminant animals*. Disponível em: <<http://en.engormix.com/Articles/View.aspx?id=695>>. Publicado em: 31 out. **2007**.
- (41) Bento, C.B.P.; Silva, J.S.; Rodrigues, M.T.; Kasuya, M.C.M.; Mantovani, H.C. Influence of white-rot fungi on chemical composition and in vitro digestibility of lignocellulosic agro-industrial residues. *African Journal of Microbiology Research*. **2014**, 8, 28, 2724-2732.
- (42) Ballaminut, N.; Yamanaka, R.; Machado, Gomes, K. M.. Interference of a commercial catalase preparation in laccase and peroxidase activities. *Brazilian Archives of Biology and Technology (Impresso)* **2009**, 52, 1193-1198.

- (43) Yu, H.; Guo, G.; Zhang, X.; Yan, K.; Xu, C. The effect of biological pretreatment with the selective white-rot fungus *Echinodontium taxodii* on enzymatic hydrolysis of softwoods and hardwoods. *Bioresource Technology* **2009**, 100, 5170–5175.
- (44) Elisashvili, V.; Penninckx, M.; Kachlishvili, E.; Tsiklauri, N.; Metreveli, E.; Kharziani, T.; Kvesitadze, G. *Lentinus edodes* and *Pleurotus* species lignocellulolytic enzymes activity in submerged and solidstate fermentation of lignocellulosic wastes of different composition. *Bioresource Technology* **2008**, 99, 457-462.
- (45) Beauchemin, K. A.; Colombatto, D.; Morgavi, P. D.; Yang, Z. W. Use of exogenous fibrolytic enzymes to improve feed utilization by ruminants. *Journal of Animal Science* **2003**, 81, 2, 37-47.
- (46) Baldrian P.; Valásková V. Degradation of cellulose by basidiomycetous fungi. *FEMS Microbiology* **2008**, 32, 501-521.
- (47) Kilpatrick, M.; Murray, D.J.; Ward, F. Influence of substrate formulation and autoclave treatment on *Lentinula edodes* production. *Mushroom Science* **2000**, 15, 803-810.
- (48) Mahesh, M.S.; Mohini, M. Biological treatment of crop residues for ruminant feeding: A review. *African Journal of Biotechnology* **2013**, 12, 27, 4221-4231.
- (49) Lynch, J.P.; O’Kiely, P.; Murphy, R.; Doyle, E.M. Changes in chemical composition and digestibility of three maize stover components digested by white-rot fungi. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* **2013**, 68, 91-98.
- (50) Baldrian, P. Fungal laccases - occurrence and properties. *FEMS Microbiology Reviews* **2006**, 30, 215-242.
- (51) Hatfield R.; Fukushima, R. S. Can lignin be accurately measured? *Crop Science* **2005**, 45, 832–839.

FIGURAS E TABELAS

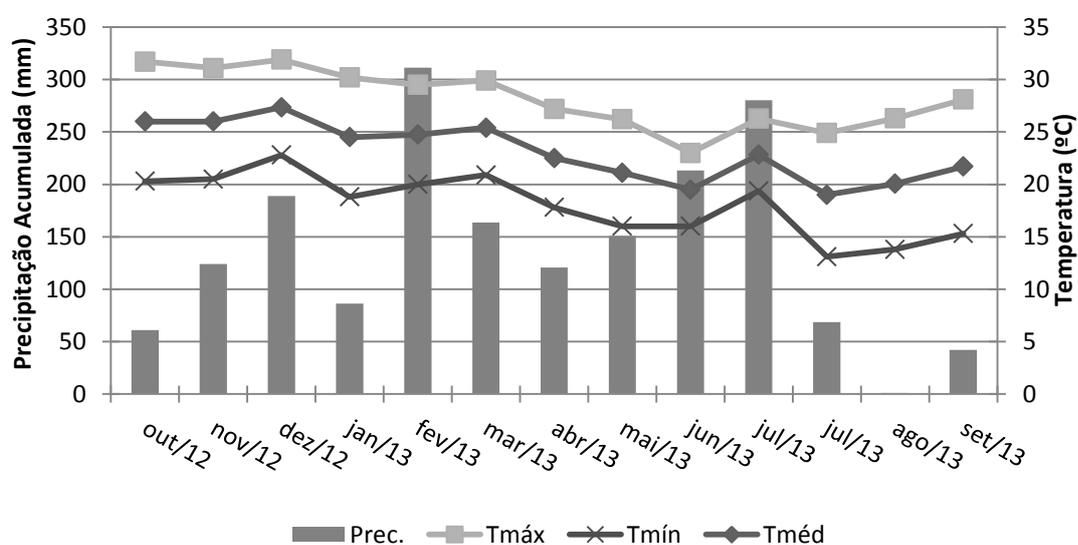


Figura 1: Dados climáticos de precipitação e temperatura: máxima, média e mínima durante o período experimental.

Tabela 1 – Componentes químicos do solo das pastagens de capim-tanzânia no início do período experimental.

| Trat. | Prof. cm | P ¹ mg/dm ₃ | C g/dm ₃ | Ph H ₂ O | -----cmol _c /dm ⁻³ ----- | | | | | | CTC ₄ | V ⁵ % |
|-------|----------|--------------------------------------|------------------------|------------------------|--|-----------------|-----------------|----------------|-----------------|------|-------------------|---------------------|
| | | | | | H+Al | Ca ² | Mg ² | K ¹ | SB ³ | | | |
| 1 | 0-20 | 10.23 | 13.3 ₃ | 6.00 | 2.27 | 1.89 | 0.60 | 0.12 | 2.60 | 4.87 | 53.4 ₁ | |
| 2 | 0-20 | 8.09 | 11.3 ₂ | 5.90 | 2.45 | 1.20 | 0.47 | 0.08 | 1.75 | 4.20 | 41.6 ₁ | |
| 3 | 0-20 | 5.34 | 10.1 ₂ | 5.70 | 2.45 | 1.38 | 0.43 | 0.07 | 1.87 | 4.32 | 43.3 ₁ | |
| 4 | 0-20 | 4.89 | 9.02 | 5.80 | 2.36 | 1.89 | 0.64 | 0.04 | 2.56 | 4.92 | 52.0 ₈ | |

Fonte: Laboratório Rural de Maringá. ¹Extraído por Melich; ²Ca e Mg - extraídos com KC 1mol L⁻¹; ³Soma de Bases; ⁴Capacidade de troca de cátions; ⁵Porcentagem de saturação por bases.

Tabela 2 – Teor de açúcar redutor, lacase, manganês peroxidase, celulase, xilanase, digestibilidade *in vitro* da matéria seca, digestibilidade *in vitro* da matéria orgânica, fibra em detergente neutro, fibra em detergente neutro ácido, celulose, hemicelulose e lignina na lâmina foliar, em função dos níveis de nitrogênio e tratamentos com e sem fungo, no verão.

| Trat. | Níveis de nitrogênio (kg/ha/ano) | | | | Média | Equação Regressão | R ² |
|--|----------------------------------|------------|------------|-----------|----------|--------------------|----------------|
| | 0 | 150 | 300 | 450 | | | |
| AÇÚCAR REDUTOR (μmol/ml) | | | | | | | |
| Sem FPB | 48,50 bB | 30,40 bA | 44,90 aB | 28,50 aA | 38,07 | Y=26,0000+0,0026N | 0,34 |
| Com FPB | 7,80 aA | 13,90 aA | 45,60 aB | 42,40 bB | 27,42 | Y=7,1000+0,0903N | 0,82 |
| LACASE (U/L) | | | | | | | |
| Sem FPB | - | - | - | - | - | - | - |
| Com FPB | 65,70 AB | 56,50 A | 78,50 BC | 83,40 C | 71,02 | Y= 59,7600+0,0500N | 0,63 |
| MANGANÊS PEROXIDASE (U/L) | | | | | | | |
| Sem FPB | - | - | - | - | - | - | - |
| Com FPB | 87,70 | 93,60 | 96,30 | 88,50 | 91,52 | ns | ns |
| CELULASE (U/L) | | | | | | | |
| Sem FPB | - | - | - | - | - | - | - |
| Com FPB | 4,80 A | 6,50 AB | 9,00 B | 9,70 B | 7,50 | ns | ns |
| XILANASE (U/L) | | | | | | | |
| Sem FPB | - | - | - | - | - | - | - |
| Com FPB | 3,40 A | 3,70 A | 5,30 AB | 6,20 B | 4,65 | ns | ns |
| DIGESTIBILIDADE <i>IN VITRO</i> DA MATERIA SECA (%) | | | | | | | |
| Sem FPB | 43 aA | 66,64 bB | 60,37 aB | 65,30 aB | 58,33 | Y= 49,6460+0,0510N | 0,66 |
| Com FPB | 51,28 bA | 56,39 aB | 66,25 bC | 68,66 aD | 61,13 | Y= 51,4315+0,0306N | 0,99 |
| DIGESTIBILIDADE <i>IN VITRO</i> DA MATERIA ORGÂNICA(%) | | | | | | | |
| Sem FPB | 40,37 aA | 58,53 aB | 61,67 aB | 66,59 aB | 59,52 | Y=47,3632+0,0540N | 0,67 |
| Com FPB | 53,57 bA | 65,29 bB | 64 aB | 67,52 aC | 60,14 | Y= 53,7812+0,0282N | 0,95 |
| FIBRA EM DETERGENTE NEUTRO (g/kg de MS) | | | | | | | |
| Sem FPB | 659,04 aA | 650,67 aA | 646,51 aA | 661,41 aA | 654,35 | Y=ns | ns |
| Com FPB | 718,31bAB | 773,66 bB | 676,27 aA | 696,53 aA | 716,19 | Y=740,60-0,1084N | 0,25 |
| FIBRA EM DETERGENTE ÁCIDO (g/kg de MS) | | | | | | | |
| Sem FPB | 372,36 aB | 325,90 aAB | 336,70 aAB | 284,56 aA | 329,68 | ns | ns |
| Com FPB | 409,62 aB | 399,03bAB | 357,32 aAB | 342,61 bA | 377,14 | ns | ns |
| HEMICELULOSE (g/kg de MS) | | | | | | | |
| Sem FPB | 286,67 | 324,75 | 309,61 | 376,86 | 324,47 a | ns | ns |
| Com FPB | 308,97 | 357,73 | 314,78 | 359,37 | 335,21 a | ns | ns |
| CELULOSE (g/kg de MS) | | | | | | | |
| Sem FPB | 260,58 bA | 240,45 bA | 257,77 bA | 197,14 bA | 238,98 | ns | ns |
| Com FPB | 104,14 aA | 93,60 aA | 82,43 aA | 81,44 aA | 90,40 | ns | ns |
| LIGNINA (g/kg de MS) | | | | | | | |
| Sem FPB | 37,54 aA | 27,28 aA | 26,74 aA | 28,45 aA | 30 | ns | ns |
| Com FPB | 45,31 aAB | 50,28 bAB | 56,57 bB | 31,45 aA | 46,03 | ns | ns |

Letras minúsculas diferem entre si nas colunas para tratamento com e sem FPB; Letras maiúsculas diferem entre si nas linhas para níveis de N (P<0,05). R² = Coeficiente de determinação; N = 0, 150, 300 e 450 kg/ha de N; ns= não significativo.

Tabela 3 – Teor de açúcar redutor, lacase, manganês peroxidase, celulase, xilanase, digestibilidade *in vitro* da matéria seca, digestibilidade *in vitro* da matéria orgânica, fibra em detergente neutro, fibra em detergente neutro ácido, celulose, hemicelulose e lignina na lâmina foliar, em função dos níveis de nitrogênio e tratamentos com e sem fungo, no inverno.

| Trat. | Níveis de nitrogênio (kg/ha/ano) | | | Média | Equação Regressão | R ² |
|---|-----------------------------------|------------|------------|----------|---------------------|----------------|
| | 150 | 300 | 450 | | | |
| AÇÚCAR REDUTOR (μmol/ml) | | | | | | |
| Sem FPB | 25,40 aB | 13,70 aA | 19,30 aAB | 19,4333 | Y=25,4333- 0,0200N | 0,27 |
| Com FPB | 20,40 aA | 35,80 bB | 47,50 bC | 34,5556 | Y=7,4666 +0,0903N | 0,90 |
| LACASE (U/L) | | | | | | |
| Sem FPB | - | - | - | - | - | - |
| Com FPB | 90,20 A | 105,40 A | 139,70 B | 117,7666 | Y=62,2666 +0,1650N | 0,95 |
| MANGANÊS PEROXIDASE (U/L) | | | | | | |
| Sem FPB | - | - | - | - | - | - |
| Com FPB | 86,50 A | 186,10 B | 211,80 C | 161,50 | Y= 36,3000+ 0,4173N | 0,89 |
| CELULASE (U/L) | | | | | | |
| Sem FPB | - | - | - | - | - | - |
| Com FPB | 5,40 | 7,30 | 7,90 | 6,86 | ns | ns |
| XILANASE (U/L) | | | | | | |
| Sem FPB | - | - | - | - | - | - |
| Com FPB | 3,20 A | 4,50 B | 3,10 A | 3,60 | ns | ns |
| DIGESTIBILIDADE <i>IN VITRO</i> DA MATERIA SECA (%) | | | | | | |
| Sem FPB | 45,66 aA | 48,74 aAB | 50,03 aB | 48,14 | ns | ns |
| Com FPB | 61,13 bA | 63,83 bAB | 66,62 bB | 63,86 | ns | ns |
| DIGESTIBILIDADE <i>IN VITRO</i> DA MATERIA ORGÂNICA (%) | | | | | | |
| Sem FPB | 40,30 aA | 43,13 aA | 44,17 aA | 42,53 | ns | ns |
| Com FPB | 68,82 b A | 66,15 bA | 69,67 bA | 68,21 | ns | ns |
| FIBRA EM DETERGENTE NEUTRO (g/kg de MS) | | | | | | |
| Sem FPB | 649,44 aAB | 654 aB | 624 aA | 642,40 | Y=667,9491-0,0851N | 0,62 |
| Com FPB | 722 bB | 690,70 bA | 714,26 bAB | 709 | Y=N.S. | ns |
| FIBRA EM DETERGENTE ÁCIDO (g/kg de MS) | | | | | | |
| Sem FPB | 363,55 bA | 402,16 bB | 387,75 aAB | 384,49 | Y=360,2900+0,0806N | 0,39 |
| Com FPB | 354,18 aB | 314,11 aA | 377,80 aB | 348,70 | Y=N.S. | ns |
| HEMICELULOSE (g/kg de MS) | | | | | | |
| Sem FPB | 286 aB | 251,71 aAB | 236,14 aA | 258 | ns | ns |
| Com FPB | 387,73 bA | 361,70 bA | 373,96 bA | 374,46 | ns | ns |
| CELULOSE (g/kg de MS) | | | | | | |
| Sem FPB | 203 bA | 278,09 bB | 259,11 bAB | 246,72 | ns | ns |

| | | | | | | |
|----------------------|-----------|----------|----------|-------|-------------------|------|
| Com FPB | 73,06 aA | 80,64 aA | 72,20 aA | 75,30 | ns | ns |
| LIGNINA (g/kg de MS) | | | | | | |
| Sem FPB | 62,11 bA | 45 aA | 63,27 bA | 56,73 | Y=N.S. | ns |
| Com FPB | 26,72 aAB | 43 aB | 19,08 aA | 29,59 | Y=37,2400-0,0254N | 0,10 |

Letras minúsculas diferem entre si nas colunas para tratamento com e sem FPB; Letras maiúsculas diferem entre si nas linhas para níveis de N ($P < 0,05$). R^2 = Coeficiente de determinação; N = 0, 150, 300 e 450 kg/ha de N; ns= não significativo.

Tabela 4 – Teor de açúcar redutor, lacase, manganês peroxidase, celulase, xilanase, digestibilidade *in vitro* da matéria seca, digestibilidade *in vitro* da matéria orgânica, fibra em detergente neutro, fibra em detergente neutro ácido, celulose, hemicelulose e lignina na colmo+bainha em função dos níveis de nitrogênio e tratamentos com e sem fungo, no verão.

| Trat. | Níveis de nitrogênio (kg/ha/ano) | | | | Média | Equação Regressão | R2 |
|---|----------------------------------|-----------|------------|-----------|---------|---|------|
| | 0 | 150 | 300 | 450 | | | |
| AÇÚCAR REDUTOR ($\mu\text{mol/ml}$) | | | | | | | |
| Sem FPB | 28,40 aB | 14,80 aA | 19,10 aAB | 22,10 aAB | 21,1000 | ns | ns |
| Com FPB | 52,90 bAB | 48,50 bA | 61,20 bB | 64,40 bB | 56,7500 | ns | ns |
| LACASE (U/L) | | | | | | | |
| Sem FPB | - | - | - | - | - | - | - |
| Com FPB | 112,00 A | 123,70 AB | 135,00 B | 127,00 AB | 124,550 | ns | ns |
| MANGANÊS PEROXIDASE (U/L) | | | | | | | |
| Sem FPB | - | - | - | - | - | - | - |
| Com FPB | 178,40 A | 160,30 A | 252,70 B | 237,50 bB | 207,225 | Y=83.3850+0.08990N | 0,61 |
| CELULASE (U/L) | | | | | | | |
| Sem FPB | - | - | - | - | - | - | - |
| Com FPB | 10,20 | 7,90 | 8,70 | 11,20 | 9,50 | ns | ns |
| XILANASE (U/L) | | | | | | | |
| Sem FPB | - | - | - | - | - | - | - |
| Com FPB | 4,40 AB | 3,60 AB | 3,20 A | 4,60 B | 4,40 AB | ns | ns |
| DIGESTIBILIDADE <i>IN VITRO</i> DA MATERIA SECA (%) | | | | | | | |
| Sem FPB | 40,22 aA | 57,89 aB | 62,83 aB | 68,66 aB | 59,69 | Y= 42,2757+0,1589N-0,0002N ² | 0,84 |
| Com FPB | 49,89 bA | 67,03 bB | 74,36 bC | 85,94 bD | 67,02 | Y= 48,3152+0,0831N | 0,98 |
| DIGESTIBILIDADE <i>IN VITRO</i> DA MATERIA ORGÂNICA (%) | | | | | | | |
| Sem FPB | 46,58 aA | 61,82 aB | 62,25 aB | 69,00 aB | 60,62 | Y= 51,3432+0,0412N | 0,68 |
| Com FPB | 51,61 aA | 65,41 aA | 78,96 bB | 88,22 bB | 70,15 | Y= 51,1157+0,0846N | 0,98 |
| FIBRA EM DETERGENTE NEUTRO (g/kg de MS) | | | | | | | |
| Sem FPB | 713,60 aA | 650,11 aA | 658,59 aAB | 651,63 aA | 688,48 | ns | ns |
| Com FPB | 720,60 aA | 734,88 bA | 762,14 bA | 731,54 bA | 737,30 | ns | ns |
| FIBRA EM DETERGENTE ÁCIDO (g/kg de MS) | | | | | | | |

| | | | | | | | |
|---------------------------|-----------|------------|-----------|------------|----------|--------------------|------|
| Sem FPB | 440,36 aB | 387,11 aAB | 315,99 aA | 374,90 aAB | 379,39 | ns | ns |
| Com FPB | 398,19 aA | 421,30 aA | 458,10 bA | 428,80 bA | 426,57 | ns | ns |
| HEMICELULOSE (g/kg de MS) | | | | | | | |
| Sem FPB | 273,24 | 263 | 342,60 | 277,53 | 289,09 a | ns | ns |
| Com FPB | 322,49 | 313,58 | 304,13 | 302,75 | 310,71 a | ns | ns |
| CELULOSE (g/kg de MS) | | | | | | | |
| Sem FPB | 348,69 bB | 289,25 bAB | 214,32 bA | 307,28 bB | 290 | ns | ns |
| Com FPB | 103,92 aA | 126,15 aA | 108,56 aA | 137,92 aA | 119,14 | ns | ns |
| LIGNINA (g/kg de MS) | | | | | | | |
| Sem FPB | 52,47 aB | 46,32 aB | 38,19 aAB | 22,25 bA | 39,81 | Y=54,6317-0,0658N | 0,95 |
| Com FPB | 76,28 bB | 30,00 aA | 29,39 aA | 8,54 aA | 36,00 | Y= 66,6333-0,1358N | 0,85 |

Letras minúsculas diferem entre si nas colunas para tratamento com e sem FPB; Letras maiúsculas diferem entre si nas linhas para níveis de N ($P < 0,05$). R^2 = Coeficiente de determinação; N = 0, 150, 300 e 450 kg/ha de N; ns= não significativo.

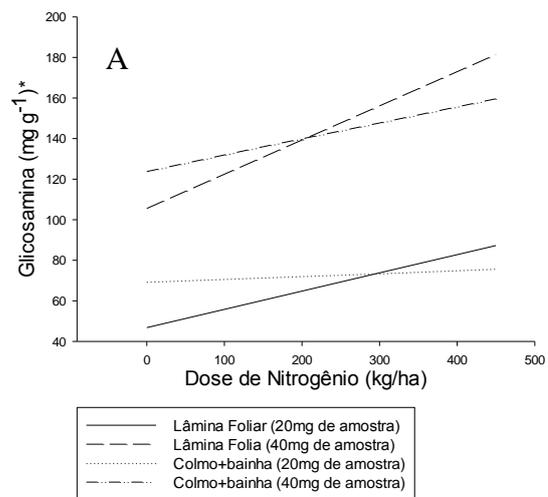
Tabela 5 – Teor de açúcar redutor, lacase, manganês peroxidase, celulase, xilanase, digestibilidade *in vitro* da matéria seca, digestibilidade *in vitro* da matéria orgânica, fibra em detergente neutro, fibra em detergente neutro ácido, celulose, hemicelulose e lignina na colmo+bainha em função dos níveis de nitrogênio e tratamentos com e sem fungo, no inverno.

| Trat. | Níveis de nitrogênio (kg/ha/ano) | | | Média | Equação Regressão | R^2 |
|---|-----------------------------------|-----------|-----------|---------|--------------------|-------|
| | 150 | 300 | 450 | | | |
| AÇÚCAR REDUTOR ($\mu\text{mol/ml}$) | | | | | | |
| Sem FPB | 7,6333 aA | 16,80 aAB | 26,80 aB | 17,0778 | ns | ns |
| Com FPB | 44,50 bA | 58,90 bB | 68,80 bB | 56,7333 | ns | ns |
| LACASE (U/L) | | | | | | |
| Sem FPB | - | - | - | - | - | - |
| Com FPB | 117,30 | 126,20 | 130,10 | 124,533 | ns | ns |
| MANGANÊS PEROXIDASE (U/L) | | | | | | |
| Sem FPB | - | - | - | - | - | - |
| Com FPB | 205,30 A | 279,20 B | 312,30 B | 265,60 | Y=79,3000+ 0,0078N | 0,95 |
| CELULASE (U/L) | | | | | | |
| Sem FPB | - | - | - | - | - | - |
| Com FPB | 10,40 A | 13,90 AB | 17,40 bAB | 13,90 | ns | ns |
| XILANASE (U/L) | | | | | | |
| Sem FPB | - | - | - | - | - | - |
| Com FPB | 5,60 | 6,50 | 6,90 | 6,33 | ns | ns |
| DIGESTIBILIDADE <i>IN VITRO</i> DA MATERIA SECA (%) | | | | | | |
| Sem FPB | 47,48 aA | 48,57 aA | 52,22 aA | 49,42 | Y= 44,6955+0,0157N | 0,91 |
| Com FPB | 63,20 bA | 74,71 bB | 93,22 bC | 76,66 | Y= 47,7991+0,0962N | 0,98 |

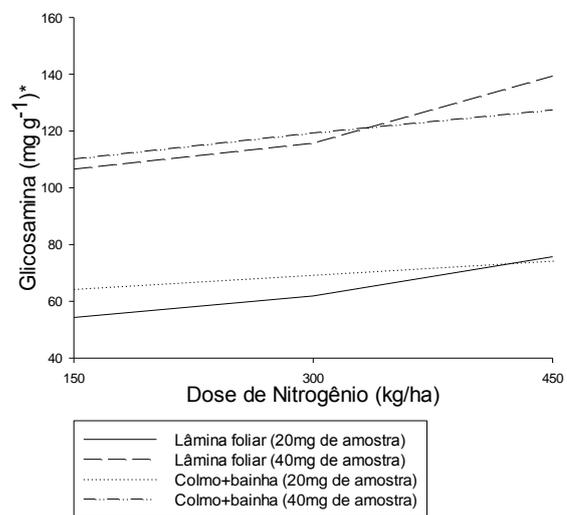
| DIGESTIBILIDADE <i>IN VITRO</i> DA MATERIA ORGÂNICA (%) | | | | | | |
|---|------------|-----------|-----------|----------|--------------------|------|
| Sem FPB | 56,69 aB | 42,86 aA | 47,65 aAB | 49,10 | Y= 58,2366+0,0304N | 0,42 |
| Com FPB | 66,14 bA | 77,36 bB | 94,08 bC | 79,19 | Y= 51,2533+0,0931N | 0,98 |
| FIBRA EM DETERGENTE NEUTRO (g/kg de MS) | | | | | | |
| Sem FPB | 671,14 | 746,12 | 669,73 | 695,67 a | ns | ns |
| Com FPB | 728,34 | 722,37 | 688,95 | 713,22 a | ns | ns |
| FIBRA EM DETERGENTE ÁCIDO (g/kg de MS) | | | | | | |
| Sem FPB | 483,18 bA | 466,69 bA | 458,46 bA | 469,44 | ns | ns |
| Com FPB | 365,25 aAB | 393 aB | 330,78 aA | 363,01 | ns | ns |
| HEMICELULOSE (g/kg de MS) | | | | | | |
| Sem FPB | 187,93 aA | 279,42 aA | 211,27 aA | 226,22 | ns | ns |
| Com FPB | 339,63 bA | 329,37 aA | 358,16 bA | 342,39 | ns | ns |
| CELULOSE (g/kg de MS) | | | | | | |
| Sem FPB | 359,86 bA | 359,56 bA | 349,66 bA | 356,55 | ns | ns |
| Com FPB | 116,45 aA | 95,48 aA | 89,45 aA | 100,46 | ns | ns |
| LIGNINA (g/kg de MS) | | | | | | |
| Sem FPB | 55,39 bA | 46,69 aA | 51,52 bA | 49,87 | Y=N.S | - |
| Com FPB | 28,14 aB | 35,12 aB | 4,56 aA | 22,49 | Y= 46,1933-0,0786N | 0,52 |

Letras minúsculas diferem entre si nas colunas para tratamento com e sem FPB; Letras maiúsculas diferem entre si nas linhas para níveis de N ($P < 0,05$). R^2 = Coeficiente de determinação; N = 0, 150, 300 e 450 kg/ha de N; ns= não significativo.

Gráfico 1 – Teor de Glicosamina em 20 e 40 mg de amostra coletadas no verão (A) e inverno (B) nos níveis de adubação nitrogenada.



B



CAPÍTULO V – UTILIZAÇÃO DE NITROGÊNIO E FUNGO DA PODRIDÃO BRANCA NA COMPOSIÇÃO DOS MONÔMEROS DA LIGNINA EM CAPIM-TANZÂNIA

(Journal of Agricultural and Food Chemistry)

RESUMO

Objetivou-se avaliar a composição química das lâminas foliares (LF) e colmo + bainha (CB) de capim-tanzânia, na ausência de nitrogênio e adubado com níveis crescentes de nitrogênio (N) (150, 300 e 450 kg/ha de N) e posterior tratamento com *Pleurotus ostreatus* (fungo da podridão branca) no verão e inverno. O experimento foi realizado entre novembro de 2012 e setembro de 2013. O delineamento experimental foi em blocos ao acaso, em parcelas subdivididas. A ausência de nitrogênio e os três níveis de nitrogênio (150, 300 e 450 kg/ha de N) representaram a parcela principal, e o pré-tratamento com e sem fungo, as subparcelas com quatro repetições. Menores teores do monômero guaiacil (G) foram encontrados quando a adubação foi maior, na LF e no período do verão e com a utilização do fungo, tornando a hidrólise mais fácil e, portanto, liberando maior teor de celulose. O monômero isovanilina (I) foi o que apresentou menores teores, em todos os tratamentos havendo, contudo a sua diminuição com os tratamentos com FPB tanto no CB quanto na LF. Unidades siringil (S) tendem a ser mais raras que G, sendo que sua presença foi reduzida pela aplicação do N. O aumento dos níveis de nitrogênio promove maior desenvolvimento do FPB, ocasionando assim maior degradação do material lignocelulósico, por causa do aumento da produção das enzimas lignocelulósicas como manganês peroxidase e lacase. O aumento dos níveis de adubação nitrogenada ocasiona a diminuição dos monômeros, principalmente quando utilizado o FPB.

Palavras-chave: adubação nitrogenada, guaiacil, hidroxifenil, isovalinina, lignina, *Pleoturos ostreatus*, siringil

INTRODUÇÃO

O capim-tanzânia (*Panicum maximum* Jacq. cv. Tanzânia) vem ocupando posição de destaque entre as forrageiras, pela elevada produtividade, boa capacidade fotossintética e a excelente resposta à adubação e à irrigação (1). Contudo, pesquisas vêm sendo realizadas para melhorar sua resposta nutricional e evitar a lignificação de suas estruturas.

A lignina está presente em todas as plantas vasculares e representa, em média, 25% da biomassa da planta terrestre. Seu conteúdo é um dos principais fatores que influenciam a digestibilidade, por causa de sua propriedade recalcitrante e a sua resistência à degradação por microrganismos do solo e enzimas extracelulares (2). O teor de lignina de plantas varia de acordo com a composição da parede celular, sendo mais presente nas raízes e colmos do que nas folhas (3).

A lignina é composta de monômeros fenólicos (do tipo fenilpropano), classificados em guaiacil (G), siringil (S) e hidroxifenil (H). Também faz parte da lignina o aldeído fenólico isovanilina (I), cuja predominância interfere diretamente na lignificação da parede celular.

O nitrogênio é o nutriente com maior impacto sobre o crescimento e desenvolvimento vegetativo da gramínea, afetando diretamente a proporção de fibra e melhorando sua qualidade nutricional. Isso, pois o nitrogênio promove a ativação de gemas dormentes potencializa a ocupação de espaço e acelera o surgimento de perfilhos jovens (4), conseqüentemente com menos fibra e maior qualidade.

Com o intuito de aumentar a degradação de estruturas que compõem as plantas, o fungo *Pleurotus ostreatus* vem sendo estudado, com foco em produção de biodiesel, por sua capacidade diferenciada de degradar materiais lignocelulósicos (5). Contudo, não há registros sobre a relação entre o pré-tratamento com este fungo e a adubação nitrogenada, bem como seu efeito sobre os monômeros que compõem a lignina.

A partir destas inferências, acredita-se que o uso do fungo *Pleurotus ostreatus* em foragem adubada com níveis crescentes de nitrogênio, para alimentação animal, pode ser uma alternativa interessante para o aumento da digestibilidade da forragem.

Uma vez que este fungo melhora a degradação dos componentes da lignina, acredita-se que o mesmo atue na modificação composição monomérica da lignina.

Objetivou-se com este trabalho quantificar os monômeros da lignina presentes na lâminas foliares e colmo+bainha do capim-tanzânia adubado com níveis crescentes de nitrogênio, com utilização ou não de pré-tratamento com fungo *Pleurotus ostreatus*, no verão e no inverno.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado na Fazenda Experimental de Iguatemi (FEI) localizada na latitude de 23° 25' S; 51° 57' O, e 550 metros de altitude, da Universidade Estadual de Maringá (UEM), Maringá-PR. O tipo climático predominante desta região é o Cfa subtropical úmido mesotérmico, segundo a classificação de Köppen, com temperatura média anual de 22°C. Este se caracteriza pela predominância de verões quentes, baixa frequência de geadas severas e uma tendência de concentração das chuvas no período do verão. O período experimental foi de novembro de 2012 a setembro de 2013, cujos dados climáticos foram coletados no posto meteorológico da FEI, campus da UEM (Figura 1).

O experimento foi conduzido em uma área de *Panicum maximum* Jacq. cv. Tanzânia-1, estabelecida em novembro de 2003 em área de Latossolo Vermelho distrófico (6).

No mês de agosto de 2012 foi realizada a coleta de amostras de solo na profundidade (0-20 cm) nos quatro blocos, para correção de acidez para elevação da saturação de bases a 60%, segundo Werner et al. (7), além da aplicação de 40 kg/ha de P₂O₅ na forma de superfosfato simples. Os resultados da análise de solo se encontram na Tabela 1, caracterizando solo com baixo valores de Mg, K e baixa %V (porcentagem de saturação por base), fatores estes que determinaram a necessidade de calagem.

A área experimental apresentava total de 800 m² dividida em 16 parcelas, com 50 m² cada, nos quais foram alocados os tratamentos com aplicações de nitrogênio (N) e potássio (K₂O) que foram parceladas de acordo com a quantidade total a ser aplicada, com início no dia 21/11/2012. O nitrogênio teve como fonte o nitrato de amônio e foi aplicado de acordo com o tratamento, a menor dose (150 kg/ha de N) em três aplicações com intervalos de 45 dias, 300 kg/ha de N em seis aplicações com intervalos de 30 dias, e 450 kg/ha de N em nove aplicações com intervalos de 15 dias. O K₂O teve como fonte

o cloreto de potássio e foi aplicado com intervalo de 45 dias em todas as parcelas, totalizando de 80 kg/ha de K₂O.

Cada parcela foi pastejada por uma novilha da raça holandês de aproximadamente 250 kg, pelo método de pastejo intermitente, em que os animais permaneceram, aproximadamente, 1 a 2 dias com período de descanso variável em função da mensuração da interceptação luminosa. A entrada do animal ocorreu quando se atingia 95% de interceptação luminosa, cuja mensuração foi realizada com analisador de dossel modelo *LAI 2000* (LI-COR, Lincoln, Nebraska, EUA). A retirada dos animais das parcelas foi realizada quando o resíduo de pastejo chegou próximo de 30 cm de altura.

O acúmulo de massa verde de forragem foi mensurado utilizando um quadrado de ferro com 1 m² de área, sendo colhidas três amostras por parcela, a 30 cm do nível do solo. Foram retiradas duas subamostras de forragem, sendo as mesmas para a determinação da massa seca (MS) de forragem e a outra para separação dos componentes morfológicos da forragem, obtendo-se as frações lâmina foliar (LF), colmo+bainha (CB) e material morto (MM), que foram pesadas verdes e colocadas em estufa de circulação forçada de ar a 55°C, por 72 horas e, posteriormente, pesadas as frações secas. Com exceção do MM, as frações LF e CB foram moídas em moinho tipo Willey com peneira de 1 mm.

Foi utilizado o fungo da podridão branca (FPB), *Pleurotus ostreatus*, como pré-tratamento no capim-tanzânia, obtido da coleção de culturas da Embrapa, Colombo-PR. Os basidiomicetos foram mantidos em laboratório através de repiques sucessivos em batata-dextrose-ágar.

Para obtenção dos micélios, um disco com 10 mm foi inoculado em BDA e cultivado em estufa a 28°C por até 10 dias. As biomassas lignocelulósicas de capim-tanzânia, após secas a 40° C em estufa de circulação forçada até peso constante, foram trituradas em tela de 60 mesh.

Para o pré-tratamento, os resíduos (10g) foram acondicionados em frascos Erlenmeyer de 250 ml. Os resíduos foram suplementados com solução mineral de Vogel (8) e água destilada para obtenção de umidade final variando de 70% no início do cultivo. Foram suplementados com glicose 0,5% (p/p) e extrato de levedura 0,2% (p/p). Os materiais foram embalados e autoclavados por 15 min. Quatro discos de 10 mm de

BDA colonizados com cada um dos fungos e foram introduzidos nos meios de cultivos. Os materiais foram mantidos por 20 dias a 28° C em condições estáticas e no escuro.

Os materiais insolúveis foram secos a temperatura de 40°C em estufa de circulação forçada até peso constante para análises.

As biomassas secas da LF e CB (0,3 g) foram homogeneizadas em 7 mL de tampão fosfato de sódio e potássio (50 mM, pH 7,0) e transferido para tubos de centrífuga de 15 mL (9). O precipitado foi centrifugado (1.400g, 2 min) sucessivamente como segue: mais 4 vezes com 7 mL de tampão fosfato (50 mM, pH 7,0); 3 vezes com 1% (v/v) Triton® em tampão fosfato pH 7,0 (7 mL); 3 vezes com 1 M NaCl em tampão pH 7,0 (7 mL); 3 vezes com água destilada (7 mL) e 2 vezes com acetona (5 mL). O precipitado foi seco em estufa (60 °C, 24 horas) e resfriado em dessecador a vácuo. A MS foi definida como a fração da parede celular livre de proteínas.

Para determinar a composição monomérica da lignina, foi usada a oxidação com nitrobenzeno (10). Uma fração da parede celular livre de proteínas (50 mg) foi colocada em ampola Pyrex® contendo 1 mL de NaOH 2 M e 100 µL de nitrobenzeno. A ampola foi selada e aquecida a 170°C por 2,5 h, com agitação na metade do tempo de reação. Após oxidação, a amostra foi resfriada, lavada duas vezes com clorofórmio, acidificada HCl 5 M e extraída duas vezes com clorofórmio.

Os extratos orgânicos foram combinados, secos e ressuspendidos em metanol. Todas as amostras foram filtradas em filtro de 0,45 µm e analisadas por HPLC. A fase móvel foi metanol/ácido acético 4% em água (20/80, v/v), com fluxo de 1,2 mL min⁻¹ para análise isocrática de 20 min. As quantificações de p-hidroxibenzaldeído (H), isovanilina (I), guaiacil (G) e siringaldeído (S) foram realizadas a 290 nm utilizando os padrões correspondentes. Os resultados foram expressos como mg do monômero g⁻¹ de parede celular. Através desses resultados foram calculados o somatório e H+I+G+S e a relação S/G.

O delineamento experimental blocos ao acaso em parcelas subdivididas. A ausência de nitrogênio e os três níveis de nitrogênio (150, 300 e 450 kg/ha de N) representaram a parcela principal, e a ausência ou presença do tratamento com fungo representaram as subparcelas com quatro repetições. Para testar o efeito nitrogênio e tratamento com fungo nas variáveis, foi utilizada análise de variância, seguida de teste de médias a 5% de probabilidade, conforme abaixo:

$$y_{ijk} = \mu + A_i + b_j + Ab_{ij} + B_k + AB_{ik} + e_{ijk}$$

y_{ijk} é o valor observado na i -ésimo nível de nitrogênio, no j -ésimo bloco e a presença ou ausência de fungo ($k=0$ ou 1)

μ é a constante inerente a todas observações;

A_i é o efeito do i -ésimo nível de dose de nitrogênio;

b_j é o efeito do j -ésimo bloco experimental;

B_k é o efeito da presença ou ausência de fungo;

Ab_{ij} é o erro experimental em nível de parcelas;

AB_{ik} é o efeito da interação entre a i -ésimo nível de nitrogênio e a presença ou ausência de fungo;

e_{ijk} é o erro experimental em nível de subparcelas.

Havendo interação entre níveis de nitrogênio e o fungo foi utilizado modelos estatísticos, que testaram regressões linear e quadrática uma para ausência de fungo e outra com fungo para todas as variáveis, conforme abaixo:

$$y_{ijk} = \mu + A_i + b_j + e_{ijk}$$

y_{ijk} é a média dos cortes observada na i -ésimo nível de nitrogênio e no j -ésimo bloco

μ é a constante inerente a todas observações;

A_i é o efeito do i -ésimo nível de dose de nitrogênio (linear ou quadrático);

b_j é o efeito do j -ésimo bloco experimental;

e_{ijk} é o erro experimental associado à observação y_{ijk} .

RESULTADOS

Na análise da LF coletada no verão, houve efeito apenas do FPB ($P < 0,05$) para o H, I, G, S e H+G+I+S (Tabela 2), não sendo observado efeito para o N ($P > 0,05$) e não havendo interação.

Tanto na ausência de adubação e na maior dose de N (450 kg/ha de N), foram observados valores de H 82% inferiores para o tratamento com FPB, em relação ao tratamento sem o FPB. Foram observados teores do monômero I de 97%, 97%, 97% e 99% inferiores nos tratamentos com FPB em relação ao tratamento sem o FPB, nos níveis de 0, 150, 300 e 450 kg/ha, respectivamente.

Para o G, foram observados valores também inferiores no tratamento com o FPB em relação ao sem o FPB, sendo de 74%, 74%, 73% e 78% nos níveis de 0, 150, 300 e 450 kg/ha de N, respectivamente. Foram observados teores de S 74%, 79%, 72% e 75%

menores no tratamento com FPB, comparado ao sem o FPB, nos níveis de 0, 150, 300 e 450 kg/ha, respectivamente.

Na avaliação do H+I+G+S, observaram-se valores inferiores para o tratamento com o FPB em detrimento do sem o FPB, sendo de 76%, 77%, 75% e 80% nos níveis de 0, 150, 300 e 450 kg/ha, respectivamente. Não foi observado efeito do FPB e do N ($P>0,05$) para o H/S, também sem interação.

Na análise da LF coletada no inverno, foi observado efeito do FPB e do N ($P<0,05$) para o H+I+G+S, porém não houve interação. Foram observados teores de H+I+G+S 80%, 85% e 83% inferiores nos tratamentos com FPB em relação ao tratamento sem o FPB, nos níveis de 150, 300 e 450 kg/ha de N, respectivamente. No tratamento sem FPB, houve aumento de 5% de H+I+G+S entre a menor dose de N (150 kg/ha) e a maior dose de N (450 kg/ha), enquanto no tratamento com o FPB houve redução de 10%.

Houve efeito apenas do FPB ($P<0,05$) para o H, I, G, S e H/S (Tabela 3), não sendo observado efeito para o N ($P>0,05$) e não havendo interação. Para o H, foram observados teores 82%, 84% e 80% menores no tratamento com FPB, comparado ao sem o FPB, nos níveis de 150, 300 e 450 kg/ha de N, respectivamente.

Na avaliação do monômero I, foram observados teores 97%, 98% e 98% menores no tratamento com FPB, comparado ao sem o FPB, nos níveis de 150, 300 e 450 kg/ha de N, respectivamente. No monômero G também foram verificados teores menores no tratamento com FPB, em detrimento ao tratamento sem o FPB, sendo de 79%, 84% e 82% nos níveis de 150, 300 e 450 kg/ha de N, respectivamente. Ainda, foram verificados teores de S 76%, 84% e 81% inferiores nos níveis de 150, 300 e 450 kg/ha de N, respectivamente.

O H/S apresentou teores superiores no tratamento com o FPB, em relação ao sem o FPB, na menor e na maior dose de N, sendo de 16% e 10%, respectivamente. No nível intermediário (300 kg/ha de N) foram observados teores de H/S semelhantes tanto no tratamento sem o FPB quanto no com o FPB.

Na análise da CB coletada no verão, houve efeito do N e do FPB ($P<0,05$) para o G, S, H+G+I+S e H/S (Tabela 4), havendo interação, sendo quadrática ($P<0,05$) para o H/S nos tratamentos com e sem o FPB, quadrática para o G, S e H+G+I+S apenas no tratamento sem o FPB, e linear negativa ($P<0,05$) para o G, S e H+G+I+S no tratamento com o FPB.

Foram observados valores inferiores para o G no tratamento com FPB, em comparação ao sem o FPB, sendo 44%, 51%, 68% e 91% inferiores nos níveis de 0, 150, 300 e 450 kg/ha de N, respectivamente, na equação de regressão. No tratamento sem o FPB, houve redução de 20% do G com o aumento dos níveis de N, comparando a ausência e a maior dose de N. No tratamento com o FPB, a redução, comparando as mesmos níveis, foi de 87%.

Avaliando o monômero S, foi verificada redução no tratamento com o FPB, comparado com o tratamento sem o FPB, sendo de 40%, 48%, 64%, 84%, nos níveis de 0, 150, 300 e 450 kg/ha de N, respectivamente, na equação de regressão. Entre a ausência de N e o nível de 450 kg/ha de N, houve redução do S de 11% e 75%, nos tratamentos sem e com FPB, respectivamente.

Os monômeros totais H+I+G+S também apresentaram valores inferiores no tratamento com o FPB, comparado ao sem o FPB, em 46%, 55%, 70% e 89%, nos níveis de 0, 150, 300 e 450 kg/ha de N, respectivamente, na equação de regressão. Houve redução também entre a ausência de N e o nível de 450 kg/ha de N, de 14% e 81%, nos tratamentos sem e com FPB, respectivamente.

Na avaliação do H/S, foi verificado valor inferior em 4% no tratamento com o FPB, comparado ao sem o FPB, apenas para a ausência de N. Nos demais níveis de N foram verificados valores superiores no tratamento com o FPB, comparado ao sem FPB, em 37%, 60% e 69%, nos níveis de 150, 300 e 450 kg/ha de N, respectivamente, na equação de regressão. Entre a ausência de N e o nível de 450 kg/ha de N, houve aumento do H/S de 6% e 86%, nos tratamentos sem e com FPB, respectivamente.

Houve efeito apenas para o FPB ($P < 0,05$) no H e I, não sendo observado efeito para o N ($P > 0,05$). Houve interação apenas para o H, sendo quadrática para o tratamento com o FPB e não significativa para o tratamento sem o FPB.

Para o monômero H, foi verificada redução de 56%, 57%, 74% e 84% quando comparado o tratamento com FPB ao sem FPB, nos níveis de 0, 150, 300 e 450 kg/ha de N, respectivamente. Neste, houve redução também com o aumento dos níveis de N, sendo observada a diminuição do H em 58%, quando comparado a ausência de N com a maior dose.

Na avaliação do monômero I, foi verificada redução de 85%, 99%, 98% e 98% quando comparado ao tratamento com FPB ao sem FPB, nos níveis de 0, 150, 300 e 450 kg/ha de N, respectivamente.

Na análise da CB coletada no inverno, houve efeito do N e do FPB ($P < 0,05$) para o I, G, S e H+G+I+S (Tabela 5), havendo interação apenas para o I e G, sendo linear negativa ($P < 0,05$) em ambos no tratamento sem o FPB, e linear positiva ($P < 0,05$) para ambos no tratamento com o FPB.

Foram observados valores inferiores para o I no tratamento com FPB, em comparação ao sem o FPB, sendo 99%, 98% e 96% inferiores nos níveis de 150, 300 e 450 kg/ha de N, respectivamente, na equação de regressão. No tratamento sem o FPB, houve redução de 14% do I com o aumento dos níveis de N, comparando a ausência e a maior dose de N. No tratamento com o FPB, houve aumento do I, comparando as mesmos níveis, de 338%.

Efeito semelhante foi observado no monômero G, que apresentou teores inferiores no tratamento com o FPB em relação ao sem FPB, de 90%, 89% e 87% nos níveis de 150, 300 e 450 kg/ha de N, respectivamente, na equação de regressão. Quando avaliado o efeito do N, no tratamento sem o FPB houve redução de 9% do G com o aumento dos níveis de N, comparando a ausência e a maior dose de N, enquanto no tratamento com o FPB houve aumento do G, comparando as mesmos níveis, de 13%.

Na avaliação do monômero S, foram observados teores 89%, 84% e 86% inferiores no tratamento com o FPB, comparado ao sem o FPB, nos níveis de 150, 300 e 450 kg/ha de N, respectivamente. Semelhantemente aos monômeros I e G, o S apresentou redução de 7% no tratamento sem o FPB com o aumento dos níveis de N, e aumento de 11% no tratamento com o FPB.

Os monômeros totais H+I+G+S apresentaram valores inferiores no tratamento com o FPB, comparado ao sem o FPB, em 90%, 87% e 87%, nos níveis de 150, 300 e 450 kg/ha de N, respectivamente. Houve redução também no tratamento sem o FPB, entre a ausência de N e o nível de 450 kg/ha de N, de 8%, e aumento no tratamento com o FPB de 15%.

Houve efeito apenas para o FPB ($P < 0,05$) no H e H/S, não sendo observado efeito para o N ($P > 0,05$) e não havendo interação. No monômero H foram verificados teores 91%, 90% e 88% inferiores para o tratamento com o FPB, comparado ao sem o FPB, nos níveis de 150, 300 e 450 kg/ha de N, respectivamente. Na avaliação do H/S houve redução de 0,4% e 5% nos níveis de 150 e 450 kg/ha de N, respectivamente, comparando o tratamento com FPB e sem FPB. No nível de 300 o valor de H/S no tratamento com o FPB foi 22% superior ao valor observado no tratamento sem o FPB.

DISCUSSÃO

Compreende-se que há variação entre o conteúdo dos monômeros G, S e H na composição da lignina entre diferentes espécies, tipos celulares e/ou tecidos de uma mesma planta. Contudo, Raes et al. (11) e Harrington et al. (12) sugerem que há uma série de evidências que demonstram que os mecanismos envolvidos na lignificação são conservados entre estas espécies ou estruturas.

O monômero I (isovanilina) foi o que apresentou menores teores, em todos os tratamentos, havendo contudo a sua diminuição com os tratamentos com FPB tanto no CB quanto na LF. Akin e Chesson (13) descreveram que a lignina rica em monômeros S (siringaldeído e o ácido siríntrico) é mais facilmente degradada do que aquelas ricas em monômeros I, ou núcleos guaiacólicos (vanilina, ácido vanílico e ácido ferúlico).

Lopez-Malo et al. (14), em pesquisa sobre a concentração de vanilina (350 a 1200 ppm) durante o crescimento de *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus ochraceus* e *Aspergillus parasiticus*, descobriram que a vanilina pode ser utilizada como agente antimicrobiano, prevenindo a degradação de alimentos por fungos.

Fitzgerald et al. (15), analisando o efeito da vanilina sobre o crescimento de três tipos de leveduras (*S. cerevisiae*, *Z. bailii* e *Z. rouxii*) sugeriram que o efeito antimicrobiano da vanilina pode estar relacionado aos processos vitais da célula, podendo ser pela inibição das enzimas oxi-redutases ou das vias que geram os cofatores reduzidos necessários para estas enzimas.

De acordo com Kiyota et al. (16), ligninas com maior quantidade de monômeros G possuem mais ligações recalcitrantes, como 8-5, 5-5 e 5-O-4. Em contrapartida, ligninas ricas em monômeros S são menos interligadas e menos recalcitrantes à hidrólise (16). Isto indica, conforme observado nos resultados, que menores teores do monômero G são encontrados quando a adubação é maior, na LF e no período do verão e com a utilização do fungo, tornando a hidrólise mais fácil e, portanto, liberando maior teor de celulose.

De modo geral, foi observado maior conteúdo de monômero G no verão, tanto na LF e CB. Nesta estação, as estruturas avaliadas podem ser consideradas mais jovens do que as estruturas avaliadas no inverno, uma vez que houve maior intervalo entre cortes na estação seca. Ainda, este fator pode ser atribuído a dinâmica do processo de polimerização dessas estruturas, que rapidamente são incorporadas em pequenos

oligômeros e imobilizadas na parede celular. Além disso, nas regiões imaturas ou mais jovens, os dímeros que apresentam ligações 8-5 com os monômeros G também foram mais frequentes.

Aparentemente, unidades S tendem a ser mais raras que G, sendo que sua presença foi reduzida pela aplicação do N. Segundo dados da literatura, unidades S são principalmente encontradas em paredes secundárias (12), e tendem a ser mais abundantes em estruturas mais maduras. Os resultados desta pesquisa sugerem que adubação nitrogenada e FPB possivelmente proporcionaram diminuição na polimerização da lignina.

Saliba et al. (17) demonstrou que os grupamentos guaiacílicos (G) influenciaram mais na degradação da parede celular que os grupamentos siringílicos (S) em estudos de degradação, utilizando palhas de milho e de soja.

De acordo com Klock et al. (18), a relação S/G é a quantidade de unidades derivadas dos alcoois sinapílico (monômeros siringila) em relação ao conteúdo de álcool coniferílico (monômeros guaiacila) da lignina. Uma vez que o monômero S é menos recalcitrante, apresentando uma estrutura mais reativa, acredita-se que plantas com alta relação S/G sejam mais fáceis de deslignificar.

Tanto na LF quanto no CB o tratamento sem FPB foi o que obteve os menores valores de S/G, comportamento não desejável, pois dificulta o processo de deslignificação, uma vez que a lignina se encontra mais condensada (19). Pode-se inferir que a menor relação S/G acarreta em maior dificuldade de deslignificação e, portanto, menor degradação da parede celular.

O efeito dos níveis de nitrogênio no CB no verão, na avaliação da relação S/G, tanto na ausência de FPB quanto com a presença do mesmo, aumentou sua relação a medida que se aumentaram os níveis de N. Isto pode estar relacionado principalmente a predominância de CB jovens tanto em função do clima quanto da adubação, que promovem aceleração do crescimento e menor acúmulo de material lignocelulósico. Ainda, o aumento dos níveis de nitrogênio promove maior desenvolvimento do FPB, ocasionando assim maior degradação do material lignocelulósico, por causa do aumento da produção das enzimas lignocelulósicas como manganês peroxidase e lacase.

No somatório dos monômeros (H+I+G+S) destaca-se a grande redução dos mesmos com a utilização do FPB tanto na LF como CB. Fica evidente que a utilização deste pré-tratamento no capim-tanzânia é eficiente para reduzir os teores totais dos

monômeros. Observa-se na tabela 5 que o somatório dos monômeros (H+I+G+S) do CB reduziu até valores próximos ou menores que a LF no verão com a utilização do FPB em todos os níveis de nitrogênio utilizados, melhorando assim a qualidade da fibra do CB, que é um insumo muitas vezes rejeitado pelo animal. Esse mesmo resultado foi observado na LF, o que torna LF e CB praticamente iguais no teor de monômeros.

Alguns estudos têm mostrado que os monômeros H, G, S e ligninas possuem efeitos semelhantes no que se refere a degradação da parede quando outros fatores da parede celular são mantidos constantes (20). Portanto, alterando composição S/G por si só provavelmente não altera apenas a digestibilidade, mas o teor de lignina (21).

Esses resultados descortinam novas pesquisas para a utilização do FPB como pré-tratamento no manejo de pastagem e sua melhoria e eficiência na qualidade da forrageira. A utilização do fungo como pré-tratamento em forrageiras pode ser uma alternativa sustentável e economicamente viável para redução da proporção do material lignocelulósico na forrageira.

O aumento dos níveis de adubação nitrogenada tem efeito positivo para diminuição dos monômeros, principalmente quando utilizado o FPB, promovendo diminuição significativa do monômero G (guaiacil).

Provavelmente, maiores teores de S estão relacionados as mudanças no metabolismo feitas pelas forragens quando mantidas sob diferentes níveis de luz (22), que podem ser determinadas pelo genótipo, reguladas pelo nível de luminosidade a qual a forragem está submetida. Este fato ocorre geralmente com menor dose de nitrogênio, em que a arquitetura da folha e do dossel aumenta o sombreamento da planta.

A adubação nitrogenada sozinha promove redução nos teores totais dos monômeros da lignina, porém quando associada ao FPB, a redução é mais acentuada. No inverno, o capim-tanzânia apresentou maior quantidade de monômeros para o colmo+bainha, em comparação a lâmina foliar.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) Cutrim Junior, J.A.A.; Cândido, M.J.D.; Valente, B.S.M.; Carneiro, M. S. S.; Carneiro, H. A. V. Características estruturais do dossel de capim-tanzânia submetido a três frequências de desfolhação e dois resíduos pós-pastejo. *Revista Brasileira de Zootecnia* **2011**, 40, 489-497.

- (2) Austin, A.T., Ballare, C.L. Dual role of lignin in plant litter decomposition in terrestrial ecosystems. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* **2010**, 107, 4618-4622.
- (3) Abiven, S.; Recous, S.; Reyes, V.; Oliver, R.. Mineralisation of C and N from root, stem and leaf residues in soil and role of their biochemical quality. *Biology and Fertility of Soils* **2005**, 42, 119-128.
- (4) Martuscello, J.A.; Fonseca, D.M. Da; Nascimento Júnior, D. Do; Santos, P.M.; Cunha, D. De N.F.V. Da; Moreira, L. de M. Características morfogênicas e estruturais de capim-massai submetido a adubação nitrogenada e desfolhação. *Revista Brasileira de Zootecnia* **2006**, 35, 665-671.
- (5) Qinnghe, C.; Xiaoyu, Y.; Tiangu, N.; Cheng, J.; Qiugang, M. The screening of culture condition and properties of xylanase by white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Process Biochemistry* **2004**, 39, 561-1566.
- (6) Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA. *Sistema brasileiro de classificação de solos*. Rio de Janeiro, Ministério da Agricultura e do Abastecimento, **1999**, 412p.
- (7) Werner, J. C.; Paulino, V. T.; Cantarella, H.; *Forrageiras: recomendações de adubação e calagem para o estado de São Paulo*. 2 ed. Campinas, Instituto Agrônomo e Fundação IAC, **1996**. (Boletim técnico, 100) p. 263.
- (8) Vogel, H. J. A convenient growth medium for *Neurospora* (Medium N). *Microbial genetics bulletin* **1956**, 13, 42-43.
- (9) Ferrarese, M.L.L.; Zottis, A.; Ferrarese-Filho, O. Protein-free lignin quantification in soybean (*Glycine max*) roots. *Biologia* **2002**, 57, 541–543.
- (10) Dean, J. F. D. *Lignin analysis*. In *Methods in Plant Biochemistry and Molecular Biology*. Dashek WV (ed.). CRC Press: Boca Raton, **1997**. 215 p.
- (11) Raes, J.; Rohde, A.; Christensen, J. H.; Peer, Y. V.; Boerjan, W. Genome-Wide Characterization of the Lignification Toolbox in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **2003**, 133, 1051-1071.
- (12) Harrington, M.J., Mutwil, M., Barriere, Y. and Sibout, R. Molecular biology of lignification in grasses. *Advances in Botanical Research* **2012**, 61, 77–112.
- (13) Akin, D.C.; Chesson, A. Lignification as the major factor limiting forage feeding value specially in warm conditions. In: International Grassland Congress, 16. *Proceedings...* Nice: **1989**, p. 1753-1758.

- (14) Lopez-Malo, A.; Alzamora S. M.; Argai, A. Effect of vanillin concentration, pH and incubation temperature on *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus ochraceus* and *Aspergillus parasiticus* growth. *Food Microbiology* **1997**, 14, 117-124.
- (15) Fitzgerald, D.J.; Stratford, M.; Narbad, A. Analysis of the inhibition of food spoilage yeasts by vanillin. *International Journal of Food Microbiology* **2003**, 2708, 1-10.
- (16) Kiyota, E., Mazzafera, P., Sawaya, A.C.H.F. Analysis of soluble lignin in sugarcane by ultrahigh performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry with a do-it-yourself oligomer database. *Analytical Chemistry* **2012**, 84, 7015-7020.
- (17) Saliba, E. O. S.; Rodriguez, N. M.; Morais, S. A. L.; Piló-Veloso, D. Ligninas – métodos de obtenção e caracterização química. *Ciencia Rural* **2001**, 31, 5.
- (18) Klock, U; Muniz, G. I. B.; Hernandez, J. A.; Andrade, A. S. *Apostila de Química da Madeira*. 3.ed. Curitiba: UFPR, **2005**.
- (19) Gomes, F. J. B.; Gomes, A. F.; Colodette, J. L.; Gomes, C. M.; Souza, E.; Macedo, A. M. L. Influência do teor e da relação S/G da lignina da madeira no desempenho da polpação Kraft. *O Papel* **2008**, 69, 12, 95-105.
- (20) Grabber, J. H.; Ralph, J.; Hatfield, R. D.; Quideau, S. P-hydroxyphenyl, guaiacyl, and syringyl lignins have similar inhibitory effects on wall degradability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1997**, 45, 2530–2532.
- (21) Sewalt, V.J.H.; Ni, W.; Jung, H.; Dixon, R.A. Lignin impact on fiber degradation: increased enzymatic digestibility of genetically engineered tobacco (*Nicotiana tabacum*) stems reduced in lignin content. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1997**, 45, 1977-1983.
- (22) Moreira, G.R.; Saliba, E.O.S.; Maurício, R.M.; Sousa, L.F.; Figueiredo, M.P.; Gonçalves, L.C.; Rodriguez, N.M. Avaliação da *Brachiaria brizantha* cv. marandu em sistemas silvipastoris. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* **2009**, 61, 3, 706-713.

FIGURAS E TABELAS

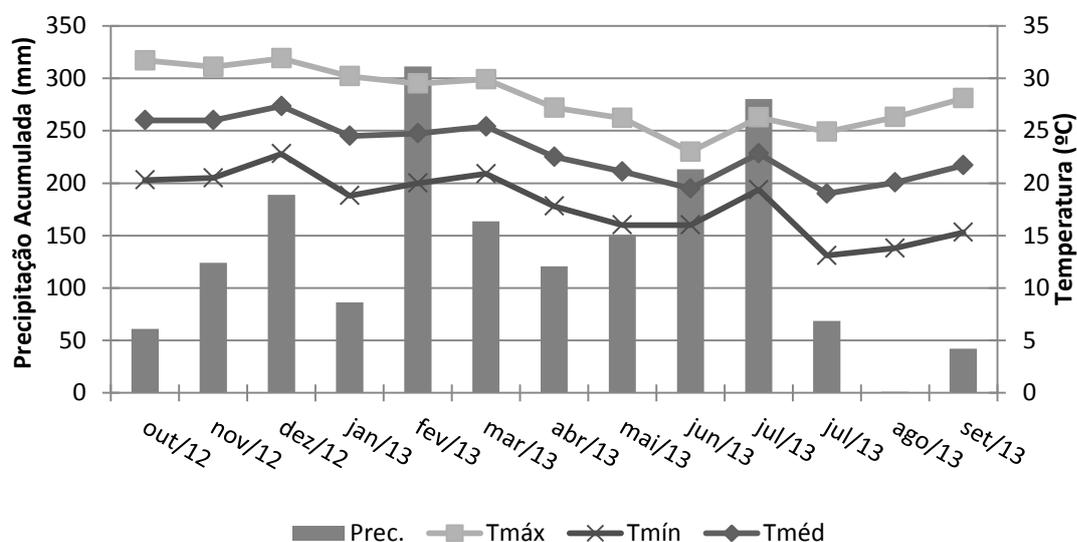


Figura 1: Dados climáticos de precipitação e temperatura: máxima, média e mínima durante o período experimental.

Tabela 1 – Componentes químicos do solo das pastagens de capim-tanzânia no início do período experimental.

| Trat. | Prof. cm | P ¹ mg/dm ₃ | C g/dm ₃ | pH H ₂ O | H+Al | Ca ² | Mg ² | K ¹ | SB ³ | CTC ⁴ | V ⁵ % |
|-------|----------|--------------------------------------|------------------------|------------------------|------|-----------------|-----------------|----------------|-----------------|------------------|---------------------|
| | | | | | | | | | | | |
| 1 | 0-20 | 10.23 | 13.3 ₃ | 6.00 | 2.27 | 1.89 | 0.60 | 0.12 | 2.60 | 4.87 | 53.4 ₁ |
| 2 | 0-20 | 8.09 | 11.3 ₂ | 5.90 | 2.45 | 1.20 | 0.47 | 0.08 | 1.75 | 4.20 | 41.6 ₁ |
| 3 | 0-20 | 5.34 | 10.1 ₂ | 5.70 | 2.45 | 1.38 | 0.43 | 0.07 | 1.87 | 4.32 | 43.3 ₁ |
| 4 | 0-20 | 4.89 | 9.02 | 5.80 | 2.36 | 1.89 | 0.64 | 0.04 | 2.56 | 4.92 | 52.0 ₈ |

Fonte: Laboratório Rural de Maringá. ¹Extraído por Melich; ²Ca e Mg - extraídos com KC 1mol L⁻¹; ³Soma de Bases; ⁴Capacidade de troca de cátions; ⁵Porcentagem de saturação por bases.

Tabela 2 – Teor dos monômeros hidroxifenil (H), isovanilina (I), guaiacil (G), siringil (S), H+I+G+S e relação S/G na lâmina foliar, para os níveis de nitrogênio e tratamentos com e sem fungo, no verão.

| Trat. | Níveis de nitrogênio (kg/ha/ano) | | | | Média | Equação Regressão | R ² |
|---------|----------------------------------|------------|------------|------------|---------|-------------------|----------------|
| | 0 | 150 | 300 | 450 | | | |
| H | | | | | | | |
| Sem FPB | 2,0706 bA | 2,3441 bA | 2,0362 bA | 1,9216 bA | 2,0931 | ns | ns |
| Com FPB | 0,3701 aA | 0,5871 aA | 0,4473 aA | 0,3281 aA | 0,4331 | ns | ns |
| I | | | | | | | |
| Sem FPB | 1,5017 bA | 1,9647 bA | 1,8857 bA | 1,7936 bA | 1,7824 | ns | ns |
| Com FPB | 0,0348 aA | 0,0481 aA | 0,0481 aA | 0,0089 aA | 0,0323 | ns | ns |
| G | | | | | | | |
| Sem FPB | 12,5930 bA | 10,8950 bA | 11,9281 bA | 10,2532 bA | 11,4173 | ns | ns |
| Com FPB | 3,3368 aA | 2,8500 aA | 3,2545 aA | 2,2975 aA | 2,9347 | ns | ns |
| S | | | | | | | |
| Sem FPB | 4,9013 bB | 4,6328 bAB | 4,4302bAB | 4,0615 bA | 4,5064 | ns | ns |
| Com FPB | 1,2777 aA | 0,9824 aA | 1,2364 aA | 1,0095 aA | 1,1265 | ns | ns |
| H+I+G+S | | | | | | | |
| Sem FPB | 21,0666 bA | 19,6388 bA | 20, 2804bA | 18,0300 bA | 19,8034 | ns | ns |
| Com FPB | 5,0196 aA | 4,4677 aA | 4,9736 aA | 3,6439 aA | 4,5267 | ns | ns |
| S/G | | | | | | | |
| Sem FPB | 38,910 aAB | 42,6888 bB | 37,1616 aA | 39,658 aAB | 39,6056 | ns | ns |
| Com FPB | 38,1814 aA | 34,4472 aA | 37,9573 aA | 43,9287 bB | 38,6286 | ns | ns |

Letras minúsculas diferem entre si nas colunas para tratamento com FPB; Letras maiúsculas diferem entre si nas linhas para níveis de N ($P < 0,05$). R² = Coeficiente de determinação; N = 0, 15, 300 e 450 kg/ha de N; ns= não significativo.

Tabela 3 – Teor dos monômeros hidroxifenil (H), isovanilina (I), guaiacil (G), siringil (S), H+I+G+S e S/G na lâmina foliar, para os níveis de nitrogênio e tratamentos com e sem fungo, no inverno.

| Trat. | Níveis de nitrogênio (kg/ha/ano) | | | Média | Equação Regressão | R ² |
|---------|----------------------------------|------------|-------------|---------|-------------------|----------------|
| | 150 | 300 | 450 | | | |
| H | | | | | | |
| Sem FPB | 2,0300 bA | 2,3766 bA | 2,2667 bA | 2,2244 | ns | ns |
| Com FPB | 0,3633 aA | 0,3866 aA | 0,4400 aA | 0,3966 | ns | ns |
| I | | | | | | |
| Sem FPB | 1,7733 bA | 2,1133 bA | 1,9766 bA | 1,9544 | ns | ns |
| Com FPB | 0,0366 aA | 0,0400 aA | 0,0366 aA | 0,0377 | ns | ns |
| G | | | | | | |
| Sem FPB | 11,2200 bA | 13,1300 bB | 11,626 bAB | 11,9922 | ns | ns |
| Com FPB | 2,3100 aA | 2,0733 aA | 2,0100 aA | 2,1311 | ns | ns |
| S | | | | | | |
| Sem FPB | 5,1900 bA | 6,2033 bB | 5,4266 bAB | 5,6066 | ns | ns |
| Com FPB | 1,2366 aA | 0,9766 aA | 1,0300 aA | 1,0811 | ns | ns |
| H+I+G+S | | | | | | |
| Sem FPB | 20,2100 bA | 23,8200 bB | 21,2933 bAB | 21,7744 | ns | ns |

| | | | | | | |
|---------|------------|------------|------------|---------|----|----|
| Com FPB | 3,9466 aA | 3,4733 aA | 3,5200 aA | 3,6466 | ns | ns |
| S/G | | | | | | |
| Sem FPB | 46,1500 aA | 47,2533 aA | 46,5800 aA | 46,661 | ns | ns |
| Com FPB | 53,6266 bB | 47,0866 aA | 51,266 aAB | 50,6600 | ns | ns |

Letras minúsculas diferem entre si nas colunas para tratamento com FPB; Letras maiúsculas diferem entre si nas linhas para níveis de N ($P < 0,05$). R^2 = Coeficiente de determinação; N = 0, 15, 300 e 450 kg/ha de N; ns= não significativo.

Tabela 4 – Teor dos monômeros hidroxifenil (H), isovanilina (I), guaiacil (G), siringil (S), H+I+G+S e S/G no colmo+bainha, para os níveis de nitrogênio e tratamentos com e sem fungo, no verão.

| Trat. | Níveis de nitrogênio (kg/ha/ano) | | | | Média | Equação Regressão | R^2 |
|---------|----------------------------------|------------|------------|------------|---------|---|-------|
| | 0 | 150 | 300 | 450 | | | |
| H | | | | | | | |
| Sem FPB | 3,71 bAB | 3,51 bA | 4,61 bB | 4,13 bAB | 4,00 | Y=N.S. | ns |
| Com FPB | 1,67 aB | 1,33 aAB | 1,40 aAB | 0,61 aA | 1,25 | Y=1,6146+0,00015Nns0,000005N ² | 0,87 |
| I | | | | | | | |
| Sem FPB | 1,7115 bA | 2,3378 bA | 1,7658 bA | 2,0757 bA | 1,9727 | ns | ns |
| Com FPB | 0,2561 aA | 0,0254 aA | 0,0260 aA | 0,0298 aA | 0,0843 | ns | ns |
| G | | | | | | | |
| Sem FPB | 21,8962 bB | 14,9664 bA | 17,9617 bA | 16,6567 bA | 17,8723 | Y=21,1837-0,0365N+0,00006N ² | 0,61 |
| Com FPB | 13,9793 aB | 5,3277 aA | 4,1596 aA | 2,8455 aA | 6,5780 | Y=11,7634-0,0230N | 0,79 |
| S | | | | | | | |
| Sem FPB | 8,7528 bB | 7,0431 bA | 7,3830bAB | 7,4392 bAB | 7,6545 | Y=8,6361-0,0112N+0,00002N ² | 0,84 |
| Com FPB | 5,8012 aB | 2,7435 aA | 2,7698 aA | 1,4179 aA | 3,1831 | Y=5,1516-0,0087N | 0,90 |
| H+I+G+S | | | | | | | |
| Sem FPB | 36,0772bB | 27,7682 bA | 31,730bAB | 30,307bAB | 31,4955 | Y=35,2092-0,0428N+0,00007N ² | 0,58 |
| Com FPB | 21,7147 aB | 9,4323 aA | 8,3577 aA | 4,9035 aA | 11,1020 | Y=18,8283-0,0343N | 0,82 |
| S/G | | | | | | | |
| Sem FPB | 39,92 aA | 47,11 aC | 41,12 aAB | 44,62 aBC | 43,19 | Y=41,0622+0,0238N - 0,00004N ² | 0,21 |
| Com FPB | 41,42 aA | 51,45 bB | 66,46 bC | 49,82 bB | 52,29 | Y=39,5949+0,1661N-0,0002N ² | 0,79 |

Letras minúsculas diferem entre si nas colunas para tratamento com FPB; Letras maiúsculas diferem entre si nas linhas para níveis de N ($P < 0,05$). R^2 = Coeficiente de determinação; N = 0, 15, 300 e 450 kg/ha de N; ns= não significativo.

Tabela 5 – Teor dos monômeros hidroxifenil (H), isovanilina (I), guaiacil (G), siringil (S), H+I+G+S e S/G no colmo+bainha, para os níveis de nitrogênio e tratamentos com e sem fungo, no inverno.

| Trat. | Níveis de nitrogênio (kg/ha/ano) | | | Média | Equação Regressão | R^2 |
|-------|----------------------------------|-----|-----|-------|-------------------|-------|
| | 150 | 300 | 450 | | | |

| H | | | | | | |
|---------|------------|------------|------------|---------|--------------------|------|
| Sem FPB | 2,7700 bA | 3,2433 bA | 3,0066 bA | 3,0055 | ns | ns |
| Com FPB | 0,2566 aA | 0,3300 aA | 0,3600 aA | 0,3155 | ns | ns |
| I | | | | | | |
| Sem FPB | 1,8500 bB | 2,0633 bB | 1,4033 bA | 1,7722 | Y=2,2188ns0,0011N | 0,44 |
| Com FPB | 0,02333 aA | 0,0200 aA | 0,0300 aA | 0,0244 | Y=0,0177+0,0002N | 0,43 |
| G | | | | | | |
| Sem FPB | 12,3700 bA | 13,6300 bB | 11,1700 bA | 12,3900 | Y=13,5900ns0,0040N | 0,24 |
| Com FPB | 1,4000 aA | 1,7233 aA | 1,6000 aA | 1,5744 | Y=1,3744+0,0006N | 0,38 |
| S | | | | | | |
| Sem FPB | 8,6733 bB | 8,9333 bB | 8,0266 bA | 8,5444 | ns | ns |
| Com FPB | 0,9766 aA | 1,3866 aA | 1,0866 aA | 1,1500 | ns | ns |
| H+I+G+S | | | | | | |
| Sem FPB | 25,663bAB | 27,8666 bB | 23,6000 bA | 25,7100 | ns | ns |
| Com FPB | 2,6666 aA | 3,4600 aA | 3,0733 aA | 3,0666 | ns | ns |
| S/G | | | | | | |
| Sem FPB | 70,1733 bA | 65,6433 aA | 71,8700 bA | 69,2289 | ns | ns |
| Com FPB | 69,8500 aA | 80,5000 bB | 67,9533 aA | 72,7677 | ns | ns |

Letras minúsculas diferem entre si nas colunas para tratamento com FPB; Letras maiúsculas diferem entre si nas linhas para níveis de N ($P < 0,05$). R^2 = Coeficiente de determinação; N = 0, 15, 300 e 450 kg/ha de N; ns= não significativo.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O nitrogênio proporcionou melhoria nos componentes químicos em geral quando se utilizou a maior dose de nitrogênio (450 kg ha^{-1}) na época das águas, porém se observou que a lignina por si só não é o único fator que diminui a qualidade da lâmina foliar e do colmo+bainha.

Deve-se atentar ao arranjo estrutural da parede celular e a influência dos fatores abióticos que influenciam diretamente a utilização do nitrogênio pela forrageira.

As propriedades biomecânicas foram influenciadas pela adubação nitrogenada, proporcionando uma forragem mais tenra, e se observou que a ausência de adubação dificulta a colheita de forragem, principalmente na estação seca.

A correlação da tensão com as variáveis bromotológicas possibilitou observar a importância destas variáveis biomecânicas no contexto do manejo de pastagens tropicais, estando intimamente relacionadas à escolha do animal e à colheita do capim.

Assim como a composição química, os componentes morfoanatômicos demonstraram efeito positivo a utilização da adubação nitrogenada, principalmente no que diz respeito às estruturas de digestibilidade baixa e/ou limitada. Pode-se observar que as estruturas anatômicas apresentam correlação também com os parâmetros biomecânicos, podendo ser utilizadas para avaliação da qualidade da pastagem.

As características químicas, biomecânicas e anatômicas se relacionam, sugerindo que novas pesquisas, envolvendo as três áreas, sejam importantes para melhoria das propriedades nutricionais da forrageira. São necessários, ainda, novos estudos acerca das propriedades biomecânicas de forrageiras no Brasil.

O *Pleurotus ostreatus* (fungo da podridão branca) apresentou resultados significativos para melhoria da qualidade do capim-tanzânia, principalmente no que diz

respeito à digestibilidade, tanto na lâmina foliar como colmo+bainha, tornando interessantes mais investigações sobre esse fungo como pré-tratamento para forrageiras, em especial na época das secas, pela perda da qualidade da forragem.

Através do estudo da composição monomérica da lignina, pode-se concluir que o FPB tem ação direta na lignina, modificando a estrutura e a qualidade do material, melhorando a digestibilidade. Por ser um material atóxico, o fungo da podridão branca pode ser utilizado de forma segura na alimentação animal.

ANEXO 1 - FORMATAÇÃO DA REVISTA SCIENTIA AGRICOLA JOURNAL

SUBMISSÃO DO MANUSCRITO

Comece a submissão revendo na íntegra as Instruções aos Autores para garantir que o artigo esteja de acordo com as normas da Scientia Agricola. Uma vez que estas páginas são atualizadas periodicamente, recomenda-se fortemente que o autor leia as normas antes da submissão, mesmo que já tenha feito isso anteriormente.

Os autores devem submeter os manuscritos pelo sistema on-line, acessando o site <http://www.scielo.br/sa>, clicando em "submissão online".

Manuscritos deverão ser organizados em MS Word para Windows ou num software compatível. Evite o uso de recursos de processamento de texto automatizados, tais como listas e numeração, cabeça e formatação subtítulo, links internos, ou estilos.

Palavras-chave só deverão ser adicionadas nos casos nos quais os autores acreditem que uma palavra que não está no título ou no resumo ajudará na indexação do manuscrito.

Ao submeter um artigo, os autores devem recomendar cinco revisores qualificados que são especialistas na área de conhecimento abordada, e fornecer os email e filiação. No mínimo dois dos revisores devem ter nacionalidade distinta do autor correspondente. Revisores oriundos da mesma instituição do autor correspondente devem ser evitados.

CARTA DE APRESENTAÇÃO (deve ser escrita em inglês)

Uma carta declarando que todos os autores concordam com a submissão do manuscrito para a Scientia Agricola e conceder uma licença exclusiva para publicar o artigo submetido na forma impressa ou eletrônica, incluindo fotografias que possam ser submetidas e selecionadas para a capa da revista, deve ser apresentada com o manuscrito (comentários para o editor ou arquivo suplementar). O conteúdo da carta deve apresentar a garantia de que o artigo é original, não foi publicado anteriormente e não está sendo considerado para publicação na sua forma final em outro lugar, tanto em veículo impresso quanto eletrônico.

A publicação de um resumo ou resumo expandido em um evento científico não é considerada publicação anterior da pesquisa. Entretanto, resultados de pesquisas publicados anteriormente como trabalhos completos em eventos científicos não serão aceitos.

Os autores devem incluir cinco destaques (máximo de 100 caracteres incluindo espaços para cada destaque) explicando a importância do trabalho e como e porque os destaques principais se relacionam com o escopo da revista.

ESTILO DO MANUSCRITO

Defina o significado das abreviaturas na primeira vez que forem citadas no resumo e no texto, e novamente nas tabelas e figuras. Uma vez que uma abreviação for citada, ela deve ser usada em todo o manuscrito, exceto no início de uma frase.

O nome latino ou nomenclatura binomial (ou trinomial) e autoria deve ser utilizado quando mencionado pela primeira vez que se menciona todas as plantas, insetos, patógenos e animais.

Tanto o ingrediente ativo quanto o nome químico da substância de pesticidas devem ser inseridos quando mencionado pela primeira vez.

Identifique os solos utilizando a taxonomia de solos do USDA (<http://soils.usda.gov/technical/classification/osd/index.html>) até o segundo nível (subordem) ou até o quarto nível (subgrupo). A classificação da FAO também pode ser utilizada até o segundo nível. A tradução livre do nome e da classificação do solo não é permitida.

Utilize o Sistema Internacional de Unidades em todo texto.

Verifique os caracteres gregos e figuras cuidadosamente.

Certifique-se que exceto quando seguidos por unidades, números de um a dez sejam escritos por extenso. Para quantidades decimais <1, coloque um zero antes do ponto decimal.

Use ponto (.) como separador decimal.

Porcentagens devem ser expressas como números inteiros, por exemplo: 35% em vez de 35,4%, 48%, em vez de 47,5%, 79%, em vez de 78,9%.

Utilizar o formato potência negativa para notar e inter-relacionar unidades, e.g.: kg ha⁻¹; não inter-relacione unidades usando a barra vertical, e.g.: kg/ha.

Utilize um espaço simples entre as unidades, g L⁻¹, e não g.L⁻¹, ou gL⁻¹.

Use o sistema horário de 24 h, com quatro dígitos para horas e minutos: 09h00, 18h30.

As datas devem ser escritas: primeiro o dia, depois o mês e o por último o ano: 18 mar. 2000, 01 fev. 1987.

Abreviar os meses com mais de quatro letras: jan.; fev.; mar. etc.

PREPARAÇÃO DO MANUSCRITO

Texto e ilustrações submetidos à apreciação pelo corpo editorial devem ser escritos em língua inglesa, segundo as regras ortográficas e gramáticas norte-americanas.

Manuscritos devem ser organizados em um arquivo denominado documento principal e em arquivos separados contendo tabelas e figuras. MS Word ou software compatível devem ser utilizados para preparar o documento principal, fonte Times New Roman 12, 3.0 cm de margens e duplo espaço. Organize o documento principal na seguinte ordem: Página de rosto, Resumo (máximo de 250 palavras), Introdução (normalmente 20-30 linhas), Materiais e Métodos, Resultados, Discussão, Agradecimentos (opcional), Referências, e Legendas das Figuras.

O item Conclusão é opcional e, quando utilizado deverá vir após a seção de discussão. O item Resultados e Discussão podem ser combinados e, a conclusão pode ser incorporada à discussão.

O manuscrito deve ter um máximo de 30 páginas (papel A4); linhas e páginas devem ser numeradas sequencialmente, ilustrações e tabelas inclusive.

Tabelas e Figuras devem ser carregadas no sistema em arquivos separados, somente uma tabela ou figura por arquivo.

Página de rosto:

Cada artigo deve conter uma página de rosto contendo o título (máximo de 15 palavras), os nomes completos dos autores, e afiliações completas em inglês.

Deverá ser fornecido um título abreviado de 40 caracteres ou menos (além do título do trabalho completo).

Os autores devem selecionar uma categoria: Engenharia Agrícola; Microbiologia Agrícola; Agrometeorologia; Ciência Animal e Pastagens; Biometria; Modelagem e Estatística; Fitotecnia; Ecologia; Entomologia; Ciência e Tecnologia de Alimentos; Ciências Florestais; Genética e Melhoramento de Plantas; Fitopatologia; Fisiologia Vegetal e Bioquímica; Solos e Nutrição de Plantas; Zoologia.

O autor correspondente deve ser identificado(a) com um asterisco e um endereço eletrônico institucional do autor(a) correspondente deve ser informado.

A afiliação/endereço funcional dos autores(as) deve ser informado da maneira mais detalhada possível.

O autor correspondente deverá assumir a responsabilidade plena pelo manuscrito, incluindo o cumprimento das políticas do periódico, e será o contato prioritário com a revista. O autor que submete o artigo pode assumir essa função se indicado na carta de apresentação.

Por favor, forneça afiliação institucional de cada autor no momento que a pesquisa foi realizada.

Se um autor se mudou para uma instituição diferente, o novo local pode ser indicado em nota de rodapé. Números sobrescritos separados por vírgulas (sem espaços) são utilizados para filiações dos autores. Símbolos sobrescritos separados por vírgulas (sem espaços) são utilizados para notas de rodapé do autor. Use na ordem §, ¶, §§, ¶¶.

Submissão de imagem para a capa

A capa da Scientia Agricola poderá utilizar uma imagem representativa de um artigo publicado no volume. Os autores são convidados a submeter imagens para a capa que tenham apelo visual e que sejam cientificamente interessantes. As imagens devem ter alta resolução (300dpi) e medir 17 x 17cm. As imagens para a capa podem ser de organismos, habitat, montagens de diferentes imagens, diagramas, mapas ou dados. As ilustrações não precisam estar nos artigos, devem sim ser representativas do trabalho publicado. As imagens devem ser originais e os autores cedem os direitos de publicação exclusivamente a Scientia Agricola. Carregue o arquivo contendo a imagem como um arquivo suplementar junto com um arquivo texto que deverá conter uma breve descrição de um parágrafo da imagem relacionando-a com o manuscrito publicado. Se o autor não tiver os direitos autorais da imagem submetida, ele é responsável por obter a permissão necessária para poder utilizá-la.

Tabelas/Figuras

Tabelas:

Devem ser numeradas sequencialmente com algarismos arábicos, e geradas com a ferramenta "Tabela" do MS Word ou MS Excel (manuscritos contendo tabelas coladas como figuras serão devolvidos aos autores).

Os títulos das tabelas devem aparecer imediatamente acima do corpo das tabelas.

Numere figuras e gráficos sequencialmente usando algarismos arábicos.

Figuras/Gráficos:

Gráficos devem ser gerados em MS Excel.

Fotografias devem ser apresentadas como arquivo "tagged image format [TIFF]", 300 DPI.

Numere figuras e gráficos sequencialmente na ordem em que aparecem no texto.

As figuras devem fornecer informações suficientes para que o leitor possa compreendê-las sem uma contribuição significativa do texto.

Para as figuras que contêm mais de um painel, designar os painéis com letras maiúsculas (sem parênteses e sem pontos após as letras) no canto superior esquerdo de cada painel, se possível.

As palavras utilizadas nas figuras devem ser iguais as utilizadas no manuscrito no que diz respeito à capitalização, itálico e símbolos.

INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

Manuscritos que avaliem a bioatividade de produtos químicos e/ou biológicos, incluindo reguladores do crescimento, em insetos, ácaros, fungos, bactérias, nematóides e plantas daninhas, não serão objeto de análise para publicação na Scientia Agricola.

Manuscritos que avaliem melhorias ou protocolos de cultura de tecidos baseados no teste de aditivos, explantes ou condições de crescimento, ou ainda que falhem em mostrar uma melhoria substancial que não poderia ser deduzida da literatura existente, não serão considerados para publicação na Scientia Agricola.

Os manuscritos devem obedecer aos critérios estabelecidos nos Códigos Internacionais de cada área.

Os conceitos e opiniões contidos nos artigos são de exclusiva responsabilidade dos(as) autores(as).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Scientia Agricola não encoraja os autores a citar referências que não são facilmente acessadas e compreendidas pelos leitores. A citação de resumos de congressos, artigos técnicos, dissertações e teses não é permitida. Favor reavaliar a necessidade de referências em português e outra língua além do inglês, minimizando-a o máximo possível. Quando essas referências forem extremamente necessárias, os autores devem

providenciar uma explicação por mantê-las no texto. Tais referências devem ser citadas em inglês, mantendo a citação na língua original no final da referência.

Scientia Agricola não recomenda que os autores citem análises estatísticas ou soluções de softwares como referências. Essas ferramentas devem ser mencionadas no texto (Material e Métodos) ao incluir a análise específica e o nome do software, sua versão e/ou ano de lançamento. Por exemplo, "... a análise estatística foi realizada utilizando o PROC NLIN no SAS (Statistical Analysis System, versão 9.2)".

As referências e citações para artigos da Scientia Agricola serão formatadas utilizando o estilo de formato mínimo 'autor, ano' ou 'nome (ano)'. Checar se todas as citações no texto constam da lista de referências bibliográficas. Os exemplos:

1. Apenas um autor: Reichardt (2000) ou (Reichardt, 2000).
2. Dois autores: Fiorio and Demattê (2009) ou (Fiorio and Demattê, 2009).
3. Três ou mais autores: Rosso et al. (2009) ou (Rosso et al., 2009).
4. Organizar as referências em ordem alfabética e cronologicamente dentro de parênteses, e use (;) ponto e vírgula para separar citações múltiplas dentro de parêntesis, por exemplo: (Boleli, 2003; Boerjan, 2006; Muraroli and Mendes, 2003).
5. Identificar múltiplas citações 'mesmo autor, mesma data' com a ajuda de letras minúsculas, por exemplo: (Cyrino, 2004a, b).
6. Usar o estilo "autor-ano" para ordenar a lista de referências, e: (i) abreviar os primeiros e segundos nomes dos autores, mas nenhuma outra palavra; (ii) usar letras maiúsculas para todos os acrônimos, isto é, quando o autor for uma organização; (iii) utilizar letras maiúsculas para a 1ª letra do sobrenome e demais iniciais dos autores, que deverão ser separados por um ponto (.); (iv) separar autores por ponto-e-vírgula; (v) não usar "e comercial" (&) nas citações, nem na lista de referência; (vi) não usar caracteres grifados ou negritados para destacar qualquer parte da referência; (vii) usar letras maiúsculas na 1ª letra dos títulos de livros e de periódicos; (viii) não usar vírgula (,) para separar o título e o volume do periódico; (ix) separar os números de volume do periódico das páginas por dois pontos (:); (x) usar os números completos das páginas; (xi) separar os números de página por um traço (-); (xii) separar os grupos de páginas por uma vírgula se o artigo foi publicado em páginas descontínuas; (xiii) indicar o número da edição de um livro ou manual como "2ed", por exemplo; (xiv) sobre livros e manuais, indicar os editores ou a editora antes de discriminar a localidade sede dos

editores ou da editora; (xv) separar os editores ou a editora da localidade por meio de uma vírgula (,); e (xvi) nestes casos, declarar os nomes da cidade, do estado e do país.

6.1 Revistas/Periódicos Científicos

Guillard, R.R.L.; Wangersky, P. 1958. The production of extracellular carbohydrates
__by some marine flagellates. *Limnology and Oceanography* 3: 449-454.

6.2 Livros

6.2.1 Livros com autores

Pais, I.; Jones Jr., J.R. 1998. *The Handbook of Trace Elements*. St. Lucie Press, Boca
__Raton, FL, USA.

6.2.2 Livros com editores/organizadores

Day, W.; Atkin, R.K., eds. 1985. *Wheat Growth and Modelling*. Plenum Press, New
__York, NY, USA.

6.2.3 Livros (e manuais) com organização/instituição como autor ou editora/organizadora

Association of Official Analytical Chemists - International [AOAC]. 2005. *Official
__Methods of - Analysis*. 18ed. AOAC, Gaithersburg, MD, USA.

6.3 Capítulo de Livro

Sharpley, A.N.; Rekolainen, S. 1997. Phosphorus in agriculture and its environmental
__implications. p. 1-53. In: Tunney, H.; Carton, O.T.; Brookes, P.C.; Johnston, A.E.,
__eds. *Phosphorus loss from soil to water*. CAB International, New York, NY, USA.

6.4 Fontes eletrônicas

6.4.1 Elementos necessários para listar citações disponíveis on-line:

A autoria, autor ou fonte. Ano. O título do documento da web ou página da web
__(isto é, título principal da página). [meio] (data de atualização). Disponível em:
__endereço completo para localizar o recurso (URL / endereço) [Accessed
__Sept 19, 1992]

6.4.2 Elementos necessários para listar publicações disponíveis on-line:

A autoria, autor ou fonte. Ano. O título do documento ou página da web. [meio]
__Produtor/Editor. Disponível em: endereço completo para localizar o recurso
__[Accessed Sept 19, 1992]

6.5 Listagem de referências não escritas em inglês

Fornecer o título em inglês e indicar a língua original de publicação da revista ao final da referência, como exemplo a baixo:

Baretta, D.; Santos, J.C.P.; Figueiredo, S.R.; Klauberg-Filho, O. 2005. Effects of
__native pasture burning and Pinus monoculture on changes in soil biological
__attributes on the Southern Plateau of Santa Catarina - Brazil. Revista Brasileira
__de Ciência do Solo 29: 715-724 (in Portuguese, with abstract in English).

Mingoti, A.S. 2005. Data analysis using multivariate statistics methods: an applied
__approach. = Análise de Dados Através de Métodos de Estatística Multivariada:
__uma abordagem aplicada. Editora UFMG, Belo Horizonte, MG, Brazil (in
Portuguese).

ENCAMINHAMENTO DOS ARTIGOS

Os manuscritos devem ser submetidos pelo sistema on-line, acessando o site <http://www.scielo.br/sa>, clicando em "submissão online".

Por favor, leia a lista de checagem de conformidade antes de submeter o seu manuscrito.

ANEXO 2 - FORMATAÇÃO DA REVISTA AGRICULTURAL SCIENCE

The title should be in sentence case, 14pt, and the title, short title, author names and affiliations and indication of the corresponding author must be saved in a separate file from the main text as a title page or front page

Short title: This must not be longer than 50 characters including spaces

A. B. SURNAME¹, C. D. SURNAME¹, E. F. SURNAME² AND G. H. SURNAME³

¹Affiliations must be indicated after each name using superscript numbers, if the authors belong to different institutions

²Affiliations should be written below the author names in italics and the superscript number, if applicable, should appear (not in italics) at the beginning of each different affiliation

³Each affiliation should begin on a new line. The corresponding author must be denoted by an asterisk and the following should be added:

* To whom all correspondence should be addressed. Email: xxxxxx@xxxx

SUMMARY

Please set your language to English (UK), but please note that many words ending in –ise should be spelled –ize, such as fertilize, fertilizer, minimize, hypothesize, etc. The Summary should not appear in the title page file, only in the file with the Introduction, Results, etc. First level headings should be in capital letters, left-aligned and not bold: you can use Heading 1 in this template. Note: we use SUMMARY, not Abstract. Text should be fully justified, not left-aligned, and double-spaced throughout. The Summary should be a short description of the work, with the main findings. Abbreviations should be kept to a minimum and must be explained at first mention. P values should not be included in the Summary. The Summary should not be written in italics.

INTRODUCTION

This should be the next section and may be several paragraphs long. Note that in each section or sub-section the first line should NOT be indented but the first line of

subsequent paragraphs within that section or sub-section SHOULD (see next paragraph). No blank lines should be left between paragraphs within a section, but one blank line should be left between the end of one section/subsection and the heading of the next.

This section should give the background to the work, your reasons for undertaking it and the objectives of the current paper.

This section will normally include several references: all references must be cited in the text with the surname of the authors and the date. Where there are 2 authors, both surnames must appear: Surname1 & Surname2 – we do not use ‘and’. Where there are 3 or more authors, cite as Surname1 et al. There should be no commas and et al. should be in italics.

Use of brackets depends on the context, for instance ‘Surname1 & Surname2 (year) used...’ or ‘according to previous papers (Surname1 et al. year)’. Where several references are cited together, they should be arranged in chronological order first, and then if necessary in alphabetical order according to the first author. Where you have two or more references with the same author(s) and year of publication, they should be designated as a, b, c, etc. Each reference should be separated from the next by a semi-colon, but if you have two citations for the same authors at the same place, cite the authors only once and list both/all publication dates separated by a comma: (FirstRef1 et al. 1995; SecondRef1 & SecondRef2 2001; ThirdRef1 et al. 2001; FourthRef1 et al. 2004a, b).

MATERIALS AND METHODS

Delineamento experimental e preparação do solo

Level 2 headings, or sub-headings, should have an initial capital and be left-aligned

It is often helpful to format the paragraph style for level 2 headings so that there is a larger space after them, to differentiate longer headings from the following text; you can use Heading 2 in this template.

Level 3 headings

Initial capital and italics for level 3 headings.

You can use Heading 3 in this template for level 3 headings. None of the headings should be in bold and headings should not be numbered.

For crops papers, please provide the latitude, longitude and altitude of the experimental site. Latitude and Longitude should be given in degrees and minutes (seconds are not required), not decimal coordinates, and altitude in metres above sea level, written as 'xx m asl': (aa°bb' N, xx°yy' E, xxx m a.s.l.).

All papers must be written in the third person, e.g. 'it was found that', not 'we found'. You must not use 'this/our' paper/study/work, etc. when referring to your work; use 'the current' instead, throughout the whole paper. The Summary, Materials and Methods, and Results sections should also be in the past tense.

We do not use -1 for 'per', and we use a lower case l for litre, not upper case. So, for example we would NOT write 20 mgL-1 but 20 mg/l, and mg/kg not mg kg-1. Similarly, 'per square metre' would be written as /m², not m-2

Please keep abbreviations to a minimum, and ensure that all abbreviations (including chemical symbols and formulae such as N for nitrogen and P₂O₅) have been explained at first mention (in the Summary, if applicable, and again at first mention in the text). We do not allow an explanatory paragraph at the beginning of the paper to explain abbreviations. However, please note that we use Fig. or Figs when referring to Figures in the text, and these do not need explained. The only exception is where this is at the start of a sentence: sentences must not begin with an abbreviation so the full word must be used there.

Wherever you list equipment that has been used, please state the make, model, and city and country of origin in brackets.

We avoid the use of % in most cases, other than where you are describing a relative change in a response (such as 'increased by 10%' or 'a reduction of 2.5%'). For example, we would not say "85-90% of the area". We would use proportion in that case; in many other cases, such as for concentrations, we would use g/kg or mg/g instead of %. Please check and change throughout the paper where necessary.

For crops papers, use recognized international codes for growth stages (GS) where applicable, i.e.

ZADOKS, J.C., CHANG, T.T. & KONZAK, C.F. (1974). A decimal code for the growth stages of cereals. *Weed Research* 14, 415-421.

or

BBCH (BIOLOGISCHE BUNDESANSTALT FÜR LAND-UND FORSTWIRTSCHAFT) (1997). Growth Stages of Mono-and Dicotyledonous Plants: BBCH Monograph. Berlin: Blackwell Wissenschafts-Verlag.

RESULTS

The Results should be in a separate section from the Discussion, unless you have a specific reason for writing them in the same one. You must make a case for this and it will be discussed with the Senior Editor.

Rather than using a blanket statement at the end of the Materials and Methods section, P values should be cited at the appropriate places in the Results, i.e. wherever mention is made of significant results. Please note that we use P, not p, P or p. Likewise, R² should be written as R² and r as r.

Results generally should not contain references.

DISCUSSION

This should draw together your results, present possible reasons for your findings, comparisons with earlier results from other authors, possible reasons for different results, and suggestions for future work. In general, Tables and Figs should not be cited in the Discussion section.

REFERENCES

The reference list should be formatted using a hanging indent (as this paragraph is) and no blank lines should be left between references. It must be in alphabetical order by the surname of the first author.

In order to format the list with a hanging indent, the easiest way is to highlight the whole list, then drag the lower half of the tab indicator on the ruler slightly to the right:

Ensure each reference is formatted as per the attached Instructions to Contributors: in particular, notice that journal titles are italicised and written in full, with no comma or full stop after it, and volume numbers are in bold.

AUTHOR NAMES SHOULD BE WRITTEN IN SMALL CAPS (YOU CAN USE HEADING 4 IN THIS TEMPLATE).

Volume and page numbers are separated by a comma and a space. The full page range is always given, i.e. write '675-680' instead of '675-80'. The surname of the last author is preceded with '&' – again, we do not use 'and' – and there is no comma after the initials of the last two authors. Issue numbers are generally not used, other than in exceptional circumstances where it is otherwise difficult to locate an article (for example in publications where every issue starts at page 1). For extracts from books, please give Editor names if available as well as the place of publication and the publisher.

Please make sure that every reference cited in the paper appears in the reference list, and vice versa.

If you wish to use Endnote, a style exists for this and can be found at <http://endnote.com/downloads/style/journal-agricultural-science>

Tables & Figures

Tables and Figs should not be presented in the main text, but should either come after the reference list or be submitted as separate files.

Each Table should be followed by a page break, so that each one starts on a new page, together with its title. Please do not use hard returns. Ensure that text wrapping is set to None, not Around. Table titles should be formatted as follows:

Table 1. The title should be in italics, other than Latin terms and should not have a full stop at the end

All abbreviations must be explained in a footnote. Any other footnotes required should be inserted using the following symbols, in this order: * † ‡ §

Tables and Figures should not contain asterisks, letters, etc. to denote statistical significance or significant differences or similarities. For Tables, you can write the P value in brackets after the relevant value rather than using asterisks, or if you have letters showing entries that are statistically different or similar, please add a row showing the S.E.M. or S. E. D., and D.F. They can often be removed from Figures, but if required a note can be added to the legend. If you use error bars on Figs you must explain what they are.

In general, you should not quote values to more than 2 or 3 decimal places, unless this is unavoidable. Usually, values of 10 or more can be rounded to integers or quoted to one decimal place. Standard errors **MUST** be quoted to one decimal place more than the means.

Where you have \pm in a table, you must state what the value after the \pm is, for example SE. Similarly you must explain what numbers in parentheses mean. This can be done either in the table title, or in a footnote.

All figure legends should be written on a sheet separate from the Figs themselves, in a Word file. If you are submitting your Figs in a Word document, the legends can be in the same file as long as they are on a separate sheet, preceding the Figures themselves. Each Figure must be on a separate sheet (i.e. parts a, b, etc if applicable should, if possible be on the same sheet but always separated from the next Figure with a page break) with 'Fig. 1.', 'Fig. 2.' etc. written at the bottom of the relevant page. If you are submitting Figs as tif files or similar, then the legends can appear on a separate sheet at the bottom of one of your Word files, either after the References or the Tables.

Please note that we charge for colour printing (currently £200 per figure), so you should give serious consideration to use of different line styles, hatching, etc. rather than colour. However, we have the option of presenting the Figs in black and white in the printed version but in colour online, with a note to alert readers, for no charge. Please let the Editorial Assistant know if you would like to take up this option (amsage@cambridge.org).

ANEXO 3 - FORMATAÇÃO DA REVISTA JOURNAL OF AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY

Scope, Policy, and Instructions for Authors

(Revised May 2014)

Contents (click on the topic) Submission of Manuscripts | Journal Scope | Manuscript Types | Ethics, Conflict of Interest | Author List | Editorial Peer Review Process | Manuscript Preparation – Title and Authorship – Abstract and Keywords – Introduction – Materials and Methods – Results and Discussion – Abbreviations and Nomenclature – Acknowledgment – References – Tables and Artwork – Table of Contents Graphics – Supporting Information – Currently Acceptable Word-Processing Packages – Word-Processing Details Revisions and Resubmissions | Journal Publishing Agreement | Proofs and Reprints | Reporting Specific Data

IMPORTANT MANUSCRIPT SUBMISSION REQUIREMENTS

Manuscripts and revised manuscripts must be submitted via the ACS Paragon Plus Web site (<http://paragonplus.acs.org/login>). E-mailed submissions and hardcopy submissions will not be processed. An overview of and complete instructions for the Web submission process are available at the ACS Paragon Plus Web site.

When submitting, please be aware of the following requirements.

- All manuscripts must be accompanied by a cover letter that includes an explanation of the manuscript's significance, including its originality, its contribution to new knowledge in the field, and its relevance to research in agricultural and food chemistry.
- The system requires authors to supply the names, e-mail addresses, and affiliations of at least four recommended reviewers. The recommended reviewers should be experts in the subject matter of the manuscript and not be anyone who is or has been a former adviser/advisee, colleague in the same institution, research collaborator, and/or coauthor of papers and patents or in any other way has a conflict of interest.
- The author's preference for manuscript category is indicated during the submission process. However, the final decision on the category under which the manuscript will be listed lies with the Editor.
- The manuscript abstract and text must appear in a single, double-spaced column; lines in the abstract and text must be numbered consecutively from beginning to end in a separate column at the left.

- All coauthors listed on the title page of the manuscript must be entered into the Paragon Plus System at step 2 in the manuscript submission process. Only one corresponding author is allowed for each manuscript in Paragon Plus. Additional corresponding authors may be designated on the manuscript title page.
- Authors selecting the Just Accepted manuscript option when submitting should be sure that the form of author and coauthor names as entered into the Paragon Plus System is identical to the form on the manuscript title page.
- References must be numbered in the order in which they appear in the text.
- All of the text (including the title page, abstract, all sections of the body of the paper, figure captions, scheme or chart titles and footnotes, and references) and tabular material should be in one file, with the complete text first followed by the tabular material.
- A separate conclusion section is not to be used. Conclusions should be incorporated into the results and discussion section.
- If the manuscript is one of a series of companion manuscripts that will be published sequentially, please describe the planned series in the cover letter, mentioning previously published parts and giving an estimate of when subsequent parts will be submitted.

Complete instructions for manuscript preparation and the Journal Publishing Agreement form are updated frequently and are available at the Journal's Web site. Please conform to these instructions when submitting manuscripts.

Authors whose manuscripts are published in Journal of Agricultural and Food Chemistry will be expected to review manuscripts submitted by other researchers from time to time.

JOURNAL SCOPE

The Journal of Agricultural and Food Chemistry publishes high-quality, cutting edge original research representing complete studies and research advances dealing with the chemistry and biochemistry of agriculture and food. The Journal also encourages papers with chemistry and/or biochemistry as a major component combined with biological/sensory/nutritional/toxicological evaluation related to agriculture and/or food. As a general rule, manuscripts dealing with herbal remedies or those testing specific compounds in cell-based assays related to disease states (e.g., "anticancer" activity) will

no longer be considered within the scope of the Journal and should be submitted elsewhere. Manuscripts describing properties of extracts, without detailing the chemical composition of the extracts responsible for the described properties, will generally not be accepted for review.

The Journal is organized into the following sections:

3

Agricultural and Environmental Chemistry: crop protection chemistry, addressing synthesis combined with testing of new materials, environmental behavior and fate, residues, and mechanism of effects on both target and nontarget organisms.

Analysis and Chemosensory Perception of Flavor: chemistry of flavor (i.e., smell, aroma, taste, texture, and color) of foods and associated with plant and animal production of foods.

Analytical Methods: new analytical method development using chemical, physical, and biological methods. When a manuscript describes the application of an existing method, even when modified, the category selected should be driven by the application (e.g., Agricultural and Environmental Chemistry, Analysis and Chemosensory Perception of Flavor, Bioactive Constituents and Functions, etc.).

Bioactive Constituents and Functions: identification and characterization of bioactive constituents (e.g., antioxidants and other phytonutrients and nutraceuticals) in foods and how they function to affect health status of consumers, including molecular nutrition aspects. Manuscripts describing work with traditional medicines, herbal remedies, etc., will not normally be considered. We also urge authors to evaluate bioactives in animal models or clinical human trials and not rely solely on cell-based or other in vitro assays.

Biofuels and Biobased Products: chemistry of biofuel and biobased products, including feedstocks, conversion, refining, waste utilization, disposal, and sustainability, and environmental emissions and effects associated with these processes.

Chemical Aspects of Biotechnology and Molecular Biology: processes and underlying chemical science involving classical and modern aspects of biotechnology applicable to food and agricultural systems; to include proteomic and genomic techniques applicable to measurement and evaluation in food production and metabolism.

Food and Beverage Chemistry/Biochemistry: chemistry and biochemistry associated with food and beverage production, processing, preparation, composition, packaging and storing, including both naturally occurring and added components.

Food Safety and Toxicology: chemical aspects of toxicology of crop protection, contaminants, and related chemicals and the design and action of chemically related processes that enhance food safety.

Targeted Metabolomics Applied to Agriculture and Food (see more details on p 18): applications of metabolomics as related to research topics in agriculture, food, and nutrition, in particular metabolite-targeted analysis and progress in the development of analytical platforms for metabolomics approaches.

4

MANUSCRIPT TYPES

Research articles must report original research that is expected to have a definable impact on the advancement of science and technology, incorporating a significant component of innovative chemistry. Originality will be documented by novel experimental results, theoretical treatments, interpretations of data, and absence of prior publications on the same/similar topics. Fragmentation of work into an incremental series of manuscripts is not acceptable.

Letters are manuscripts describing results deemed to be highly important and urgent in a field of research. Only manuscripts reporting complete research, as opposed to preliminary results, will be considered. The cover letter for these manuscripts must clearly describe why the results are timely and urgent enough to justify the Letters format. In addition, the abstract must also make this plain to the reader. If deemed appropriate by the editors for the format, these manuscripts will be subject to the normal, but expedited, peer review process.

Review articles will be considered that summarize information in a field in which the literature is scattered and/or treat published data or other information so as to provide a new approach or stimulate further research. Authors considering the preparation of a review should submit a synopsis to the Editor before submission to establish whether the manuscript will meet these guidelines.

Perspectives, which explore needs and opportunities in agricultural and food chemistry in a less technical format than a review article, will be considered. Authors should contact the Editor to outline the area to be covered before submitting a Perspectives manuscript. For an example, see *J. Agric. Food Chem.* 2008, 56, 7587–7592.

Comments related to published papers will be considered from readers if the correspondence is received within six months of the date of publication of the original

paper; the authors of the original paper will be given the opportunity to reply to such comments within two months, if they so desire. Both comments and replies should not exceed 1000 words each, including citations, and will be published consecutively in the same issue of the Journal after peer review. For examples, see *J. Agric. Food Chem.* 2007, 55, 7213–7214 and *J. Agric. Food Chem.* 2007, 55, 7215–7216; *J. Agric. Food Chem.* 2011, 59, 464–465 and *J. Agric. Food Chem.* 2011, 59, 466.

Symposia or Topical Collections. The Editor will consider publication of a series of manuscripts reporting or synthesizing original research that are presented in a symposium or otherwise clustered around a single topic. Prospective organizers should contact the Editor well in advance to determine whether the subject matter conforms to the Journal's goals, criteria, and available space and to obtain specific instructions for submission of the manuscripts. For an example, see *J. Agric. Food Chem.* 2008, 56, 5983–6184. Each manuscript will be subject to the normal peer-review process.

Additions/Corrections. Corresponding authors wishing to submit a correction to a paper already published in print should submit the item via the Paragon Plus Web site. In your cover letter, include the manuscript number of the paper to be corrected. In the correction document, include the full title of the original publication, all author names, the volume and page numbers of the print publication, the original manuscript number, and a brief description of the correction(s) needed. If a figure is to be corrected, please include the figure in the correction document. Please note that the Editor has final approval as to whether an addition/correction will be published.

5

ETHICS, CONFLICT OF INTEREST

Authors and coauthors are responsible for the integrity of their manuscripts. The Editor may impose a two year submission moratorium on authors and coauthors that are found to be in violation of the ethical guidelines.

Authors and coauthors should familiarize themselves by reading the entire Ethical Guidelines to Publication of Chemical Research, which is available at the ACS Publications Web site.

A statement describing any financial conflicts of interest or lack thereof is published with each manuscript. During the submission process, the corresponding author must provide this statement on behalf of all authors of the manuscript. The statement should describe all potential sources of bias, including affiliations, funding sources, and

financial or management relationships, that may constitute conflicts of interest (please see <http://pubs.acs.org/ethics>, ACS Ethical Guidelines). The statement will be published in the final paper. If no conflict of interest is declared, the following statement will be published in the paper: “The authors declare no competing financial interest.”

In publishing only original research, ACS is committed to deterring plagiarism, including self-plagiarism. ACS Publications uses CrossCheck's iThenticate software to screen submitted manuscripts for similarity to published material. Note that your manuscript may be screened during the submission process. Further information about plagiarism can be found in Part B of the Ethical Guidelines to Publication of Chemical Research.

AUTHOR LIST

During manuscript submission, the submitting author must provide contact information (full name, e-mail address, institutional affiliation and mailing address) for all of the co-authors. Because all of the author names are automatically imported into the electronic Journal Publishing Agreement, the names must be entered into ACS Paragon Plus in the same sequence as they appear on the first page of the manuscript. (Note that co-authors are not required to register in ACS Paragon Plus.) The author who submits the manuscript for publication accepts the responsibility of notifying all co-authors that the manuscript is being submitted. Deletion of an author after the manuscript has been submitted requires a confirming letter to the Editor-in-Chief from the author whose name is being deleted. For more information on ethical responsibilities of authors, see the Ethical Guidelines to Publication of Chemical Research.

EDITORIAL PEER REVIEW PROCESS

Peer review is used to help ensure the highest possible quality in published manuscripts. For a discussion of this, see “The Importance of Peer Review” by H. L. Wheeler and W. B. Wheeler, *J. Agric. Food Chem.* (Editorial) 2006, 54, 8983–8983. Scientists with expertise in the subject matter being treated will evaluate the manuscript for validity of the experimental design and results, originality, significance, and appropriateness to the Journal. The Editors may exercise their prerogative to decline a manuscript without external peer review if that paper is judged to be outside the scope of the Journal (lacks significant chemistry/biochemistry), poorly written or formatted, fragmentary and marginally incremental, or lacking in significance.

All manuscripts submitted are reviewed and handled by the Editor-in-Chief or assigned to one of the Associate Editors. The Associate Editor and Editorial Assistant are then responsible for the assigned manuscripts, including evaluating the content and format of the paper, selecting reviewers, monitoring the progress of the review process, evaluating the comments of reviewers

6

and forwarding them to the authors for their response, communicating ultimate acceptance or rejection to the corresponding author, and carrying out a final check of accepted manuscripts for appropriate format and style.

Typically, three reviewers are selected per paper on the basis of the subject matter, available expertise, and the Editor's knowledge of the field. Potential reviewers for each paper are identified by various means, including a computerized search of the subject area. Authors must submit the names and addresses (including e-mail addresses) of at least four potential reviewers who do not have conflicts of interest with the authors or manuscript content; however, the Editors are under no obligation to use specific individuals. Reviewers are normally asked to provide their assessments within two to three weeks. Anonymous copies of the reviews and the Editor's decision regarding the acceptability of the manuscript are sent to the corresponding author. If the reviewers' evaluations of the manuscript disagree, or if reviewer's and Editor's comments are not satisfactorily addressed by the authors, the Editor may reject the manuscript or select additional reviewers. These additional reviews are used by the Editor to assist in reaching the final decision regarding disposition of the manuscript.

The obligations of the Editors and Reviewers are outlined in the Ethical Guidelines. Aids for reviewers titled "A Guide to a Review" and "Components of a Manuscript to be Considered in a Review" are available at the Reviewer Information Web site (<http://pubs.acs.org/4authors>).

Just Accepted Manuscripts. Just Accepted manuscripts are peer-reviewed, accepted manuscripts that are published on the ACS Publications Web site prior to technical editing, formatting for publication, and author proofing—usually within 30 minutes to 24 hours of acceptance by the editorial office. During the manuscript submission process, authors can choose to have their manuscript published online as a Just Accepted manuscript. Authors choosing this option must ensure that all intellectual property/patent issues are resolved. To ensure rapid delivery of the accepted manuscript

to the Web, authors must adhere carefully to all requirements in the journal's Scope, Policy, and Instructions for authors. For further information, please refer to the Just Accepted FAQ, at <http://services.acs.org/pubshelp/passthru.cgi?action=kb&item=244>. Note that publishing a manuscript as Just Accepted is not a means by which to comply with the NIH Public Access Mandate.

ASAP Publication. Accepted manuscripts will be published on the "Articles ASAP" page on the Journal's Web site as soon as page proofs are corrected and all author concerns are resolved. Publication on the Web usually occurs within 4 working days of receipt of page proof corrections, and this can be anywhere from 2 to 6 weeks in advance of the cover date of the issue. Manuscripts assigned to a special issue often remain published ASAP for several months. Authors should take this schedule into account when planning intellectual and patent activities related to a manuscript. The date on which an accepted paper is published on the Web is recorded on the Web version of the manuscript and on the first page of the PDF version.

MANUSCRIPT PREPARATION

Manuscript Format. Manuscripts must be prepared using accepted word-processing software, and all parts must be double-spaced. All pages must be numbered consecutively starting with the title page and including tables and figures. Lines in the abstract and text should be numbered consecutively from beginning to end in a separate column at the left. Do not put line numbers on pages with tables or figures. A standard font, in a size of 12 points or greater, must be used. The Journal has a 20 typed page limit, not including references, tables, and figures. Authors must request approval to submit manuscripts exceeding 20 typed pages.

7

Standard American English usage is required. Authors who are not familiar with standard American English are urged to seek assistance; deficiencies in grammar may be a serious hindrance during the review process.

Assistance with English Language Editing. Authors may want to have their manuscripts edited professionally before submission to improve clarity. The ACS ChemWorx English Editing Service can assist you in improving and polishing the language in your manuscript. You can learn more about the services offered, at <http://es.acschemworx.acs.org>.

The ACS Style Guide (3rd ed., 2006; ISBN 0-8412-3999-1), available from Oxford University Press, Order Department, 201 Evans Road, Cary, NC 27513, provides a detailed treatment of the fundamentals of manuscript preparation. Refer to a current issue of the Journal for general style.

The style guide is also available at the Journal's Web site and through ACS ChemWorx. The various sections of the manuscript should be assembled in the following sequence:

Title and authorship (single page)

Abstract and keywords (single page)

Introduction

Materials and Methods (including Safety information)

Results/Discussion

Abbreviations Used

Acknowledgment

Supporting Information description

References

Figure captions

Tables

Figure graphics

Graphic for table of contents

TITLE AND AUTHORSHIP

The title, authorship, and institutional affiliations should be included on a single page.

Title. The title should be specific, informative, and concise. Keywords in the title assist in effective literature retrieval. If a plant is referred to in the title or elsewhere in the text by its common or trivial name, it should be identified by its scientific name in parentheses immediately following its first occurrence. This term should also be provided as one of the keywords. If trade names are mentioned, give generic names in parentheses.

Authorship. Be consistent in authorship designation on the manuscript and on all correspondence. First name, middle initial, and last name are generally adequate for correct identification, but omit titles. Give the complete mailing address of all institutions where work was conducted and identify the affiliation of each author. If the current address of an author is different, include it in a footnote on the title page. The name of the author to whom inquiries about the paper should be addressed must be

marked with an asterisk; provide the telephone and fax numbers and e-mail address of this correspondent.

ABSTRACT AND KEYWORDS

Abstract. Authors' abstracts are used directly for Chemical Abstracts. The abstract should be a clear, concise (100–150 words), one-paragraph summary, informative rather than descriptive, giving scope and purpose, experimental approach, significant results, and major conclusions. Write for literature searchers as well as journal readers.

8

Keywords. Provide significant keywords to aid the reader in literature retrieval. The keywords are published immediately before the text, following the abstract.

INTRODUCTION

Discuss relationships of the study to previously published work, but do not reiterate or attempt to provide a complete literature survey. Use of Chemical Abstracts/Scifinder and other appropriate databases is encouraged to ensure that important prior publications or patents are cited and that the manuscript does not duplicate previously published work. The purpose or reason for the research being reported, and its significance, originality, or contribution to new knowledge in the field, should be clearly and concisely stated.

Do not include or summarize current findings in this section.

MATERIALS AND METHODS

Authors are required to call special attention in their manuscripts to safety considerations such as explosive tendencies, special precautionary handling procedures, and toxicity.

Apparatus, reagents, and biological materials used in the study should be incorporated into a general section. List devices of a specialized nature or instruments that may vary in performance, such that the model used may affect the quality of the data obtained (e.g., spectroscopic resolution).

List and describe preparation of special reagents only. Reagents normally found in the laboratory and preparations described in standard handbooks or texts should not be listed.

Specify the source, vendor [city and state (or city and country if non-U.S.)], and availability of special equipment, reagents, kits, etc. Do not include catalog numbers.

Biological materials should be identified by scientific name (genus, species, authority, and family) and cultivar, if appropriate, together with the site from which the samples were obtained. Specimens obtained from a natural habitat should be preserved by deposit of samples in an herbarium for plants or in a culture collection for microorganisms, with a corresponding collection or strain number listed.

Manuscripts describing studies in which live animals or human subjects are used must include a statement that such experiments were performed in compliance with the appropriate laws and institutional guidelines and also name the institutional committee that approved the experiments. Authors are encouraged to note the approval code or number or give the name of the approving office or official. (See Reporting Specific Data: Animal or Human Studies.) Manuscripts reporting data from inhumane treatment of experimental animals will be rejected.

Specific experimental methods should be sufficiently detailed for others to repeat the experiments unequivocally. Omit details of procedures that are common knowledge to those in the field. Brief highlights of published procedures may be included, but details must be left to the References, and verbatim repeat of previously published methods, even if done by the authors, will not be permitted unless a quotation from a published work is included, and placed in quotation marks, with the reference to the source included at the end of the quotation. Describe pertinent and critical factors involved in reactions so the method can be reproduced, but avoid excessive description. For information on the reporting of certain types of data see Reporting Specific Data.

Describe statistical design and methods in this section.

9

RESULTS/DISCUSSION

Results and discussion may be presented in separate sections or combined into a single section, whichever format conveys the results in the most lucid fashion without redundancy. Be complete but concise in discussing findings, comparing results with previous work and proposing explanations for the results observed.

All data must be accompanied by appropriate statistical analyses, including complete information on sampling, replication, and how the statistical method employed was chosen.

Avoid comparisons or contrasts that are not pertinent, and avoid speculation unsupported by the data obtained.

A separate summary or conclusion section is not to be used; any concluding statements are to be incorporated under Results and Discussion.

ABBREVIATIONS AND NOMENCLATURE

Standard abbreviations, without periods, should be used throughout the manuscript.

Refer to The ACS Style Guide for the preferred forms of commonly used abbreviations. Specialized abbreviations may be used provided they are placed in parentheses after the word(s) for which they are to substitute at first point of use and are again defined in this section. Avoid trivial names and “code” abbreviations (e.g., NAR for naringenin) unless such codes are in common usage (e.g., MTBE for methyl tert-butyl ether).

If trade names are used, define at point of first use. If nomenclature is specialized, include a “Nomenclature” section at the end of the paper, giving definitions and dimensions for all terms. Use SI units insofar as possible. Refer to The ACS Style Guide for lists of SI units and a discussion of their use.

Write all equations and formulas clearly and number equations consecutively. Place superscripts and subscripts accurately; avoid superscripts that may be confused with exponents. Identify typed letters and numbers that might be misinterpreted, such as “oh” for zero or “ell” for one. Chemistry numbering requiring primes should be identified as such (i.e., 3,3'-dihydroxy-), not by an apostrophe (e.g., 3,3'-dihydroxy-).

It is the authors' responsibility to provide correct nomenclature. Structures should be included for uncommon chemicals, particularly when the systematic or common name is too complex or unclear to readily denote the structure. Such structures should be included as a figure or table. All nomenclature must be consistent and unambiguous and should conform with current American usage. Insofar as possible, authors should use systematic names similar to those used by Chemical Abstracts Service, the International Union of Pure and Applied Chemistry, and the International Union of Biochemistry and Molecular Biology. Chemical Abstracts (CA) nomenclature rules are described in Appendix IV of the Chemical Abstracts Index Guide. For CA nomenclature advice, consult the Manager of Nomenclature Services, Chemical Abstracts Service, P.O. Box 3012, Columbus, OH 43210-0012. A name generation service is available for a fee through CAS Client Services, 2540 Olentangy River Road, P.O. Box 3343, Columbus, OH 43210-0334 [telephone (614) 447-3870; fax (614) 447-3747; e-mail answers@cas.org]. In addition, the ACS Web site has links to nomenclature recommendations at <http://chemistry.org>.

ACKNOWLEDGMENT

Include essential credits but hold to an absolute minimum. Omit academic and social titles. Meeting presentation data and acknowledgment of financial support of the work should not be

10

included here; give these instead in a note following the References. It is the responsibility of the corresponding author to notify individuals named in the Acknowledgment.

FUNDING SOURCES

During manuscript submission, the submitting author is asked to select funding sources from the list of agencies included in the FundRef Registry <http://www.crossref.org/fundref/>.

REFERENCES

Consult The ACS Style Guide and current issues of the Journal for examples of reference format.

Authors should cite all prior published work directly pertinent to the manuscript. However, extensive bibliographies that go beyond a direct connection with the manuscript are discouraged. Prior work can often be covered by citation of a few leading references or of review articles. As a general guideline, authors should attempt to limit the literature cited to approximately 50 or fewer citations (except for review or perspective manuscripts).

Authors are responsible for the accuracy of their references. References taken from a review or other secondary source should be checked for accuracy with the primary source.

References should be listed on a separate page and numbered in the order in which they are cited in the text.

References should be cited in the text by superscript numbers, for example, 1,2–5, etc.

Give complete information, using the last name and initials of the author, patentee, or equivalent; do not use “Anonymous”.

Follow Chemical Abstracts Service Source Index for abbreviations of journal titles. Because subscribers to the Web edition of the Journal are now able to click on the “Chemport” or other tag following each reference to retrieve the corresponding abstract from various Web resources, reference accuracy is critical.

Typical references follow the styles given below.

For journals:

1. Brown, J.; Jones, M.; Green, D. Article title. *J. Agric. Food Chem.* 1980, 28, 1–4.
(Issue number must be used if each issue of the periodical begins with page 1.)

For books:

2. Smith, L; Caldwell, A. Chapter title. In *Book Title*, edition no.; Keys, F., Park, G., Eds.; Publisher: City, State (or Country if non-U.S.), Year; Vol. no., pp.

For Web pages:

3. Black, A.; White, B. Page title. URL (<http://...>) (most recent access date).

Papers should not depend for their usefulness on unpublished material, and excessive reference to material “in press” is discouraged. Reference to the authors’ own unpublished work is permitted if the subject is of secondary importance to the manuscript in question, but any unpublished results of central importance must be described in sufficient detail within the manuscript. If pertinent references are “in press” or unpublished for any reason, furnish copies to enable reviewers to evaluate the manuscript. An electronic copy of these materials should be uploaded according to the directions for review-only Supporting Information.

11

“In press” references should include the Digital Object Identifier (DOI) assigned by the potential publisher.

TABLES AND ARTWORK

The tables and graphics (illustrations) should be inserted in the manuscript file after the References section. Do not upload tables and graphics that are to be published with the manuscript as Supporting Information files.

Tables and figures should be carefully designed to maximize presentation and comprehension of the experimental data with superfluous information excluded. Useful information not directly relevant to the discussion may be included under Supporting Information.

Tables. Tables may be created using a word processor’s text mode or table format feature. The table format feature is preferred. Ensure each data entry is in its own table cell. Lower case should be used for all table entries unless a capital letter is required. If the text mode is used, separate columns with a single tab and use a line feed (enter) at the end of each row.

Tables should be numbered consecutively with Arabic numerals and should be grouped after the figure captions. Footnotes in tables should be given letter designations and be cited in the table by italic superscript letters. The sequence of letters should proceed by row rather than by column. Each table should be provided with a descriptive heading, which, together with the individual column headings, should make the table, as nearly as possible, self-explanatory. In setting up tabulations, authors are requested to keep in mind the type area of the journal page (17.8 × 25.4 cm), and the column width (8.5 cm), and to make tables conform to the limitations of these dimensions. Arrangements that leave many columns partially filled or that contain much blank space should be avoided. Conversely, arrangements that include >20 columns should be broken into two tables if possible. If significance of values is to be indicated, use a lower case letter, on line, one space after the value.

Figures and Artwork. The preferred submission procedure is to embed graphic files in a Word document. It may help to print the manuscript on a laser printer to ensure all artwork is clear and legible. Artwork should be sequentially numbered using Arabic numbers. Schemes and charts may have titles and footnotes; figures should have captions. Insert the captions following the References and the graphics after the Tables. Additional acceptable file formats are TIFF, PDF, EPS (vector artwork), or CDX (ChemDraw file). If submitting individual graphic files in addition to their being embedded in a Word document, ensure the files are named according to graphic function (i.e., Scheme 1, Figure 2, Chart 3), not the scientific name. Labeling of all figure parts should be present, and the parts should be assembled into a single graphic. For EPX files, ensure that all fonts are converted to outlines or embedded in the graphic file. The document setting should be in RGB mode. Note: Although EPS files are accepted, the vector-based graphics will be rasterized for production. Please see below for TIFF file production resolutions.

TIFF files (either embedded in a Word document or submitted as individual files) should have the following resolution requirements: black and white line art, 1200 dpi; grayscale art (a monochromatic image containing shades of gray), 600 dpi; color art (RGB color mode), 300 dpi.

The RGB and resolution requirements are essential for producing high-quality graphics within the published paper. Graphics submitted in CMYK or at lower resolution may be

used; however, the colors may not be consistent. Graphics of poor quality may not be able to be improved.

12

Most graphic programs provide an option for changing the resolution when images are saved. Best practice is to save the graphic file at the final resolution and size using the program used to create the graphic.

For bar charts, bars with hatching patterns generally reproduce well. Bars that range in shading from light to dark gray to black can usually be reproduced successfully, although we do not recommend any more than two shades of gray. A legend needs to be included within the figure itself rather than the patterns or shades included in the caption.

For manuscripts containing gel patterns, use of a high-resolution digital scanner is recommended. Only high-quality original, unaltered digital reproductions will allow reviewers to correctly verify the experimental results. For an example of gel patterns see *J. Agric. Food Chem.* 2004, 52, 5717–5723, Figures 2 and 3.

Only readable and accurately represented images are acceptable; the Editors reserve the option to reject images that do not satisfactorily support points made in the manuscript or that are not of satisfactory quality for publication.

The quality of the illustrations published in the Journal largely depends on the quality of the originals provided. Figures cannot be modified or enhanced by the journal production staff. Contrast is important. Each figure or photograph should be properly labeled.

Graphics should be sized at the final production size when possible. Single-column graphics are preferred and can be sized up to 240 points (3.33 in.). Double-column graphics must be sized between 300 and 504 points (4.167 in. and 7 in.). All graphics have a maximum depth of 660 points (9.167 in.) including the caption (please allow 12 points for each line of caption text). Consistently sizing letters and labels in graphics throughout the manuscript will help to ensure consistent graphic presentation for publication. Lettering should be no smaller than 4.5 points. (Helvetica or Arial type works well for lettering.) Lines should be no thinner than 0.5 point. Lettering and lines should be of uniform density. Avoid the use of very large and very small lettering within the same figure.

If artwork that must be reduced will be submitted, use larger lettering and thicker lines so that, when reduced, the artwork meets the above-mentioned parameters.

Avoid using complex textures and shading to achieve a three-dimensional effect. To show a pattern, choose a simple crosshatch design.

Color illustrations should be submitted only if they are essential for clarity of communication. Reproduction of color illustrations will be provided at no cost to the author. Do not submit color prints to be printed in black and white.

Structural Formulas. Structural formulas should be included for all new chemicals and for existing chemicals for which chemical nomenclature and/or trivial names do not convey the structure adequately. Structural formulas are valuable in expressing concisely the precise nature of the compounds under discussion and revealing the essence of the subject to readers unfamiliar with the topic, without their necessary recourse to reference materials. The use of chemical names without accompanying structures may cause readers to overlook the significance of the paper.

Structures should be produced with the use of a drawing program such as ChemDraw. Structure drawing preferences (preset in the ACS Stylesheet in ChemDraw) are as follows:

as drawing settings select...

chain angle

120°

13

bond spacing

18% of width

fixed length

14.4 points (0.508 cm, 0.2 in.)

bold width

2.0 points (0.071 cm, 0.0278 in.)

line width

0.6 point (0.021 cm, 0.0084 in.)

margin width

1.6 points (0.056 cm, 0.0222 in.)

hash spacing

2.5 points (0.088 cm, 0.0347 in.)

as text settings select...

font

Arial or Helvetica

size

10 points

under preferences choose...

units

points

tolerances

3 pixels

under page setup choose...

paper

US Letter

scale

100%

Using the ChemDraw ruler or appropriate margin settings, create structure blocks, schemes, and equations having maximum widths of 11.3 cm (one-column format) or 23.6 cm (two-column format). Note: if the foregoing preferences are selected as cm values, the ChemDraw ruler is calibrated in cm. Also note that a standard sheet of paper is only 21.6 cm wide, so all graphics submitted in two-column format must be prepared and printed in landscape mode.

Use boldface type for compound numbers but not for atom labels or captions.

Authors using other drawing packages should, as far as possible, modify their program's parameters to reflect the above guidelines.

For more information, please visit <http://pubs.acs.org/page/4authors/submission/index.html>.

TABLE OF CONTENTS GRAPHICS

Authors of research articles, perspectives, and reviews are required to include a suitable graphic for publication in the table of contents (TOC) in the Web edition of the Journal. Submission of this graphic is mandatory. This graphic should capture the reader's attention and, in conjunction with the manuscript's title, give the reader a quick visual impression of the type of chemistry described. Structures should be constructed as specified under Structural Formulas above. The TOC graphic may be up to 3.25 in. (8.5

cm) wide and 1.75 in. (4.75 cm) tall. (See detailed instructions at the Paragon Plus Web site.) Text should be limited to labels for compounds, reaction arrows, and figures. The use of color to enhance the scientific value is encouraged. The TOC graphic should be inserted on a separate page at the end of the manuscript file. A guide to TOC graphics is available [here:](http://pubs.acs.org/paragonplus/submission/toc_abstract_graphics_guidelines.pdf) (http://pubs.acs.org/paragonplus/submission/toc_abstract_graphics_guidelines.pdf).

SUPPORTING INFORMATION

Extensive tables, graphs, spectra, calculations, and other material beyond a modest content in the published paper may be included in the Web edition of the Journal. These will not be part of the published article but can be accessed separately on the Web by readers.

Supporting Information must be submitted at the same time as the manuscript and uploaded separately to the ACS Paragon Plus environment. A list of acceptable file types is available on the Web. All Supporting Information files of the same type should be prepared as a single file

14

(rather than submitting a series of files containing individual images or structures). For example, all Supporting Information available as PDF files should be contained in one PDF file.

The material should be described in a paragraph inserted between the Acknowledgment and the References sections, using the following format: “Supporting Information Available: Description. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.”

Components of the Supporting Information should be clearly labeled with all necessary figure captions and table titles and footnotes.

DO NOT UPLOAD FIGURES AND TABLES THAT ARE TO BE PUBLISHED IN THE ARTICLE INTO THE SUPPORTING INFORMATION FILE. Figures and tables that will appear in the published article are to be inserted in the manuscript directly after the References section.

CONFLICT OF INTEREST

A statement describing any financial conflicts of interest or lack thereof is published with each manuscript. During the submission process, the corresponding author must provide this statement on behalf of all authors of the manuscript. The statement should

describe all potential sources of bias, including affiliations, funding sources, and financial or management relationships, that may constitute conflicts of interest (please see the Ethical Guidelines). The statement will be published in the final article. If no conflict of interest is declared, the following statement will be published in the article: “The authors declare no competing financial interest.”

CURRENTLY ACCEPTABLE WORD-PROCESSING PACKAGES

Refer to the Paragon Plus environment Web site for acceptable software packages.

Using TeX/LaTeX

ACS Publications supports TeX/LaTeX version 2.0.2 and earlier. For best results, submit your author-generated Manuscript PDF File—and provide your native TeX/LaTeX manuscript package as a ZIP Archive. Note that your submission must include all referenced files, including all necessary resource files such as bibliographic and style files, images, etc. Use of the freely available *achemso* style package to help prepare your submission is strongly encouraged. See *Preparing and Submitting Manuscripts Using TeX/LaTeX* for complete instructions.

REVISIONS AND RESUBMISSIONS

For all revisions:

- Clearly identify the manuscript as a revision; reference the manuscript number.
- Include an itemized list of changes, with a response to each comment made by the Editor and by each reviewer.
- Be aware that the manuscript may be sent for additional review, to the same or additional reviewers, at the discretion of the Editor.
- Please upload the signed Journal Publishing Agreement or fax it to the assigned Editor.

For all resubmissions:

15

- Clearly identify all resubmissions; reference the previous manuscript number.
- Include an itemized list of changes, including a response to each comment made by the Editor and by each reviewer.
- Please upload the signed Journal Publishing Agreement or fax it to the assigned Editor.

JOURNAL PUBLISHING AGREEMENT

A properly completed and signed Journal Publishing Agreement (JPA) must be submitted for each manuscript. ACS Paragon Plus provides an electronic version of the JPA that will be available on the My Authoring Activity tab of the Corresponding Author's Home page once the manuscript has been assigned to an Editor. A PDF version of the Agreement is also available, but authors are strongly encouraged to use the electronic JPA. If the PDF version is used, all pages of the signed PDF JPA must be submitted. If the corresponding author cannot or should not complete either the electronic or PDF version for any reason, another author should complete and sign the PDF version of the form. Forms and complete instructions are available at <http://pubs.acs.org/page/copyright/journals/index.html>. For questions about the form or about signing the form, contact the ACS Copyright Office at (202) 872-4368 or -4367.

Note: Authors who are not U.S. Government employees or bona fide agents should sign Part A of the form only. If ALL of the authors were employees or bona fide agents of the U.S. Government when the paper was prepared, the work is a work of the U.S. Government and only Part B, "U.S. Government Employees", should be signed if BOTH of the following circumstances apply:

- ALL authors are or were bona fide officers or employees of the U.S. Government when the paper was prepared.
- The work is a work of the U.S. Government, prepared by an officer/employee of the U.S. Government as part of official duties.

If the work was prepared under a U.S. Government contract or is coauthored by a non-U.S. Government employee, the work is not a work of the U.S. Government; DO NOT SIGN PART B. Sign only Part A of the form. Call the ACS Copyright Office at the above telephone number for assistance.

PROOFS AND REPRINTS

Proofs. The corresponding author of an accepted manuscript will receive e-mail notification and complete instructions when page proofs are available for review via a secure Web site. Authors will access the secure site through ACS ChemWorx and will need an ACS ID. To obtain an ACS ID or to reset your password, go to www.acschemworx.org.

It is the responsibility of the corresponding author to ascertain that all coauthors agree with the corrections before the corrections are returned. Corrections should be designated by galley proof line number. Galley proof corrections should be returned

within 48 h of receipt to ensure timely publication of the manuscript. Routine rephrasing of sentences or additions are not permitted at the page proof stage. Alterations should be restricted to serious changes in interpretation or corrections of data. Extensive or important changes on page proofs, including changes to the title or list of authors, are subject to Editorial review.

ACS Policies for E-prints and Reprints. Under the ACS Articles on Request policy, the Society will provide (free of charge) to all contributing authors a unique URL within the ACS Web site that they may e-mail to colleagues or post on external Web sites. These author-directed

16

links are designed to facilitate distribution of an author's published work to interested colleagues in lieu of direct distribution of the PDF file by the author. The ACS Articles on Request policy allows 50 downloads within the first year after Web publication and unlimited access via the same author-directed links 12 months after Web publication.

The ACS AuthorChoice option establishes a fee-based mechanism for authors or their research funding agencies to sponsor the open availability of their articles on the Web at the time of online publication. Effective January 1, 2014, ACS AuthorChoice will be expanded to offer authors a wider range of open access license options, such as Creative Commons licenses and provisions for immediate or 12-month embargoed open access, both coupled with a new ACS Certified Deposit service. For complete details see <http://acsopenaccess.org/>.

When authors are sent the proof of their paper, they will receive a link to a Web site where they may order author reprints. They may also call Cierant Corporation, (866) 305-0111, from 9 a.m. to 5 p.m. EST. Reprints will be shipped within two weeks after the issue publication date. Neither the Editors nor the Washington ACS Office keeps a supply of reprints; requests for single copies of papers should be addressed to the corresponding author of the paper concerned.

REPORTING SPECIFIC DATA

Bioactivity. Manuscripts reporting on bioactivity of plant-derived or other extracts must also include identification and characterization of individual chemicals responsible for the observed bioactivity.

For peptide studies, such as anti-ACE peptides, the authors should provide the in vivo animal (or human) data to substantiate activity of the peptides studied and, if no in vivo data are provided, the chemistry must be novel and the amount of work substantial.

Gas Chromatographic Methods. For manuscripts in which gas chromatographic methods are used, see “Reporting of Gas Chromatographic Methods”, by Morton Beroza and Irwin Hornstein [J. Agric. Food Chem. 1973, 21, 7A (located at the back of the January 1973 issue or as a link from the Journal’s Author Information page)]. Consult recent issues for examples of GC, LC, and other instrument parameter descriptions.

Spectroscopic Data. This is a guide only; in certain cases different methods of data presentation may be more suitable. Authors are encouraged to consult examples of data presentation published in recent issues of the Journal for appropriate style and format. Complete infrared, NMR, mass, or other spectra will be published only if novel or necessary to substantiate points made under the Results or Discussion sections. Such presentations take up valuable space, and essentially the same information can frequently be put into a much more compact form by simply listing the position and intensity of the maxima. It is usually not necessary to list all of the maxima in the spectra to provide an adequate description. Report the type of instrument used (e.g., in mass spectrometry, whether magnetic, quadrupole, time-of-flight, etc.) and also the type of cell, the solvent (if any), and the state of the sample (whether liquid, gas, solution, etc.).

Mass Spectra. List the molecular ion and about 10 of the major ions with their intensities in parentheses, or more preferably use the method outlined by H. S. Hertz, R. A. Hites, and K. Biemann (Anal. Chem. 1971, 43, 681–691). This method involves dividing the spectrum into consecutive regions of 14 mass units starting at m/z 6 (i.e., 6–19, 20–33, 34–47, 48–61, etc.). The two most intense ions in each region are then listed. Intensities, relative to the most intense ion, the intensity of which is taken as 100, are shown in parentheses immediately following the m/z value; for example: hexanal, mass spectrum found (70 eV, two most intense ions each 14 mass units above m/z 34): 43 (86), 44 (100), 56 (86), 57 (65), 71 (28), 72 (33), 82 (18), 85 (5), 97 (2),

17

100 (2). If the molecular ion does not appear in this presentation, the author should indicate it separately.

Nuclear Magnetic Resonance (^1H NMR or ^{13}C NMR) Spectra. A document providing detailed information for the presentation of NMR data is now available through “Information for Authors and Reviewers” on the Journal’s home page.

The frequency, the solvent, and also the temperature (if other than ambient) used are first specified. The type of unit used (δ or τ) is then stated, followed by the position of the center of gravity of the sharp line, broad line, or spin–spin multiplet in these units. This is then followed by information in parentheses which (1) describes the type of splitting, that is, singlet as s, doublet as d, triplet as t, quadruplet as qd, multiplet as m; (2) gives the value of the number of protons the area represents; (3) gives the coupling constant J; and (4) gives the part of the molecule connected with the particular absorption with the protons involved underlined.

An example would be ^1H NMR for ethanol (60 MHz, CCl_4): δ 1.22 (t, 3, $J = 7$ Hz, CH_2CH_3), 2.58 (s, 1, OH), 3.70 (qd, 2, $J = 7$ Hz, OCH_2CH_3).

Other Spectra. In general, list position and intensity of the maxima. In some cases it may be desirable to list points of inflection.

A brief explanation should be given for any abbreviations not in common use.

Examples:

- Reporting liquid chromatography (HPLC) and HPLC/MS: “Analysis of Polyphenolic Antioxidants from the Fruits of Three Pouteria Species by Selected Ion Monitoring Liquid Chromatography–Mass Spectrometry”, by Jun Ma et al. *J. Agric. Food Chem.* 2004, 52, 5873–5878.
- Reporting data in detail, including UV shifts and IR spectra: “Characterization of Vegetable Oils: Detailed Compositional Fingerprints Derived from Electrospray Ionization Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry”, by Zhigang Wu et al. *J. Agric. Food Chem.* 2004, 52, 5322–5328.

Novel Compound Characterization. For a discussion of the Journal’s expectations for compound characterization, please read “Compound Identification: A Journal of Agricultural and Food Chemistry Perspective” by R. J. Molyneux and P. Schieberle. *J. Agric. Food Chem.* 2007, 55, 4625–4629 (DOI: 10.1021/jf070242j). It is essential that novel compounds, either synthetic or isolated from natural sources, be characterized rigorously and unequivocally. Supporting data normally include physical form, melting point (if solid), UV/IR spectra if appropriate, ^1H and ^{13}C NMR, mass spectrometric data, and optical rotation (when compounds have chiral centers).

Examples:

- Reporting X-ray data: “Racemic and Enantiopure Synthesis and Physicochemical Characterization of the Novel Taste Enhancer N-(1-Carboxyethyl)-6-(hydroxymethyl)pyridinium-3-ol Inner Salt”, by Renaud Villard et al. *J. Agric. Food Chem.* 2004, 51, 4040–4045.

- Reporting data in detail, including UV shifts: “Novel Flavonol Glycoside, 7-O-Methyl Mearnsitrin, from *Sageretia theezans* and Its Antioxidant Effect”, by Shin-Kyo Chung et al. *J. Agric. Food Chem.* 2004, 52, 4664–4668.

18

- Reporting data for previously known compounds: “Phenolic Constituents and Antioxidant Activity of *Wendita calysina* Leaves (Burrito), a Folk Paraguayan Tea”, by Anna Lisa Piccinelli et al. *J. Agric. Food Chem.* 2004, 52, 5863–5868.

Flavor Constituents. Manuscripts reporting on flavor constituents should conform to the recommendations made by the International Organization of the Flavor Industry [for details, see the Editorial in the October 1996 issue of *J. Agric. Food Chem.* (44, 2941–2941)]. In brief, any identification of a flavoring substance must pass scrutiny of the latest forms of available analytical techniques. In practice, this means that any particular substance must have its identity confirmed by at least two methods, for example, comparison of chromatographic and spectrometric data (which may include GC, MS, IR, and NMR) with those of an authentic sample. If only one method has been applied (MS data alone or retention index or Kovats index alone), the identification shall be labeled “tentative”. In addition, authors are encouraged to include at least semiquantitative data on the concentration of an identified component in the original source, for example, foodstuff or plant part. Ranges such as <1 µg/kg, 1–10 µg/kg, and 10–100 µg/kg are acceptable.

Flavor is evoked by smell (aroma) and taste. A good example showing the correct characterization of taste compounds is the study by Czepa and Hofmann (*J. Agric. Food Chem.* 2003, 51, 3865–3873). A good example for aroma compound identification is the study by Milo and Grosch (*J. Agric. Food Chem.* 1996, 48, 2366–2371).

The use of reference compounds is a must, if data on sensory properties of single compounds are reported. Odor, which is perceived during sniffing of a food extract at a certain retention index, may be indicative of the presence of a given compound, but not

conclusive unless substantiated by chromatographic and/or spectrometric data and comparison with an authentic reference compound.

Soil Classification. Soils used in research should be described down to the family level according to the soil classification scheme given in *Soil Taxonomy, A Basic System of Soil Classification for Making and Interpreting Soil Surveys*, 2nd ed. (Agricultural Handbook 436; U.S. Government Printing Office: Washington, DC, 1999) (available on-line at <http://soils.usda.gov/technical/classification/taxonomy/>). Also give series name if known.

This requirement is to allow comparison and extrapolation to other work giving similar soil classifications, as published in journals such as the *Journal of Soil Science*, *Soil Science Society of America Journal*, *Journal of Environmental Quality*, and *Geoderma*. If information is unavailable to classify the soils at the desired family level, classification should be described or estimated at least to the great group level in the same classification system.

Statistics. Manuscripts reporting analytical, biological activity, composition, and related data must include relevant statistical information to support discussion of differences or similarities in data sets. Refer to a standard statistics reference such as *Statistical Methods*, 8th ed.; Snedecor, G. W., Cochran, W. G., Eds.; University Press: Ames, IA, 1989.

Metabolomics. This category considers applications of metabolomics as related to research topics in agriculture, food, and nutrition, in particular metabolite-targeted analysis and progress in the development of analytical platforms for metabolomics approaches. A metabolome is the quantitative set of chemical compounds in a biological system, i.e., a food, at a given time. However, also metabonomics studies, focused on changes in a given metabolome, e.g., induced by environmental conditions or diseases, fall into this category.

19

Metabolic profiling and metabolomic fingerprinting correlated with multivariate or data-mining methods are acceptable, if presented in a targeted way. For additional information consult “Targeted Metabolomics: A New Section in the *Journal of Agricultural and Food Chemistry*” by J. N. Seiber, R. J. Molyneux, and P. Schieberle, *J. Agric. Food Chem.* 2013, DOI: 10.1021/jf4046254.

Animal or Human Studies. Manuscripts describing studies in which the use of live animals or human subjects is involved must include under Materials and Methods a statement that such experiments were performed in compliance with the appropriate laws and institutional guidelines, and also name the institutional committee that approved the experiments. For experiments with human subjects, a statement that informed consent was obtained from each individual must be included and the consent forms made available to the Journal on request. Reviewers of manuscripts involving animal or human experiments will be asked to comment specifically on the appropriateness and conformity to regulations of such experiments. Authors are encouraged to note the approval code or number or give the name of the approving office of official.

Animal Subjects. The use of animals in a study should be employed only when there are no alternative methods for investigating the fundamental questions of the study. In such cases, it is the ethical responsibility of all authors to ensure that the care of animals is of the highest possible order, that pain and/or distress is minimized, and that the numbers involved are strictly limited to those essential to fulfill the experimental design. In the United States the care and use of laboratory animals is regulated by the U.S. Department of Agriculture (USDA) under the Animal Welfare Act. Links to the regulations and other information are available at http://www.aphis.usda.gov/animal_welfare/links.shtml. It is recognized that researchers in other countries may be governed by different laws and regulations. In such cases, experiments should be designed to conform either to the above USDA regulations or to the International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals (1985), available at http://www.cioms.ch/publications/guidelines/1985_texts_of_guidelines.htm.

Human Subjects. The use of human subjects in experimental studies requires informed consent. Such consent requires that the subjects be informed completely not only about the procedures involved but also about the aims, design, and expected outcomes of the study. Consent must be obtained not only when subjects are involved directly in the study but also when samples (tissue, blood, plasma, etc.) are required for in vitro experiments. In the United States the protection of human research subjects is regulated by the U.S. Department of Health and Human Services (HHS). Regulations are available at <http://www.hhs.gov/ohrp/>. Laws and regulations governing researchers in

other countries must be observed, but experiments should be designed to conform to the intent of the HHS regulations as far as possible.

In relation to the subject matter of the Journal, experiments involving taste and food quality evaluation and consumer acceptance are exempt from the above regulations [CFR 46.101 (b) (6)]. However, it should be noted that this would not exempt studies in which extracts, isolates, pure compounds, etc., obtained from conventional food sources are subjected to such evaluation.

The Journal will reject any manuscript for which there is reason to believe that animals have been subjected to unnecessary pain or distress or when informed consent of human subjects is absent or incomplete.

20

Editor Contact Information:

James N. Seiber, Editor

Journal of Agricultural and Food Chemistry

Department of Environmental Toxicology

University of California

One Shields Avenue

Davis, California 95616

U.S.A.

Telephone (530) 754-7005

E-mail jafc@jafc.acs.org