

Análise Comparativa de Fragmentos Identificáveis de Forrageiras, pela Técnica Micro-Histológica¹

Maristela de Oliveira Bauer², José Alberto Gomide³, Eldo Antônio Monteiro da Silva⁴, Adair José Regazzi⁵, José Franklim Chichorro⁶

RESUMO - Objetivou-se, com este trabalho, verificar, pela técnica micro-histológica, diferenças entre espécies forrageiras quanto ao percentual de fragmentos identificáveis, em função do processo digestivo e da época do ano. Lâminas foliares frescas recém-expandidas, correspondentes à última e à penúltima posição no perfilho, das espécies *Melinis minutiflora* Pal. de Beauv (capim-gordura), *Hyparrhenia rufa* (Nees) Stapf. (capim-jaraguá), *Brachiaria decumbens* Stapf. (capim-braquiária), *Imperata brasiliensis* Trin. (capim-sapé), de *Medicago sativa* L. (alfafa) e de *Schinus terebenthifolius* Raddi (aroeira), amostradas nos períodos chuvoso e seco, foram digeridas *in vitro* e preparadas de acordo com a técnica micro-histológica. Observou-se que as espécies apresentaram diferenças marcantes na porcentagem de fragmentos identificáveis e que a digestão alterou estas porcentagens em torno de 10 %; que o período de amos-tragem não influenciou a porcentagem de fragmentos identificáveis para a maioria das espécies; que a presença de pigmentos e a adesão da epiderme às células dos tecidos internos da folha prejudicaram a identificação dos fragmentos; e que a digestão melhorou a visualização dos fragmentos dos capins sapé e jaraguá e da aroeira, mas prejudicou a do capim-braquiária e, principalmente, a da alfafa.

Palavras-chave: características epidérmicas, digestão *in vitro*, reconhecimento de fragmentos

Comparative Analysis of Identifiable Fragments of Forages, by the Microhistological Technique

ABSTRACT - The objective of this study was to verify differences among forages species in relation to the percentage of identifiable fragment as affected by the digestion process and season. Fresh last expanded leaf lamina samples of the species *Melinis minutiflora* Pal. de Beauv (Molassesgrass), *Hyparrhenia rufa* (Nees) Stapf. (Jaraguagrass), *Brachiaria decumbens* Stapf. (Signalgrass), *Imperata brasiliensis* Trin. (Sapegrass), and foliar laminas of *Medicago sativa* L. (Alfalfa) and *Schinus terebenthifolius* Raddi (Aroeira), sampled in the rainy and dry seasons, were digested *in vitro* and prepared according to the microhistological technique. The digestion process caused change of 19 units in the percentage of identifiable fragments whose values varied among forage species. The season did not influence the percentage of identifiable fragments for most species; the presence of pigments and adherence of epidermis to internal tissues of the leaf hindered the identification of fragments. The digestion improved the identification of sapeggrass fragments, jaraguagrass and *Schinus terebenthifolius* Raddi, but hindered identification of signalgrass fragments and mainly those of alfalfa.

Key Words: epidermical characteristics, *in vitro* digestion, recognition of fragments

Introdução

A determinação da dieta de animais tem grande importância nos estudos ecológicos (Duarte et al., 1992; Bauer et al., 1998; Santos et al., 2002; Mellado et al., 2003). Os pioneiros da técnica micro-histológica foram Baumgartner & Martin (1939) e mais tarde, Dusi (1949) adaptou-a para análise fecal. No entanto, as primeiras verificações básicas foram realizadas por Sparks & Malechek (1968).

O reconhecimento de fragmentos de plantas é a chave para o sucesso da técnica micro-histológica

(Nogueira et al., 1999; Dacar & Giannoni, 2001; Bontti & Bóo, 2002; Rosito & Marchezan, 2003).

As folhas são compostas de epiderme, mesófilo e feixes vasculares, mas são as características epidérmicas das plantas as utilizadas pela técnica micro-histológica. Esta técnica utiliza como características identificáveis a presença, o tamanho e a forma dos tricomas, os estômatos, a forma e a organização das células epidérmicas propriamente ditas, a inclusão de cristais, a ocorrência e posição de células especializadas, como as suberosas, silicosas e o par sílico-suberosas, e a orientação das nervuras (Davies,

¹ Parte da tese apresentada à UFV pelo primeiro autor, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

² Professora Adjunto do Departamento de Zootecnia e Extensão Rural/UFMT (bauermo@terra.com.br).

³ Bolsista IA do CNPq/UFV (jagomide@mail.ufv.br).

⁴ Professor Titular do Departamento de Biologia vegetal/UFV (esilva@ufv.br).

⁵ Professor Titular do Departamento de Informática/UFV (adairreg@ufv.br).

⁶ Professor Adjunto da FENF/UFMT (jfranklim@terra.com.br).

1959; Storr, 1961; Mandret, 1989). Essas características apresentam bases taxonômicas confiáveis para identificação de espécies (Metcalf & Chalk, 1988).

A epiderme vegetal é coberta por um material ceroso, a cutícula, que, além de proteger a planta contra danos mecânicos e químicos, quando destacada da epiderme, pode trazer consigo a impressão da estrutura e do arranjo das células epidérmicas, que auxiliam no reconhecimento das plantas. A cutícula é formada por cutina e ceras e encontra-se sobre as paredes periclinais externas. A cutina, um poliéster tridimensional, é sempre esterificada com ácidos fenólicos e apresenta íntima associação com a pectina da parede celular da epiderme, podendo aparecer embebida de ceras e pectina (Hilmmlsbach, 1993).

Em seu trânsito pelo trato digestivo do animal, os fragmentos vegetais sofrem digestão diferenciada dos tecidos, em decorrência de suas características anatômicas e químicas. Esta tem sido considerada outra fonte de erro na estimativa da composição botânica da dieta, pois o processo digestivo pode destruir a epiderme de algumas plantas ou provocar mudanças que a tornam irreconhecível. Isso depende da fragilidade da cutícula ou do tempo de retenção do alimento no trato digestivo do animal, que pode afetar a persistência desta e, então, influenciar o reconhecimento (Dunnet et al., 1973). Portanto, pode haver forte correlação entre a espessura da camada cuticular da parede celular da epiderme e a maior resistência de algumas plantas a danos mecânicos e químicos (Lees, 1984).

Acredita-se que a relação entre o número de fragmentos identificáveis e o de não-identificáveis varia entre as espécies de plantas, tornando-se fonte significativa de erro na estimativa da composição botânica da dieta de animais. O objetivo neste trabalho foi verificar, pela técnica micro-histológica, diferenças entre espécies forrageiras quanto ao percentual de fragmentos identificáveis, em função do processo digestivo e da época do ano.

Material e Métodos

Amostras de lâminas foliares frescas recém-expandidas, correspondentes à última e à penúltima posição no perfilho, das espécies *Melinis minutiflora* Pal. de Beauv (capim gordura), *Hyparrhenia rufa* (Nees) Stapf. (capim jaraguá), *Brachiaria decumbens* Stapf. (capim-braquiária) e *Imperata brasiliensis*

Trin. (capim-sapé), e lâminas foliares de *Medicago sativa* L. (alfafa) e *Schinus terebenthifolius* Raddi (aroeira), foram coletadas em seus canteiros na Agrostologia, área pertencente ao Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa, durante os períodos chuvoso e seco e embaladas individualmente em sacolas plásticas. Aquelas relativas ao período chuvoso foram imediatamente processadas, enquanto as do período seco, por disponibilidade de tempo, foram congeladas com nitrogênio líquido e conservadas em congelador a -80°C. O descongelamento do material ocorreu de forma gradual, sendo repassado para um congelador doméstico a -20°C, por duas semanas, em seguida para geladeira e, por fim, foi mantido em temperatura ambiente, para que pudesse ser processado. O material submetido ao congelamento somente foi utilizado depois de confirmada sua integridade.

As lâminas foliares de cada espécie foram cortadas na porção mediana em segmentos de 2 a 4 mm de comprimento, para compor uma amostra de aproximadamente 0,3 g, com três repetições. A incubação do material seguiu a metodologia descrita por Tilley & Terry (1963), com um estágio de digestão. Entretanto, os tempos de digestão utilizados foram 0, 48 e 72 horas.

Após cada tempo de digestão, o material foi liquidificado por um minuto, lavado e coado em peneira tipo ABNT 140, abertura 0,105 e “Tyler” 150 (Scott & Dahl, 1980; Duarte et al., 1992). Em seguida, foi colocado em substância clareadora hipoclorito de sódio 5% (água sanitária doméstica), na qual permaneceu pelo tempo necessário para o clareamento do material. Após a lavagem, fez-se a montagem das lâminas microscópicas, adicionando-se pequena porção do material sobre a lâmina contendo glicerina 50%. Para vedação, utilizou-se esmalte incolor, sendo confeccionadas três lâminas microscópicas para cada repetição.

Para se anotar o número total de fragmentos presentes em cada campo e o número de fragmentos identificáveis, em cada lâmina microscópica foram analisados 20 campos de observação, com aumento de 100 vezes, em um microscópio binocular. Foram considerados fragmentos identificáveis aqueles que apresentavam pelo menos três características de identificação da espécie, como tricomas, formato das células epidérmicas propriamente ditas e estômatos.

A porcentagem de fragmentos identificáveis foi dada pela relação entre o número de fragmentos identificados e o número total de fragmentos.

Os fragmentos identificáveis ou não-identificáveis de cada espécie foram fotomicrografados em um fotomicroscópio OLYMPUS AX70, utilizando-se filmes coloridos e preto e branco TMAX ISO 100.

A análise estatística dos dados correspondentes ao reconhecimento dos fragmentos foi realizada por meio da análise de variância, utilizando-se o Sistema de Análises Estatísticas e Genéticas (SAEG), desenvolvido na Universidade Federal de Viçosa. O delineamento adotado foi o inteiramente casualizado, com três repetições, com os tratamentos no esquema fatorial, utilizando-se o seguinte modelo estatístico:

$$Y_{ijkl} = \mu + E_i + P_j + T_k + EP_{ij} + ET_{ik} + PT_{jk} + EPT_{ijk} + \epsilon_{ijkl}$$

com $i = 1, 2, \dots, 5$; $j = 1, 2$; $k = 1, 2$ e 3 ; $l = 1, 2$ e 3

em que Y_{ijkl} = observação referente à avaliação l , da espécie i , no período j , no tempo k ; μ = média geral; E_i = efeito da espécie i ; P_j = efeito do período de coleta j ; T_k = efeito do tempo de fermentação k ; EP_{ij} = efeito da interação espécie x período; ET_{ik} = efeito da interação espécie x tempo; PT_{jk} = efeito da interação período x tempo; EPT_{ijk} = efeito da interação espécie x período x tempo; e ϵ_{ijkl} = erro aleatório associado à observação Y_{ijkl} , suposto normal e independentemente distribuído com média 0 e variância σ^2 .

Não foi incluída na análise a espécie *Medicago sativa* L., porque esta apresentou valores extremamente baixos, tendendo a 0 nos tempos de 48 e 72 horas.

Foi admitido o modelo fixo, isto é, somente o erro ϵ_{ijkl} como aleatório. Para o estudo do fator quantitativo (tempo), utilizou-se a técnica dos polinômios ortogonais, avaliando-se os efeitos linear e quadrático.

Resultados e Discussão

A alfafa não foi incluída na análise estatística, em virtude da digestão massiva dos fragmentos epidérmicos após 48 e 72 horas de digestão. Considerou-se que a porcentagem de fragmentos identificados após esses tempos de digestão foi menor que 10%, enquanto, no tempo 0, a porcentagem média foi de 79,8% (Figura 1).

Foi observada interação ($P < 0,01$) entre espécie e período (Tabela 1). O capim-jaraguá foi a única espécie que sofreu influência significativa ($P < 0,01$)

dos períodos e a porcentagem de seus fragmentos identificados foi maior no período chuvoso.

As diferenças ($P < 0,01$) entre as espécies nas porcentagens variaram de período para período (Tabela 1). O capim-braquiária e a aroeira foram as espécies com maior porcentagem de fragmentos identificáveis, independentemente do período de amostragem. Os menores valores de fragmentos identificáveis corresponderam ao capim-gordura e ao capim-sapé. Em virtude da redução no percentual de fragmentos identificáveis do capim jaraguá no período seco, não se observou diferença estatística entre as porcentagens de fragmentos dessas espécies.

Na Tabela 2 e nas Figuras 1 e 2, estão representados os estudos sobre a interação espécie e tempo de digestão.

O capim-gordura foi a única espécie que não sofreu influência do tempo de digestão (Tabela 2), embora tenha havido tendência de redução na porcen-

Tabela 1 - Porcentagem média de fragmentos identificados, segundo as espécies e os períodos chuvoso e seco

Table 1 - Means of identifiable fragment percentage, according to the species and the rainy and dry seasons

Espécie <i>Specie</i>	Período chuvoso <i>Rainy season</i>	Período seco <i>Dry season</i>
	%	
Capim-gordura <i>Molassesgrass</i>	30,1Ac	36,6Ab
Capim-sapé <i>Sapegrass</i>	25,5Ac	30,2Ab
Capim-jaraguá <i>Jaraguagrass</i>	44,7Ab	35,5Bb
Capim-braquiária <i>Signalgrass</i>	56,8Aa	53,0Aa
Alfafa <i>Alfalfa</i>	_1/	_1/
Aroeira <i>Aroeira</i>	61,7Aa	58,3Aa

Valores médios, para a mesma espécie, seguidos de letras maiúsculas diferentes são diferentes pelo teste F ($P > 0,01$).

Valores médios das espécies, dentro de cada período, seguidos de letras minúsculas diferentes são diferentes ($P > 0,01$) pelo teste Tukey.

¹ Não incluído na análise estatística.

Mean values for the same specie followed by different capital letter differ ($P > 0,01$) by F test.

Mean values of the species, within each season, followed by different small letters differ ($P > 0,01$) by Tukey test.

¹ Not included in the statistical analysis.

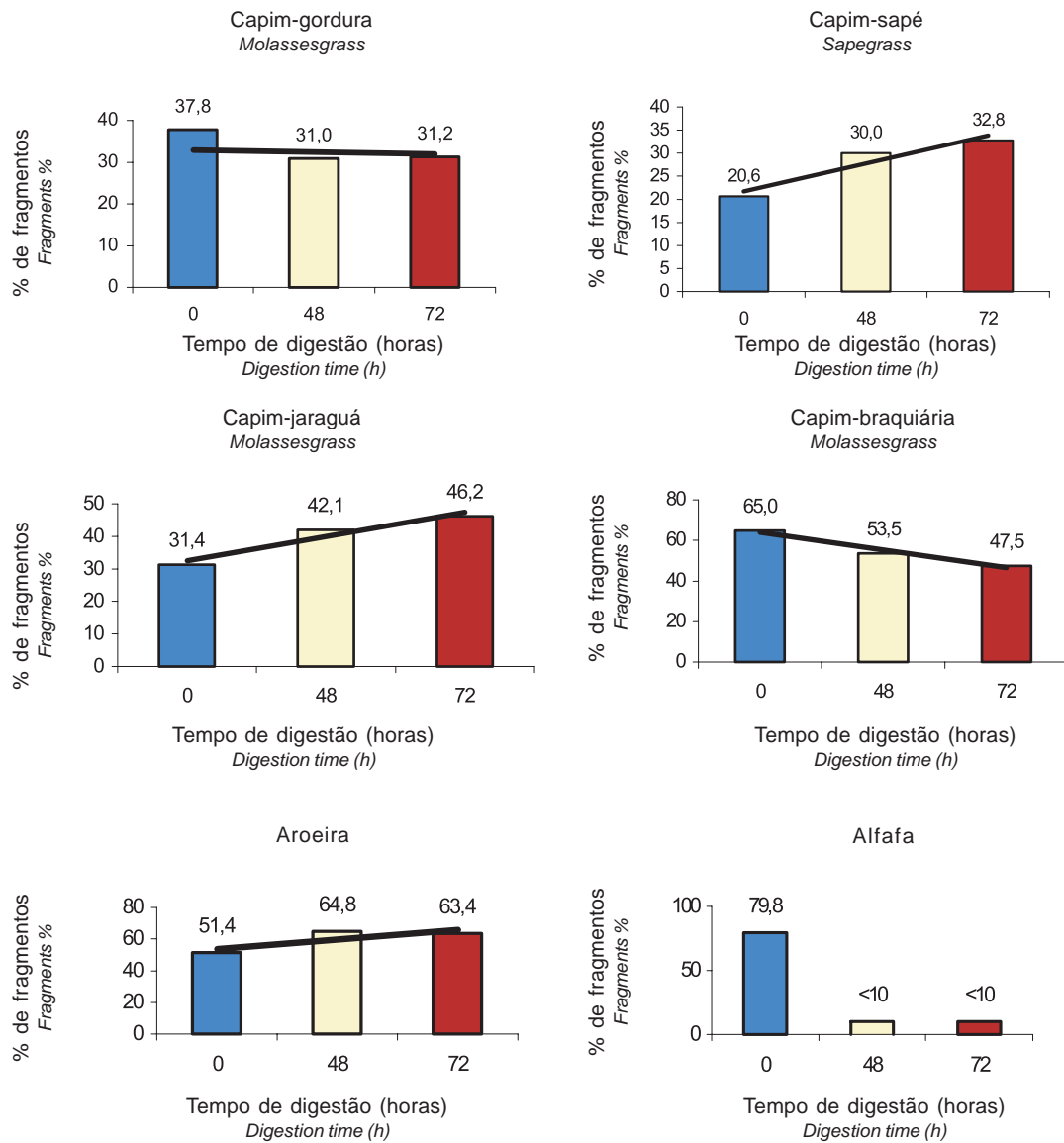


Figura 1 - Porcentagem média de fragmentos identificados nos tempos de digestão 0, 48 e 72 horas, para diferentes espécies.

Figure 1 - Means of identifiable fragments percentage at digestion times 0, 48 and 72 hours for different species.

tagem de fragmentos identificados, em torno de 6,6% (Figura 1). A influência do tempo de digestão sobre as demais espécies seguiu um padrão linear (Tabela 2), sugerindo melhoria de, aproximadamente, 10% na visualização das epidermes dos capins sapé e jaraguá e da aroeira em razão da digestão do material. No caso do capim-braquiária, o efeito foi inverso, pois houve redução de 18%.

Para cada tempo de digestão, o percentual de fragmentos identificados diferiu entre as espécies ($P < 0,01$) pelo teste Tukey a 1% (Figura 2). O comportamento na identificação das espécies foi o mesmo após 48 e 72 horas de digestão, tendo a aroeira o maior

percentual; os capins braquiária e jaraguá, valores intermediários; e os capins gordura e sapé, valores inferiores. Entretanto, no tempo 0, o percentual do capim-braquiária foi o mais alto, enquanto o menor foi do capim-sapé.

As Figuras 3 a 6 ilustram alguns campos microscópicos contendo fragmentos epidérmicos utilizados na determinação das porcentagens de fragmentos identificáveis e na observação do efeito da digestão sobre os fragmentos das espécies. Os fragmentos indicados como não-identificáveis são aqueles formados por feixes vasculares isolados e/ou por porções da epiderme que tiveram sua visualização prejudicada

Tabela 2 - Estudo do efeito do fator tempo sobre o percentual de fragmentos identificáveis de cada espécie, por meio de polinômios ortogonais

Table 2 - Effect of the factor time on the identifiable fragments percentage of each species, by polynomials ortogonais methods

Fonte de variação <i>Source of variation</i>	gl <i>df</i>	Quadrado médio <i>Mean square</i>
Tempo/Gordura (<i>Time/Molassesgrass</i>)	(2)	
Efeito linear (<i>Linear effect</i>)	1	155,5002 ^{ns}
Efeito quadrático (<i>Quadratic effect</i>)	1	23,6714 ^{ns}
Tempo/Sapé (<i>Time/Sapegrass</i>)	(2)	
Efeito linear (<i>Linear effect</i>)	1	478,8864*
Efeito quadrático (<i>Quadratic effect</i>)	1	6,5822 ^{ns}
Tempo/Jaraguá (<i>Time/Jaraguagrass</i>)	(2)	
Efeito linear (<i>Linear effect</i>)	1	714,7812*
Efeito quadrático (<i>Quadratic effect</i>)	1	7,6206 ^{ns}
Tempo/Braquiária (<i>Time/Signalgrass</i>)	(2)	
Efeito linear (<i>Linear effect</i>)	1	973,7694*
Efeito quadrático (<i>Quadratic effect</i>)	1	4,8984 ^{ns}
Tempo/Aroeira (<i>Time/Aroeira</i>)	(2)	
Efeito linear (<i>Linear effect</i>)	1	549,7134*
Efeito quadrático (<i>Quadratic effect</i>)	1	128,5896 ^{ns}
Resíduo (<i>Error</i>)	60	42,7049

* Efeito significativo ($P < 0,01$), pelo teste F.* Significant difference ($P < 0.01$), by F test.ns - Efeito não-significativo ($P > 0,01$), pelo teste F.ns - Not significant difference ($P < 0.01$), by F test.

pelas células de tecidos adjacentes, como o mesófilo, ou destruídas pela digestão.

Na Figura 4, pode-se observar a diferença entre um fragmento identificável de capim-gordura e um não-identificável provocado pelo processo digestivo. Mesmo após 72 horas de digestão, foi possível encontrar, para esta espécie, vários fragmentos que mantiveram suas características originais.

Apesar de ser um fragmento identificável de capim-sapé (Figura 5), este apresenta uma região de não-identificação, em razão da presença de tecidos na camada inferior da epiderme e, nesse caso, essa região não prejudicou sua identificação.

A semelhança nas porcentagens de fragmentos identificáveis sugere que cada espécie seja tão identificável quanto outra e que a composição percentual final de uma dieta estimada refletirá com acurácia a participação de cada espécie (Havstad & Donart, 1978).

A menor porcentagem de fragmentos identificados do capim-jaraguá no período seco, decorreria do estágio senescente em que se encontrava o material.

Apesar de serem as últimas e penúltimas lâminas recém-expandidas, as amostras desta espécie coletadas neste período apresentavam inevitavelmente uma coloração amarelada ou amarronzada, ao contrário das amostradas no período chuvoso, que exibiam um verde viçoso. Por outro lado, as demais espécies, em ambos os períodos, aparentemente eram semelhantes.

A cutinização progressiva, com o avanço do estágio de desenvolvimento, favorece a resistência da epiderme a danos mecânicos e químicos (Wilson, 1976; Yagueddu et al., 1998), refletindo no reconhecimento dos fragmentos. No entanto, o avanço do estágio de desenvolvimento pode aumentar a resistência dos tecidos adjacentes à epiderme, dificultando sua separação.

Observou-se que a presença de células do mesófilo adjacente prejudicou a visualização da epiderme, pois a formação de um bloco de células, na maioria das vezes pigmentado, impediu a passagem da luz microscópica, caracterizando o fragmento como não-identificável. O isolamento dos feixes vasculares, com ou sem a epiderme aderida, foi outro fator que

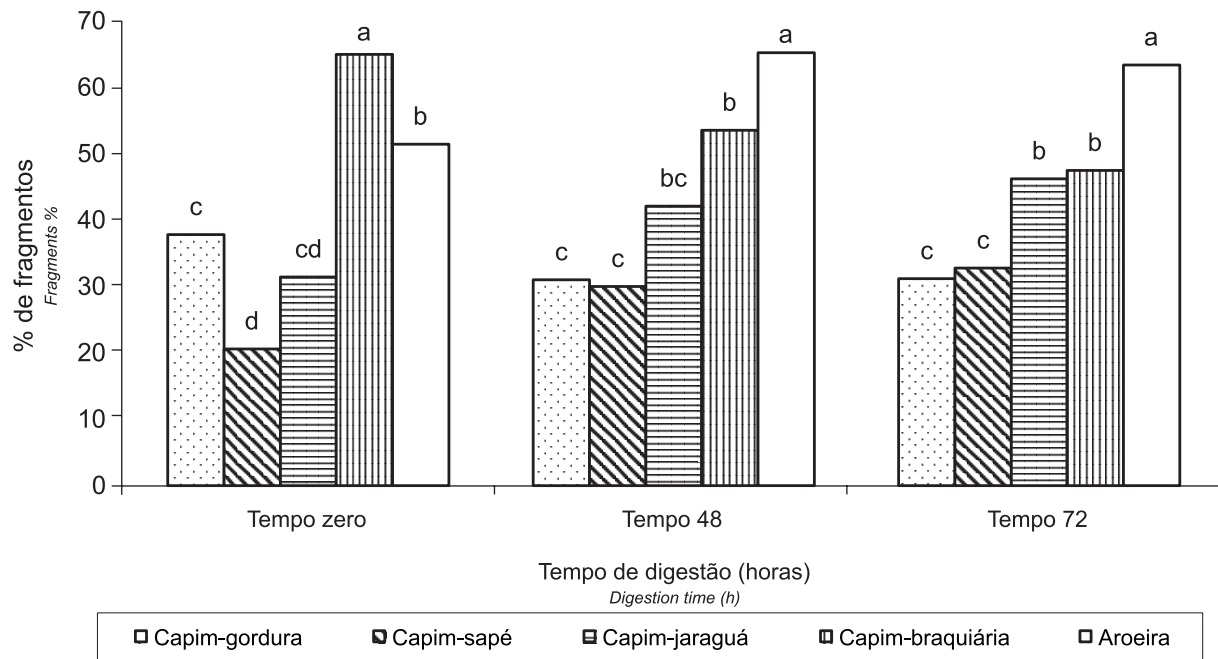


Figura 2 - Comparação das porcentagens médias de fragmentos identificados das espécies capim-gordura, capim-sapé, capim-jaraguá, capim-braquiária, aroeira e alfafa, pelo teste Tukey a 1% de probabilidade, nos tempos de digestão 0, 48 e 72 horas.

Figure 2 - Comparison of the means of identifiable fragments percentage of molassesgrass, sapeggrass, jaraguagrass, signalgrass, aroeira and alfafa, by Tukey test, in the digestion times 0, 48 and 72 hours.

contribuiu para redução da porcentagem de fragmentos identificados.

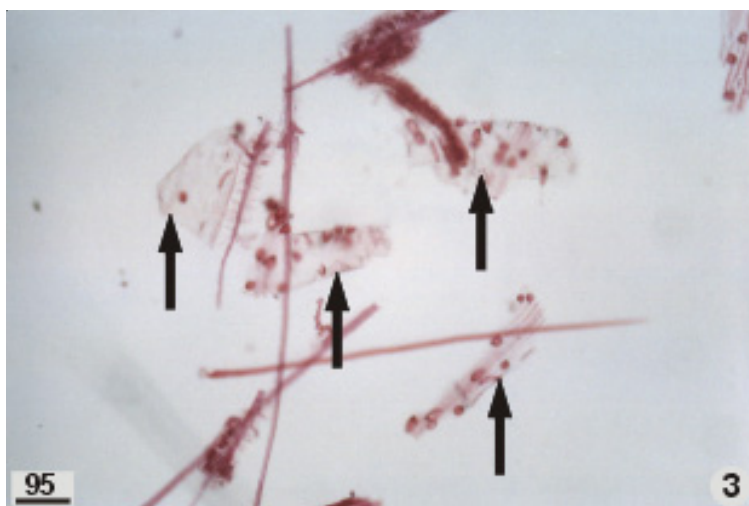
As razões pelas quais a aroeira e os capins braquiária e jaraguá apresentaram valores médios superiores aos dos capins gordura e sapé podem ser atribuídas ao desprendimento de suas epidermes do restante da lâmina foliar ou ao fato de as epidermes adaxiais dos capins gordura e sapé não terem contribuído para o seu reconhecimento. Para a identificação de uma espécie a contento, foi necessário que os fragmentos epidérmicos contivessem pelo menos três características confiáveis. Após o preparo das lâminas microscópicas, não se constatou, na maioria das vezes, a presença das epidermes adaxiais dos capins gordura e sapé, possivelmente porque elas não apresentavam o mínimo de informações para sua identificação.

Bauer (2000), ao caracterizar as epidermes dessas espécies, verificou que, na epiderme adaxial dos capins gordura e sapé, as células buliformes ocupam a maior parte do espaço entre as nervuras (região intercostal) e que os estômatos se encontram muito próxi-

mos destas células ou da nervura. Assim, após a fragmentação, as células buliformes e os feixes vasculares podem ter constituído um amontoado de células que bloqueava a passagem da luz microscópica. Os estômatos podem ter ficado atrelados aos feixes vasculares ou terem se fixado às células buliformes, de forma a impedir sua visualização.

As epidermes adaxial e abaxial do capim-sapé apresentam-se presas aos feixes vasculares grandes e pequenos por estruturas de viga (feixes esclerenqui-máticos) bastante desenvolvidas. Segundo Bauer (2000), esta espécie foi a que apresentou maior porcentagem de esclerênquima (6%). Portanto, durante o preparo, a ruptura da epiderme tende a ocorrer na região entre os feixes vasculares de forma que esta se mantenha aderida a eles.

Com relação aos pêlos, que é uma outra característica que poderia auxiliar na identificação dessas espécies, observou-se um desprendimento dos pêlos maiores, resultante do processo de liquidação. Ao se soltarem, eles rasgavam a epiderme, provocando sua



Figuras 3 - Campos microscópios contendo fragmentos epidérmicos de *Melinis minutiflora* após 48 horas de digestão *in vitro*. Seta - Fragmentos não-identificáveis, devido à digestão. Escala em micrometros (μm).

Figure 3 - Epidermical fragments of *Melinis minutiflora* after 48 hours hours *in vitro* digestion time. Arrow - no identifiable fragmnets, due to digestion. Micromenters scale (μm).

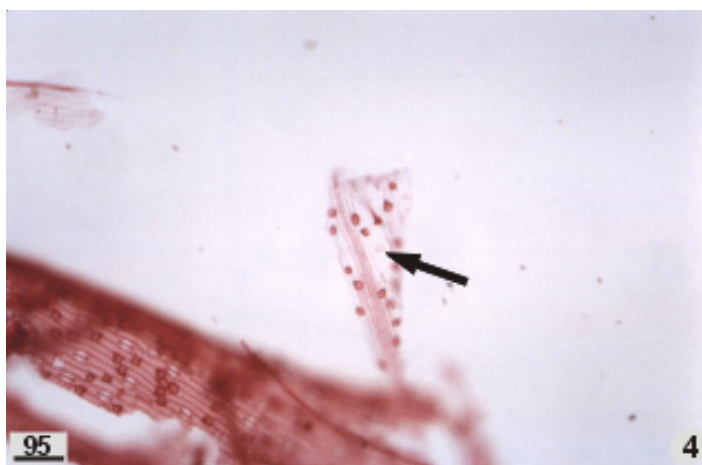


Figura 4 - Campos microscópios contendo fragmentos epidérmicos de *Melinis minutiflora* após 72 horas de digestão *in vitro*. Seta - Fragmentos não-identificáveis, devido à digestão. Escala em micrometros (μm).

Figure 4 - Epidermical fragments of *Melinis minutiflora* after 72 hours hours *in vitro* digestion time. Arrow - no identifiable fragmnets, due to digestion. Micromenters scale (μm).

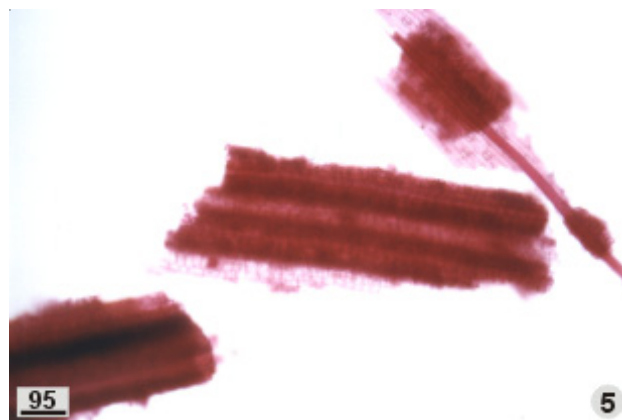


Figura 5 - Campos microscópios contendo fragmentos epidérmicos de *Imperata brasiliensis* após 48 horas de digestão *in vitro*. Escala em micrometros (μm).

Figure 5 - Epidermical fragments of *Melinis minutiflora* after 48 hours hours *in vitro* digestion time. Micromenters scale (μm).



Figura 6 - Campos microscópicos contendo fragmentos epidérmicos de *Imperata brasiliensis* após 72 horas de digestão *in vitro*. Escala em micrometros (μm).

Figure 6 - Epidermal fragments of *Melinis minutiflora* after 72 hours hours *in vitro* digestion time. Micrometers scale (μm).

descharacterização e, ao serem isolados, não auxiliavam na identificação. Isto foi observado principalmente com as células epidérmicas propriamente ditas do capim-gordura, que se apresentou com paredes delgadas a base dos pêlos com inserção volumosa.

As epidermes adaxiais dos capins braquiária e Jaraguá, da aroeira e da alfafa seguiram o mesmo padrão de desprendimento das epidermes abaxiais, ou seja, elas se soltavam por inteiro, formando fragmentos grandes e contendo as características marcantes que garantiram sua identificação.

As células buliformes do capim-jaraguá apresentam características tão peculiares que permitiram confiabilidade na identificação da epiderme adaxial desta espécie mesmo quando o fragmento não apresentava o número mínimo de características necessárias.

Um problema básico desta técnica é a presença de pigmentos, que tornam a identificação do material epidérmico mais difícil; daí a importância de utilizar técnicas apropriadas de preparo das amostras (Holechek, 1982). O clareamento do material aumenta o número de fragmentos identificáveis (Willians, 1969), entretanto, dependendo da solução utilizada, pode ocorrer destruição dos mesmos.

Para a realização deste trabalho, optou-se por utilizar hipoclorito de sódio, que não prejudicou a integridade dos fragmentos. Caso contrário, os fragmentos de alfafa, que são frágeis, teriam apresentado deformações no tempo de digestão 0. Segundo Smith & Shandruk (1979), o preparo do material é de

grande importância para se obter sucesso na identificação dos fragmentos, considerando-se a manutenção da integridade do material. Em parte, confirma-se esta afirmativa, mas, nesse caso, a identificação dos fragmentos dos capins sapé e jaraguá e da aroeira poderia ter sido mais eficiente caso fosse utilizada uma solução que diminuísse ainda mais a pigmentação, uma vez que seus fragmentos mantiveram-se íntegros.

As epidermes dos capins sapé e jaraguá e da aroeira foram melhores visualizadas quando houve redução na pigmentação dos fragmentos. O material que foi submetido à digestão, ao ser mergulhado em hipoclorito de sódio, clareou mais rapidamente que aquele tomado do tempo 0. É provável que a redução parcial ou completa da parede celular, pela digestão dos tecidos vegetais, favoreça a exposição destes tecidos, facilitando a penetração da solução e o desprendimento da epiderme no momento da liquidação do material.

Pelo fato de essas espécies apresentarem epidermes com células de parede espessas, a digestão não afetou sua integridade, favorecendo o aumento na porcentagem de fragmentos identificáveis. No entanto, as epidermes dos capins gordura e braquiária e da alfafa sofreram digestão de suas células, que tornou alguns fragmentos irreconhecíveis. Os fragmentos de cutícula dessas espécies não apresentavam as impressões das células epidérmicas. De modo geral, apenas os micropêlos, os pêlos bicelulares e as células silicosas das epidermes das duas gramíneas permane-

ciam intactos, pois os pêlos maiores se destacaram da epiderme, independentemente do tempo de digestão. Os pêlos da alfafa permaneceram atrelados à cutícula mesmo após a digestão, mas não foram utilizados como referência.

A porcentagem de fragmentos da aroeira no tempo de digestão 0 só não foi igual ou superior às do capim-braquiária (Figura 2) porque a epiderme dos fragmentos da gramínea apresentava-se nítida, enquanto os fragmentos da aroeira apresentavam-se com tecidos aderidos e pigmentados. Com a digestão, os fragmentos do capim-braquiária perderam a nitidez e os da aroeira se despigmentaram, produzindo valores percentuais inferiores aos da aroeira. A melhoria na visualização dos fragmentos dos capins sapé e jaraguá com a digestão também foi a razão da equivalência dos valores destas espécies com os dos capins gordura e braquiária, respectivamente.

Basicamente, foram observados dois comportamentos para as diferenças entre as espécies, um antes da digestão, que está relacionado à adesão das células de tecidos adjacentes e à pigmentação e outro após a digestão, que tem relação com a redução ou o aumento da nitidez da epiderme. Esses fatos estão bastante relacionados à resistência dos tecidos internos da lâmina foliar ao processo de digestão.

Segundo alguns autores, o processo digestivo pode reduzir o peso médio dos fragmentos muito mais que destruí-lo totalmente (Hansen et al., 1973; Todd & Hansen, 1973), sugerindo que a digestão teria poucos efeitos sobre o reconhecimento destes (Dearden et al., 1975).

Dependendo da espécie, alguns fragmentos se encontravam presentes após a digestão, embora desfigurados. Os fragmentos de alfafa, por exemplo, no tempo de digestão 0, não sofreram distorções, sugerindo que o preparo do material não alterou sua integridade, mas o processo digestivo teve influência, repercutindo significativamente sobre o reconhecimento dos fragmentos. Free et al. (1970) sugeriram haver relação entre o reconhecimento dos fragmentos e a indigestibilidade da epiderme.

Conforme Johnson & Wofford (1983), a digestão altera o reconhecimento dos fragmentos de algumas plantas, mas seu impacto sobre a estimativa da composição botânica raramente causa alterações significativas, pois uma mudança no reconhecimento de 10% alteraria em apenas 1% a estimativa da

proporção da planta que compõe 10% de uma dieta real. Caso a espécie participasse com 50% da dieta, esse erro seria de 5%.

As considerações sobre a existência da digestão diferencial da epiderme de diferentes plantas são válidas e estão relacionadas à distribuição da cutina. A cutícula se estende para baixo entre as células e as circundam completamente em células de plantas resistentes, porém, em plantas frágeis, como alfafa, a cutícula cobre apenas a parede externa da epiderme (Storr, 1961). A espessura da cutícula varia de espécie para espécie e algumas resistem à digestão, mas aquelas que cobrem tecidos da folha em crescimento ativo são finas e podem não resistir, restando apenas as de tecidos maduros (Croker, 1959). Assim, as células epidérmicas de tecidos jovens ou de plantas anuais podem ser corroídas pela ação mecânica ou química, tornando o fragmento irreconhecível. A persistência da cutícula depende da idade da folha e de sua localização na planta, pois estas variáveis influenciam sua espessura (Dunnet et al., 1973).

De acordo com Volth & Black (1973), as folhas com a epiderme lisa são mais fáceis de serem reconhecidas e sua estimativa tende a aumentar, enquanto as epidermes de folhas glabras e pubescentes podem ter sua participação reduzida, por não apresentarem a epiderme em perfeito estado, após a digestão. Portanto, dependendo da participação das espécies na dieta de um herbívoro, tanto a digestão quanto as técnicas de preparo das lâminas microscópicas podem influenciar a determinação da composição botânica da mesma.

Conclusões

As espécies apresentaram diferenças quanto às porcentagens de fragmentos identificáveis e a digestão alterou em torno de 10% estas porcentagens.

O período de amostragem não influenciou a porcentagem de fragmentos identificáveis das espécies.

A presença de pigmentos e a adesão da epiderme às células dos tecidos internos da lâmina foliar prejudicaram a identificação dos fragmentos.

O capim-gordura foi a única espécie cuja identificação não se alterou com o processo digestivo.

A digestão melhorou a visualização dos fragmentos dos capins sapé e jaraguá e da aroeira, mas prejudicou a do capim-braquiária e, principalmente, a da alfafa.

Literatura Citada

- BAUER, M.O. **Avaliação da técnica micro-histológica para a estimativa da dieta de ruminantes**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2000. 152p. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Federal de Viçosa, 2000.
- BAUER, M.O.; NASCIMENTO JR., D.; SILVA, E.A.M. et al. Composição botânica da dieta de bovinos nos relevos côncavo e convexo, em pastagem natural de Viçosa-MG. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.27, n.1, p.1-8, 1998.
- BAUMGARTNER, L.L.; MARTIN, A.C. Plant histology as an aid in squirrel food-habit studies. **Journal Wildlife Management**, v.3, p.266-268, 1939.
- BONTTI, E.E.; BÓO, R.M. Sample numbers for microhistological estimation of fecal vizcacha diets. **Journal Range Management**, v.55, n.2, p.498-501, 2002.
- CROKER, B.H. A method of estimating the botanical composition of the diet of sheep. **New Zealand Journal Agricultural Research**, v.2, p.72-85, 1959.
- DACAR, M.A.; GIANNONI, S.M. Nota técnica: un método simple para preparar los patrones de referencia de semillas. **Journal of Range Management**, v.54, n.2, p.191-193, 2001.
- DAVIES, I. The use of epidermal characteristics for the identification of grasses in the leafy stage. **Journal British Grassland Society**, v.14, p.7-16, 1959.
- DEARDEN, B.L.; PEGAU, R.E.; HANSEN, R.M. Precision of microhistological estimates of ruminant food habits. **Journal Wildlife Management**, v.39, n.2, p.402-407, 1975.
- DUARTE, C.M.L.; NASCIMENTO JR., D.; SILVA, E.A.M. et al. Métodos para estimar a composição botânica da dieta de herbívoros. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.21, n.2, p.279-290, 1992.
- DUNNET, G.M.; HARVIE, A.E.; SMIT, T.J. Estimating the proportions of various leaves in the diet of the opossum, *Trichosurus vulpecula* Kerr, by faecal analysis. **Journal Applied Ecology**, v.10, p.737-745, 1973.
- DUSI, J.L. Methods for determination of food habits by plant microtechniques and histology and their applications to cottontail rabbits in Ohio. **Journal Wildlife Management**, v.13, n.2, p.295-298, 1949.
- FREE, J.C.; HANSEN, R.M.; SIMS, P.L. Estimating dry weights of foodplants in feces of herbivores. **Journal of Range Management**, v.23, p.300-306, 1970.
- HANSEN, R.M.; PEDEN, D.G.; RICE, R.W. Discerned fragments in feces indicates diet overlap. **Journal of Range Management**, v.26, n.2, p.103-105, 1973.
- HAVSTAD, K.M.; DONART, G.B. The microhistological technique: testing two central assumptions in south central New Mexico. **Journal of Range Management**, v.31, n.6, p.469-470, 1978.
- HILMELSBACH, D.S. Structure of forage cell walls: session synopsis. In: JUNG, H.G., BUXTON, D.R.; HATFIELD, R.D. et al. (Eds.) **Forage cell wall structure and digestibility**. Madison: ASA-CSSA-SSSA, 1993. p.271-283.
- HOLECHEK, J.L. Sample preparation techniques for microhistological analysis. **Journal of Range Management**, v.35, n.2, p.267-268, 1982.
- JOHNSON, M.K.; WOFFORD, H. Digestion and fragmentation: Influence on herbivore diet analysis. **Journal Wildlife Management**, v.47, n.3, p.877-879, 1983.
- LEES, G.L. Cuticle and cell wall thickness: relation to mechanical strength of whole leaves and isolated cells from some forage legumes. **Crop Science**, v.24, p.1077-1081, 1984.
- MANDRET, G. Regime alimentaire des ruminants domestiques (bovins, ovins, caprins) exploitant des parcours naturels sahéliens et soudano-sahéliens. III. Caractères épidermiques des principales espèces végétales consommées au pâturage: Constitution d'un atlas de référence en vue de l'étude du régime alimentaire. **Revue Élevage Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux**, v.42, n.2, p.237-243, 1989.
- MELLADO, M.; VALDEZ, R.; LARA, L.M. et al. Stocking rate effects on goats: a research observation. **Journal Range Management**, v.56, n.3, p.167-173, 2003.
- METCALF, C.R.; CHALK, L. **Anatomy of the dicotyledons**. Oxford: Clarendon Press, 1988. v.1. 276p.
- NOGUEIRA, M.C.L.; ROSITO, J.M.; SCHIRMER, A.G. Identificação de *Paspalum notatum* FLUEGGÉ e *Axonopus affinis* CHASE através da análise de fragmentos foliares. **Ciência Rural**, v.29, n.1, p.27-31, 1999.
- ROSITO, J.M.; MARCHEZAN, E. Determinação de descritores foliares para identificação micro-histológica de espécies forrageiras. **Acta Scientiarum**, v.25, n.2, p.407-413, 2003.
- SANTOS, S.A.; COSTA, C.; SOUZA, G.S. et al. Composição botânica da dieta de bovinos em pastagem nativa na sub-região da Nhecolândia, Pantanal. **Revista Brasileira Zootecnia**, v.31, n.4, p.1648-1662, 2002.
- SCOTT, G.; DAHL, B.E. Key to selected plant species of Texas using plant fragments. Texas, **The Museum**. Texas Tech University, 1980. p.1-9. (Occasional Papers).
- SMITH, A.D.; SHANDRUK, L.J. Comparison of fecal, rumen and utilization methods for ascertaining pronghorn diets. **Journal of Range Management**, v.32, n.4, p.275-279, 1979.
- SPARKS, D.R.; MALECHEK, J.C. Estimating percentage dry weight in diets using a microscopic technique. **Journal of Range Management**, v.21, n.4, p.264-265, 1968.
- STORR, G.M. Microscopic analysis of faeces, a technique for ascertaining the diet of herbivorous mammals. **Australian Journal Biology Science**, v.14, p.157-162, 1961.
- TILLEY, J.M.A.; TERRY, R.A. A two-stage technique for the *in vitro* digestion of forage crops. **Journal of British Grassland Society**, v.18, n. 2, p.104-111, 1963.
- TODD, J.W.; HANSEN, R.M. Plant fragments in the faeces of bighorns as indicators of food habits. **Journal Wildlife Management**, v.37, n.3, p.363-366, 1973.
- VOLTH, E.H.; BLACK, H.C. A histologic technique for determining feeding habits of small herbivores. **Journal Wildlife Management**, v.37, n.2, p.223-231, 1973.
- WILLIAMS, O.B. An improved technique for identification of plant fragments in herbivore feces. **Journal of Range Management**, v.22, n.1, p.51-52, 1969.
- WILSON, J.R. Variation of leaf characteristics with level of insertion on a grass tiller. II. Anatomy. **Australian Journal Agricultural Research**, v. 27, p.355-364, 1976.
- YAGUEDDU, C.; CID, M.S.; LOPEZ, T. Microhistological analysis of sheep gastro-intestinal content to confirm poisonous plant ingestion. **Journal of Range Management**, v.51, n.6, p.655-660, 1998.

Recebido em: 16/02/03

Aceito em: 21/06/05