

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

**EFEITO DA ADIÇÃO DE NUTRIENTES NA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA  
SERAPILHEIRA FOLIAR AO LONGO DO PROCESSO DE DECOMPOSIÇÃO  
EM UMA ÁREA DE CERRADO DO BRASIL CENTRAL**

ROBERTA CAPIM ROCHA

BRASÍLIA, DF  
2022

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

CENTRO DE DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL (CDS)  
DEPARTAMENTO DE ECONOMIA (ECO)  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (IB)  
INSTITUTO DE GEOCIÊNCIAS (IG)  
INSTITUTO DE QUÍMICA (IQ)

CURSO DE BACHARELADO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS

**EFEITO DA ADIÇÃO DE NUTRIENTES NA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA  
SERAPILHEIRA FOLIAR AO LONGO DO PROCESSO DE DECOMPOSIÇÃO  
EM UMA ÁREA DE CERRADO DO BRASIL CENTRAL**

ROBERTA CAPIM ROCHA

Trabalho de conclusão de curso apresentado  
ao Curso de Graduação em Ciências  
Ambientais da Universidade de Brasília,  
como requisito para obtenção do título de  
Bacharela em Ciências Ambientais.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Gabriela Bielefeld Nardoto

BRASÍLIA, DF  
2022

Este trabalho é dedicado a duas mulheres incríveis que são meu maior exemplo de vida, à minha mãe Creuzelina Capim Rocha, e à minha eterna “Tia Ici” Eunice Ferreira dos Santos (*in memoriam*).

## AGRADECIMENTOS

À minha família, em especial à minha mãe Creuzelina Rocha, minhas irmãs “Tisa” Rayssa Rocha e “Naná” Renata Rocha. Às minhas irmãs do coração Fernanda Santos “Fê” e Flayane Santos “Flay”. À minha eterna tia Eunice, que está descansando ao lado de Deus. Amo vocês.

À minha orientadora, professora Gabriela Bielefeld Nardoto, por todos os ensinamentos na disciplina de solos e vegetação, o que despertou meu interesse por essa área, resultando no presente estudo. Por ter me dado a oportunidade de estagiar no Laboratório de Solos e Vegetação da Universidade de Brasília, e pela orientação também na Iniciação Científica. Ao meu super coorientador extraoficial Vinícius Tirelli Pompermaier, a quem ora eu chamo de Vinicius, ora eu chamo de Pomper. Sou eternamente grata por toda sua dedicação tanto na minha Iniciação Científica, quanto neste estudo. Por todos os ensinamentos, paciência e apoio, sem os quais a conclusão deste trabalho não seria possível. Saiba que eu desejo o seu sucesso sempre.

Ao professor José Francisco Gonçalves Júnior por permitir que eu utilizasse o Laboratório de Limnologia da Universidade de Brasília, para análise de polifenóis, lignina e celulose. Agradeço também ao Guilherme Sena “Gui”, por me ajudar diretamente em cada etapa da análise destes compostos, pelas conversas de laboratório, troca de experiências de vida e a quem eu devo um açaí com paçoca, apesar de preferir juçara com farinha de mandioca. Agradeço às minhas amigas do grupo Grau de Entropia (Nalu, Jana, Gi, Lu e Luli), pelos conselhos, conversas e apoio durante toda a minha trajetória acadêmica.

Às reuniões e integrantes do *Environmental Isotope Studies* (EIS), que contribuíram para o aperfeiçoamento deste trabalho, e me proporcionou ensinamentos valiosos no meio acadêmico. Ao Marcus Vinicius “o Marquitos” pela companhia no laboratório, conversas, desabafos e ajuda na confecção deste TCC.

Ao Alex Rosa por ter realizado a coleta da serapilheira, e pela realização de parte das análises utilizadas neste estudo.

Agradeço à Universidade de Brasília, principalmente por ser uma instituição de referência da ciência nacional e internacional. E aos professores dessa instituição, mas especificamente às professoras e professores do curso de Ciências Ambientais, por todos os ensinamentos. Viva à ciência e à democracia! Agradeço aos que contribuíram indiretamente para a concretização deste trabalho.

## RESUMO

A expansão e a intensificação da agricultura no Cerrado são uma das principais ameaças à sua biodiversidade, um dos motivos é o aumento da utilização de fertilizantes. Estudos iniciados em 1998 em um experimento de fertilização, em um cerrado do Brasil Central, demonstraram que o acesso da mesofauna do solo, a parcelas fertilizadas com a adição combinada de nitrogênio e fósforo, eleva a taxa de decomposição da serapilheira. No entanto, ainda não compreendemos como a mesofauna do solo pode influenciar nas transformações e disponibilidade de nutrientes da serapilheira, como o nitrogênio. E nos compostos que conferem qualidade à serapilheira (lignina, celulose e polifenóis totais). O objetivo do presente estudo, foi investigar o efeito da adição de nutrientes (nitrogênio, fósforo, adição combinada de nitrogênio e fósforo, e calagem), e da mesofauna do solo, nos processos de transformações do nitrogênio, nas concentrações de compostos estruturais (lignina e celulose) e compostos secundários (polifenóis totais) da serapilheira, ao longo do processo de decomposição. Este estudo foi desenvolvido na Reserva Ecológica do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, em vegetação de cerrado sentido restrito, em 3 réplicas de cada tratamento e o controle (resultando em 15 parcelas de fertilização). A serapilheira foi submetida a 360 dias de decomposição em *litter bags* de 0,3 mm (sem acesso da mesofauna) e de 2 mm (com acesso a mesofauna). As amostras foram unidas de 2 em 2 meses, para determinar o conteúdo total de nitrogênio, a razão isotópica  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$  ( $\delta^{15}\text{N}$ ), e a razão carbono/nitrogênio da serapilheira. As análises de polifenóis totais, lignina e celulose da serapilheira foram realizadas para o 3º, 6º, 9º e 12º mês de exposição da serapilheira. Os resultados indicaram que houve um aumento da concentração de nitrogênio, e da razão carbono/nitrogênio nos tratamentos com adição de nitrogênio, e adição combinada de nitrogênio e fósforo. O tratamento com adição combinada de nitrogênio e fósforo, apresentou diminuição da razão lignina/nitrogênio. Todos os tratamentos apresentaram aumento do valor de  $\delta^{15}\text{N}$ . Na calagem, houve uma diminuição significativa na concentração de polifenóis totais. Conclui-se que os tempos de exposição da serapilheira à decomposição, e a adição de nutrientes, afetam os compostos da serapilheira analisados (com exceção da razão lignina/celulose, que foi afetada apenas pelo tempo). E que o efeito de legado da adição de nutrientes, pode ter influenciado na atuação da mesofauna do solo, quanto aos compostos analisados. O estudo demonstra, que os nutrientes oriundos tanto da fertilização, quanto da calagem, levam a mudanças nos processos que envolvem o nitrogênio.

**Palavras-chave:** agricultura, calagem, fertilização, isótopos estáveis, mesofauna do solo.

## ABSTRACT

The expansion and intensification of agriculture in the Cerrado is one of the main threats to its biodiversity, one of the reasons being the increased use of fertilizers. Studies initiated in 1998 in a fertilization experiment, in a Cerrado of Central Brazil, showed that the access of mesofauna to fertilized plots with the combined addition of nitrogen and phosphorus, elevates the decomposition rate of the serapilheira. However, we still do not understand how soil mesofauna can influence the transformations and availability of serapilheira nutrients, such as nitrogen. And in the compounds that confer quality to the burlap (lignin, cellulose and total polyphenols). The objective of this study was to investigate the effect of nutrient addition (nitrogen, phosphorus, combined addition of nitrogen and phosphorus, and liming), and soil mesofauna, in the processes of nitrogen transformations, in the concentrations of structural compounds (lignin and cellulose) and secondary compounds (total polyphenols) of the burlap, throughout the decomposition process. This study was developed in the Ecological Reserve of the Brazilian Institute of Geography and Statistics, in cerrado vegetation sense restricted, in 3 replicates of each treatment and the control (resulting in 15 fertilization plots). The litter was submitted to 360 days of decomposition in litter bags of 0.3 mm (without mesofauna access) and 2 mm (with mesofauna access). Samples were pooled every 2 months to determine the total nitrogen content,  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$  isotope ratio ( $\delta^{15}\text{N}$ ), and carbon/nitrogen ratio of the litter. The analyses of total polyphenols, lignin and cellulose of the burlap were carried out for the 3<sup>o</sup>, 6<sup>o</sup>, 9<sup>o</sup> and 12<sup>o</sup> month of burlap exposure. The results indicated that there was an increase in nitrogen concentration, and carbon/nitrogen ratio in the treatments with added nitrogen, and combined addition of nitrogen and phosphorus. The treatment with combined addition of nitrogen and phosphorus, presented a decrease in the lignin/nitrogen ratio. All the treatments presented increase of the value of  $\delta^{15}\text{N}$ . In liming, there was a significant decrease in the concentration of total polyphenols. We conclude that the times of exposition of the burlap to decomposition, and the addition of nutrients, affect the analyzed burlap compounds (except the lignin/cellulose ratio, which was affected only by the time). And that the legacy effect of nutrient addition may have influenced the performance of soil mesofauna, as to the compounds analysed. The study demonstrates that the nutrients originating both from fertilization and liming lead to changes in the processes that involve nitrogen.

**Keywords:** agriculture, liming, fertilization, stable isotopes, soil mesofauna.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1.** Mapa de localização das parcelas de experimento de fertilização na RECOR do IBGE, Brasília-DF..... 20
- Figura 2.** Desenho experimental mostrando as 20 parcelas de fertilização em um cerrado sentido restrito na RECOR do IBGE, Brasília-DF..... 21
- Figura 3.** Concentração média de nitrogênio da serapilheira em malha fina nos tratamentos ao longo do tempo de exposição da serapilheira em um cerrado sentido restrito submetido a adição de nutrientes, localizado na RECOR do IBGE, Brasília, DF. Sendo: ‘\*’  $p < 0,05$ ; ‘\*\*’  $p < 0,01$ ; ‘\*\*\*’  $p < 0,001$ ..... 27
- Figura 4.** Valor médio de  $\delta^{15}\text{N}$  da serapilheira em malha fina nos tratamentos ao longo do tempo de exposição da serapilheira em um cerrado sentido restrito submetido a adição de nutrientes, localizado na RECOR do IBGE, Brasília, DF. Sendo: ‘\*’  $p < 0,05$ ; ‘\*\*’  $p < 0,01$ ; ‘\*\*\*’  $p < 0,001$ ..... 28
- Figura 5.** Razão carbono/nitrogênio da serapilheira em malha fina nos tratamentos ao longo do tempo de exposição da serapilheira em um cerrado sentido restrito submetido a adição de nutrientes, localizado na RECOR do IBGE, Brasília, DF. Sendo: ‘\*’  $p < 0,05$ ; ‘\*\*’  $p < 0,01$ ; ‘\*\*\*’  $p < 0,001$ .....29
- Figura 6.** Concentração média de polifenóis totais da serapilheira em malha fina nos tratamentos ao longo do tempo de exposição da serapilheira em um cerrado sentido restrito submetido a adição de nutrientes, localizado na RECOR do IBGE, Brasília, DF. Sendo: ‘\*’  $p < 0,05$ ; ‘\*\*’  $p < 0,01$ ; ‘\*\*\*’  $p < 0,001$ .....30
- Figura 7.** Razão lignina/celulose da serapilheira em malha fina nos tratamentos ao longo do tempo de exposição da serapilheira em um cerrado sentido restrito submetido a adição de nutrientes, localizado na RECOR do IBGE, Brasília, DF. Sendo: ‘\*’  $p < 0,05$ ; ‘\*\*’  $p < 0,01$ ; ‘\*\*\*’  $p < 0,001$ .....31
- Figura 8.** Razão lignina/nitrogênio da serapilheira em malha fina nos tratamentos ao longo do tempo de exposição da serapilheira em um cerrado sentido restrito submetido a adição de nutrientes, localizado na RECOR do IBGE, Brasília, DF. Sendo: ‘\*’  $p < 0,05$ ; ‘\*\*’  $p < 0,01$ ; ‘\*\*\*’  $p < 0,001$ .....32
- Figura 9.** Efeito dos tratamentos de fertilização na concentração total de nitrogênio (A), valor de  $\delta^{15}\text{N}$ , (B), razão carbono/nitrogênio (C), concentração de polifenóis totais (D), razão lignina/nitrogênio (E) da serapilheira em um cerrado sentido restrito submetido a adição de nutrientes, localizado na RECOR do IBGE, Brasília, DF. O efeito dos tratamentos sobre os compostos da serapilheira foi testado com regressões lineares. Sendo: ‘\*’  $p < 0,05$ ; ‘\*\*’  $p < 0,01$ ; ‘\*\*\*’  $p < 0,001$ .....52
- Figura 10.** Efeito do tempo na concentração total de nitrogênio (A), valor de  $\delta^{15}\text{N}$ , (B), razão carbono/nitrogênio (C), concentração de polifenóis totais (D), razão lignina/celulose (E), razão lignina/nitrogênio (F) da serapilheira em um cerrado sentido restrito submetido a adição de nutrientes, localizado na RECOR do IBGE, Brasília, DF.

O efeito do tempo sobre os compostos da serapilheira foi testado com regressões lineares.  
Sendo: '\*'  $p < 0,05$ ; '\*\*'  $p < 0,01$ ; '\*\*\*'  $p < 0,001$ .....54



## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Composição química da serapilheira inicial no controle e tratamentos de adição de nutrientes em um cerrado sentido restrito, localizado na RECOR do IBGE, Brasília, DF..... 25
- Tabela 2.** Resultados da ANOVA multifatorial testando o efeito do tratamento, tempo e malha para a concentração de nitrogênio, de polifenóis totais, valor de  $\delta^{15}\text{N}$ , e razões carbono/nitrogênio, lignina/nitrogênio e lignina/celulose em um cerrado sentido restrito, localizado na RECOR do IBGE, Brasília, DF..... 25
- Tabela 3.** Valores de nitrogênio,  $\delta^{15}\text{N}$ , polifenóis totais e razões carbono/nitrogênio, lignina/celulose e lignina/nitrogênio em percentagem da serapilheira inicial no controle e tratamentos de adição de nutrientes em um cerrado sentido restrito, localizado na RECOR do IBGE, Brasília, DF.....43
- Tabela 4.** Valores de nitrogênio,  $\delta^{15}\text{N}$  e razão carbono/nitrogênio em percentagem da serapilheira em malha fina e malha grossa, ao longo do tempo no controle e tratamentos de adição de nutrientes em um cerrado sentido restrito, localizado na RECOR do IBGE, Brasília, DF..... 44
- Tabela 5.** Valores de polifenóis, razões lignina/nitrogênio e lignina/celulose em percentagem, da serapilheira em malha fina e malha grossa, ao longo do tempo no controle e tratamentos de adição de nutrientes em um cerrado sentido restrito, localizado na RECOR do IBGE, Brasília, DF..... 48

## SUMÁRIO

<b>RESUMO.....</b>	<b>5</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>6</b>
<b>LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....</b>	<b>7</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>9</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>12</b>
<b>2. OBJETIVO.....</b>	<b>14</b>
<b>3. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>14</b>
<b>3.1 O processo de decomposição e o papel da mesofauna do solo.....</b>	<b>14</b>
<b>3.2 Composição química da serapilheira.....</b>	<b>16</b>
<b>3.3 Introdução aos isótopos estáveis, com foco no <math>\delta^{15}\text{N}</math>.....</b>	<b>17</b>
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>19</b>
<b>4.1 Caracterização da área de estudo.....</b>	<b>19</b>
<b>4.2 O Experimento de fertilização.....</b>	<b>21</b>
<b>4.3 Coleta da serapilheira, confecção e distribuição de bolsas de decomposição.....</b>	<b>22</b>
<b>4.4 Análises químicas da serapilheira.....</b>	<b>23</b>
<b>4.5 Análise estatística dos dados.....</b>	<b>24</b>
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>24</b>
<b>5.1 Composição química da serapilheira inicial.....</b>	<b>24</b>
<b>5.2 Efeito dos tratamentos, tempo e malha na composição química da serapilheira.....</b>	<b>25</b>
5.2.1 Concentração de Nitrogênio.....	26
5.2.2 Valores de $\delta^{15}\text{N}$ .....	27
5.2.3 Razão carbono/ nitrogênio.....	29
5.2.4 Polifenóis totais.....	30
5.2.5 Razão lignina/celulose.....	31
5.2.6 Razão lignina/nitrogênio.....	31
<b>6. DISCUSSÃO.....</b>	<b>32</b>
<b>7. CONCLUSÃO.....</b>	<b>35</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>37</b>
<b>APÊNDICE A- Dados brutos da composição química da serapilheira inicial.....</b>	<b>43</b>

<b>APÊNDICE B- Dados brutos de nitrogênio, <math>\delta^{15}\text{N}</math> e razão carbono/nitrogênio.....</b>	<b>44</b>
<b>APÊNDICE C- Dados brutos de polifenóis, razões lignina/nitrogênio e lignina/celulose.....</b>	<b>48</b>
<b>APÊNDICE D- Boxplots do efeito dos tratamentos de fertilização nos compostos analisados da serapilheira.....</b>	<b>51</b>
<b>APÊNDICE E- Boxplots do efeito dos tempos de exposição da serapilheira nos compostos analisados da serapilheira.....</b>	<b>53</b>
<b>ANEXO A- Protocolo de determinação de lignina e celulose.....</b>	<b>55</b>
<b>ANEXO B- Protocolo de determinação de polifenóis.....</b>	<b>59</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A expansão e a intensificação da atividade agrícola, se configuram como uma das principais ameaças à biodiversidade do Cerrado. Este que é considerado um dos *hotspots* mundiais de biodiversidade, uma vez que possui altos níveis de endemismo de espécies de plantas e animais, possuindo a flora mais rica dentre as savanas do mundo (KLINK e MACHADO, 2005).

Nos últimos 40 anos, cerca de 50% da cobertura natural do Cerrado foi convertida para outros usos (MYERS et al., 2000). Segundo dados do Relatório Anual de Desmatamento do MapBiomas (2022), em 2021 o Cerrado foi o bioma que apresentou a segunda maior área desmatada, com 500.537 hectares, uma alta de 20% no desmatamento em comparação ao ano de 2020. De acordo com o relatório, 98% desse desmatamento tem como vetor de pressão a agropecuária.

Os solos profundos, o predomínio de uma topografia plana e suavemente ondulada (que favorece a agricultura mecanizada e a irrigação), assim como investimentos em técnicas para a correção da acidez dos solos, e em culturas adaptadas a esta realidade, favoreceram o avanço da fronteira agrícola sobre o Cerrado (QUEIROZ, 2009). E mudaram um cenário em que o bioma era considerado impróprio para a agricultura, devido a seus solos intemperizados, ácidos e de baixa fertilidade (BOURLAG, 2002).

O uso excessivo e indiscriminado de fertilizantes, como fósforo (P) e nitrogênio (N), pode se configurar como uma ameaça para a qualidade da água, do ar e do solo, afetando ciclos como o do N, e o balanço de gases do efeito estufa (SUTTON et al., 2011). As atividades humanas não só dobraram a quantidade de N reativo, levando o N a ser o terceiro maior condutor de mudanças na biodiversidade do planeta, como também aceleraram o ciclo biogeoquímico do P (SMILL, 2000; SALA et al., 2000; GALLOWAY et al., 2008). Em savanas, o aumento da disponibilidade de N pode levar à acidificação do solo, e perda da biodiversidade (FYNN e O'CONNOR, 2005; BUSTAMENTE et al., 2012a). Em uma projeção até 2050, o Cerrado está entre os *hotspots* mundiais de biodiversidade, que podem receber mais que o dobro de N via deposição atmosférica (PHOENIX et al., 2006).

No Cerrado, além da fertilização, ocorre também a calagem, com a finalidade de corrigir o pH dos solos, impulsionando a prática agrícola nesta região. Neste sentido, o legado tanto da fertilização quanto da calagem, podem permanecer por um longo prazo em áreas agrícolas abandonadas, dificultando a restauração desses ecossistemas (BUISSON et al., 2019).

Estudos iniciados em 1998 em um cerrado do Brasil Central, vem demonstrando que a fertilização com +N e +NP, aumentou a disponibilidade de N inorgânico no solo (GAROFALO, 2001). A invasão por capim gordura (*Melinis minutiflora*) foi identificada em tratamento com calagem (MELLO, 2019). A entrada de nutrientes também resultou em mudanças na riqueza e diversidade de espécies, mas estes foram mais intensos com a adição combinada de +NP (JACOBSON et al., 2011), indicando que estes e outros efeitos parecem ser colimitados por N e P (BUSTAMENTE et al., 2012b). Parcelas fertilizadas com +NP apresentaram a maior concentração de N na serapilheira, aumento da qualidade da serapilheira, e aceleração da sua taxa de decomposição (KOZOVITS et al., 2007). Um aumento na taxa de decomposição nos tratamentos com +NP, também foi observado por Jacobson (2009). Estudando os efeitos da mesofauna do solo, Pompermaier et al. (2021) demonstraram que as taxas de decomposição foram significativamente mais elevadas, quando a mesofauna do solo acessava a serapilheira no tratamento com +NP.

A mesofauna do solo inclui organismos com tamanho corporal de 0,2 mm a 2 mm (MELO et al., 2009), que atuam na fragmentação de resíduos vegetais da serapilheira, e no controle de microrganismos (BROWN et al., 2015). Com isso, a mesofauna aumenta a taxa de decomposição, e a liberação de nutrientes para o solo (BROWN et al., 2015). Dentre os organismos da fauna edáfica, é a que apresenta maior efeito na decomposição (CHAPIN et al., 2011). Além da mesofauna, há a microfauna, que compreende organismos com tamanho < 0,2 mm (MELO et al., 2009), e que atuam como estimuladores da mineralização de nutrientes, e no controle de outros microrganismos (LAVELLE, 1997). A macrofauna do solo abrange organismos > 2 mm, que são visíveis a olho nu (MELO et al., 2009). Estes atuam por exemplo, na movimentação de partículas do solo e controle de organismos, e contribuem para a aceleração da decomposição, e reciclagem de nutrientes minerais retidos na matéria orgânica (CONSTANTINO e ACIOLI, 2008; BROWN et al., 2015).

Com base no trabalho de Pompermaier et al. (2021), nós começamos a compreender como a mesofauna do solo, atua na decomposição da serapilheira sob influência da adição de nutrientes. No entanto, ainda não compreendemos como a mesofauna e a adição de nutrientes, podem influenciar as transformações e disponibilidade de nutrientes da serapilheira (como o N), ao longo do processo de decomposição. Além disso, buscamos entender como a mesofauna e a adição de nutrientes, atuam em compostos que conferem qualidade à serapilheira, que são os compostos estruturais (lignina e celulose) e secundários (polifenóis totais).

A lignina é um componente recalcitrante da parede celular dos vegetais (CHAPIN et al., 2011), portanto é um dos controladores da taxa de decomposição da serapilheira (MELILLO et al., 1982). Assim como a lignina, a celulose também é um composto estrutural da serapilheira, porém é mais lábil (CHAPIN et al., 2011), e influencia no aumento da taxa de decomposição. A celulose é considerada um biopolímero e um polissacarídeo, e constitui de 20% a 30% da massa da serapilheira (BERG e LASKOWSKI, 2005). Os polifenóis totais são considerados compostos secundários da serapilheira, e atuam como compostos de defesa (HÄTTENSCHWILER e VITOUSEK, 2000), sua toxicidade pode reduzir a atuação de organismos (CHAPIN et al., 2011). Sendo assim, a qualidade da serapilheira, e a sua fragmentação por organismos como a mesofauna do solo, aumentam a atuação dos microrganismos, favorecendo o processo de decomposição.

## **2. OBJETIVO**

Investigar o efeito da adição de nutrientes (+N, +P, +NP e calagem) e da mesofauna do solo, nos processos de transformações do nitrogênio, nas concentrações de compostos estruturais (lignina e celulose) e compostos secundários (polifenóis totais) da serapilheira, ao longo do processo de decomposição.

## **3. REVISÃO DE LITERATURA**

### **3.1 O processo de decomposição e o papel da mesofauna do solo**

A decomposição é o processo no qual ocorre a degradação física e química da matéria orgânica morta (TOWNSEND et al., 2007; CHAPIN et al., 2011), que é fragmentada e convertida em compostos orgânicos, água e em dióxido de carbono- CO<sub>2</sub> (TOWNSEND et al., 2007; CHAPIN et al., 2011). Isto é possível devido a três processos: lixiviação, onde a ação da água propicia a remoção de compostos solúveis; fragmentação, onde a ação da fauna do solo reduz o tamanho do material, aumentando a área para colonização por microrganismos, contribuindo para o processo de decomposição; e a alteração química da matéria orgânica morta, devido a ação dos microrganismos do solo (CHAPIN et al., 2011). Cabe frisar que algumas reações químicas ocorrem no solo sem a mediação por microrganismos (CHAPIN et al., 2011).

A decomposição é importante para o equilíbrio, o funcionamento e a manutenção de ecossistemas (PINTO et al., 2016), pois permite que parte do carbono incorporado no material orgânico seja liberado para a atmosfera na forma de CO<sub>2</sub>, e que a outra parte seja

integrada ao solo (OLSON, 1963), o que contribui para a manutenção da fertilidade do solo (BARGALI, 2015), e para a disponibilização de nutrientes para as plantas. Essa disponibilização se dá por meio do ciclo biogeoquímico, que é responsável pelos processos de transferência dos nutrientes dentro do sistema solo-planta (NEVES et al., 2001).

Sendo assim, a decomposição é determinada por fatores bióticos (como qualidade do material a ser decomposto, diversidade e abundância dos organismos do solo) e abióticos (como temperatura e precipitação) (TOWNSEND et al., 2007; BARGALI, 2015). Um exemplo da atuação destes fatores é o que ocorre no bioma Cerrado, onde há um longo período de seca, devido ao clima tipicamente sazonal, resultando num processo de decomposição mais lento da matéria orgânica (KLEIN, 2002).

A fauna edáfica é um dos principais fatores bióticos do processo de decomposição, e é composta por animais invertebrados que passam parte ou todo o ciclo de sua vida no solo (BERUDE et al., 2015), e que desempenham importantes serviços ambientais, como a atuação na decomposição e mineralização da matéria orgânica (SILVA et al., 2011). Estes organismos concentram sua atividade biológica na camada superficial do solo, que chega até 15 cm em ambientes de climas tropicais e até 30 cm em climas temperados (PRIMAVESI, 1990).

Essa diversidade da fauna edáfica abrange organismos que apresentam tamanho corporal <0,2 mm (microfauna), como nematoides e protozoários, até organismos >2,0 mm (macrofauna) que são visíveis a olho nu (MELO et al., 2009; BROWN et al., 2015). Há também a mesofauna, que abrange organismos que medem de 0,2 a 2 mm (MELO et al., 2009), como diplura, protura, enquitreídeos, sínfilos, paurópodos, pseudo-escorpiões, palpígrados, coleópteros, ácaros e colêmbolos, sendo estes dois últimos mais abundantes e diversos (BERUDE et al., 2015; BROWN et al., 2015).

A mesofauna do solo atua na fragmentação de resíduos vegetais, favorecendo a ação de microrganismos e conseqüentemente no aumento da taxa de decomposição (BROWN et al., 2015), e na mobilização de nutrientes através de enzimas (PRIMAVESI, 1990). Os colêmbolos por exemplo, exercem importante função detritívora e atuam no controle de microrganismos, como os fungos (MELO et al., 2009). Enquanto que os ácaros agem como predadores, o que implica no controle de populações de organismos da microbiota, por exemplo (MELO et al., 2009). A atuação da fauna edáfica, tem relação direta com a composição química da serapilheira, sendo esta última, outro fator importante para o processo de decomposição.

### 3.2 Composição química da serapilheira

Dentre os diversos fatores que influenciam o processo de decomposição da serapilheira, cabe destacar a sua qualidade química, que é determinada pelos teores em compostos orgânicos e inorgânicos da serapilheira. Como frações solúveis, carbono, nutrientes, lignina, polifenóis totais, celulose e razões C/N (carbono/nitrogênio), C/P (carbono/fósforo), L/N (lignina/nitrogênio) e L/C (lignina/celulose) (SWIFT et al., 1979; BEARE et al., 1992; QUEIROZ, 2001; SALIBA et al., 2001).

A decomposição da serapilheira (biomassa orgânica composta por folhas, cascas, ramos, troncos, gravetos, flores, inflorescências, frutos, sementes e fragmentos vegetais não identificáveis) tem relação direta com o fluxo de nutrientes que retorna ao solo (JACOBSON, 2009), sendo o material foliar o mais expressivo em quantidade de nutrientes (MEGURO et al., 1980), e o que corresponde ao maior percentual da serapilheira total (PINTO et al., 2016).

A qualidade química exerce influência sobre as interações da fauna do solo, resultando, por exemplo, em uma maior palatabilidade da serapilheira e crescimento populacional da fauna do solo, assim, levando ao aumento da taxa de decomposição (SWIFT et al., 1979; TAYLOR et al., 1989; BEARE et al., 1992; FROES et al., 2021). Estudos demonstram que altas concentrações de N, P e compostos facilmente degradáveis, como os açúcares, estão associados a uma melhor qualidade da serapilheira, elevando as taxas de decomposição (TAYLOR et al., 1989; LI et al., 2011).

Como exemplo da influência qualidade química da serapilheira, a lignina (composto estrutural da serapilheira), por possuir um alto teor de carbono, reduz a qualidade química da serapilheira, pois exige um maior gasto de energia por parte dos organismos decompositores (MELILLO et al., 1982). Enquanto que a celulose (composto estrutural da serapilheira) possui estruturas menos irregulares do que a lignina, facilitando sua decomposição (CHAPIN et al., 2011). Os polifenóis totais, que são compostos secundários da serapilheira, podem inibir a decomposição da serapilheira, pois reduzem a mineralização do N (CHAPIN, 1995). Além disso, como os polifenóis totais são compostos de defesa, sua toxicidade pode reduzir a atuação de organismos (CHAPIN et al., 2011). Sendo assim, teores de constituintes químicos como P, cálcio, lignina e carboidratos como a celulose, influenciam na taxa de decomposição (MEGURO, 1980).

As plantas do cerrado por exemplo, apresentam baixa taxa de decomposição, pois além do regime de precipitação sazonal, elas estão sujeitas a solos muito intemperizados e baixa disponibilidade de nutrientes (principalmente N e P), o que levou ao



desenvolvimento de mecanismos conservativos, resultando na produção de serapilheira com altas razões C/N e C/P (HARIDASAN, 2000; NARDOTO et al., 2006). Outro mecanismo utilizado pela vegetação para se adaptar às condições do Cerrado, é a baixa produção de serapilheira ao longo do ano, investindo assim na longevidade das folhas, para diminuir os custos de investimento na produção de biomassa (HARIDASAN, 2000).

A qualidade da serapilheira também varia conforme o tipo de solo, a espécie vegetal e sua habilidade em absorver, utilizar e redistribuir os nutrientes, e conforme a organização do sistema florestal (nativo ou plantado, homogêneo ou heterogêneo), o que determina a atuação dos organismos decompositores (NEVES et al., 2001; GAMA-RODRIGUES e BARROS, 2002). Deste modo, estudos indicam que há uma relação positiva entre a heterogeneidade vegetal e os organismos decompositores, visto que uma maior diversidade da composição vegetal, pode resultar em uma maior abundância e diversidade de organismos específicos para atuarem na decomposição, frente as suas necessidades alimentícias diferentes e/ou habilidades diversas (MUSCARDI et al., 2015; FROES et al., 2021).

Considerando que o processo de decomposição tem relação direta com fatores como a fauna edáfica, e a composição química da serapilheira, dentre suas diversas aplicações, os isótopos estáveis se apresentam como uma ferramenta que permite medir a dinâmica de nutrientes ao longo do tempo.

### **3.3 Introdução aos isótopos estáveis, com foco no $\delta^{15}\text{N}$**

A palavra isótopo vem do grego, onde *ISO* significa mesmo ou igual, e o termo *TOPOS* significa lugar, já que são elementos que ocupam o mesmo lugar na tabela periódica (DUCATTI et al., 2011). Isótopos são espécies atômicas de um mesmo elemento químico, que possuem massas diferentes, pois tem no seu núcleo atômico o mesmo número de prótons, mas diferente número de nêutrons (MARTINELLI et al., 2020). Enquanto que os isótopos estáveis têm essa denominação, por não alterarem sua massa ao longo de sua existência, os isótopos denominados radioativos ou instáveis, apresentam decaimento de massa por emissão de energia ou partículas subatômicas (MARTINELLI et al., 2009).

A utilização de isótopos estáveis baseia-se na análise da razão isotópica, que é dada pelo quociente entre o isótopo mais pesado (aquele que possui maior número de nêutrons em seu núcleo atômico), e o isótopo mais leve (que possui menor número de nêutrons em seu núcleo atômico) (CAXITO e SILVA, 2015; NARDOTO et al., 2017).

Por exemplo, no caso do nitrogênio, a razão isotópica é dada pelo quociente entre o número de átomos de  $^{15}\text{N}$  (isótopo mais pesado), e o número de átomos de  $^{14}\text{N}$  (isótopo mais leve) (NARDOTO et al., 2017). Já para o carbono, a razão isotópica é dada pelo quociente entre o número de átomos de  $^{13}\text{C}$  (isótopo mais pesado), e o número de átomos de  $^{12}\text{C}$  (isótopo mais leve) (NARDOTO et al., 2017). A fórmula da razão isotópica é demonstrada abaixo:

$$\delta = (\mathbf{R}_{\text{amostra}} / \mathbf{R}_{\text{padrão}} - 1) \times 1000$$

Onde  $\mathbf{R}_{\text{amostra}}$  = razão isotópica medida na amostra e  $\mathbf{R}_{\text{padrão}}$  = razão isotópica de um padrão conhecido internacionalmente, no caso do carbono é o de um fóssil marinho denominado *Belemnintella americana*, que foi encontrado na formação geológica denominada Pee Dee no estado da Carolina do Sul (MARTINELLI et al., 2020). No caso do nitrogênio o ar atmosférico é o valor de referência, que é igual a 0‰ (NARDOTO et al., 2017). Como R tem valores muito pequenos, seu valor é multiplicado por mil, criando a notação denominada  $\delta$  por mil (‰). Para o carbono, a notação mais usual é  $\delta^{13}\text{C}$ , e para o nitrogênio a notação mais usual é  $\delta^{15}\text{N}$  (NARDOTO et al., 2017).

A razão isotópica de um elemento varia de acordo com processos físicos, químicos e biológicos, que causam mudanças nas abundâncias relativas dos isótopos entre reagentes e produtos, esse processo é denominado fracionamento isotópico (CAXITO e SILVA, 2015), onde o valor de  $\delta$  pode ser mais positivo ou negativo (NARDOTO et al., 2017). Essa variação ocorre porque isótopos leves formam ligações atômicas mais fracas, portanto são mais reativos e por consequência se concentram no produto da reação, enquanto que os isótopos pesados se concentram nos reagentes (COPLEN et al., 2002).

Essas mudanças na razão isotópica são os alicerces da metodologia isotópica, já que permitem traçar os caminhos seguidos pelos principais elementos que fazem parte dos organismos vivos (MARTINELLI et al., 2020). Por isso os isótopos estáveis são de grande interesse para diversas áreas, como a ambiental. No campo da biologia, elementos químicos de grande interesse são o carbono, hidrogênio, oxigênio, enxofre e nitrogênio (DUCATTI et al., 2011). Nesse contexto, temos a utilização do nitrogênio para estudar o modo de fixação deste elemento nas plantas (CAXITO e SILVA, 2015).

Somente as plantas que possuem associação com bactérias fixadoras de nitrogênio, conseguem assimilar o nitrogênio atmosférico ( $\text{N}_2$ ), de forma que a maioria das plantas fixam nitrogênio através da incorporação de compostos nitrogenados do solo (DUCATTI et al., 2011), que são o amônio ( $\text{NH}_4^+$ ) e o nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) (MARTINELLI et al., 2020). Sendo assim, o modo de fixação influencia na assinatura isotópica da planta,

como é o caso das leguminosas, que apresentam um valor de  $\delta^{15}\text{N}$  em torno de 0‰, devido a sua relação simbiótica com as micorrizas, que fixam nitrogênio atmosférico (HANDLEY e RAVEN, 1992; WERNER e SCHIMIDT, 2002; DUCATTI et al., 2011; CAXITO e SILVA, 2015).

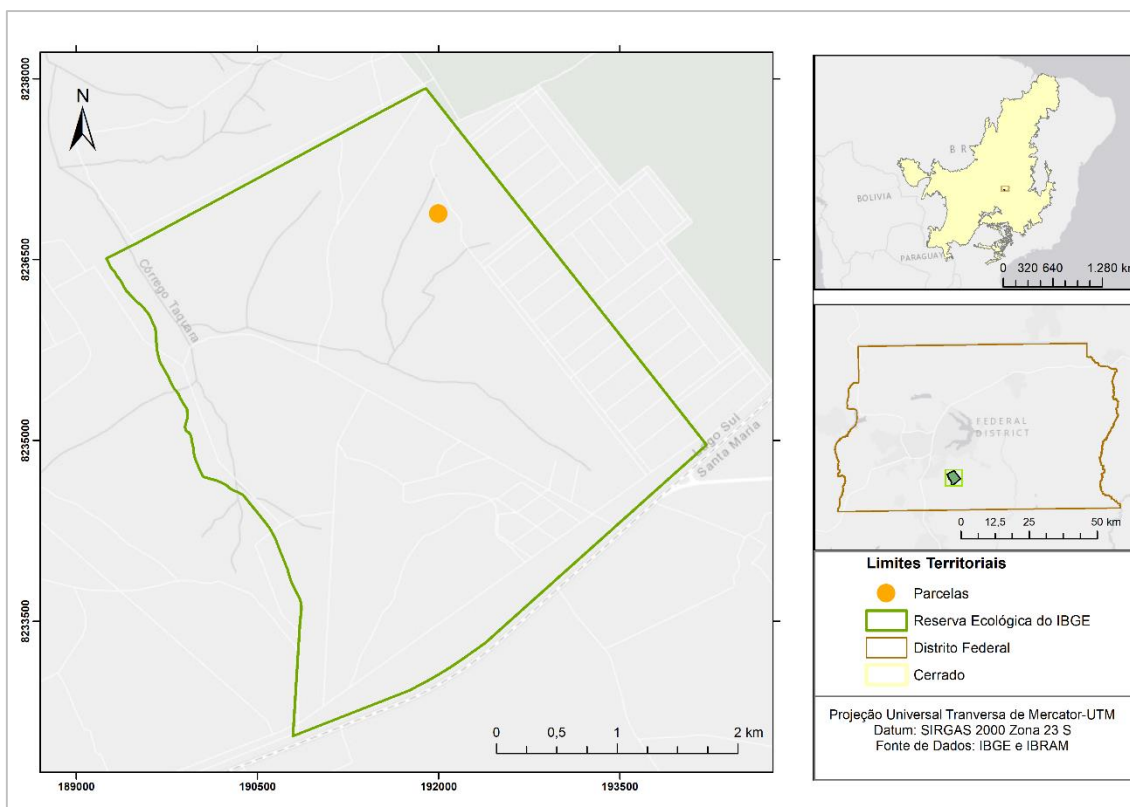
A utilização de fertilizantes industriais também leva a baixos valores de  $\delta^{15}\text{N}$  (próximo de 0‰), já que a principal fonte para sua fabricação é o  $\text{N}_2$  (YONEYAMA et al., 1986; CLARK e FRITZ, 1997; SHIBUYA et al., 2006). Enquanto isso, valores negativos de  $\delta^{15}\text{N}$  são observados em solos com baixa porcentagem de matéria orgânica, secos e arenosos (MARTINELLI et al., 1999; SHIBUYA et al., 2006; DUCATTI et al., 2011). Em contrapartida, a utilização de fertilizante orgânico e matéria orgânica decomposta aumenta o valor de  $\delta^{15}\text{N}$  nos solos (CLARK e FRITZ, 1997; SHIBUYA et al., 2006).

O fato é que a composição isotópica do nitrogênio nas plantas é influenciada por diversos fatores, como práticas de agricultura, condições geográficas e climáticas (CAXITO e SILVA, 2015). Um estudo de Craine et al. (2009) considerando uma escala global, demonstra que os valores de  $\delta^{15}\text{N}$  foliar podem diferir consistentemente entre as plantas que estão associadas a diferentes fungos micorrízicos, e que alguns estudos demonstram uma relação positiva entre o  $\delta^{15}\text{N}$  foliar e as concentrações de N foliar.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Caracterização da área de estudo**

O presente estudo foi desenvolvido em parcelas experimentais de fertilização, localizadas no interior da Reserva Ecológica do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (RECOR do IBGE), no bioma Cerrado. Criada em 1975, a RECOR do IBGE é uma unidade de conservação (UC) com cerca de 1.391 hectares, localizada no Distrito Federal (DF), nas coordenadas 15° 56' S e 47° 53' N (Figura 1).



**Figura 1.** Mapa de localização das parcelas de experimento de fertilização na RECOR do IBGE, Brasília-DF.

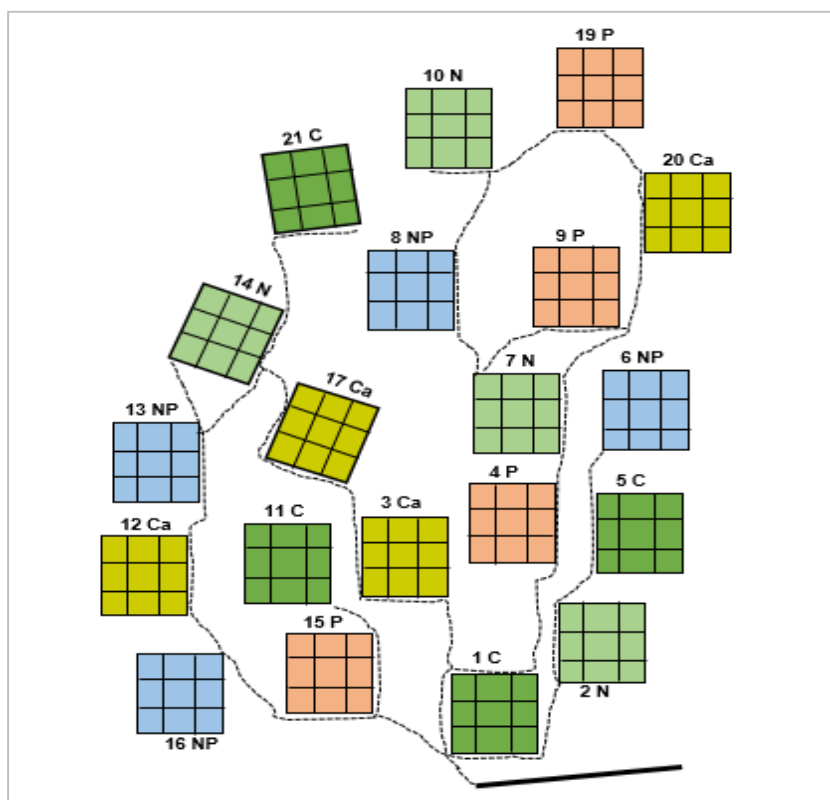
O clima da região em que se encontra a RECOR é tipicamente sazonal, com duas estações bem definidas, são elas: estação chuvosa, que se inicia no mês de outubro e se estende até abril; e a estação seca, que se inicia em maio e se estende até setembro. A precipitação e a temperatura média anual são respectivamente de 1.453 mm e 22° C. Quanto a hidrografia, cinco cursos d'água nascem na reserva, são os córregos Taquara, Roncador, Monjolo, Escondido e Pitoco.

Quanto ao relevo, a UC está localizada no Pediplano de Brasília, com altitude média de 1.100 m. Conforme o Sistema Brasileiro de Classificação de Solos, o solo do local é classificado como Latossolo Vermelho Distrófico, que é um solo profundo, bem drenado, contém argilominerais do tipo 1:1, com predomínio de óxidos de ferro e alumínio. A fitofisionomia da localidade de estudo é o cerrado sentido restrito. Este é caracterizado pela presença de estratos arbóreo e arbustivo-herbáceo definidos, sem a formação de dossel contínuo, devido a distribuição espaçada de árvores em diferentes densidades sobre o terreno (RIBEIRO e WALTER, 2008).

## 4.2 O Experimento de fertilização

As parcelas experimentais de fertilização alvo deste estudo, são componentes do projeto “Estudo dos efeitos das mudanças globais que determinam a estrutura e o funcionamento de ecossistemas de Cerrado”, que se iniciou em 1998 na RECOR do IBGE, em vegetação de cerrado sentido restrito.

O desenho experimental foi o de blocos inteiramente casualizados, que consistiu em 4 tratamentos de fertilização e o controle (sem adição de nutrientes), com 4 réplicas de cada, resultando em 20 parcelas com 15 x 15 m de tamanho, separadas por uma distância mínima de 10 m (Figura 2). Cada parcela foi dividida em 9 subparcelas de 5 x 5 m para fins amostrais. Os tratamentos consistiram na adição de +N (sulfato de amônio- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ), +P (superfosfato simples 20% -  $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 + \text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), +NP (sulfato de amônio e superfosfato simples 20% ), calagem (60% de calcário dolomítico ( $\text{CaO} + \text{MgO}$ ) + 40% de gesso agrícola ( $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )) e controle (sem adição de nutrientes).



**Figura 2.** Desenho experimental mostrando as 20 parcelas de fertilização em um cerrado sentido restrito na RECOR do IBGE, Brasília-DF. Fonte: adaptado de Jacobson, 2009.

Foram adicionados  $100 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1}$  de +N, +P e +NP, anualmente, entre os anos de 1998 a 2006, a lanço, sempre no início e no fim do período chuvoso. A aplicação em dois períodos teve como objetivo, diminuir a perda dos nutrientes pelo sistema. A aplicação da calagem ocorreu apenas uma vez ao ano, com um quantitativo de  $4 \text{ t} \cdot \text{ha}^{-1}$ . Após um

período de paralização, as adições de nutrientes foram retomadas em novembro de 2017 (início do período chuvoso), abril de 2018 (fim do período chuvoso).

Importante ressaltar que na retomada das adições, apenas metade do cálcio foi aplicado, devido ao efeito residual deste elemento nas propriedades do solo (MELLO, 2019). Outra informação importante é que no início do experimento, as parcelas tinham estrutura da vegetação semelhante (GAROFALO, 2001), e as parcelas apresentavam baixa variação quanto a concentração de nutrientes no solo (KOZOVITS et al., 2007).

### **4.3 Coleta da serapilheira, confecção e distribuição de bolsas de decomposição**

A coleta de serapilheira se deu através do trabalho de conclusão de curso, intitulado “Efeito da adição de nutrientes na qualidade da serapilheira e na atuação da mesofauna do solo na decomposição em um cerrado do Brasil Central” (CAMPANI, 2019). A coleta foi realizada em outubro de 2018 (tempo zero-T0), em 15 das 20 parcelas do experimento de fertilização, sendo 3 réplicas de cada tratamento (+N, +P, +NP e calagem) e do controle, onde 5 subparcelas de cada parcela foram sorteadas, sem repetição, para a coleta de serapilheira. A coleta de serapilheira foi realizada utilizando um quadrado de metal sem fundo de 25 x 25 cm em cada subparcela sorteada.

Após a coleta, a serapilheira das 5 subparcelas foram compostas (formando 3 amostras por tratamento) e secas sob luz incandescente em laboratório, por um período de 48 horas. Em seguida, o material passou pelo processo de triagem, onde foram consideradas apenas as folhas da serapilheira, resultando em um mix foliar. Parte do material foi separado para a realização de análises químicas iniciais (15 amostras de serapilheira referente às 15 parcelas de fertilização), e o restante foi destinado para a confecção de bolsas de decomposição (*litter bags*), em telas de mosquiteiro de nylon com dimensão de 20 x 20 cm.

Foram confeccionados *litter bags* de dois tipos: bolsas de malha fina, com abertura de 0,3 mm, visando restringir o acesso da mesofauna à serapilheira; bolsas de malha grossa, com abertura de 2 mm, o que permitiu o acesso da mesofauna à serapilheira. Foram construídas um total de 360 *litter bags* (180 de malha fina e 180 de malha grossa), sendo distribuídas 24 bolsas aleatoriamente (12 de malha fina e 12 de malha grossa) em cada uma das 15 parcelas, em novembro de 2018. Cada bolsa continha inicialmente 5 g do mix foliar e foi identificada com a parcela de origem da serapilheira.

Mensalmente, com início em dezembro de 2018 (T1 – 30 dias de incubação) e término em novembro de 2019 (T12 – 360 dias de incubação), 2 bolsas de decomposição

(1 bolsa de malha fina e 1 bolsa de malha grossa) eram recolhidas de cada uma das 15 parcelas, resultando em 30 bolsas por mês.

#### 4.4 Análises químicas da serapilheira

Após coletado, o material contido nas bolsas foi seco em estufa de circulação forçada a 60° C por 72 horas, e depois limpo com o auxílio de um pincel. Em seguida, as amostras foram moídas em moinho de facas, e acondicionadas em embalagens impermeáveis até a realização das análises.

Foram realizadas análises para determinar o conteúdo total de N, a razão isotópica  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$  ( $\delta^{15}\text{N}$ ) da serapilheira, este último utilizado como um *proxi* das transformações de N ao longo do processo de decomposição, e a razão C/N. Para viabilizar a realização de análises de nutrientes da serapilheira, as amostras de serapilheira já moídas, foram unidas de 2 em 2 meses, com exceção das amostras do tempo T0, ficando da seguinte forma: T0 (outubro/2018), T1+T2 (dezembro/2018 + janeiro/2019), T3+T4 (fevereiro/2019 + março/2019), T5+T6 (abril/2019 + maio/2019), T7+T8 (junho/2019 + julho/2019), T9+T10 (agosto/2019 + setembro/2019), T11+T12 (outubro/2019 + novembro/2019). Já as análises de polifenóis totais, lignina e celulose da serapilheira realizadas por Campani (2019) nos tempos T0, T3, T6 e T9, foram concluídas no presente trabalho ao serem realizadas para o tempo T12.

Para a determinação de N, razão C/N e análise isotópica, com determinação do  $\delta^{15}\text{N}$ , as amostras foram pesadas em balança de precisão (entre 1,5 e 2 mg) e acondicionadas em cápsulas de estanho. Em seguida as amostras foram armazenadas em placas de ELISA, e encaminhadas para o laboratório de Ecologia Isotópica de Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo (CENA/USP) em Piracicaba, onde a determinação do N, razão C/N e  $\delta^{15}\text{N}$  foi realizada por meio de analisador elementar acoplado a espectrômetro de massa (Carlo Elba, CHN-1100).

Para a determinação de lignina e celulose, foram pesados 0,250 g e adotado o protocolo de Gessner (2005)- Anexo A, onde as amostras foram expostas a uma solução de ácido detergente, visando a determinação de fibras. Em seguida, as amostras foram submetidas a digestão em solução de ácido sulfúrico 72%.

Para determinação de polifenóis totais, foi pesado o quantitativo de 0,100 g e utilizado o protocolo de Folin e Ciocalteu (1927)- Anexo B, onde as amostras foram submetidas a uma solução de metanol 50% e preservadas no escuro. Posteriormente as

amostras foram expostas ao reagente de Folin-Ciocalteu e ao carbonato de sódio, e submetidas a leitura em espectrofotômetro.

#### **4.5 Análise estatística dos dados**

Regressões lineares foram aplicadas para avaliar o efeito dos tratamentos de adição de nutrientes na composição química inicial da serapilheira. Para avaliar o efeito dos tratamentos (calagem, +N, +P, +NP), do tamanho da malha (fina e grossa), do tempo e da interação entre fatores sobre as concentrações de N, polifenóis totais, valores de  $\delta^{15}\text{N}$ , e sobre as razões C/N, L/N e L/C da serapilheira, foram aplicadas Análises de Variância (ANOVA) multifatorial, considerando  $\alpha= 5\%$ . Para as análises da concentração de N, valores de  $\delta^{15}\text{N}$  e razão C/N, o fator tempo foi constituído de 6 níveis (12 meses de exposição da serapilheira, agrupados de dois em dois meses). Para as análises de polifenóis e razões L/N e L/C o fator tempo foi constituído de 4 níveis (3°, 6°, 9° e 12° mês de exposição da serapilheira).

Para avaliar a magnitude do efeito significativo dos fatores, detectados pela ANOVA, aplicou-se regressões lineares. Quando os fatores explicativos (tratamento, malha e tempo) afetaram significativamente as variáveis dependentes de forma isolada, aplicou-se modelos lineares de efeito misto (colocando um fator como efeito fixo e os demais como aleatórios). As premissas de normalidade e homocedasticidade foram analisadas a partir dos resíduos dos modelos. Todas as análises foram realizadas no programa R Core Team (2022), versão 4.2.1.

## **5. RESULTADOS**

### **5. 1 Composição química da serapilheira inicial**

A serapilheira inicial continha uma concentração significativamente maior de N, nos tratamentos com +N e +NP em comparação ao controle. As razões C/N e L/N diminuíram significativamente no tratamento com +N. Nenhum dos tratamentos diferiram significativamente em termos de  $\delta^{15}\text{N}$ , polifenóis totais e razão L/C (Tabela 1).



**Tabela 1.** Composição química da serapilheira inicial no controle e tratamentos de adição de nutrientes em um cerrado sentido restrito, localizado na RECOR do IBGE, Brasília, DF.

	Controle (Intercept)	Calagem	+N	+NP	+P
N total (%)	0,913	0,094	0,237*	0,202*	0,443
$\delta^{15}\text{N}$ (%)	-1,083	0,387	0,159	0,604	0,359
Polifenóis (%)	4,496	0,532	0,689	0,663	2,360
C/N (%)	52,853	-7,798	-10,979 *	-9,464	-4,231
L/C (%)	0,711	0,075	-0,069	0,043	0,037
L/N (%)	32,124	-2,547	-8,427*	-5,196	-1,592

O efeito dos tratamentos sobre a composição química da serapilheira inicial foi testado com regressões lineares. Sendo: ‘\*’  $p < 0,05$ ; ‘\*\*’  $p < 0,01$ ; ‘\*\*\*’  $p < 0,001$ . Legenda: +N: adição de nitrogênio, +P: adição de fósforo, +NP: adição combinada de nitrogênio e fósforo. N total: nitrogênio total, razões C/N: carbono/nitrogênio, L/C: lignina/celulose, L/N: lignina/nitrogênio.

## 5.2 Efeito dos tratamentos, tempo e malha na composição química da serapilheira

Os resultados da ANOVA multifatorial demonstraram que a concentração de N, de polifenóis totais, o valor de  $\delta^{15}\text{N}$ , e as razões C/N e L/N foram afetados de forma significativa apenas pelos fatores tempo e tratamento, de forma isolada. A razão L/C foi afetada significativamente e de forma isolada, apenas pelo fator tempo (Tabela 2).

**Tabela 2.** Resultados da ANOVA multifatorial testando o efeito do tratamento, tempo e malha para a concentração de nitrogênio, de polifenóis totais, valor de  $\delta^{15}\text{N}$ , e razões carbono/nitrogênio, lignina/nitrogênio e lignina/celulose em um cerrado sentido restrito, localizado na RECOR do IBGE, Brasília, DF.

	Fatores	df	SS	MS	F-value	P
Concentração de N	Tratamento	4	2,334	0,5835	18,831	0,00005***
	Tempo	5	0,511	0,1022	3,220	0,00918**
	Malha	1	0,003	0,0027	0,086	0,76951
	Tratamento x tempo	20	0,352	0,0176	0,555	0,93546
	Tratamento x malha	4	0,112	0,0279	0,879	0,47878
	Tempo x malha	5	0,012	0,0024	0,075	0,99591
	Tratamento x tempo x malha	20	0,299	0,0149	0,470	0,97298
Valor de $\delta^{15}\text{N}$	Tratamento	4	59,79	14,947	17,310	0,00005***
	Tempo	5	22,28	4,455	5,160	0,00025***
	Malha	1	0,00	0,001	0,001	0,97976
	Tratamento x tempo	20	17,16	0,858	0,993	0,47507
	Tratamento x malha	4	3,69	0,924	1,070	0,37468
	Tempo x malha	5	0,89	0,178	0,206	0,95924
	Tratamento x tempo x malha	20	8,28	0,414	0,479	0,96995
Razão C/N	Tratamento	4	2626	656,4	14,169	0,0002***
	Tempo	5	2103	420,5	9,078	0,0022***
	Malha	1	1	1,2	0,027	0,870
	Tratamento x tempo	20	309	15,4	0,333	0,997
	Tratamento x malha	4	59	14,6	0,316	0,867

Tabela 2- continua

	<b>Fatores</b>	<b>df</b>	<b>SS</b>	<b>MS</b>	<b>F-value</b>	<b>P</b>
	Tempo x malha	5	67	13,5	0,291	0,917
	Tratamento x tempo x malha	20	430	21,5	0,465	0,975
Polifenóis totais	Tratamento	4	56,49	14,12	6,607	0,00012***
	Tempo	3	175,46	58,49	27,361	0,00001***
	Malha	1	5,67	5,67	2,650	0,10745
	Tratamento x tempo	12	22,50	1,87	0,877	0,57297
	Tratamento x malha	4	3,75	0,94	0,438	0,78051
	Tempo x malha	3	2,60	0,87	0,406	0,74905
	Tratamento x tempo x malha	12	16,95	1,41	0,661	0,78320
Razão L/C	Tratamento	4	2,81	0,701	1,764	0,144
	Tempo	3	12,11	4,036	10,152	0,024***
	Malha	1	0,90	0,898	2,257	0,137
	Tratamento x tempo	12	2,58	0,215	0,541	0,881
	Tratamento x malha	4	0,37	0,092	0,232	0,920
	Tempo x malha	3	0,50	0,165	0,416	0,742
	Tratamento x tempo x malha	12	3,19	0,266	0,668	0,777
Razão L/N	Tratamento	4	2331	582,8	3,361	0,01352*
	Tempo	3	3999	1332,9	7,687	0,00014***
	Malha	1	2	1,9	0,011	0,91617
	Tratamento x tempo	12	1296	108,0	0,623	0,81689
	Tratamento x malha	4	136	34,0	0,196	0,93962
	Tempo x malha	3	187	62,2	0,359	0,78303
	Tratamento x tempo x malha	12	1246	103,8	0,599	0,83706

Sendo: \* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,01$ , \*\*\*\* $p < 0,001$ . Legenda: N: nitrogênio, razões C/N: carbono/nitrogênio, L/C: lignina/celulose, L/N: lignina/nitrogênio.

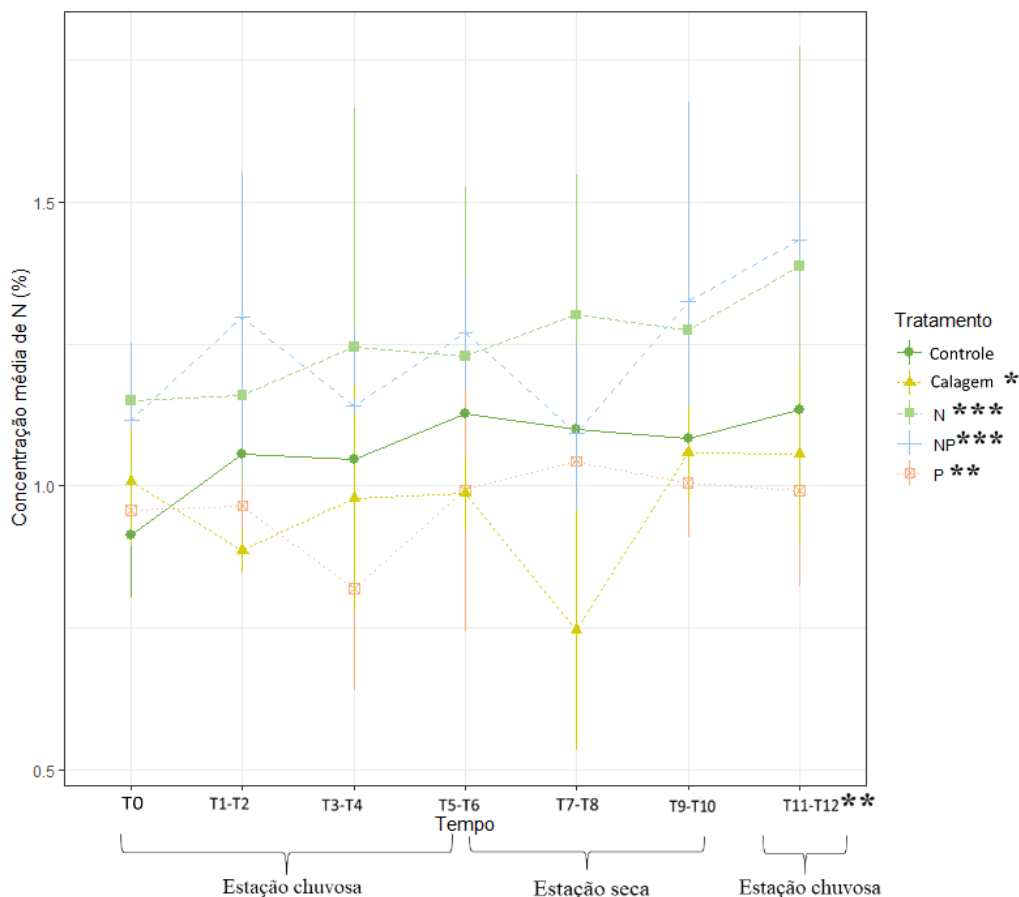
Como o fator malha não apresentou efeito significativo na composição química da serapilheira, foram utilizados os resultados da malha fina (sem acesso da mesofauna), para analisar tendências ao longo do tempo nas concentrações médias de N, polifenóis totais, nos valores médios de  $\delta^{15}\text{N}$ , e nas razões C/N, L/N e L/C.

### 5.2.1 Concentração de Nitrogênio

Todos os tratamentos apresentaram efeito significativo na concentração de N da serapilheira, em comparação ao controle (Estimate: 1,084). Quedas significativas da concentração de N foram observadas nos tratamentos de calagem (Estimate: -0,095;  $p < 0,05$ ) e +P (Estimate: -0,108;  $p < 0,01$ ), ao passo que aumentos significativos foram observados nos tratamentos com +N (Estimate: 0,144;  $p < 0,001$ ) e +NP (Estimate: 0,159;  $p < 0,001$ ) (Figura 9, Anexo D).

Um aumento significativo na concentração de N da serapilheira, em relação aos primeiros meses de exposição da serapilheira (T1-T2, Estimate: 1,062), foi observado ao final do experimento (T11-T12, Estimate: 0,126;  $p < 0,01$ ) (Figura 10, Anexo E).

Com a observação de tendências ao longo do tempo, no geral, a serapilheira dos tratamentos com +N e +NP mantiveram concentrações de N mais altas. Enquanto que nos tratamentos com +P e calagem, essas concentrações de N mantiveram-se abaixo do controle (Figura 3).



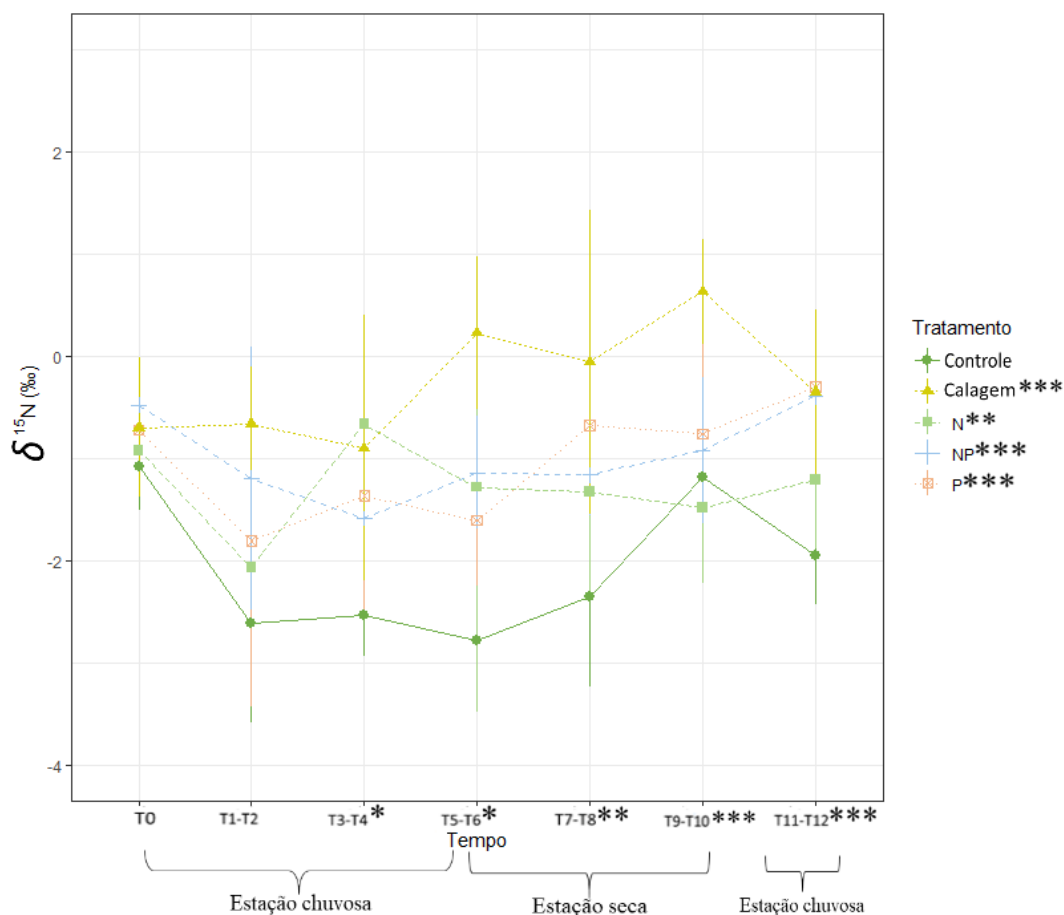
**Figura 3.** Concentração média de nitrogênio da serapilheira em malha fina nos tratamentos ao longo do tempo de exposição da serapilheira em um cerrado sentido restrito submetido a adição de nutrientes, localizado na RECOR do IBGE, Brasília, DF. Sendo: ‘\*’  $p < 0,05$ ; ‘\*\*’  $p < 0,01$ ; ‘\*\*\*’  $p < 0,001$ .

### 5.2.2 Valores de $\delta^{15}\text{N}$

Todos os tratamentos apresentaram aumentos significativos no valor de  $\delta^{15}\text{N}$  da serapilheira (Calagem, Estimate: 1,742,  $p < 0,001$ ; +N, Estimate: 0,659,  $p < 0,01$ ; +NP, Estimate: 1,187,  $p < 0,001$ ; +P, Estimate: 0,851,  $p < 0,001$ ), em comparação ao controle (Estimate: -2,071) (Figura 9, Anexo D).

Aumentos significativos de  $\delta^{15}\text{N}$  da serapilheira, em relação aos primeiros meses de exposição (T1-T2, Estimate: -1,797), foram observados em todos os tempos do experimento (T3-T4, Estimate: 0,480,  $p < 0,05$ ; T5-T6, Estimate: 0,460,  $p < 0,05$ ; T7-T8, Estimate: 0,741,  $p < 0,01$ ; T9-T10, Estimate: 1,068,  $p < 0,001$ ; T11-T12, Estimate: 0,932,  $p < 0,001$ ) (Figura 10, Anexo E).

Os resultados para o valor médio do  $\delta^{15}\text{N}$  na serapilheira ao longo do tempo demonstraram que, apesar de todos os tratamentos apresentarem valores próximos de  $\delta^{15}\text{N}$  no T0, eles se diferenciaram ao longo do tempo. No geral, o controle apresentou os menores valores de  $\delta^{15}\text{N}$  em comparação aos tratamentos. Na calagem, os valores médios de  $\delta^{15}\text{N}$  foram aumentando gradualmente com o tempo, e contrastaram de forma mais expressiva com os do controle (Figura 4).



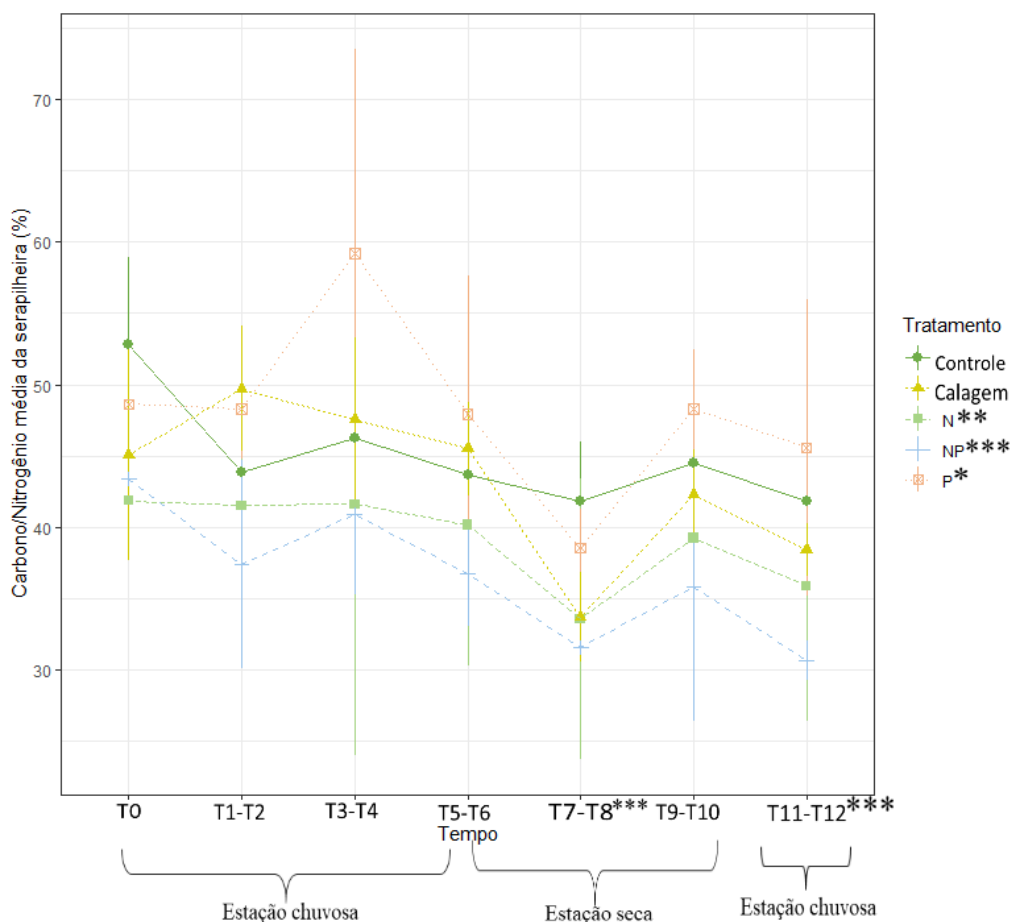
**Figura 4.** Valor médio de  $\delta^{15}\text{N}$  da serapilheira em malha fina nos tratamentos ao longo do tempo de exposição da serapilheira em um cerrado sentido restrito submetido a adição de nutrientes, localizado na RECOR do IBGE, Brasília, DF. Sendo: '\*'  $p < 0,05$ ; '\*\*'  $p < 0,01$ ; '\*\*\*'  $p < 0,001$ .

### 5.2.3 Razão carbono/nitrogênio

Quedas significativas na razão C/N da serapilheira, em relação ao controle (Estimate: 43,750), foram detectadas nos tratamentos +N (Estimate: -4,621;  $p < 0,01$ ) e +NP (Estimate: -7,955;  $p < 0,001$ ), ao passo que um aumento significativo na razão C/N foi detectado no tratamento +P (Estimate: 3,058;  $p < 0,05$ ) (Figura 9, Anexo D).

Quedas significativas na razão C/N foram observadas nos tempos T7-T8 (Estimate: -8,351;  $p < 0,001$ ) e T11-T12 (Estimate: -5,731;  $p < 0,001$ ), em comparação aos meses iniciais de exposição (T1-T2, Estimate: 44,671) (Figura 10, Anexo E).

Com exceção do tratamento +P, a razão média de C/N da serapilheira tendeu a diminuir ao longo do tempo em todos os tratamentos, mas principalmente em +N e +NP, que se mantiveram sempre abaixo do controle (Figura 5).



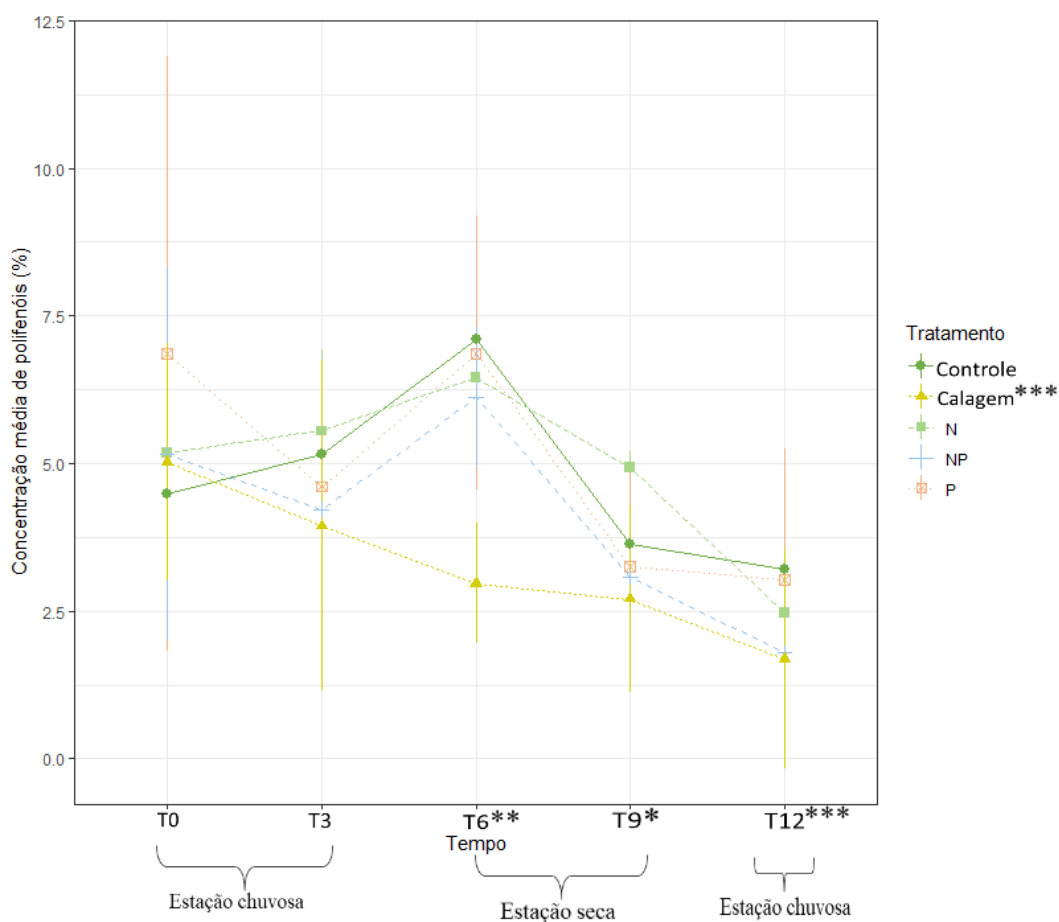
**Figura 5.** Razão carbono/nitrogênio da serapilheira em malha fina nos tratamentos ao longo do tempo de exposição da serapilheira em um cerrado sentido restrito submetido a adição de nutrientes, localizado na RECOR do IBGE, Brasília, DF. Sendo: ‘\*’  $p < 0,05$ ; ‘\*\*’  $p < 0,01$ ; ‘\*\*\*’  $p < 0,001$ .

### 5.2.4 Polifenóis totais

Uma diminuição significativa na concentração de polifenóis totais da serapilheira, quando comparado ao controle (Estimate: 4,212), foi observada no tratamento com calagem (Estimate: -1,457;  $p < 0,001$ ) (Figura 9, Anexo D).

A concentração de polifenóis totais da serapilheira aumentou significativamente no tempo T6 (Estimate: 1,162;  $p < 0,01$ ), em comparação aos três primeiros meses de exposição (T3, Estimate: 4,378). Enquanto foi observada uma queda significativa nos tempos T9 (Estimate: -0,839;  $p < 0,05$ ) e T12 (Estimate: -2,152;  $p < 0,001$ ) (Figura 10, Anexo E).

No tratamento com calagem, foram observadas diminuições graduais nas concentrações médias de polifenóis totais da serapilheira ao longo do tempo. No geral, o controle e os tratamentos com +N, +NP e +P, apresentaram uma maior concentração média de polifenóis totais ao longo do tempo (Figura 6).

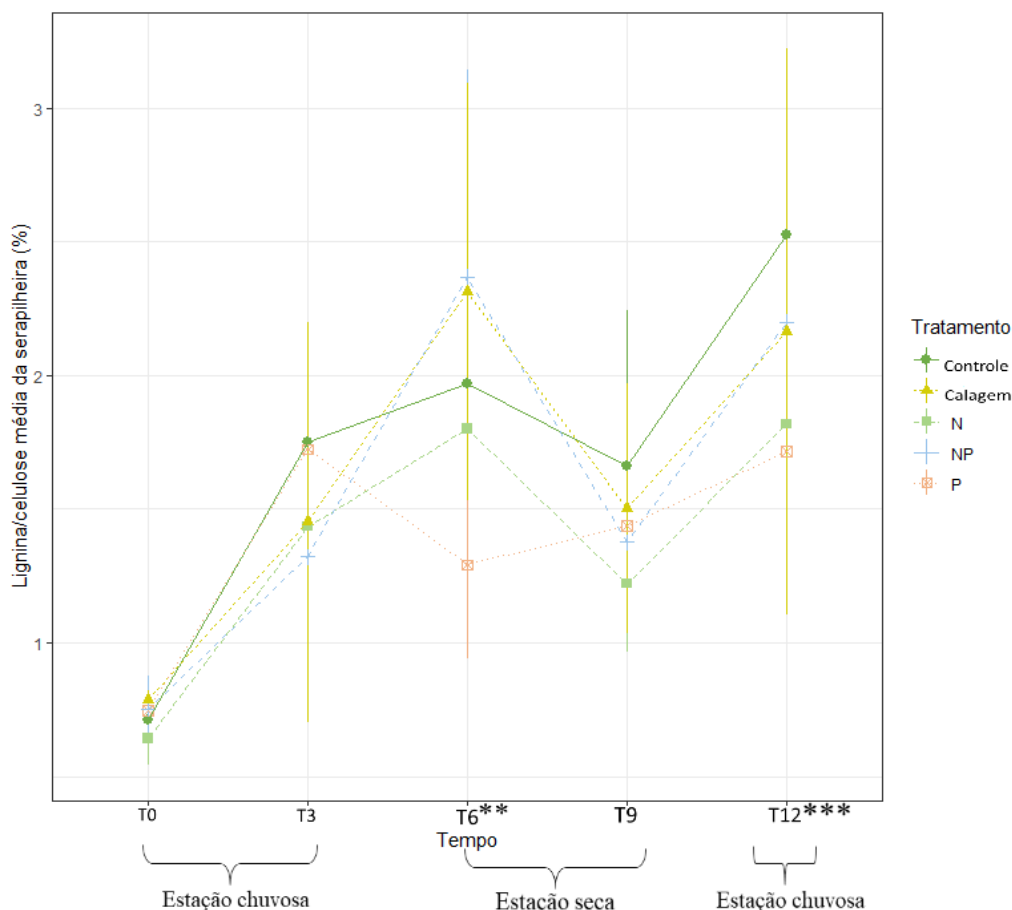


**Figura 6.** Concentração média de polifenóis totais da serapilheira em malha fina nos tratamentos ao longo do tempo de exposição da serapilheira em um cerrado sentido restrito submetido a adição de nutrientes, localizado na RECOR do IBGE, Brasília, DF. Sendo: '\*'  $p < 0,05$ ; '\*\*'  $p < 0,01$ ; '\*\*\*'  $p < 0,001$ .

### 5.2.5 Razão lignina/celulose

A razão L/C da serapilheira aumentou significativamente nos tempos T6 (Estimate: 0,408;  $p < 0,01$ ) e T12 (Estimate: 0,697;  $p < 0,001$ ), em comparação aos três primeiros meses de exposição (T3, Estimate: 1,585) (Figura 10, Anexo E).

Os resultados demonstraram que no T0, todos os tratamentos tinham uma razão L/C bastante parecida, e que ao longo do tempo, todos os tratamentos apresentaram tendências semelhantes de aumento da razão L/C (Figura 7).



**Figura 7.** Razão lignina/celulose da serapilheira em malha fina nos tratamentos ao longo do tempo de exposição da serapilheira em um cerrado sentido restrito submetido a adição de nutrientes, localizado na RECOR do IBGE, Brasília, DF. Sendo: ‘\*’  $p < 0,05$ ; ‘\*\*’  $p < 0,01$ ; ‘\*\*\*’  $p < 0,001$ .

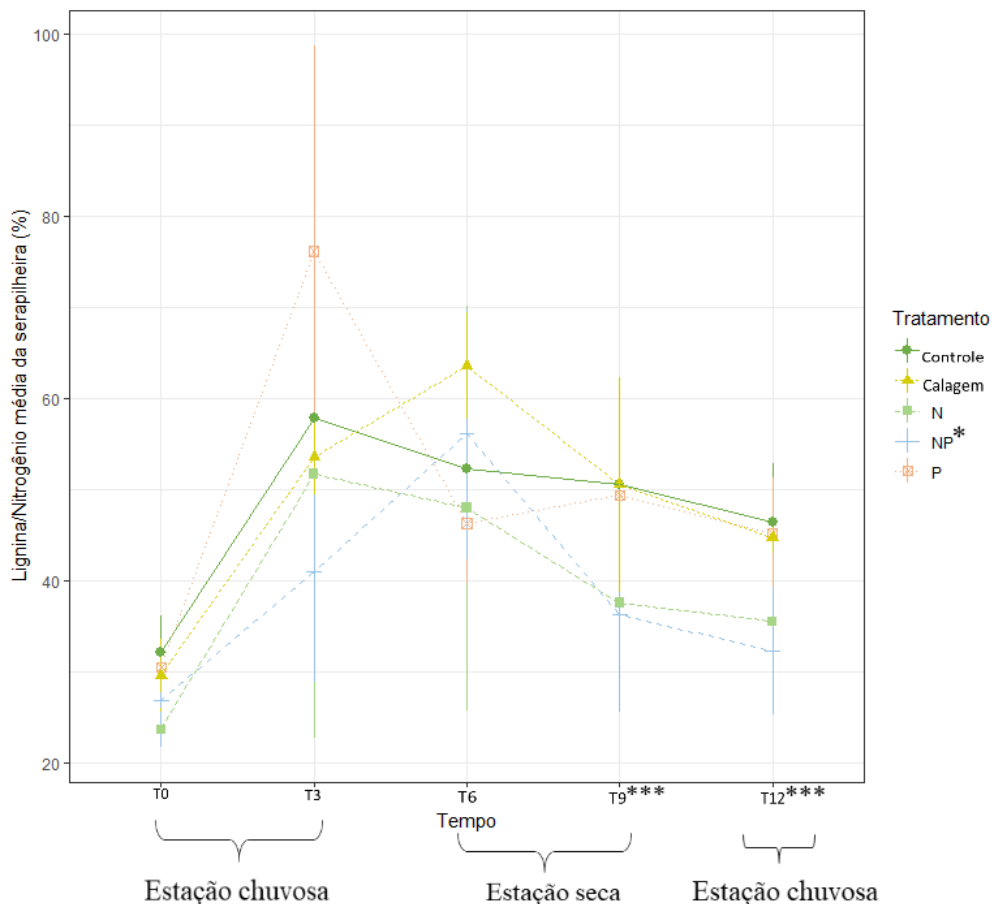
### 5.2.6 Razão lignina/nitrogênio

Uma diminuição significativa na razão L/N foi observada no tratamento +NP (Estimate: -9,025;  $p < 0,001$ ), em comparação com o controle (Estimate: 51,557) (Figura 9, Anexo D).

Quedas significativas da razão L/N foram observadas nos tempos T9 (Estimate: -12,488;  $p < 0,001$ ) e T12 (Estimate: -13,074;  $p < 0,001$ ), em comparação com os três

primeiros meses de exposição da serapilheira (T3, Estimate: 55,993) (Figura 10, Anexo E).

No T0 os tratamentos tinham uma razão L/N próxima, e no geral, apresentaram tendências de aumento (do T0 para o T3), e diminuição da razão L/N nos tempos finais do experimento (Figura 8).



**Figura 8.** Razão lignina/nitrogênio da serapilheira em malha fina nos tratamentos ao longo do tempo de exposição da serapilheira em um cerrado sentido restrito submetido a adição de nutrientes, localizado na RECOR do IBGE, Brasília, DF. Sendo: ‘\*’  $p < 0,05$ ; ‘\*\*’  $p < 0,01$ ; ‘\*\*\*’  $p < 0,001$ .

## 6. DISCUSSÃO

O presente estudo, revela que o fator malha não afetou significativamente as concentrações de N, e as transformações de N da serapilheira (refletidas pelos valores de  $\delta^{15}\text{N}$ ). A pesquisa demonstra, que estas variáveis são afetadas independentemente pelo tempo, e pela adição de nutrientes.

Estudos anteriores mostraram que a qualidade da serapilheira (refletida por valores de C/N), pode aumentar sob influência de +N, mas principalmente de +NP, refletindo em um aumento nas taxas de decomposição da serapilheira (KOZOVITS et al.,



2007; JACOBSON, 2009). Posteriormente, descobriu-se que esta aceleração na taxa de decomposição, era mediada pela mesofauna do solo (POMPERMAIER et al., 2021). Com os resultados do presente estudo, constata-se que essa perda de massa da serapilheira, assim como a influência da mesofauna do solo no processo, pode se dar principalmente pela decomposição de compostos não nitrogenados.

A partir dos resultados obtidos aqui, não é possível afirmar que a mesofauna do solo, não afeta os compostos analisados da serapilheira. Visto que as parcelas experimentais de fertilização, vem recebendo a adição de nutrientes desde 1998, o que pode ter alterado a composição química da serapilheira, ao longo do tempo, afetando a atuação da mesofauna do solo. Pompermaier (2021) constatou que o legado da adição de N e P, aparentemente reduziu a diversidade de recursos que os colêmbolos acessam, com o desenvolvimento de estudos, verificando a influência da adição de nutrientes na resposta taxonômica, funcional e trófica da fauna de colêmbolos epigéicos, que compõem a mesofauna do solo.

Os tratamentos com +N e +NP foram os que apresentaram as maiores concentrações de N na serapilheira, e essas concentrações se mantiveram no tempo, indicando um processo de imobilização de N. Um estudo desenvolvido por Jacobson (2009), com a incubação da serapilheira de cerrado, por 473 dias em *litter bags*, constatou que o tratamento com +NP promoveu a imobilização de N. Um indicativo de que a biota do solo aumentou sua atividade em decorrência da fertilização, retendo nutrientes frente a um possível aumento da ciclagem biogeoquímica (JACOBSON, 2009). Em um estudo desenvolvido em Massachusetts-EUA, com serapilheira de pinheiro vermelho (*Pinus resinosa* Ait.), constatou-se que nos meses iniciais de exposição da serapilheira ao processo de decomposição, houve uma imobilização de N, e em seguida, ocorreu a mineralização de N, após 22 meses do início do experimento de decomposição (MELILLO et al., 1989)

Constatou-se aqui que a maior qualidade da serapilheira (indicada pelos menores valores de C/N) nos tratamentos com +N e +NP, como já observada na mesma área de estudo por Kozovits et al. (2007), permanece alta ao longo do tempo, e que pode aumentar ao longo do processo de decomposição, independente da adição de nutrientes. O tratamento com +NP apresentou a menor razão L/N, e também foi observada uma diminuição da razão L/N ao longo do tempo, o que reforça que a adição combinada de N e P, contribui para uma serapilheira de melhor qualidade. Isso pode reforçar que, inicialmente, há uma colonização de microrganismos que acessam e imobilizam o N

(processo estimulado pela adição de N e NP), e posteriormente atraem a biota decompositora, que acessa principalmente os compostos de carbono, reduzindo a razão C/N da serapilheira.

O Cerrado é marcado por uma forte sazonalidade, e pelo desenvolvimento de mecanismos conservativos pelas plantas, para minimizar as perdas de nutrientes, o que leva a taxas lentas de decomposição da serapilheira, em comparação com a serapilheira de florestas tropicais (HARIDASAN, 2000; NARDOTO et al., 2006; KOZOVITS et al., 2007). No Cerrado também há a predominância de solos altamente intemperizados, levando a uma baixa disponibilidade de nutrientes, principalmente N e P (HARIDASAN, 2000). Os resultados observados nas parcelas com +N e principalmente em +NP, demonstram que a fertilização, contribui para a alteração da composição química da serapilheira típica de cerrado, melhorando sua qualidade.

Como a razão C/N engloba compostos de carbono, que possuem estruturas e taxas de decomposição distintas (AGREN e ANDERSSON, 2012; CRONAN, 2018), também foi acessada a razão L/C. Observou-se aqui, que há uma maior decomposição da celulose em relação a lignina ao longo do tempo, mas isso não é estimulado pela adição de nutrientes. Esse é um padrão esperado, visto que a lignina é a fração orgânica mais resistente à degradação microbiana (ARGYROPOULOS e MENACHEM, 1997; HAMMEL, 1997). De acordo com Melillo et al. (1989), a fase inicial do processo de decomposição é caracterizada pelo rápido desaparecimento da celulose, após esse estágio, o processo de decomposição apresenta taxas de perda de massa muito baixas. Estudos demonstram que a disponibilidade de compostos lábeis de carbono, como açúcares simples, pode aumentar a taxa de decomposição da lignina (DREW e KADAM, 1979; CRAWFORD, 1981; REDDY, 1984; MELILLO et al., 1989).

Ao contrário do que se observou nos tratamentos com +N e +NP, a serapilheira das parcelas com +P, apresentaram uma diminuição significativa nas concentrações de N da serapilheira, acarretando um aumento significativo da razão C/N. Isso indica, que a adição de P, pode estimular a biota do solo ao acesso de compostos nitrogenados da serapilheira, em detrimento dos compostos de carbono. Por outro lado, a diminuição das concentrações de N da serapilheira na calagem, não resultou em um aumento da razão C/N, indicando que o acesso de compostos nitrogenados aumentou, mas não em detrimento dos compostos de carbono.

No geral, observou-se aqui, que essas transformações de N da serapilheira em todos os tratamentos de adição de nutrientes, podem ser detectadas pelos valores de  $\delta^{15}\text{N}$ .

Embora os valores de  $\delta^{15}\text{N}$  da serapilheira observados aqui, foram em sua maioria negativos, refletindo a composição natural de  $\delta^{15}\text{N}$  das espécies de cerrado (BUSTAMANTE et al., 2004; NARDOTO, 2005), houve um aumento significativo do  $\delta^{15}\text{N}$  em decorrência da adição de nutrientes. Conforme Handley e Raven (1992), a abundância natural de isótopos de N, fornece medidas sobre a dinâmica do N ao longo do tempo, já que é usado para o balanço entre entradas e saídas de N, dentro de um ecossistema.

Essa tendência é nitidamente observada, quando comparamos o tratamento calagem com o controle, em termos de valores médios de  $\delta^{15}\text{N}$ . A calagem registrou os maiores aumentos de  $\delta^{15}\text{N}$  ao longo do tempo, enquanto o controle (que não recebeu nenhuma adição de nutrientes) apresentou os menores valores. As baixas concentrações de N na calagem, indicam justamente que o N está sendo disponibilizado e utilizado pela biota, o que resultou no aumento dos valores de  $\delta^{15}\text{N}$ .

Essas transformações do N na calagem, muito provavelmente estão associadas às menores concentrações de polifenóis totais encontradas neste tratamento, uma vez que concentrações elevadas de polifenóis, podem reduzir a taxa de mineralização de N, pois se ligam ao N orgânico, além de reduzir a atuação dos microrganismos (CHAPIN, 1995). Outra explicação para as transformações de N no tratamento com calagem, são as mudanças no pH do solo, que resultou numa maior diversidade de bactérias, conforme constatado por Silveira et al. (2020).

Estudos demonstram que a deposição de N e P tem sido elevada globalmente, em decorrência de atividades antrópicas (GALLOWAY et al., 2008; WANG et al., 2015). Nesse sentido, os resultados obtidos aqui, demonstram que a adição de nutrientes leva a transformações de N em ambiente de cerrado, afetando os ciclos do N e do P. O presente estudo também nos ajuda a entender os efeitos da calagem, que tem sido largamente utilizada para corrigir os solos do Cerrado. E complementa resultados constatados por Silveira et al. (2020), de que a calagem apresenta efeitos a longo prazo, como o pH elevado mesmo após 11 anos sem aplicação de cal.

## 7. CONCLUSÃO

O presente estudo indica, que os tempos de exposição da serapilheira à decomposição, e a adição de nutrientes, afetam os compostos da serapilheira analisados (com exceção da razão L/C, que foi afetada apenas pelo tempo). E que o efeito de legado da adição de nutrientes, pode ter influenciado na atuação da mesofauna do solo, quanto

aos compostos analisados. Uma novidade apresentada aqui, é o estudo dos valores de  $\delta^{15}\text{N}$  da serapilheira das parcelas de fertilização, estes valores de  $\delta^{15}\text{N}$  sofreram aumento em todos os tratamentos, indicando que a adição de nutrientes leva a transformações de N. Um ponto de destaque, é a influência da calagem nos compostos de N, aparentemente estimulada pela diminuição da concentração de polifenóis totais. O estudo demonstra, que os nutrientes oriundos tanto da fertilização, quanto da correção do solo, levam a mudanças nos processos que envolvem o N. Esses efeitos a longo prazo, em áreas agrícolas abandonadas, podem tornar a restauração do Cerrado um grande desafio.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARGYROPOULOS, D.S; MENACHEM, S.B, 1997. Lignina. Em: Eriksson, K.-EL (Ed.), *Avanços em Engenharia Bioquímica Biotecnologia*, vol. 57. **Springer**, Alemanha, pp. 127-158.

AGREN, G. I.; ANDERSSON, F. O. **Terrestrial Ecosystem Ecology: principles and applications**. New York: Cambridge University Press, 2012.

BARGALI, S.S.; SHUKLA, K.; SINGH, L.; GHOSH, L.; LAKHERA, M.L. Leaf litter decomposition and nutrient dynamics in four tree species of dry deciduous forest. **Tropical Ecology** 56(2): 191-200, 2015.

BERG, B.; LASKOWSKI, R. Litter Decomposition: a Guide to Carbon and Nutrient Turnover. *Advances in Ecological Research*, v. 38. **Amsterdam: Elsevier Academic Press**, 2005. p. 20-71.

BEARE, M.H.; PARMELEE, R.W.; HENDRIX, P.F.; CHENG, W.; COLEMAN, D.C.; CROSSLEY, D. A. J. Microbial and Faunal Interactions and Effects on Litter Nitrogen and Decomposition in Agroecosystems. **Ecological Monographs**, Dec., 1992, Vol. 62, No. 4 (Dec., 1992), pp. 569-591.

BERUDE, M.C.; GALOTE, J.K.B.; PINTO, P.H.; AMARAL, A.A. do. A mesofauna do solo e sua importância bioindicadora. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.11 n.22; p.14, 2015.

BOURLAG, N.E. 2002. **Feeding a world of 10 billion people: the miracle ahead**. In: R. Bailey (ed.). *Global warming and other eco-myths*. pp. 29-60. Competitive Enterprise Institute, Roseville, EUA.

BUSTAMANTE, M. D. C., MARTINELLI, L. A., SILVA, D. A., CAMARGO, P. D., KLINK, C. A., DOMINGUES, T. F., SANTOS, R. V. (2004). <sup>15</sup>N natural abundance in woody plants and soils of central Brazilian savannas (cerrado). **Ecological Applications**, 14(sp4), 200-213.

BUSTAMANTE, M.M.C.; NARDOTO, G. B.; PINTO, A S.; RESENDE, J. C. F.; TAKAHASHI, F. S. C.; VIEIRA, L. C. G. Potential impacts of climate change on biogeochemical functioning of Cerrado ecosystems. **Brazilian journal of biology**, v. 72, n. 3, p. 655–71, ago. 2012a.

BUSTAMANTE, M. M. C.; BRITO, D. Q. DE; KOZOVITS, A. R.; LUEDEMANN, G.; MELLO, T. R. B. DE; SIQUEIRA-PINTO, A.; MUNHOZ, C. B. R.; TAKAHASHI, F. S. C. Effects of nutrient additions on plant biomass and diversity of the herbaceous-subshrub layer of a Brazilian savanna (Cerrado). **Plant Ecology**, v. 213, n. 5, p. 795–808, 16 maio 2012b.

BUISSON, E., LE STRADIC, S., SILVEIRA, F.A.O., DURIGAN, G., OVERBECK, G.E., FIDELIS, A., FERNANDES, G.W., BOND, W.J., HERMANN, J.M., MAHY, G., ALVARADO, S.T., ZALOUMIS, N.P., VELDMAN, J.W., 2019. Resilience and restoration of tropical and subtropical grasslands, savannas, and grassy woodlands. **Biol. Rev.** 94, 590–609.

BROWN, G. G.; NIVA, C. C.; ZAGATTO, M. R. G.; FERREIRA, S. de A.; NADOLNY, H. S.; CARDOSO, G. B.X.; SANTOS, A.; MARTINEZ, G. de A.; PASINI, A.; BARTZ, M. L. C.; SAUTTER, K. D.; THOMAZINI, M. J.; BARETTA, D.; SILVA, E. da;

ANTONIOLLI, Z. I.; DECAENS, T.; LAVELLE, P. M.; SOUSA, J. P.; CARVALHO, F. Biodiversidade da fauna do solo e sua contribuição para os serviços ambientais. **Embrapa**, Brasília, DF, 2015.

CAXITO, F.A.; SILVA, A.V. Isótopos estáveis: fundamentos e técnicas aplicadas à caracterização e proveniência de geográfica de produtos alimentícios. **Geonomos**, 23(1), 10-17, 2015.

CAMPANI, A. R. **Efeito da adição de nutrientes na qualidade da serapilheira e na atuação da mesofauna do solo na decomposição em um Cerrado no Brasil Central**. Trabalho de Conclusão de Curso (Ciências Ambientais) -Departamento de Ecologia da Universidade de Brasília, Brasília, 2019.

CHAPIN, F.S. **New cog in the nitrogen cycle**. *Nature* 377, 19–20, 1995.

CHAPIN, F.S.; MATSON, P.A.; VITOUSEK, P.M. **Principles of Terrestrial Ecosystem Ecology**, 2ª edição, 2011.

CLARK, I.; FRITZ, P. **Environmental Isotopes in Hydrogeology**. 1997.

CRAWFORD, R.L, 1981. **Lignin Biodegradation and Transformation**. John Wiley and Sons, New York 154 p.

CRONAN, C. S. **Ecosystem Biogeochemistry: element cycling in the forest landscape**. Cham, Switzerland: **Springer**, 2018.

COPLEN, T. B.; BÖHLKE, J. K.; BIÈVRE, P. de; DING, HOLDEN, N.E.; T., N. E., HOPPLE, J. A.; KROUSE, H. R.; LAMBERTY, A.; PEISER, H. S.; RÉVÉSZ, K.; RIEDER, S. E.; ROSMAN, K. J. R.; ROTH, E.; TAYLOR, P. D. P.; VOCKE, R. D.; JR.; XIAO, Y. K. Isotope-abundance variations of selected elements. **Pure Appl. Chem.**, Vol. 74, No. 10, pp. 1987–2017, 2002.

CONSTANTINO, R.; ACIOLI, A. N. S. **Diversidade de cupins (Insecta: Isoptera) no Brasil**. In: MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O.; BRUSSAARD, L. (Ed.). Biodiversidade do solo em ecossistemas brasileiros. Lavras: Ed. da UFLA, 2008. p. 277-297.

CRAINE, J. M.; ELMORE, A. J.; AIDAR, M. P. M.; BUSTAMANTE, M.; DAWSON, T. E.; HOBBIE, E. A.; KAHMEN, A.; MACK, M. C.; MCLAUCHLAN, K. K.; MICHELSEN, A.; NARDOTO, G. B.; PARDO, L. H. P.; PEÑUELAS, J.; REICH, P. B.; SCHUUR, E. A. G.; STOCK, W. D.; TEMPLER, P. H.; VIRGINIA, R. A.; WELKER, J. M.; WRIGHT, I. J. Global patterns of foliar nitrogen isotopes and their relationships with climate, mycorrhizal fungi, foliar nutrient concentrations, and nitrogen availability. **New Phytologist** (2009) 183: 980–992.

DUCATTI, C.; MARTINS, C.L.; ARRIGONI, M. de B.; MARTINS, M.B.; JÚNIOR, L.C.V.; DENADAI, J.C. Utilização de isótopos estáveis em ruminantes. **R. Bras. Zootec.**, v.40, p.68-75, 2011 (supl. especial).

DREW, S. W.; KADAM, K. L. 1979. **Lignin metabolism by *Aspergillus fumigatus* and white rot fungi**. *Deo. Ind. Microbiol.* 125, 227-332.

FOLIN, O.; CIOCALTEAU, V. **On tyrosine and tryptophane determination in proteins**. *Journal of Biology and Chemistry*, v. 73, p. 627–650, 1927.

FYNN, R.W.S.; O'CONNOR, T.G. Determinants of community organization of a South African mesic grassland. **Journal of Vegetation Science**, Feb., 2005, Vol. 16, nº 1, pp. 93-102.

FROÉS, C.G.; FERNANDES, S.S.L.; JUNGLOS, M.S.; COSTA, P.F. da.; LINÊ, J.D.B.; PEREIRA, Z.V. Decomposição foliar visando ao monitoramento de áreas de em processo de restauração ecológica no Mato Grosso do Sul. **Ci. Fl.**, Santa Maria, v. 31, n. 3, p. 1323-1343, jul./set. 2021.

GAROFALO, C. R. **Efeitos do aumento da disponibilidade de nutrientes na dinâmica de nutrientes em plantas lenhosas e solo em uma área de cerrado *stricto sensu***. Dissertação (Mestrado em Ecologia) – Departamento de Ecologia da Universidade de Brasília, Brasília, 2001.

GALLOWAY, J.N., TOWNSEND, A.R., ERISMAN, J.W., BEKUNDA, M., CAI, Z., FRENEY, J.R., MARTINELLI, L.A., SEITZINGER, S.P., SUTTON M.A., 2008. Transformation of the Nitrogen Cycle : Recent Trends, Questions, and Potential Solutions. **Science**. 320, 889–892.

GAMA-RODRIGUES, A.C. da.; BARROS, N.F. Ciclagem de nutrientes em floresta natural e em plantios de eucalipto e de dandá no sudoeste da Bahia, Brasil. **R. Árvore**, Viçosa-MG, v.26, n. , p. , 2002.

GESSNER, M. O. **Proximate Lignin and Cellulose**. In: GRAÇA, M. A. S.; BÄRLOCHER, F.; GESSNER, M. O. (org.). *Methods to Study Litter Decomposition: A Practical Guide*. Dordrecht, The Netherlands: Springer, 2005. chap. 17, p. 115-120.

HANDLEY, L.L.; RAVEN, J.A. The use natural abundance of nitrogen isotopes in plant physiology na ecology. **Plant cell and environment**, Oxford, v.15, n.9, p. 965-985, Dec. 1992.

HAMMEL, K.E. Fungal degradation of lignin. In CADISH, G.; GILLER, K.E., (Eds.) *Driven by Nature: plant litter quality and decomposition*. Walingford: CAB International, 1997. 33-46p.

HARIDASAN, M. Nutrição mineral de plantas nativas do Cerrado. **R. Bras. Fisiol.Veg.**, 12(1):54-64, 2000.

HÄTTENSCHWILER, S.; VITOUSEK, P. M. The role of polyphenols in terrestrial ecosystem nutrient cycling. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 15, n. 6, p. 238-243, June, 2000.

JACOBSON, T. K. B. **Composição, estrutura e funcionamento de um cerrado sentido restrito submetido à adição de nutrientes em médio prazo**. Tese de Doutorado. Universidade de Brasília, 2009.

JACOBSON, T. K. B.; BUSTAMANTE, M. M. D. C.; KOZOVITS, A. R. Diversity of shrub tree layer, leaf litter decomposition and N release in a Brazilian Cerrado under N, P and N plus P additions. **Environmental Pollution**, v. 159, n. 10, p. 2236–2242, 2011.

KLEIN, A.L. **Eugen Warming e o cerrado brasileiro: um século depois**. São Paulo: Editora UNESP; Imprensa Oficial do Estado, 2002.

KLINK, C.A.; MACHADO, R.B. A conservação do Cerrado brasileiro. **Megadiversidade**, Volume 1, nº 0, julho 2005.

- KOZOVITS, A. R.; BUSTAMANTE, M. M. C.; GAROFALO, C. R.; BUCCI, S.; FRANCO, A. C.; GOLDSTEIN, G.; MEINZER, F. C. Nutrient resorption and patterns of litter production and decomposition in a Neotropical Savanna. **Functional Ecology**, v. 21, n. 6, p. 1034-1043, December, 2007.
- LAVELLE, P.; BIGNELL, D.; LEPAGE, M.; WOLTERS, V.; ROGER, P.; INESON, P.; HEAL, O. W.; GHILLION, S. Soil function in a changing world: The role of invertebrate ecosystem engineers. **European Journal of Soil Biology**, Paris, v. 33, p. 159-193, 1997.
- LI, L-J.; ZENG, D-H.; YU, Z-Y.; FAN, Z-P.; YANG, D.; L, Y-X. Impact of litter quality and soil nutrient availability on leaf decomposition rate in a semi-arid grassland of Northeast China. **Journal of Arid Environments** 75 (2011) 787 e 792.
- MARTINELLI, L.A.; PICCOLO, M.C.; TOWNSEND, A.R.; VITOUSEK, P.M.; CUEVAS, E.; MCDOWELL, W.; ROBERTSON, G.P.; SANTOS, O.C.; TRESEDER, K. Nitrogen stable isotopic composition of leaves and soil: Tropical versus temperate forests. **Biogeochemistry** 46: 45–65, 1999.
- MARTINELLI, L. A.; OMETTO, J. P. H. B.; FERRAZ, E.S.; VICTORIA, R.L.; CAMARGO, P. B. de.; MOREIRA, M. Z. **Desvendando questões ambientais com isótopos estáveis**. 1a. ed. ed. São Paulo: Oficina de Textos 2009, 144 p.
- MARTINELLI, L. A.; NARDOTO, G. B.; COSTA, F. J. V.; MASCARENHAS, R. de O.; MAYRINK, R. R. Princípios básicos sobre as variações naturais dos isótopos estáveis. *Fronteiras em Ciências Forenses*, **Encarte Científico da Revista da Associação Nacional dos Peritos Criminais Federais**, 2020.
- MEGURO, M.; VINUEZA, G.N.; DELITTI, W.B.C. Ciclagem de nutrientes minerais na mata mesófila secundária- São Paulo. III- Decomposição do material foliar e liberação dos nutrientes minerais. **Bol. Botânica**, Univ. S. Paulo, 1980.
- MELILLO, J.M.; ABER, J.D.; MURATORE, J.F. Nitrogen and Lignin Control of Hardwood Leaf Litter Decomposition Dynamics. **Ecology**, Jun., 1982, Vol. 63, No. 3 (Jun., 1982), pp. 621-626.
- MELILLO, J. M.; ABER, J. D.; LINKINS, A. E.; RICCA, A.; FRY, B.; NADELHOFFER, K. J. Carbon and nitrogen dynamics along the decay continuum: Plant litter to soil organic matter. **Plant and Soil** 115, 189-198 (1989).
- MELO, F.V. de.; BROWN, G.G.; CONSTANTINO, R.; LOUZADA, J.N.C.; LUIZÃO, F.J.; MORAIS, J.W. de.; ZANETT, R. **A importância da mesa e macrofauna do solo na fertilidade como bioindicadores**. *Biologia do Solo*, 2009.
- MELLO, T. de R.B. de. **Efeitos a médio e longo prazo da adição de nutrientes em áreas de cerrado típico sobre a vegetação herbáceo-arbustiva e interações acima e abaixo do solo**. Tese (Doutorado em Ecologia) – Departamento de Ecologia da Universidade de Brasília, Brasília, 2019.
- MUSCARDI, D.C.; SCHOEREDER, J.H.; SPERBER, C.F. **Biodiversity and ecosystem functioning: a conceptual model of leaf litter decomposition**. Chapter 2, 2015.
- MYERS, N., MITTERMEIER, R., MITTERMEIER, C. et al. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature** 403, 853–858 (2000).
- NARDOTO, G.B. **Abundância natural de 15N na Amazônia e Cerrado-implicações para a ciclagem de nitrogênio**. Tese de Doutorado. Piracicaba, 2005.



NARDOTO, G.B.; BUSTAMANTE, M.M. da C.; PINTO, A.S.; KLINK, C.A. Nutrient use efficiency at ecosystem and species level in savanna áreas of Central Brazil and impacts of fire. **Journal of Tropical Ecology** (2006) 22:191–201.

NARDOTO, G.B.; RIBEIRO, J.F.; SENA-SOUZA, J.P.; GUARALDO, A. de C.; SAQUETTI, C.H.C. **Rastreamento forense: uso dos isótopos estáveis no combate ao crime**. 2017.

NEVES, E.J.M.; MARTINS, E.G.; REISSMANN, C.B. Deposição de serapilheira e de nutrientes de duas espécies da Amazônia. **Bol. Pesq. Fl.**, Colombo, n.43, p. 47-60, jul./dez. 2001.

OLSON, J.S. Energy Storage and the Balance of Producers and Decomposers in Ecological Systems. **Ecology**, Apr., 1963, Vol. 44, No. 2 (Apr., 1963), pp. 322-331.

PINTO, H.C.A.; BARRETO, P.A.B.; GAMA-RODRIGUES, E.F. da.; OLIVEIRA, F.G.R.B. de; PAULA, A. de.; AMARAL, A.R. Decomposição da serapilheira foliar de floresta nativa de plantios de *Pterogyne nitens* E *Eucalyptus urophylla* no sudoeste da Bahia. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 26, n. 4, p. 1141-1153, out.-dez., 2016.

POMPERMAIER, V.T.; CAMPANI, A. R.; DOURADO, E. COLETTA, L.D.; BUSTAMANTE, M.M. da C.; NARDOTO, G.B. Soil mesofauna driver litter decomposition under combined nitrogen and phosphorus additions in a Brazilian woodland savana. **Ecological Society of Australia**, 2021.

POMPERMAIER, V.T. **Resposta taxonômica, funcional e trófica de colêmbolos epigéicos e da mesofauna decompositora à adição de nutrientes em um cerrado do Brasil Central**. Tese de Doutorado. Universidade de Brasília, 2021.

PRIMAVESI, A. **O manejo ecológico do solo: agricultura em regiões tropicais**. São Paula-Nobel, 1990.

PHOENIX, G.K., HICKS, W.K., CINDERBY, S., KUYLENSTIERNA, J.C.I., STOCK, W.D., DENTENER, F.J., GILLER, K.E., AUSTIN, A.T., LEFROY, R.D.B., GIMENO, B.S., ASHMORE, M.R., INESON, P., 2006. Atmospheric nitrogen deposition in world biodiversity hotspots: The need for a greater global perspective in assessing N deposition impacts. **Glob. Chang. Biol.** 12, 470–476.

QUEIROZ, C.R.A. dos A. **Análise da lignina e dos polifenóis da aroeira-preta (*Astronium urundeuva*)**. Dissertação de mestrado- Universidade Federal de Urubelândia, 2001.

QUEIROZ, F.A. de. Impactos da sojicultura de exportação sobre a biodiversidade do Cerrado. **Sociedade & Natureza**, Uberlândia, 21 (2): 193-209, ago. 2009.

REDDY, C. A. 1984. **Physiology and biochemistry of lignin degradation**. pp. 558-571. In *Microbial Ecology*. Proc. 3rd Intl. Symp. Microb. Eds. M J Klug and C A Reddy. Am. Soc. of Microbiol., Washington, D.C.

R Core Team (2022). **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.

Relatório Anual de Desmatamento 2021 - São Paulo, Brasil. **MapBiomas**, 2022 - 126 páginas.

- RIBEIRO, J. F.; WALTER, B. M. T. **As Principais Fitofisionomias do Bioma Cerrado**. In: SANO, S. M.; ALMEIDA, S. P.; RIBEIRO, J. F. (org.). Cerrado: Ecologia e Flora. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica; Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2008. v. 1, cap. 6, p. 152-212.
- SALIBA, E. de O. S.; RODRIGUEZ, N. M.; MORAIS, S. A. L. de.; PILÓ-VELOSO, D. Ligninas- Métodos de obtenção e caracterização química. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.31, n.5, p.917-928, 2001.
- SALA, O.E., CHAPIN, F.S., ARMESTO, J.J., BERLOW, E., BLOOMFIELD, J., DIRZO, R., HUBER-SANWALD, E., HUENNKE, L.F., JACKSON, R.B., KINZING, A., LEEMANS, R., LODGE, D.M., MOONEY, H.A., OESTERHELD, M., POFF, N.L., SYKES, M.T., WALKER, B.H., WALKER, M., WALL, D.H., 2000. Global Biodiversity Scenarios for the Year 2100. **Science**. 287, 1770–1774.
- SHIBUYA, E.K.; SARKIS, J.E.S.; NETO, O.N.; MOREIRA, M.Z.; VICTORIA, R.L. Sourcing brazilian marijuana by applying IRMS analysis to seized samples. **Forensic Science International** 160 (2006) 35–43.
- SILVEIRA, R.; MELLO, T. R. B.; SILVA, M. R. S.; KRÜGER, R. H.; BUSTAMANTE, M. M. C. Long-term liming promotes drastic changes in the composition of the microbial community in a tropical savanna soil. **Biology and Fertility of Soils**, 2020.
- SILVA, R.C. de S.; ALMEIDA, J.C.R. de.; BATISTA, G.T.; NETO, P.F. Os indicadores físicos, químicos e biológicos da qualidade do solo e da sustentabilidade dos ambientes naturais. **Repositório Eletrônico Ciências Agrárias, Coleção Ciências Ambientais**, p. 1-11, 2011.
- SMILL, V., 2000. Phosphorus in the Environment: Natural Flows and Human Interferences. Annu. **Rev. Energy Environ**. 25, 53–88.
- SUTTON, M. A.; OENEMA, O.; ERISMAN, J. W.; LEIP, A.; VAN GRINSVEN, H.; WINIWARTER, W. **Too much of a good thing**. Nature, v. 472, p. 159-161, April, 2011.
- SWIFT, M. J. et al. **Decomposition in terrestrial ecosystems**. Berkeley: University of California Press, 1979.
- TAYLOR, B.R.; PARKINSON, D.; PARSONS, W.F.J. Nitrogen and Lignin Content as Predictors of Litter Decay Rates: A Microcosm Test. **Ecology**, Feb., 1989, Vol. 70, No. 1 (Feb., 1989), pp. 97-104.
- TOWNSEND, C.R.; BEGON, M.; HARPER, J.L. **Fundamentos em Ecologia**, 3ª edição, 2007.
- WANG, R.; BALKANSKI, Y., BOUCHER, O.; CIAIS, P.; PEÑUELAS, J.; TAO, S. 2015. Significant contribution of combustion-related emissions to the atmospheric phosphorus budget. **Nat. Geosci.** 8, 48–54.
- WERNER, R.A.; SCHMIDT, H-L. The in vivo nitrogen isotope discrimination among organic plant compounds. **Phytochemistry** 61 (2002) 465–484.
- YONEYAMA, K et al. Variation in natural abundance of <sup>15</sup>N among plant parts and in <sup>15</sup>N/<sup>14</sup>N fractionation during N<sub>2</sub> fixation in legume-rhizobia symbiotic system, **Plant Cell Physiol**. 27 (1986) 791–799.

### APÊNDICE A- Dados brutos da composição química da serapilheira inicial

**Tabela 3.** Valores de nitrogênio,  $\delta^{15}\text{N}$ , polifenóis totais e razões carbono/nitrogênio, lignina/celulose e lignina/nitrogênio em percentagem da serapilheira inicial no controle e tratamentos de adição de nutrientes em um cerrado sentido restrito, localizado na RECOR do IBGE, Brasília, DF.

Tratamentos	Nitrogênio	$\delta^{15}\text{N}$	C/N	Polifenóis	L/C	L/N
1C	0,9	-0,6	52,3	4,8	0,6	29,2
5C	0,8	-1,1	59,2	3,1	0,6	36,8
11C	1,0	-1,5	47,1	5,6	0,8	30,3
2N	1,1	-0,8	46,0	3,6	0,6	23,9
7N	1,2	-1,2	39,8	4,9	0,6	22,2
14N	1,2	-0,8	39,9	7,0	0,8	25,0
4P	1,0	-0,8	45,9	5,6	0,8	30,3
9P	1,0	-0,7	47,8	2,5	0,7	29,3
15P	0,9	-0,7	52,1	12,4	0,7	32,0
6NP	1,2	-0,4	39,0	3,5	0,7	23,2
13NP	1,1	-0,8	42,3	3,2	0,7	24,7
16NP	1,0	-0,2	48,9	8,8	0,9	32,8
3Ca	0,9	0,1	52,2	6,0	0,8	34,1
12Ca	1,1	-1,0	37,5	2,7	0,8	26,5
17Ca	1,0	-1,2	45,5	6,4	0,8	28,1

Legenda: C- controle, N- adição de nitrogênio, P- adição de fósforo, NP- adição combinada de nitrogênio e fósforo, Ca- calagem. Razões C/N- carbono/nitrogênio, L/C- lignina/celulose, L/N- lignina/nitrogênio.

**APÊNDICE B- Dados brutos de nitrogênio,  $\delta^{15}\text{N}$  e razão carbono/nitrogênio**

**Tabela 4.** Valores de nitrogênio,  $\delta^{15}\text{N}$  e razão carbono/nitrogênio em percentagem da serapilheira em malha fina e malha grossa, ao longo do tempo no controle e tratamentos de adição de nutrientes em um cerrado sentido restrito, localizado na RECOR do IBGE, Brasília, DF.

<b>Malha Grossa (acesso da mesofauna)</b>				
Tratamentos	Tempo	Nitrogênio	$\delta^{15}\text{N}$	C/N
1C	T1-T2	0,8	-1,7	66,0
5C	T1-T2	1,0	-2,2	47,7
11C	T1-T2	1,1	-2,5	42,1
2N	T1-T2	1,2	-2,4	39,9
7N	T1-T2	1,4	-2,0	33,7
14N	T1-T2	0,9	-1,8	49,8
4P	T1-T2	0,9	-2,2	53,1
9P	T1-T2	1,0	-1,7	47,8
15P	T1-T2	1,0	-3,8	48,6
6NP	T1-T2	1,3	-1,8	37,8
13NP	T1-T2	1,1	-1,3	41,7
16NP	T1-T2	1,1	-2,0	34,3
3Ca	T1-T2	0,8	0,3	57,2
12Ca	T1-T2	1,2	-0,4	37,6
17Ca	T1-T2	1,1	-3,4	40,5
1C	T3-T4	0,8	-0,4	63,7
5C	T3-T4	1,0	-2,3	48,2
11C	T3-T4	1,2	-3,2	40,2
2N	T3-T4	1,2	-1,4	37,2
7N	T3-T4	1,2	-2,1	40,6
14N	T3-T4	1,1	0,0	44,3
4P	T3-T4	0,9	-2,1	53,8
9P	T3-T4	0,9	-1,4	50,0
15P	T3-T4	1,0	-2,2	47,0
6NP	T3-T4	1,2	-0,5	39,0
13NP	T3-T4	1,0	-1,8	46,2
16NP	T3-T4	1,3	-0,9	35,9
3Ca	T3-T4	0,9	-0,5	49,7
12Ca	T3-T4	0,9	-1,2	47,7
17Ca	T3-T4	1,1	1,6	50,1
1C	T5-T6	1,3	-2,2	39,0
5C	T5-T6	1,2	-2,8	40,5
11C	T5-T6	1,0	-1,1	48,8
2N	T5-T6	1,3	-1,4	35,1
7N	T5-T6	1,2	-1,3	40,4
14N	T5-T6	1,0	-2,0	40,3
4P	T5-T6	1,0	-1,3	43,2
9P	T5-T6	1,0	-2,1	44,9
15P	T5-T6	1,0	-2,3	49,0
6NP	T5-T6	1,4	-0,5	34,0
13NP	T5-T6	1,1	-1,7	41,4
16NP	T5-T6	1,5	-0,1	29,9
3Ca	T5-T6	1,1	-0,2	40,7
12Ca	T5-T6	1,1	-1,1	39,4
17Ca	T5-T6	0,9	-0,1	42,2
1C	T7-T8	0,9	-0,9	38,1
5C	T7-T8	1,2	-1,7	36,6

Tabela 4- continua

Tratamentos	Tempo	Nitrogênio	$\delta^{15}\text{N}$	C/N
11C	T7-T8	1,1	-2,9	35,1
2N	T7-T8	1,4	-1,9	30,6
7N	T7-T8	1,3	-1,8	35,4
14N	T7-T8	1,1	-1,6	38,8
4P	T7-T8	0,8	-1,5	50,2
9P	T7-T8	1,1	-0,6	38,5
15P	T7-T8	0,8	-0,1	32,7
6NP	T7-T8	1,2	-0,9	38,1
13NP	T7-T8	1,2	-0,4	33,9
16NP	T7-T8	0,9	-0,4	30,3
3Ca	T7-T8	1,0	-0,4	39,6
12Ca	T7-T8	1,2	0,5	35,8
17Ca	T7-T8	0,8	-0,5	38,2
1C	T9-T10	1,1	-1,0	46,6
5C	T9-T10	1,2	-2,2	40,3
11C	T9-T10	1,2	-2,3	36,9
2N	T9-T10	1,4	-1,6	34,3
7N	T9-T10	1,4	-2,1	33,9
14N	T9-T10	0,9	-1,1	49,6
4P	T9-T10	1,1	-0,9	41,2
9P	T9-T10	1,1	-0,7	36,1
15P	T9-T10	0,8	-0,3	59,2
6NP	T9-T10	1,4	-0,7	33,8
13NP	T9-T10	1,0	1,5	44,7
16NP	T9-T10	1,2	0,0	31,5
3Ca	T9-T10	0,9	3,1	46,6
12Ca	T9-T10	1,0	-0,6	44,4
17Ca	T9-T10	1,1	-1,8	39,2
1C	T11-T12	1,2	-1,0	39,5
5C	T11-T12	1,0	-2,8	41,8
11C	T11-T12	1,2	-1,3	38,4
2N	T11-T12	1,3	-1,1	33,4
7N	T11-T12	1,1	-1,1	43,5
14N	T11-T12	0,9	0,1	51,8
4P	T11-T12	1,0	-0,5	45,7
9P	T11-T12	1,3	-0,4	33,9
15P	T11-T12	1,0	-0,2	46,9
6NP	T11-T12	1,6	-0,4	28,4
13NP	T11-T12	1,2	0,1	37,6
16NP	T11-T12	1,4	-0,8	30,8
3Ca	T11-T12	1,0	-1,5	44,8
12Ca	T11-T12	1,3	-1,2	34,5
17Ca	T11-T12	1,1	-1,1	40,1

**Malha Fina (exclusão da mesofauna)**

Tratamentos	Tempo	Nitrogênio	$\delta^{15}\text{N}$	C/N
1C	T1-T2	1,0	-3,4	47,5
5C	T1-T2	1,1	-1,5	43,7
11C	T1-T2	1,1	-3,0	40,3
2N	T1-T2	1,1	-1,9	43,0
7N	T1-T2	1,4	-1,9	35,1
14N	T1-T2	1,0	-2,4	46,4

Tabela 4- continua

Tratamentos	Tempo	Nitrogênio	$\delta^{15}\text{N}$	C/N
4P	T1-T2	1,0	-0,6	44,2
9P	T1-T2	0,9	-1,1	50,6
15P	T1-T2	1,0	-3,7	50,0
6NP	T1-T2	1,6	0,1	29,8
13NP	T1-T2	1,1	-2,5	44,4
16NP	T1-T2	1,2	-1,2	38,1
3Ca	T1-T2	0,9	0,0	54,8
12Ca	T1-T2	0,9	-1,0	46,8
17Ca	T1-T2	0,9	-1,0	47,6
1C	T3-T4	1,1	-2,4	42,5
5C	T3-T4	0,9	-2,2	52,3
11C	T3-T4	1,1	-3,0	44,0
2N	T3-T4	1,6	-0,9	30,3
7N	T3-T4	1,4	-1,5	32,6
14N	T3-T4	0,8	0,3	61,9
4P	T3-T4	0,6	-0,6	75,7
9P	T3-T4	0,9	-0,8	49,9
15P	T3-T4	0,9	-2,6	52,0
6NP	T3-T4	1,3	-1,0	37,1
13NP	T3-T4	1,0	-1,8	47,4
16NP	T3-T4	1,1	-2,0	38,3
3Ca	T3-T4	1,2	0,4	41,1
12Ca	T3-T4	0,9	-0,9	49,4
17Ca	T3-T4	0,9	-2,2	52,2
1C	T5-T6	1,2	-2,9	43,4
5C	T5-T6	1,2	-2,0	42,0
11C	T5-T6	1,1	-3,4	45,6
2N	T5-T6	1,3	-1,8	37,0
7N	T5-T6	1,5	-3,2	32,2
14N	T5-T6	0,9	1,1	51,2
4P	T5-T6	0,8	-2,3	57,1
9P	T5-T6	0,9	-1,4	48,8
15P	T5-T6	1,3	-1,1	37,8
6NP	T5-T6	1,4	-0,6	36,0
13NP	T5-T6	1,2	-1,7	40,7
16NP	T5-T6	1,3	-1,0	33,5
3Ca	T5-T6	0,9	0,8	48,6
12Ca	T5-T6	1,0	0,5	45,8
17Ca	T5-T6	1,1	-0,6	42,1
1C	T7-T8	1,2	-1,3	40,8
5C	T7-T8	0,9	-2,8	46,4
11C	T7-T8	1,2	-2,9	38,4
2N	T7-T8	1,5	-1,6	28,4
7N	T7-T8	1,4	-2,2	27,3
14N	T7-T8	1,0	-0,2	44,9
4P	T7-T8	1,0	-1,0	38,3
9P	T7-T8	1,1	-0,6	41,4
15P	T7-T8	1,0	-0,4	36,0
6NP	T7-T8	1,2	-1,2	31,4
13NP	T7-T8	1,2	-1,5	31,7
16NP	T7-T8	0,9	-0,7	31,7
3Ca	T7-T8	0,9	1,5	36,3
12Ca	T7-T8	0,8	-0,2	34,6

Tabela 4- continua				
Tratamentos	Tempo	Nitrogênio	$\delta^{15}\text{N}$	C/N
17Ca	T7-T8	0,5	-1,5	30,2
1C	T9-T10	1,0	-0,6	46,6
5C	T9-T10	1,0	-0,8	47,2
11C	T9-T10	1,2	-2,2	39,7
2N	T9-T10	1,5	-0,7	32,7
7N	T9-T10	1,4	-1,5	35,7
14N	T9-T10	1,0	-2,2	49,2
4P	T9-T10	0,9	0,1	53,0
9P	T9-T10	1,1	-0,7	45,4
15P	T9-T10	1,1	-1,7	46,5
6NP	T9-T10	1,2	-0,4	36,5
13NP	T9-T10	1,0	-1,7	45,0
16NP	T9-T10	1,7	-0,7	26,1
3Ca	T9-T10	1,1	1,2	43,7
12Ca	T9-T10	1,1	0,3	38,7
17Ca	T9-T10	1,0	0,3	44,5
1C	T11-T12	1,1	-1,5	46,6
5C	T11-T12	1,2	-2,4	41,0
11C	T11-T12	1,2	-1,9	38,0
2N	T11-T12	1,8	-0,7	24,9
7N	T11-T12	1,2	-2,0	41,1
14N	T11-T12	1,2	-1,0	41,7
4P	T11-T12	1,0	-0,4	45,8
9P	T11-T12	0,8	0,4	55,9
15P	T11-T12	1,2	-1,0	35,1
6NP	T11-T12	1,5	-0,4	30,3
13NP	T11-T12	1,4	-0,8	32,2
16NP	T11-T12	1,4	0,0	29,5
3Ca	T11-T12	1,2	0,5	36,5
12Ca	T11-T12	1,0	-1,0	38,7
17Ca	T11-T12	0,9	-0,5	40,1

Legenda: C- controle, N- adição de nitrogênio, P- adição de fósforo, NP- adição combinada de nitrogênio e fósforo, Ca- calagem. Razão C/N- carbono/nitrogênio. Os tempos T1-T2 a T11-T12 correspondem aos tempos de exposição da serapilheira à decomposição.

**APÊNDICE C- Dados brutos de polifenóis, razões lignina/nitrogênio e lignina/celulose**

**Tabela 5.** Valores de polifenóis, razões lignina/nitrogênio e lignina/celulose em percentagem, da serapilheira em malha fina e malha grossa, ao longo do tempo no controle e tratamentos de adição de nutrientes em um cerrado sentido restrito, localizado na RECOR do IBGE, Brasília, DF.

<b>Malha grossa (com acesso da mesofauna)</b>				
Tratamentos	Tempo	Polifenóis	L/C	L/N
1C	T3	3,1	2,0	85,0
5C	T3	4,5	1,5	62,9
11C	T3	4,6	1,3	42,8
2N	T3	5,8	1,2	44,4
7N	T3	4,5	1,3	46,3
14N	T3	4,3	2,3	60,5
4P	T3	3,9	1,9	71,9
9P	T3	3,4	1,5	54,8
15P	T3	4,7	1,3	51,4
6NP	T3	4,7	1,9	51,4
13NP	T3	4,3	1,8	59,8
16NP	T3	4,6	0,9	29,7
3Ca	T3	3,5	1,7	72,0
12Ca	T3	3,4	1,8	50,5
17Ca	T3	1,6	2,0	56,0
1C	T6	5,2	1,4	44,9
5C	T6	4,1	2,4	53,4
11C	T6	3,7	3,4	71,1
2N	T6	6,9	1,4	37,4
7N	T6	4,4	2,2	48,6
14N	T6	4,5	2,0	62,0
4P	T6	9,6	1,5	51,0
9P	T6	3,8	2,1	55,3
15P	T6	7,2	2,0	62,0
6NP	T6	4,9	2,5	51,8
13NP	T6	5,7	3,2	70,1
16NP	T6	5,1	1,1	25,8
3Ca	T6	4,3	2,5	55,5
12Ca	T6	3,1	1,1	45,3
17Ca	T6	5,2	1,9	61,4
1C	T9	3,0	1,4	42,9
5C	T9	3,5	1,9	44,6
11C	T9	3,3	0,8	25,5
2N	T9	5,4	1,1	32,4
7N	T9	5,3	1,2	31,1
14N	T9	3,4	1,6	50,9
4P	T9	4,1	1,1	34,9
9P	T9	3,5	1,3	33,3
15P	T9	4,1	1,8	70,0
6NP	T9	3,6	1,7	35,2
13NP	T9	1,3	3,8	64,2
16NP	T9	3,4	1,0	25,7
3Ca	T9	2,7	1,8	57,3
12Ca	T9	5,0	1,2	44,9
17Ca	T9	1,7	1,4	38,7
1C	T12	4,2	2,3	46,7



Tabela 5- continua

Tratamentos	Tempo	Polifenóis	L/C	L/N
5C	T12	2,3	2,7	54,7
11C	T12	2,2	2,3	41,6
2N	T12	4,8	1,5	34,6
7N	T12	4,4	1,7	44,4
14N	T12	1,2	2,9	60,4
4P	T12	1,1	3,1	57,1
9P	T12	0,3	2,4	30,0
15P	T12	5,0	1,4	41,9
6NP	T12	1,9	2,6	33,1
13NP	T12	0,5	3,0	49,2
16NP	T12	0,6	1,8	27,6
3Ca	T12	1,0	2,7	53,7
12Ca	T12	1,1	2,4	42,3
17Ca	T12	-0,4	4,5	57,8

**Malha fina (sem acesso da mesofauna)**

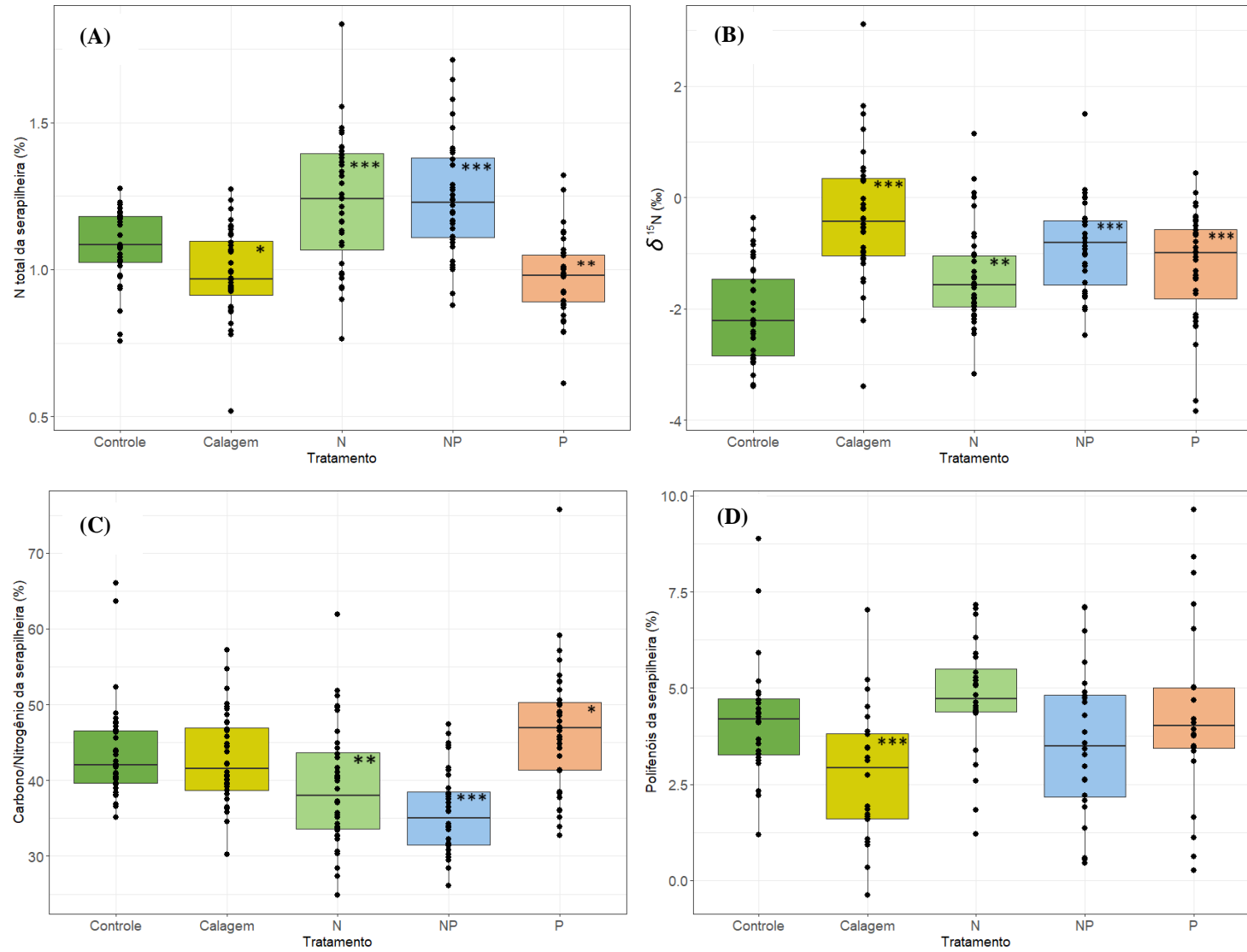
Tratamentos	Tempo	Polifenóis	L/C	L/N
1C	T3	5,9	1,5	49,2
5C	T3	4,8	2,2	73,3
11C	T3	4,7	1,5	50,9
2N	T3	7,1	0,9	34,0
7N	T3	4,4	1,3	36,1
14N	T3	5,2	2,1	85,1
4P	T3	3,8	1,8	99,7
9P	T3	3,5	1,5	54,7
15P	T3	6,5	1,9	74,1
6NP	T3	2,6	1,3	37,9
13NP	T3	7,1	1,9	54,3
16NP	T3	3,0	0,8	30,8
3Ca	T3	1,6	2,3	56,1
12Ca	T3	7,0	1,0	55,8
17Ca	T3	3,2	1,0	48,8
1C	T6	7,5	1,4	47,5
5C	T6	4,9	2,5	55,3
11C	T6	8,9	2,0	54,1
2N	T6	7,2	1,6	39,5
7N	T6	5,9	1,4	31,3
14N	T6	6,3	2,4	73,2
4P	T6	8,4	0,9	42,2
9P	T6	4,2	1,4	53,9
15P	T6	8,0	1,6	42,8
6NP	T6	4,8	2,8	49,9
13NP	T6	7,1	2,8	71,9
16NP	T6	6,5	1,5	46,5
3Ca	T6	1,9	2,9	69,1
12Ca	T6	3,2	1,4	64,3
17Ca	T6	3,9	2,6	57,5
1C	T9	3,2	1,7	51,3
5C	T9	3,4	2,2	62,0
11C	T9	4,3	1,1	38,5
2N	T9	4,6	0,9	28,2
7N	T9	5,1	1,4	36,4
14N	T9	5,1	1,3	48,3

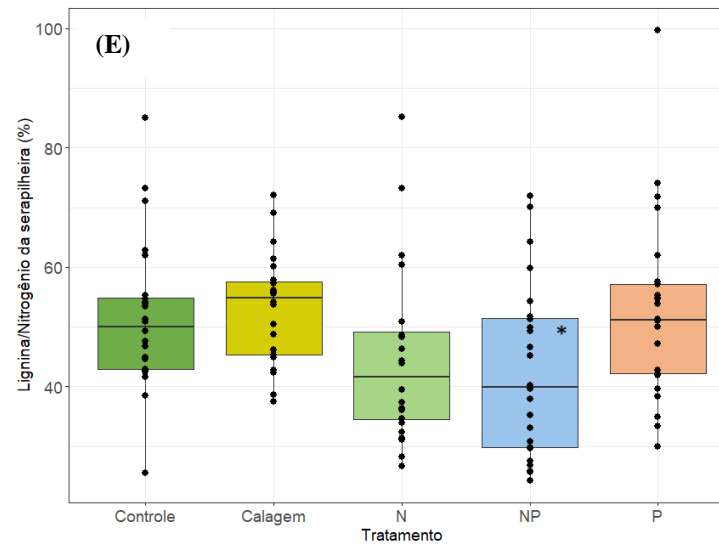
Tabela 5- continua

Tratamentos	Tempo	Polifenóis	L/C	L/N
4P	T9	1,6	1,6	57,5
9P	T9	3,1	1,2	39,6
15P	T9	5,0	1,5	51,1
6NP	T9	3,9	1,5	39,6
13NP	T9	3,3	1,3	45,2
16NP	T9	2,1	1,3	24,3
3Ca	T9	1,7	1,4	54,1
12Ca	T9	4,5	1,1	37,4
17Ca	T9	1,9	2,0	60,1
1C	T12	1,2	3,1	53,9
5C	T12	4,1	2,5	42,9
11C	T12	4,4	2,0	42,5
2N	T12	3,0	2,1	26,6
7N	T12	1,8	1,9	43,9
14N	T12	2,6	1,4	36,2
4P	T12	3,5	2,1	50,0
9P	T12	0,6	1,8	47,2
15P	T12	5,0	1,3	38,3
6NP	T12	2,2	1,9	29,8
13NP	T12	2,6	3,0	40,2
16NP	T12	0,6	1,7	26,8
3Ca	T12	0,3	3,4	46,2
12Ca	T12	3,8	1,3	42,8
17Ca	T12	0,9	1,8	45,3

Legenda: C- controle, N- adição de nitrogênio, P- adição de fósforo, NP- adição combinada de nitrogênio e fósforo, Ca- calagem. Razões L/C- lignina/celulose, L/N- lignina/nitrogênio. Os tempos T3, T6, T9 e T12 correspondem aos tempos de exposição da serapilheira à decomposição.

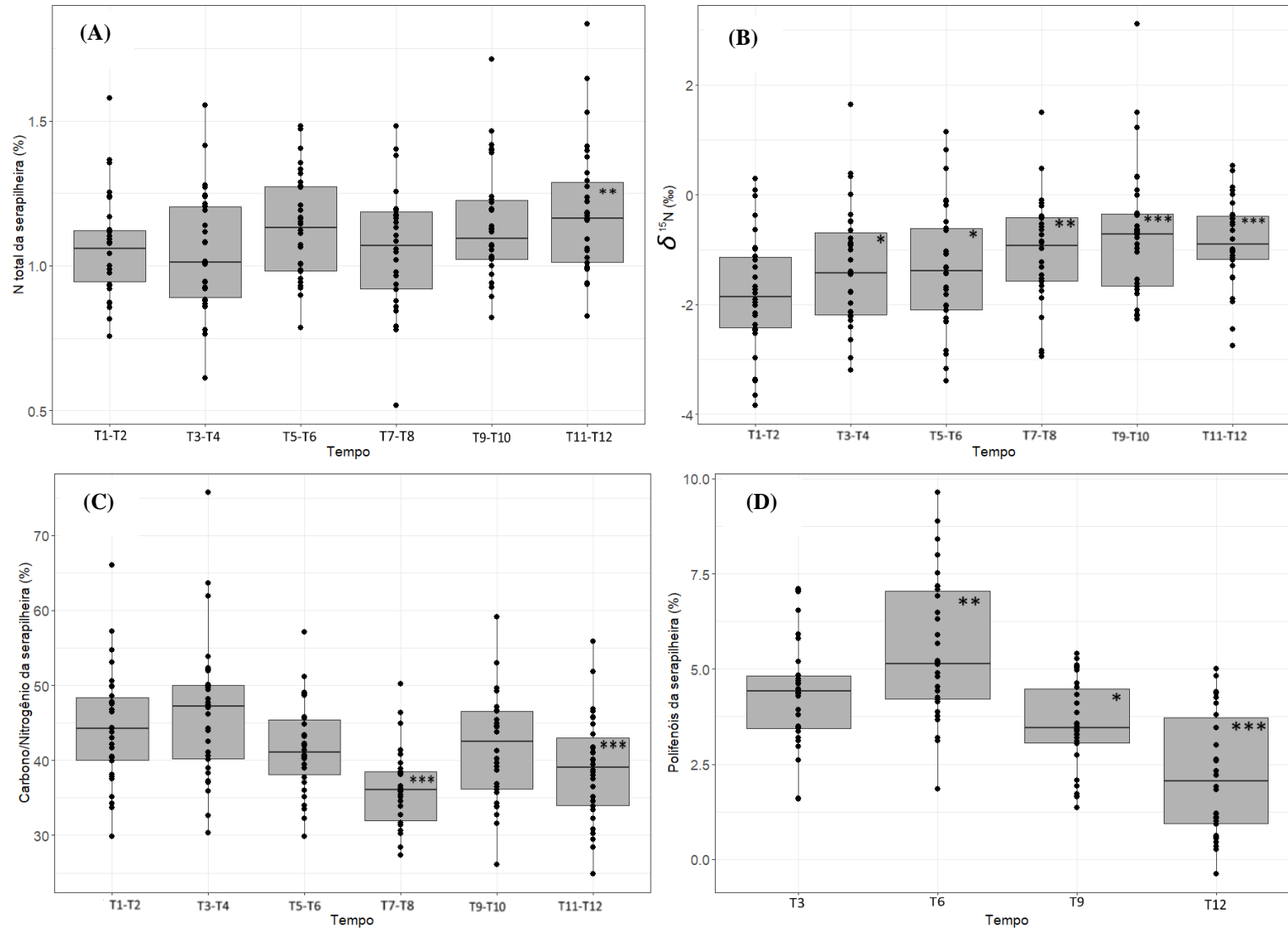
**APÊNDICE D- Boxplots do efeito dos tratamentos de fertilização nos compostos analisados da serapilheira**

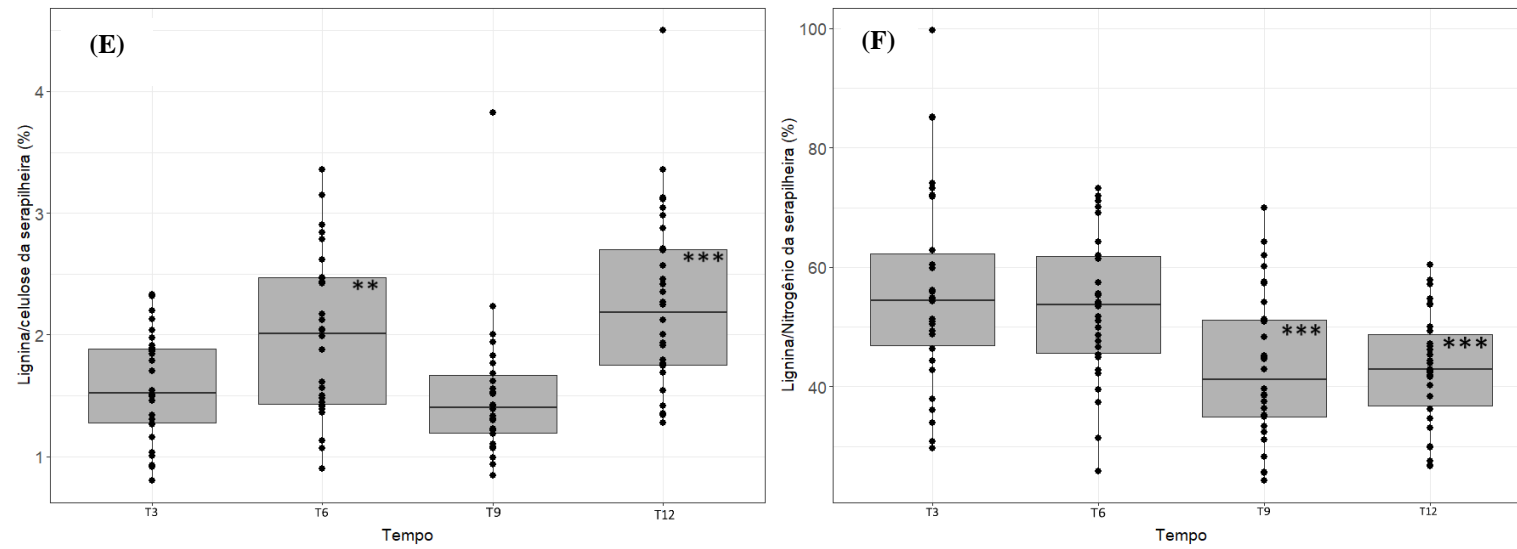




**Figura 9.** Efeito dos tratamentos de fertilização na concentração total de nitrogênio (A), valor de  $\delta^{15}\text{N}$ , (B), razão carbono/nitrogênio (C), concentração de polifenóis totais (D), razão lignina/nitrogênio (E) da serapilheira em um cerrado sentido restrito submetido a adição de nutrientes, localizado na RECOR do IBGE, Brasília, DF. O efeito dos tratamentos sobre os compostos da serapilheira foi testado com regressões lineares. Sendo: ‘\*’  $p < 0,05$ ; ‘\*\*’  $p < 0,01$ ; ‘\*\*\*’  $p < 0,001$ .

**APÊNDICE E- Boxplots do efeito dos tempos de exposição da serapilheira nos compostos analisados da serapilheira**





**Figura 10.** Efeito do tempo na concentração total de nitrogênio (A), valor de  $\delta^{15}\text{N}$ , (B), razão carbono/nitrogênio (C), concentração de polifenóis totais (D), razão lignina/celulose (E), razão lignina/nitrogênio (F) da serapilheira em um cerrado sentido restrito submetido a adição de nutrientes, localizado na RECOR do IBGE, Brasília, DF. O efeito do tempo sobre os compostos da serapilheira foi testado com regressões lineares. Sendo: ‘\*’  $p < 0,05$ ; ‘\*\*’  $p < 0,01$ ; ‘\*\*\*’  $p < 0,001$

## ANEXO A- Protocolo de determinação de lignina e celulose

### 1. Equipamentos, Reagentes e Soluções

#### I) Equipamentos

- Balança analítica (precisão de 0,1mg);
- Dessecador;
- Tubos de vidro com tampa de rosca de 40ml (resistentes a pressão);
- Banho-maria (100°C) com rack submerso para os tubos de vidro;
- Cadinhos de vidro de 30ml com placa porosa de 30mm de diâmetro e placa porosa de 40 a 100µm;
- Funis de Büchner com encaixe para os cadinhos ou com placa porosa de 40 a 100µm;
- Manifold ou unidades individuais de filtração para os cadinhos (ex. kitassatos de 500ml);
- Bomba de vácuo;
- Placa de aquecimento ou ebulidor de água;
- Luvas de borracha sintética (azuis);
- Seringas de 15 ou 25ml;
- Espátulas resistentes a ácido ou bastões de vidro (8 cm de comprimento);
- Estufa a 105°C;
- Mufla a 550°C.

#### II) Reagentes

- Ácido Sulfúrico P.A. ou 95-97%;
- Cetil Trimetil-amônio brometo (CTAB);
- Decahidronaftaleno;
- Acetona P.A.

#### III) Soluções

- **Ácido detergente (Ácido Sulfúrico 0,5 M + CTAB):** Em uma capela, adicionar 27,2ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> P.A. ou 27,5ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 95-97% com pipeta graduada em 700ml de água destilada em um bequer de 1 litro, aos poucos, e adicionar 20g do detergente CTAB em placa de agitação. Passar a solução para um balão volumétrico de 1 litro e completar o volume com água destilada. Durante a manipulação do ácido, utilizar jaleco, óculos de segurança e luvas;
- **Ácido Sulfúrico 72%:** Em uma capela, adicionar 665ml do ácido em 300ml de água destilada em um bequer de 1 litro, em pequenas porções e bem devagar, misturando

ocasionalmente (com uma pipeta ou bastão de vidro). CUIDADO: A liberação de calor pode gerar uma explosão! Com a adição do ácido e homogeneização, a solução irá esquentar. Deixe a solução esfriar por tempo suficiente para continuar. Após diluir todo o ácido e esperar a solução esfriar, passar a solução com cuidado para um balão volumétrico de 1 litro. Não encher o frasco até a marca de calibração imediatamente, esperar a solução esfriar. Completar o volume aos poucos. Durante a manipulação do ácido, utilizar jaleco, óculos de segurança e luvas.

## **2. Procedimentos experimentais**

### **I) Preparação das amostras**

- Registrar o peso das amostras obtidas no campo secas à temperatura ambiente e após 72 horas à 105°C na estufa (para a correção da umidade). O material previamente seco em estufa deve ser moído em moedor de facas e peneirado em malha de 0,5mm;
- Pesar os cadinhos de vidro limpos e secos em mufla (500°C por 1 hora) (Pc);
- Pesar 245-255mg das amostras moídas e secas, anotar o peso (Pa) e colocar nos tubos de vidro identificados;
- Pesar a mesma quantidade das amostras em cadinhos de porcelana limpos, incinerados (mufla à 500°C por 1 hora) e tarados. Registrar o peso úmido e após 3 hora em mufla à 500°C com uma balança analítica (para a correção do peso livre de cinzas).

### **II) Determinação das fibras**

- Adicionar aos tubos 20ml da Solução de Ácido Detergente e 0,4ml de decahidronaftaleno;
- Utilizando o banho-maria, aquecer os tubos até ferver agitando os tubos ocasionalmente. Ferver por 60 min;
- Filtrar as amostras nos cadinhos de vidro tarados e ajustados no manifold ou kitassatos. Quebrar a película que se forma sobre a placa porosa com a espátula ou bastão de vidro. Se necessário, utiliza a bomba de sucção (Utilizar sucção fraca!). Lavar as amostras e bordas do cadinho com água quente (5 x de 15ml), procurando levar partículas aderidas às bordas do cadinho ao fundo do cadinho;
- Repetir a lavagem com acetona pura até ela não remover mais cor das amostras (até o filtrado se tornar transparente). Quebrar todos os acúmulos de partículas para que o solvente entre em contato com todas as partículas;
- Sugar a acetona das amostras livres de fibras e secar overnight a 105°C;
- Colocar os cadinhos secos no dessecador até esfriarem e registrar o peso;
- Determinar a quantidade de fibras das amostras (F) pela fórmula:



$$F = \frac{Pf - Pc}{Pa} \times 100$$

Onde: Pf = Peso final (peso do cadinho de vidro + amostra livre de fibras);

Pc = Peso do cadinho de vidro;

Pa = Peso da amostra nos tubos de vidro (após correção de umidade, ver observações).

**Observação:** Existirá uma diferença de peso na amostra antes e após a estufa devido o a umidade perdida na amostra. Corrigir o peso da amostra utilizada, removendo o seu teor de umidade, multiplicando o peso da amostra utilizada pela porcentagem de peso seco após 105° *overnight* (Ex. Se o peso utilizado na análise foi 0,250g e a porcentagem de peso seco é 98,5%, a correção a ser feita é 0,250\*0,985), antes do cálculo do teor de fibras.

### III) Determinação da Lignina e Celulose

- Cobrir o conteúdo dos cadinhos de vidro com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 72% e misturar com a espátula ou bastão de vidro até formar uma pasta e desfazer todos os acúmulos de partícula;
- Encher o cadinho de vidro até a metade com o ácido e misturar. Deixar a espátula ou bastão de vidro no cadinho;
- Colocar novamente H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 72% até cobrir a amostra e misturar. Assim que o ácido for drenado, adicionar novamente. Três adições de ácido são suficientes. Os cadinhos não precisam estar cheios durante todo o tempo, mas as amostras devem estar sempre cobertas. Não realizar o procedimento em local com temperatura superior à 23°C;
- Após a filtração, remover a maior quantidade de ácido possível com a bomba de vácuo (começar com vácuo mais fraco e ir aumentando gradativamente se necessário);
- Lavar o conteúdo dos cadinhos com bastante água quente até eles ficarem totalmente livres do ácido (5 x 15ml). Limpar as partículas e remover a espátula de cada cadinho;
- Secar os cadinhos *overnight* a 105°C;
- Colocar os cadinhos secos no dessecador até esfriarem e registrar o peso;
- Incinerar os cadinhos na mufla a 550°C por 3 horas e deixá-los esfriar no dessecador e registrar o peso;
- Calcular a quantidade de celulose (C) pela fórmula:

$$C = \frac{La}{Pa} \times 100$$

Onde: La = Perda de peso pelo tratamento com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 72% ((peso do cadinho + amostra livre de fibras) - (peso do cadinho + amostra após tratamento com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 72%))

Pa = Peso da amostra nos tubos de vidro (após correção de umidade).

- Calcular a quantidade de lignina (L) pela fórmula:

$$L = \frac{Li}{Pa} \times 100$$

Onde: Li = Perda de peso pela incineração após tratamento com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 72% ((peso do cadinho + amostra após tratamento com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 72%) - (peso do cadinho + amostra após incineração))

Pa = Peso da amostra nos tubos de vidro (após correção de umidade e do peso seco livre de cinzas, ver observações)

## **ANEXO B- Protocolo de determinação de polifenóis**

### **1. Preparação e extração**

- I) Pesar 1g da amostra de folhas moídas. Não precisa ser necessariamente 1g, pode ser um valor aproximado. Anotar o peso;
- II) Adicionar 20ml de metanol 50% (metanol – água destilada 1:1, em uma proveta de 500ml) às amostras em tubos de ensaio de 50ml. Deixar as amostras no escuro overnight à 4°C (geladeira);
- III) Colocar as amostras em agitador por 30 min, adicionar 10ml de metanol 50%, colocar no agitador por mais 30 min e filtrar em papel filtro de 25µm;
- IV) Armazenar os extratos em refrigerador (utilizar em até 2 dias).

### **2. Análise de Folin-Ciocalteu para fenóis totais**

- I) Reagente de Folin-Ciocalteu: Diluir em água destilada 1:10 (10ml de Folin-Ciocalteu em 90ml de água destilada);
- II) Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (Carbonato de Sódio Anidro P.A.): Pesar 75g e colocar em um béquer de 1 litro com 900ml de água deionizada. Dissolver usando bastão de vidro. Transferir para balão volumétrico de 1 litro e completar o volume (ou pesar 7,5g e diluir em 90ml de água deionizada. Completar volume para 100ml). Armazenar em frasco âmbar coberto.

### **3. Curva Padrão para ensaio de fenóis totais**

- Solução mãe de 5mg/ml de ácido tânico: 250mg ácido tânico em 50ml de água destilada.

1,0 mg/ml: 10ml solução mãe em 50ml

**0,8mg/ml: 8ml solução mãe em 50ml**

**0,6mg/ml: 6ml solução mãe em 50ml**

**0,5mg/ml: 5ml solução mãe em 50ml**

**0,4mg/ml: 4ml solução mãe em 50ml**

**0,3mg/ml: 3ml solução mãe em 50ml**

**0,2mg/ml: 2ml solução mãe em 50ml**

0,1mg/ml: 1ml solução mãe em 50ml

0,05mg/ml: 0,5ml solução mãe em 50ml

0,04mg/ml: 0,4ml solução mãe em 50ml

0,025 mg/ml: 0,25 ml solução mãe em 50ml

0,02 mg/ml: 0,20 ml solução mãe em 50ml

**Cada ponto da curva padrão:** 0,5ml do padrão + 2,5ml da solução de Folin-Ciocalteu + 2ml da solução de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>.

**Branco:** 2,5ml da solução de Folin-Ciocalteu e 2ml da solução de Na<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>.

Esperar 1 hora e fazer a leitura em 760nm (espectrofotômetro UV).

**Procedimento:**

I) Fazer diluições do extrato em triplicatas em tubos de ensaio de 15ml:

**1/10: 0,050ml extrato em 0,450ml água**

**1/5: 0,100ml extrato em 0,400ml água**

**1/2: 0,250ml extrato em 0,250ml água**

II) Adicionar 0,5ml da solução do extrato diluído (anotar diluição) em tubos de ensaio de 15ml;

III) Adicionar 2,5ml da solução de Folin-Ciocalteu;

IV) Adicionar 2,0ml da solução de Na<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>;

V) Deixar as amostras em temperatura ambiente por 1 hora antes de ler a absorbância em comprimento de onda de 760nm. O branco é feito com 2,5ml da solução 1:10 do reagente de Folin-Ciocalteu e 2,0ml da solução de Na<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>.