MARCOS FELIPE ZUÑIGA SANTAMARIA

Otimização do método lignina brometo de acetila na determinação do teor de lignina em plantas forrageiras e comparação com os métodos lignina detergente ácido e lignina Klason

São Paulo

2016

MARCOS FELIPE ZUÑIGA SANTAMARIA

Otimização do método lignina brometo de acetila na determinação do teor de lignina em plantas forrageiras e comparação com os métodos lignina detergente ácido e lignina Klason

VERSÃO CORRIGIDA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:

Nutrição e Produção Animal

Área de concentração:

Nutrição e Produção Animal

Nº CLASSIFICAÇÃO

Nº TOMBO
034338

Orientador:

Prof. Dr. Romualdo S. Fukushima

De acordo:_____

Orientador

São Paulo
2016

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.3254
FMVZ

Santamaria, Marcos Felipe Zuñiga
Otimização do método lignina brometo de acetila na determinação do teor de lignina em plantas forrageiras e comparação com os métodos lignina detergente ácido e lignina Klason / Marcos Felipe Zuñiga Santamaria. -- 2016.
69 f. il.

Dessertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Nutrição e Produção Animal, São Paulo, 2016.

Programa de Pós-Graduação: Nutrição e Produção Animal.

Área de concentração: Nutrição e Produção Animal.

Orientador: Prof. Dr. Romualdo S. Fukushima.

1. Gramíneas. 2. Método analítico. 3. Leguminosas. 4. Lignina detergente ácido. 5. Lignina brometo de acetila. I. Título.

São Paulo, 04 de novembro de 2015

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Estudos objetivando aperfeiçoar o método Lignina Brometo de Acetila na quantificação do teor de lignina em plantas forrageiras tropicais.", protocolado sob o CEUA nº 5968070214, sob a responsabilidade de Romualdo S. Fukushima, foi aprovado na reunião de 07/05/2014, e está de acordo com os princípios éticos da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

We certify that the Research "", protocol number CEUA 5968070214, under the responsibility Romualdo S. Fukushima, was approved in the meeting of day 05/07/2014, and agree with Ethical Principles adopted by Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of the University of São Paulo.

Atenciosamente,

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Universidade de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: SANTAMARIA, Marcos Felipe Zuniga

Título: **Otimização do método lignina brometo de acetila na determinação do teor de lignina em plantas forrageiras e comparação com os métodos lignina detergente ácido e lignina Klason**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do titulo de Mestre em Ciências

Data: __/__/__

Banca Examinadora

Prof. Dr._____

Instituição:_____ Julgamento:_____

Prof. Dr._____

Instituição:_____ Julgamento:_____

Prof. Dr._____

Instituição:_____ Julgamento:_____

DEDICATÓRIA

Dedico esta obra as pessoas que acreditaram em mim, a minha família, que presentes ou não eu sei que me apoiaram, as pessoas que conheci neste país que agora fazem parte da minha família também.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Faculdade de Medicina Veterinária especialmente ao Departamento de Nutrição e Produção Animal pela aceitação e o ensino, a fundação CAPES pela bolsa nos dois anos do meu mestrado, aos funcionários do departamento pela ajuda incondicional e agradeço especialmente a vida por me deixar viver e experimentar vivências inesquecíveis.

Agradeço especialmente ao Professor Dr. Romualdo S. Fukushima pela compreensão e ajuda em todo momento.

Por ultimo e não menos importante agradeço a minha namorada e sua família pelo apoio incondicional.

RESUMO

SANTAMARIA, M. F. Z. **Otimização do método lignina brometo de acetila na determinação do teor de lignina em plantas forrageiras e comparação com os métodos lignina detergente ácido e lignina Klason.** [Method optimization acetyl bromide lignin in determining the lignin content in forages and comparison with the methods lignin and acid detergent lignin Klason]. 2016. 69 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Técnicas analíticas empregadas para a quantificação do teor de lignina em plantas forrageiras, atualmente em uso, são questionáveis quanto às suas acurácias. O método lignina detergente ácido (LDA), que é um dos métodos mais utilizado em Ciência Animal e Agronomia, apresenta algumas falhas, particularmente devido à parcial solubilização da lignina durante a preparação da fibra em detergente ácido (FDA). A lignina Klason (LK), outro método muito usado, apresenta o inconveniente de mensurar a proteína da parede celular como sendo lignina. Em ambos os procedimentos recomenda-se também mensurar cinzas nos resíduos de lignina. A quantificação da concentração de lignina pelo método espectrofotométrico lignina brometo de acetila (LBA) vem ganhando interesse de pesquisadores no Brasil e no exterior. Nesta metodologia, a lignina da planta contida na preparação parede celular (PC) é solubilizada numa solução a 25% de brometo de acetila em ácido acético e a absorbância mensurada é com luz UV a 280 nm. O valor da absorbância é inserido numa equação de regressão e a concentração de lignina é obtida. Para que esta técnica analítica seja mais aceita pelos pesquisadores, ela deve ser, obviamente, convincente e atrativa. O presente trabalho analisou alguns parâmetros relacionados à LBA em 7 gramíneas e 6 leguminosas, em dois estádios de maturidade. Dentre as diferentes temperaturas de pré-secagem, os resultados indicaram que os procedimentos de 55ºC com ventilação e liofilização podem ser utilizados com a mesma eficácia. As temperaturas de 55ºC sem ventilação e 80ºC sem ventilação não são recomendadas, pois aumentaram os valores de FDA e LDA, possivelmente devido ao surgimento de artefatos de técnica como os compostos de Maillard. No método LBA os valores menores das amostras de leguminosas chamaram a atenção e colocaram em questão se a lignina destas plantas seria menos solúvel no reagente brometo de acetila. Dentre algumas alterações na metodologia da técnica LBA, a utilização do moinho de bolas (para diminuir o tamanho particular) nas amostras de

PC não mostrou efeito; a hipótese era melhorar a solubilização da lignina usando partículas menores. O uso de um ultrasonicador, que aumenta a vibração das moléculas e assim, facilitaria a solubilização da lignina no reagente brometo de acetila, melhorou a solubilização da lignina em cerca de 10%, tanto nas gramíneas como nas leguminosas. Foi acoplado um ensaio biológico como referência, a degradabilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS); e como a lignina está intimamente associada à estrutura fibrosa da parede celular, também foi feito um ensaio de degradabilidade *in vitro* da fibra em detergente neutro (DIVFDN). Os resultados confirmaram o efeito da maturidade, reduzindo a degradabilidade nas plantas mais maduras, e que o teor de lignina de leguminosas é realmente inferior ao de gramíneas. Os resultados de degradabilidade apresentaram coeficientes de correlação mais elevados com o método LBA, quando foi empregada a técnica do ultrasom; o método LK mostrou os menores coeficientes. Também testou-se, com sucesso, a utilização da FDN, como preparação fibrosa, ao invés de PC. A razão é simples: enquanto que a FDN é amplamente conhecida, a preparação PC não o é. Inquestionável que esta manobra facilitará substancialmente a divulgação desse método, tornando-a mais aceitável pela comunidade científica.

Palavras-chave: Gramíneas. Método analítico. Leguminosas. Lignina detergente ácido. Lignina brometo de acetila.

ABSTRACT

SANTAMARIA, M. F. Z**. Improving the acetyl bromide lignin method in determining lignin content in forages and comparison with the methods acid detergent lignin and Klason lignin.** [Otimização do método lignina brometo de acetila na determinação do teor de lignina em plantas forrageiras e comparação com os métodos lignina detergente ácido e lignina Klason]. 2016. 69 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Analytical techniques employed to quantify lignin content in forages, currently in use, are questionable as to their accuracies. The method acid detergent lignin (ADL), which is one of the most used method in Animal Science and Agronomy, has some flaws, due to the partial lignin solubilization during the preparation of acid detergent fiber (ADF). The Klason lignin method (KL), another analytical procedure commonly used, has the drawback of measuring the cell wall protein as lignin. In both procedures also are recommended to measure ash content in the lignin residues. Quantification of lignin concentration by the spectrophotometric acetyl bromide lignin method (ABL) has been gaining interest from researchers in Brazil and abroad. In this methodology, the lignin contained in the plant cell wall preparation (CW) is solubilized in a 25% acetyl bromide in acetic acid solution and the absorbance is measured with UV light at 280 nm. The absorbance value is inserted in a regression equation and the concentration of lignin is obtained. For this analytical technique be better accepted by researchers, it must be, obviously, convincing and attractive. This study analyzed some LBA-related parameters in 7 grasses and 6 legumes in two stages of maturity. Among the different temperatures of pre-drying, the results indicated that the procedures at 55ºC with ventilation and lyophilization can be used just as effectively. Temperatures of 55 and 80 both without ventilation are not recommended because they increased ADF and ADL values, possibly due to the emergence of technical artifacts such as the compounds of Maillard. The ABL method yielded lower values for legume samples which called into question if the lignin of these plants is less soluble in the acetyl bromide reagent. Among some changes studied in the ABL technique it was the utilization of ball milling in the PC samples, which showed no effect; the hypothesis was to reduce the particle size and thus improve the solubilization of lignin. The use of an ultrasonicator, which increases the vibration of molecules and possibly allowing better solubilization of lignin in the

acetyl bromide reagent improved lignin solubilization by about 10%, both in grasses. As a reference, an *in vitro* dry matter degradability (IVDMD) was conducted. Because lignin is closely linked to the fibrous structure of the cell wall, an *in vitro* neutral detergent fiber degradability (IVNDFD) test of. Results confirmed the effect of maturity, reducing degradability as the plants matured, and that concentration of lignin is lower in legumes than in grasses. The degradability results showed higher correlation coefficients with the ABL method when the ultrasonicator was used; the KL method showed the lowest coefficients. We also tested, successfully, the use of NDF as a fiber preparation, instead of crude CW. While NDF is widely known, CW preparation is not. This maneuver will substantially facilitate the dissemination of this method, making it more acceptable to the scientific community.

Keywords: Analytical method. Acetyl bromide lignin. Acid detergent lignin. Grasses. Legumes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Médias dos teores de parede celular (PC) em gramíneas. 46
Figura 2 - Médias dos teores de parede celular (PC) em leguminosas.....47
Figura 3 - Médias de fibra detergente neutro (FDN) em gramíneas.....49
Figura 4 - Médias de fibra em detergente neutro (FDN) em leguminosas. 49
Figura 5 - Média dos teores de lignina provenientes de amostras de forragens em dois estádios de maturidade feitas da matéria seca. 55
Figura 6 - Média dos teores de lignina provenientes de amostras de forragens em dois estádios de maturidade feitas da preparação fibrosa da FDN. 56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição bromatológica *Brachiaria brizanta* cv. MG5, medias nos dois estádios de maturidade (inicio e total florescimento) e quatro temperaturas de pre-secagem 39
Tabela 2 - Composição bromatológica *Brachiaria decunvens* cv. IPEAN, medias nos dois estádios de maturidade (inicio e total florescimento) e quatro temperaturas de pre-ecagem.....40
Tabela 3 - Composição bromatológica *Cynodon nlemfuensis* (Grama Estrela Africana), medias nos dois estádios de maturidade (inicio e total florescimento) e quatro temperaturas de pre-secage.....40
Tabela 4 - Composição bromatológica *Panicum maximum* (Capim colonião), medias nos dois estádios de maturidade (inicio e total florescimento) e quatro temperaturas de pre-secagem.....41
Tabela 5 - Composição bromatológica *Paspalum plicatulum* (capim cuiabano), medias nos dois estádios de maturidade (inicio e total florescimento) e quatro temperaturas de pre-secagem.....41
Tabela 6 - Composição bromatológica Penisetum *purpureum* cv. Napier, medias nos dois estádios de maturidade (inicio e total florescimento) e quatro temperaturas de pre-secagem.....42
Tabela 7 - Composição bromatológica *Setaria anceps*(capim-kazungula), medias nos dois estádios de maturidade (inicio e total florescimento) e quatro temperaturas de pre-secagem.....42
Tabela 8 - Composição bromatológica *Cajanus cajan* (Guandu), medias nos dois estádios de maturidade (inicio e total florescimento) e quatro temperaturas de pre-secagem 43
Tabela 9 - Composição bromatológica de *Medicago sativa* (Alfafa Crioula), medias nos dois estádios de maturidade (inicio e total florescimento) e quatro temperaturas de pre-secagem.....44
Tabela 10 - Composição bromatológica de quatro (4) leguminosas, medias nos dois estádios de maturidade (inicio e total florescimento) e uma temperatura de pre-secagem 44

Tabela 11 - Valores de Parede celular (P.C) (g/kg da M.S) de sete gramíneas colhidas em dois estádios de maturidade inicio de florescimento ou 75 dias após o corte de uniformidade (IF), total florescimento 95 dias após o corte de florescimento (TF) e pre-secadas com 4 temperaturas diferentes 45
Tabela 12 - Valores de Parede celular (P.C) (g/kg da M.S) de duas leguminosas colhidas em dois estádios de maturidade inicio de florescimento ou 75 dias após o corte de uniformidade (IF), total florescimento 95 dias após o corte de florescimento (TF) e pre-secadas com 4 temperaturas diferentes 46
Tabela 13 - Valores de Fibra detergente neutro (FDN) (g/kg da M.S) de sete gramíneas colhidas em dois estádios de maturidade inicio de florescimento ou 75 dias após o corte de uniformidade (IF), total florescimento 95 dias após o corte de florescimento (TF), pre-secadas com 4 temperaturas 48
Tabela 14 - Valores de Fibra detergente neutro (FDN) (g/kg da M.S) de duas leguminosas colhidas em dois estados de maturidade inicio de florescimento ou 75 dias após o corte de uniformidade (IF), total florescimento 95 dias após o corte de florescimento (TF), pre-secadas com 4 temperaturas 50
Tabela 15 - Valores de Fibra detergente acido (FDA) (g/kg da M.S) de sete gramíneas colhidas em dois estádios de maturidade inicio de florescimento ou 75 dias após o corte de uniformidade (IF), total florescimento 95 dias após o corte de florescimento (TF), pre-secadas com 4 temperaturas diferentes 51
Tabela 16 - Valores de Fibra detergente acido (FDA) (g/kg da M.S) de duas leguminosas colhidas em dois estádios de maturidade inicio de florescimento ou 75 dias após o corte de uniformidade (IF), total florescimento 95 dias após o corte de florescimento (TF), pre-secadas com 4 temperaturas diferentes 51
Tabela 17 - Valores de Lignina detergente acido (LDA) (g/kg da M.S) de sete gramíneas colhidas em dois estádios de maturidade inicio de florescimento ou 75 dias após o corte de uniformidade (IF), total

florescimento 95 dias após o corte de florescimento (TF), pre-secadas com 4 temperaturas 52
Tabela 18 - Valores de Lignina detergente acido (LDA) (g/kg da M.S) de sete gramíneas colhidas em dois estádios de maturidade inicio de florescimento ou 75 dias após o corte de uniformidade (IF), total florescimento 95 dias após o corte de florescimento (TF), pre-secadas com 4 temperaturas 52
Tabela 19 - Teores bromatológicos (g/kg da M.S) de sete gramíneas e seis leguminosas colhidas em dois estados de maturidade inicio de florescimento ou 75 dias após o corte de uniformidade (IF), e total florescimento 95 dias após o corte de uniformidade (TF) 35 dias a pôs o corte de inicio de florescimento. 53
Tabela 20 - Valores de lignina (g/kg da M.S) de sete gramíneas colhidas em dois estados de maturidade inicio de florescimento ou 75 dias após o corte de uniformidade (IF), total florescimento 95 dias após o corte de florescimento (TF) 54
Tabela 21 - Valores de lignina (g/kg da M.S) de gramíneas e leguminosas colhidas em dois estádios de maturidade início de florescimento ou 75 dias após o corte de uniformidade (IF), total florescimento 95 dias após o corte de florescimento (TF). 57
Tabela 22 - Valores de lignina (g/kg da FDN) de gramíneas e leguminosas colhidas em dois estádios de maturidade início de florescimento ou 75 dias após o corte de uniformidade (IF), total florescimento 95 dias após o corte de florescimento (TF). 57
Tabela 23 Valores de degradabilidade *in vitro* dos diferentes métodos de extração de lignina expressos na Matéria seca (MS).....58
Tabela 24- Valores de degradabilidade *in vitro* dos diferentes métodos de extração de lignina expressos na fibra detergente neutro (FDN) 58

SUMÁRIO

1 **INTRODUÇÃO** 16
2 **REVISÃO DE LITERATURA** 19
2.1 PAREDE CELULAR 19
2.2 CARBOIDRATOS 21
2.2.1 Fibrosos 21
2.2.2 Não Fibrosos 24
2.3 LIGNINA 25
2.3.1 A importância da lignina 26
2.3.2 Reações de Maillard 29
2.3.4 Métodos analíticos para quantificar os teores de lignina 31
3 **MATERIAIS E MÉTODOS** 35
3.1 MATERIAIS FIBROSOS 36
3.1.1 Gramíneas 36
3.1.2 Leguminosas 36
3.2 ANÁLISES QUÍMICAS 36
3.3 DEGRADABILIDADE IN VITRO 37
3.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS 37
4 **RESULTADOS E DISCUSSÕES** 39
4.1 COMPOSIÇÃO 39
4.2 TEMPERATURAS 45
4.3 LIGNINA 54
4.4 CORRELAÇÕES ENTRE A DIGESTIBILIDADE E O TEOR DE LIGNINA..... 58
5 **CONCLUSÕES** 60
REFERÊNCIAS 61

1 INTRODUÇÃO

A porção fibrosa (parede celular) das plantas forrageiras fornece considerável fração da energia para os animais herbívoros. Para que isto ocorra é fundamental a máxima utilização do potencial nutritivo dos alimentos volumosos. No entanto, a utilização desta fonte de energia será inadequada se uma porção significativa do alimento não for digerida e for excretada nas fezes. No que diz respeito aos alimentos volumosos, o principal obstáculo para digestão microbiana dos carboidratos da parede celular, em animais herbívoros, incluindo-se os ruminantes, é a lignina (HATFIELD; FUKUSHIMA, 2005). Neste contexto, pesquisas científicas visando esclarecer a difícil utilização da celulose e de outros carboidratos estruturais da parede celular das plantas forrageiras pelos microrganismos do trato gastrointestinal, principalmente aqueles presentes no rúmen e no intestino grosso dos animais domésticos, tem sido objeto de estudos há várias décadas.

A lignina é uma complexa macromolécula fenólica, encontrada na parede celular, e só não é digerida pelas enzimas dos animais mamíferos como também inibe a digestão dos carboidratos estruturais da parede celular (VAN SOEST, 1994). Entretanto, os exatos mecanismos desta ação inibitória não estão completamente esclarecidos, por exemplo, as gramíneas que embora apresentem menores concentrações de lignina que as leguminosas, possuem o mesmo grau de inibição da digestão (MOWAT; KWAIN; WINCH, 1969). Outro exemplo reside na comprovação que em forrageiras jovens, contendo baixas concentrações de lignina, um pequeno acréscimo na concentração de lignina acarreta efeito negativo na digestibilidade, enquanto que forrageiras maduras, que possuem elevados teores de lignina, com um aumento na concentração de lignina, mostram pequenos decréscimos na digestibilidade (JUNG; VOGEL, 1986). Outras observações que se devem levar em conta é o fato de que a parede celular do caule apresenta valor de digestibilidade *in vitro* inferior à folha (FUKUSHIMA; SAVIOLI, 2001), e que a lignina presente no caule é possivelmente diferente daquela presente na folha (SAVIOLI; FUKUSHIMA, 2000). Não é apenas a concentração de lignina aumenta com a maturidade, mas existem indícios de que ocorrem modificações estruturais na molécula da lignina (FUKUSHIMA; DEHORITY, 2000).

O conteúdo de lignina pode ser útil na estimativa da digestão da fibra (AKIN, et al., 1977; JUNG; VOGEL, 1986), porém, qualquer estimador de digestibilidade precisa ser quimicamente determinado com níveis aceitáveis de precisão e acurácia (FAICHNEY, 1975). Os métodos lignina em detergente ácido (LDA) desenvolvido por Van Soest (1963), e o método lignina Klason (LK) (THEANDER; WESTERLUND, 1986), são de natureza gravimétrica e podem nem sempre refletir o real valor da lignina. Por exemplo, o método LDA subestima os teores de lignina devido à parcial solubilização da mesma na solução de detergente ácido (KONDO; MIZUNO; KATO, 1987; LOWRY et al., 1994). Apesar dos métodos LDA e Klason basearem-se essencialmente na hidrólise ácida (solução de ácido sulfúrico a 72%) dos componentes da parede celular, exceto a lignina, estes têm produzidos resultados conflitantes para as mesmas amostras de plantas forrageiras (HATFIELD et al., 1994). Também valores de LDA e LK podem ser erroneamente determinados em função da presença de contaminantes insolúveis, por exemplo, a cutina (FUKUSHIMA, 1989).

Um método alternativo para quantificar lignina foi proposto por Morrison (1972a,b), baseado na solubilização da lignina numa solução a 25% de brometo de acetila em ácido acético glacial, o método lignina brometo de acetila (LBA). Nesse método a determinação da concentração de lignina é baseada na leitura da densidade óptica a 280 nm. Entretanto existia um entrave que era a ausência de um padrão de referência, pois todo método espectrofotométrico pressupõe a existência de um padrão (FENGEL; WEGENER, 1984). E o método em questão necessitava de um padrão de referência confiável para desenvolver as curvas de calibração, com as quais as leituras de absorbância pudessem ser comparadas. O padrão ideal deve ser o “espelho” da substância sendo analisada. Nesse caso, uma preparação pura ou de aceitável grau de pureza, de lignina, que na época do estudo ainda não estava devidamente estudada. Por esta razão, os trabalhos desenvolvidos por Morrison relativos à LBA não evoluíram.

Diversos materiais já foram empregados como padrões por diversos autores: Indulina (CHESSON, 1981), lignina “kraft” (BRILLOVET; RIOCHET, 1983), guaiacol (SHARMA et al., 1996), ácido ferúlico (AL-ANI; SMITH, 1988), lignina nativa (FUKUSHIMA; DEHORITY; LOERCH, 1991), e lignina brometo de acetila

(FUKUSHIMA; DEHORITY, 2000). No entanto, este amplo leque de padrões levou a sérios questionamentos quanto à confiabilidade do método espectrofotométrico. Objetivando encontrar uma solução para esta questão do padrão de referência, Fukushima e Hatfield (2001) demonstraram que a lignina extraída da planta com solução ácida de dioxano continha baixos (menos que 10% da lignina extraída) teores de contaminantes, particularmente carboidratos e proteínas. Esta lignina (após descontados os contaminantes) empregada como padrão de referência nas leituras espectrofotométricas resultou em concentrações de lignina mais consistentes para as plantas estudadas. Nesse contexto o objetivo deste trabalho foi otimizar o método lignina brometo de acetila (LBA) na determinação do teor de lignina em plantas forrageiras e comparar com métodos lignina em detergente ácido (LDA) e lignina Klason (LK).

2 REVISÃO DE LITERATURA

Essa revisão engloba os tópicos relativos aos métodos analíticos: Lignina Brometo de Acetila, Lignina Detergente Ácido e Lignina Klason, no entendimento das metodologias e a correlação dos métodos com a degradabilidade *in vitro* da matéria seca e da fibra detergente neutro (FDN).

2.1 PAREDE CELULAR

O desempenho estrutural e funcional da parede celular (PC) das plantas, incluindo a utilização dos polissacarídeos pelos ruminantes, é controlado pela composição e organização dos componentes da PC. O cálculo correto da concentração de PC contida nas pastagens é importante devido a sua ampla participação, de 25% a 80%, na matéria seca. O conteúdo de PC está relacionado com o consumo e a digestibilidade das fibras, cerca de 50% desta fração é prontamente digerida pelo animal, assim, a parede celular é um fator regulador da qualidade das forragens. (BUXTON; HORNSTEIN, 1986; PATERSON; BELYEA; BOWMAN,1994).

Os principais polissacarídeos estruturais da PC são a celulose e a hemicelulose (PATERSON; BELYEA; BOWMAN, 1994), e a participação destes na composição da PC aumenta a medida que a planta amadurece. A parede celular é um dos principais responsáveis pela redução da degradibilidade dos tecidos das plantas forrageiras (JUNG; ENGELS, 2002), devido à deposição crescente de lignina durante o amadurecimento (ALBRECHT; WEDIN; BUXTON, 1987), e a concentração da lignina é decrescente da base até o topo da planta (SMITH, 1970; BUXTON et al., 1986). Este aumento no conteúdo de lignina ocorre devido ao espessamento das paredes primarias e secundarias, especialmente no caule, onde a concentração de pectina decresce enquanto a de celulose, hemicelulose e lignina aumentam (JUNG; ENGELS, 2002). O aumento, também acontece nas folhas,

porém, com menor magnitude (NESON; MOSER, 1994), uma vez que estas não participam na sustentação da planta.

Métodos utilizados para a estimativa da fibra e frações de lignina são muitas vezes baseados na extração dos componentes solúveis e remoção da proteína e outros materiais como minerais e corantes. Christian (1971) e Van Soest e Wine (1968), afirmaram que estes métodos permitem meios aproveitáveis para estudar as proporções dos componentes da fibra. Dentre os métodos mais utilizados estão a fibra em detergente neutro (FDN) e o fibra em detergente ácido (FDA), propostos sob a coordenação de Peter Van Soest [Van Soest (1963; 1964; 1967); Van Soest e Wine (1967), para citar alguns] e sendo até hoje referencia nas analises de composição química de forragens e subprodutos agrícolas.

A FDN representa a celulose, hemicelulose, lignina, cinzas e proteína da parede celular das plantas, enquanto que a FDA é caracterizada pela presença de celulose, lignina e cinzas (SHARMA, 1996). A FDN é extraída após solubilização do conteúdo celular em solução neutra (pH 7) de lauril sulfato de sódio, ficando assim um resíduo fibroso com os principais componentes da parede celular. Este procedimento é uma extração não hidrolítica que recupera a matriz insolúvel e os contaminantes que se encontram neste tipo de preparação fibrosa são amido, queratina (se forem usados produtos de origem animal, como a farinha de peixe, por exemplo) e minerais. Para poder eliminar o amido é necessária a realização de um pré-tratamento, ou um tratamento concomitante com amilase (VAN SOEST et al*.,* 1991). A FDN é amplamente utilizada pelos nutricionistas de ruminantes para diversas finalidades, incluindo a formulação de rações, estimativas do conteúdo energético e predição da ingestão alimentar, entre outras. A FDA é obtida através da extração do material vegetal com solução aácida de detergente quaternário (cetil trimetil amônio brometo). O resíduo resultante é usado na estimativa sequencial de lignina, cutina, celulose, nitrogênio indigestível e sílica (VAN SOEST, 1994).

Fukushima e Hatfield (2001) protocolaram um método de preparação de parede celular (PC) no qual são utilizados solventes orgânicos (etanol, clorofórmio e acetona) após extração hídrica à quente em aparelho de Soxhlet. Fukushima e Savioli (2001) estudaram preparações fibrosas de plantas forrageiras pelos três métodos citados, e obtiveram rendimentos de PC e FDN próximos entre si e superiores aos rendimentos de FDA. Essa diferença era esperada uma vez que a

solução de detergente ácida solubiliza a hemicelulose. Por outro lado, esta solução preserva a pectina enquanto que a solução de detergente neutro a solubiliza. Em outras palavras, a diferença algébrica entre FDN e FDA pode fornecer uma estimativa do teor de hemicelulose (VAN SOEST, 1994), mas induzir a erros naqueles materiais com presença de pectina, como as leguminosas, polpa cítrica, etc.

Queiroz et al. (2008) propuseram a, utilização de (PC) nas equações de Cornell que estimam as frações de carboidratos, pois a PC melhor refletiria a matriz da parede celular vegetal em sua totalidade, em comparação com a FDN. Isto ocorre devido ao fato que na PC a pectina e outros polissacarídeos (β-glucanas, galactanas e gomas) que são dissolvidos pela solução de detergente neutro, são preservados (HALL et al., 1999).

2.2CARBOIDRATOS

Os carboidratos estão amplamente distribuídos nas plantas servindo de energia para os animais. Estes compostos podem ser divididos nas plantas, em carboidratos estruturais, sendo os que atuam diretamente na sustentação da planta, e carboidratos não estruturais dissolvidos no conteúdo celular (citoplasma) das células vegetais. Nas plantas são produzidos por fotossíntese, por exemplo, a celulose e a hemicelulose que funcionam na estruturação física das plantas, e o amido que atua como reserva energética. Os carboidratos compõem cerca de 50 a 80% da matéria seca das plantas (VAN SOEST, 1994).

2.2.1 Fibrosos

Van Soest (1994) publicou uma classificação onde os carboidratos são divididos em estruturais e não estruturais. Assim, alguns carboidratos não se adequam a esta classificação, como por exemplo, a pectina, que desempenha um

papel estrutural dentro da parede celular, atuando como uma substância cimentante nas fibras da celulose e hemicelulose. No entanto, a pectina não era classificada como carboidrato estrutural. Desse modo, a divisão em carboidratos fibrosos e não fibrosos tem tido melhor aceitabilidade. A pectina, β-glucanas, gomas, etc. são carboidratos que desempenham papel estrutural na parede celular e são classificados como carboidratos não fibrosos. Já a celulose e hemicelulose são exemplos de carboidratos fibrosos (NRC, 2001). Os carboidratos fibrosos são aqueles que fazem parte da parede celular vegetal e contem as principais fontes de energia disponível para a alimentação dos animais herbívoros.

A principal vantagem dos ruminantes é a capacidade de degradar estes carboidratos fibrosos por meio de um sistema de enzimas microbianas presentes no rúmen e no intestino grosso, o que disponibiliza energia para o animal que os consome. Os animais não ruminantes não possuem rúmen e não podem degradar estes materiais fibrosos, e por isso possuem uma importante função no trato gastrointestinal dos animais que formar uma matriz que serve como “lastro” da digestão e do bolo fecal (CHURCH, 1988; HOFMANN, 1988; VAN SOEST, 1994).
Os carboidratos fibrosos não são substâncias com características nutricionais, químicas ou físicas uniformes (VAN SOEST et al., 1991), são substâncias que apresentam padrões de complexidade e muitas vezes associados às ligações químicas com outras moléculas, como por exemplo, a lignina. Segundo (DEHORITY; JOHNSON; CONRAD, 1962), a molécula de lignina está associada aos carboidratos fibrosos da parede celular, e é por isto que ela inibe acentuadamente a digestão da fibra, formando uma barreira física aos microrganismos ruminais.

À medida que a planta amadure, diminui a relação folha:caule e a proporção dos componentes potencialmente digestíveis (carboidratos solúveis, proteína, etc.) tende a decrescer, sendo que, por outro lado, a proporção de lignina, celulose e hemicelulose e outras frações indigestíveis (cutina, sílica, etc.) aumentam, resultando em uma menor digestibilidade da matéria seca (EUCLIDES, 1995). Na parede celular dos tecidos vasculares das plantas, as microfibras de celulose ficam em uma matriz de hemicelulose e lignina. A união destes três polímeros, que se ligam entre si por ligações covalentes e não covalentes, é conhecida como lignocelulose e pode representar 90% do peso da parede celular vegetal. A porção de cada um dos polímeros varia com a espécie, idade da planta, topografia, local

onde foi semeada, e entre as partes de uma mesma planta. Em média a lignocelulose esta constituída por 45% de celulose, 30% de hemicelulose e 25% de lignina (GLASER; NIKAIDO, 1995).

A estrutura da molécula de celulose é constituída por unidades D-glicose unidas por ligações tipo β-1,4 (CARPITA; McCANN, 2000). A celulose tem uma estrutura micro cristalina com regiões altamente ordenadas dando a característica estrutural à celulose. Essas regiões são mais ou menos susceptíveis à hidrólise das enzimas microbianas dependendo do grau de ordenamento das fibras. (Regiões cristalinas) - dificultam substancialmente o processo de hidrólise deste polímero; regiões menos ordenadas (amorfas) ou regiões desordenadas (regiões não cristalinas) são mais susceptíveis à ação enzimática (CARPITA; GILBEAUT, 1993). Esta cristalinidade provém do estabelecimento de ligações de hidrogênio entre as cadeias, embora ligações hidrogênio também ocorram na fase não cristalina, com baixo nível de organização.

Van Soest (1994) descreveu que considerar a molécula de celulose como um β-glucano puro, não deixaria desmembrar a ampla gama de características naturais que apresenta este composto, que na maioria dos casos encontra-se unido a hemicelulose e lignina. A celulose é digerida completa ou parcialmente por ruminantes, na dependência da influência da lignina e cristalinidade. As bactérias celulolíticas mais importantes são o *Ruminococcus flavefaciens, Ruminococcus albus e Fibrobacter succinogenes* (VAN SOEST, 1994).

A hemicelulose é uma macromolécula, com menor peso molecular que a celulose, composta por vários tipos de açucares como hexoses, pentoses, ácidos urônicos, etc. De acordo com o material que a compõe, esta pode ser denominada como xilana, manana, arabinoxilana, arabinogalactana ou arabana. Em muitos resíduos agroindustriais, utilizados na alimentação animal, e em madeiras duras a hemicelulose apresenta alto conteúdo de xilana unidas por ligações β-1,4, com ramificação a outros carboidratos (PEREIRA JR., 1999). As bactérias que degradam a hemicelulose são as mesmas que degradam a celulose.

2.2.2 Não Fibrosos

Carboidratos não fibrosos são aqueles que se encontram no conteúdo celular, como os açucares simples, e estão constituídos principalmente por monossacarídeos, dissacarídeos e oligossacarídeos. Estes carboidratos, ao contrario dos fibrosos, são facilmente degradados pelas enzimas microbianas presentes no rúmem. Os monossacarídeos (glicose, frutose, galactose, manose, xilose, ramnose, arabinose, entre outros) juntam-se dão origem a dissacarídeos, oligossacarídeos e polissacarídeos como a sacarose, rafinose, estaquiose, β-glucanos, etc. (FIGUEIREDO-RIBEIRO et al., 1988).

O amido e a pectina são os principais polissacarídeos não fibrosos. Estes também apresentam elevada taxa de degradação (MOORE; HATFIELD, 1994), mas um pouco mais lenta que os carboidratos solúveis. Pelo fato da pectina ser uma fonte de carboidrato altamente digestível, presente principalmente nas leguminosas, e que alguns autores a classificaram como carboidrato não fibroso, ela pode ser colocada juntamente com os carboidratos solúveis do conteúdo celular, (VAN SOEST et al., 1991). A celulose e a hemicelulose apresentam velocidade de degradação menor em relação a pectina, mesmo em tempo ilimitado de incubação (BUXTON; BRASCHE, 1991). De acordo com Moore e Hatfield (1994), a degradação da celulose de plantas forrageiras situa-se entre 25% e 90% e a da hemicelulose, entre 45% e 90%.

A pectina não é degradada pelas enzimas microbianas, como a celulose, a hemicelulose e a lignina (VAN SOEST et al., 1991). A pectina no rúmen sofre uma rápida e extensa degradação (98 % em 12 horas) pelas espécies de bactérias *Prevotella ruminicola, Butyrivibrio fibrisolvens, Lachnospira multiparus* e *Succinivibrio dextrinosolvens* (CHESSON; MONRO, 1982; RUSSELL; RYCHLIK, 2001). Na pectina, os três maiores componentes são as moléculas ácidas constituídas basicamente por cadeias de resíduos de ácido D-galacturônico unidos por ligação β-1,4, intercalados ou não por resíduos de ramnose ligados β-1,2. Os galacturonanos podem se apresentar metilesterificados em diferentes graus, e na presença de Ca^{2+}, as cadeias pécticas com baixo grau de metilesterificação, formam um gel rígido, insolúvel, frequentemente encontrado na parede celular adulta. A pectina está

associada à flexibilidade da parede celular, a porosidade e o trânsito de macromoléculas, promovendo a hidratação e a plasticidade da parede celular durante o crescimento (BARON-EPEL; GRARYAL; SCHINDLER, 1988). A fermentação da pectina usualmente gera ácido acético, ao contrário da fermentação do amido, onde são produzidos prioritariamente os ácidos propiônico e láctico. A utilização da pectina, mesmo a altas taxas de digestão, não traz drásticas quedas no pH ruminal, como se observa no caso do ácido láctico (VAN SOEST; ROBERTS; LEWIS, 1991).

O amido é um polissacarídeo de reserva energética das plantas superiores e fornece de 70 a 80% das calorias consumidas pelo homem. Os depósitos permanentes do amido nas plantas ocorrem nos órgãos de reserva (grãos, tubérculos e raízes). O amido se compõe de grânulos compactados de amilose e amilopectina (CEREDA et al., 1990). É formado por moléculas de glicose ligadas entre si através de ligações α (1,4), que são lineares, e poucas ligações α(1,6), que são pontos de ramificação. A hidrólise total do amido forma moléculas de glicose, enquanto a hidrólise parcial produz moléculas de maltose (PANDEY; SOCCOL; MITCHELL, 2000) por uma variedade de amilases que são produzidas por protozoários, fungos e bactérias do rúmen (HOOVER; STOKES, 1991). As amilases bacterianas sintetizadas por *Bacteroides amylophilus*, *Succinivibrio detrinosolvens, Selenomonas ruminantium e Streptococcus bovis,* são responsáveis pela maior parte da digestão do amido (VAN SOEST, 1994), entretanto o amido que escapa da digestão ruminal será digerido no intestino delgado pela ação da amilase pancreática (NOCEK; RUSSEL,1991). Independentemente de sua origem, o amido é tradicionalmente empregado nas indústrias alimentícias, metalúrgica, de mineração, de construção, cosmética, farmacêutica, de papel e papelão, têxtil, etc. (CEREDA et al., 1990).

2.3LIGNINA

A lignina é, depois da celulose, a mais abundante matéria orgânica renovável sobre a terra (GUILLON, 2001). Trata-se de um complexo polímero fenólico,

componente da parede celular das plantas e não digerido pelas enzimas tissulares dos animais mamíferos Sua concentração aumenta à medida que as plantas forrageiras amadurecem, atuando substancialmente na degradação microbiana dos carboidratos estruturais da parede celular (VAN SOEST, 1994). Jung e Deets (1993) relataram que a composição química da lignina poderia interferir ou limitar na digestão dos carboidratos da parede celular. Entretanto, os mecanismos pelos quais esta inibição acontece não estão totalmente compreendidos.

2.3.1 A importância da lignina

A lignina é, depois da celulose, a mais abundante matéria orgânica renovável sobre a terra (GUILLON, 2001). Trata-se de um complexo polímero fenólico, componente da parede celular das plantas e não digerido pelas enzimas tissulares dos animais mamíferos Sua concentração aumenta à medida que as plantas forrageiras amadurecem, atuando substancialmente na degradação microbiana dos carboidratos estruturais da parede celular (VAN SOEST, 1994). Jung e Deets (1993) relataram que a composição química da lignina poderia interferir ou limitar na digestão dos carboidratos da parede celular. Entretanto, os mecanismos pelos quais esta inibição acontece não estão totalmente compreendidos.

A lignina é o componente da parede celular que é o mais associado à queda da digestibilidade dos nutrientes (VAN SOEST, 1963a; JUNG; VOGEL, 1986). A falta deste componente ou sua completa indigestibilidade tem levado à presunção de que a lignificação é o principal fator causador do baixo valor nutritivo das plantas forrageiras maduras. Embora a concentração de lignina seja o fator primordial a limitar a digestibilidade da planta, há outros fatores, como por exemplo, a composição química que pode modificar a habilidade desta macromolécula em limitar a digestibilidade dos carboidratos da parede celular (JUNG; DEETZ, 1993). O arranjo espacial e/ou a configuração geométrica de como a lignina se relaciona com os carboidratos tem sido apontado como principal razão para explicar os parâmetros da digestibilidade (DETMANN et al., 2004). Com tudo, os exatos mecanismos da ação inibitória da lignina sobre os carboidratos fibrosos e não fibrosos da parede

celular ainda não estão completamente compreendidos. As gramíneas, por exemplos, apresentam menores concentrações de lignina que as leguminosas, porém a lignina das gramíneas inibe mais a digestão (MOWAT; KWAIN; WINCH, 1969). Outro exemplo está na constatação que plantas forrageiras jovens, contendo baixas concentrações de lignina, quando sofrem um pequeno acréscimo na concentração de lignina ocorre um efeito negativo significativo na digestibilidade. Já nas plantas forrageiras maduras, que possuem elevados teores de lignina, com um aumento na concentração de lignina, ocorrem pequenos decréscimos na digestibilidade (JUNG; VOGEL, 1986).

Por isso é que o teor de lignina de uma planta forrageira é altamente relacionado com a digestibilidade. Mas mudanças quantitativas na concentração de lignina tomadas isoladamente não conseguem explicar totalmente o decréscimo na digestibilidade. Deve-se considerar que à medida que as plantas forrageiras amadurecem o tipo e/ou qualidade da lignina sendo depositada na parede celular pode modificar-se gradualmente. Jung e Deetz (1993) também sugeriram que a razão guaiacílico/núcleo siringílico poderia influenciar a interação da lignina na digestibilidade. O núcleo siringílico, pode fazer ligações cruzadas através dos seus dois radicais metoxila, enquanto os grupos guaiacílico possuem apenas um. Assim, uma lignina com predominância de núcleos siringílicos tenderiam a formar uma malha mais complexa e possivelmente com efeitos deletérios mais danosos sobre a digestibilidade.

Aparentemente, a lignina não é o único agente a interferir com a digestibilidade da planta. Jung e Vogel (1986) sugeriram que a lignina inibe a digestão da parede celular de maneira mais acentuada que o restante da matéria seca da planta. Quando a lignina já não é mais uma barreira física, os polissacarídeos da parede celular ainda mostram diferenças na taxa e extensão da digestão (BARTON; AKIN, 1977). Embora, plantas maduras tenham tido mais lignina removida pelo tratamento com clorito de sódio, a digestibilidade da matéria seca continuou baixa, o que levou Ford (1978) a concluir que mesmo a lignina seja o principal fator limitante, é possível que outros fatores contribuam com o efeito geral na digestibilidade. Estes fatores incluem a taxa de passagem, nível de ingestão alimentar, densidade do alimento, entre outros (VAN SOEST, 1994). Goering et al. (1973) observaram que a digestão *in vitro* de palhada de cevada tratada com clorito

de sódio foi maior que a digestibilidade *in vivo*, possivelmente devido ao maior trânsito alimentar pelo rúmen.

Patton e Gieseker (1942) descreveram três possíveis maneiras para explicar a ação inibitória: através da incrustação, formando uma barreira mecânica às enzimas microbianas por ligações químicas com os carboidratos, formando compostos indisponíveis; e por inibição local das enzimas, devido à ação tóxica dos grupos fenólicos oriundos da degradação parcial da lignina em observações microscópicas, verificaram que a lignina poderia agir como uma barreira física entre os carboidratos estruturais e as enzimas microbianas. Esta teoria foi reforçada pelos estudos de Dehority e Johnson (1961), que encontraram um leve aumento na digestão *in vitro* da celulose quando o tamanho das partículas de plantas forrageiras foi reduzido pela técnica do moinho de bolas.

O mesmo fenômeno foi observado para a digestão da hemicelulose e da pectina, a redução do tamanho de partículas diminuiu o efeito mecânico da incrustação (DEHORITY; JOHNSON; CONRAD, 1962). Quando o resíduo de uma fermentação *in vitro* foi fermentado uma segunda vez, nenhuma quantidade significativa de celulose desapareceu, mas 67% da celulose remanescente foi digerida quando o resíduo passou pelo moinho de bolas (DEHORITY; JOHNSON, 1961). De forma paralela, a remoção química desta barreira física deveria também melhorar a digestibilidade dos polissacarídeos da parede celular. Cross et al. (1974) verificaram aumento de 30% na taxa de digestão de celulose de plantas forrageiras tratadas com clorito de sódio, que poderia ter sido relacionado tanto ao processo de deslignificação em si como por outras alterações físico-químicas na parede celular.

A incrustação pode ser um fator que afeta a disponibilidade dos polissacarídeos da parede celular. Embora haja consenso que a lignina afeta a taxa e magnitude da digestão, estudos mostram contradições. Leguminosas e gramíneas de igual digestibilidade são particularmente diferentes quanto aos teores de lignina (JUNG; DEETZ, 1993). A parede celular das leguminosas contém aproximadamente duas vezes mais lignina do que a parede celular das gramíneas, mas fermenta mais rapidamente do que gramíneas no mesmo estádio de crescimento. Supõe-se que a diferença seja resultante do maior teor de hemicelulose nas gramíneas, ou porque as respectivas ligninas sejam diferentes em suas constituições (VAN SOEST, 1994).

A lignina é sintetizada nas estruturas vasculares das plantas por meio de uma serie de reações que começam com CO_2 e H_2O e originam o acido shikimico, que seguidamente, é convertido em L-fenilalanina (SARKANEN; LUDWIG, 1971). A fenilalanina via a fenilalanina aminia-liase, enzima reguladora de metabolismo fenólico nas células vegetais, é convertida em acido cinamico, que é precursor do acido ρ-coumárico (CAMM; TOWERS, 1973). O acido ρ-coumárico, pela ação de enzimas especificas, gera os outros dois componentes mais comuns da lignina, os ácidos ferúlico e sinápico. Finalmente, uma polimerização enzimática destas unidades fanilpropanoides é o passo final da biossíntese da lignina nas plantas, sendo que a porcentagem relativa de cada monômero fenólico dentro da molécula é dependente da origem filogenética do vegetal (SARKANEN; LUDWIG, 1971).

A hidrólise que transforma o acido cinamico em acido ρ-coumárico é um passo opcional em gramíneas já que estas espécies vegetais são as únicas que conseguem utilizar outro aminoácido aromático, diferente de fenalalanina, para confeccionar a lignina. Numa reação catalisada pela enzima tirosina amônia-liase, a L-tirosina é convertida em acido ρ-coumárico, fornecendo assim substrato para lignificação (HIGUCHI; ITO; KAWAMURA, 1967).

2.3.2 Reações de Maillard

As reações de Maillard foram descobertas, através da reação química de amido-carbonil em uma tentativa de síntese de peptídeos em condições fisiológicas (NUNES; BATISTA, 2001). Nesta reação, um açúcar, como a glicose, condensa com um composto que contem um amido livre (aminoácido ou proteína) para gerar produto condensado N-substituído de glicosilamina, que se rearranja e forma o produto de Amadori. Nas primeiras etapas da reação de Maillard são formados alguns produtos como: bases de Schiff, aldose-aminas e compostos de Amadori. A partir da degradação dos compostos de Amadori poderá haver a formação de outros compostos, a maioria deles moléculas insaturadas que se polimerizam, como polímeros nitrogenados escuros conhecidos como melanoidinas. O aumento da

temperatura aumenta a taxa de reação devido à reatividade entre o açúcar e o grupo amino (MARTINS; JONGEN; VAN BEKEL, 2001). Os complexos amino-açúcar que são produzidos nas primeiras fases da reação, tem propriedades físico-químicas, com ausência de cor, alta solubilidade e estabilidade ao calor, diferentes das exibidas pelo produtos finais da reação, que tem fraca solubilização e cor castanha. A intensidade da cor e as propriedades do produto final da reação são dependentes da natureza do reagente e das condições de reação, especialmente do pH e da temperatura (NUNES; BATISTA, 2001). Durante as primeiras etapas da reação de escurecimento não enzimática (reação de Maillard) pode haver radicais livres como produtos de reação. Namiki e Haiashi (1981) utilizando Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Electronica (EPR) descobriu sinais destes radicais que vinham da ligação entre açúcar e grupos amidos, propondo o mecanismo de reação.

Em estudos relacionados com nutrição animal, a modificação induzidas pela reação de Maillard tem como principal consequência à diminuição do valor nutritivo das proteínas. Os produtos desta reação geralmente estão pressentes em alimentos que tem altos valores de umidade e sofrem aquecimento acima de 60°C, afetando as características da parede celular. A maioria das técnicas analíticas utilizadas para a determinação bromatologica em amostras orgânicas e inorgânicas precisa que estas estejam secas e o método empregado é a secagem convencional em estufa calibrada de ventilação forçada 60±5°C (AOAC, 1995). Os componentes de Maillard são mensurados junto com a lignina, quando esta é mensurada pelo método de lignina detergente acido (VAN SOEST, 1994) e evidenciam que as frações principalmente de proteína podem ser alteradas quando submetidas a temperaturas por acima de 60°C que é comumente utilizado em laboratórios de nutrição animal na pré-secagem de amostras, gerando dados errôneos acerca da composição dos alimentos e influencia negativamente no balanceamento de dietas.

2.3.4 Métodos analíticos para quantificar os teores de lignina

As determinações químicas da lignina são trabalhosas e muitas vezes produzem resíduos que podem conter mais artefatos de técnica que lignina verdadeira (VAN SOEST, 1963). Giger (1985) classificou as metodologias utilizadas na quantificação do teor de lignina em plantas forrageiras em dois grupos segundo sua natureza: os métodos gravimétricos e os métodos não gravimétricos. Dentro do grupo dos métodos gravimétricos encontram-se os métodos: lignina detergente acida (LDA) (VAN SOEST, 1963b), lignina permanganato de potássio (LPer) descrito Van Soest e Wine (1968), e o método lignina Klason (LK) (THEANDER; WESTERLUND, 1986). Os métodos não gravimétricos incluem aqueles baseados nas propriedades ópticas da lignina, tais como a lignina solúvel em brometo de acetila (JOHNSON; MOORE; ZANK, 1961; MORRISON, 1972a); e por espectroscopia de raios infravermelhos (NORRIS et al., 1976; REEVES III, 1988). Contudo, estes métodos de natureza gravimétrica nem sempre refletem o real valor da lignina (FUKUSHIMA; HARFIELD, 2004).

O conhecimento do valor real de lignina ajuda estimar a verdadeira digestão da fibra (BARTON; AKIN, 1977). O método da lignina insolúvel em ácido sulfúrico a 72% é baseado no princípio de que a lignina é insolúvel na solução aquosa de ácido sulfúrico, porém os outros componentes celulares são removidos pelos pré-tratamentos ou então digeridos pela solução ácida (ELLIS; MATRONE; MAYNARD, 1946). Van Soest (1963b) utilizou a solução de detergente acido na obtenção de FDA, preparação livre de proteína, com o objetivo de fazer um tratamento com acido sulfúrico 72% e hidrolisar os componentes da parede celular menos a lignina. Este método foi chamado como lignina detergente acida (LDA). Esta busca por um método que conseguisse resultar isento de proteína foi baseada nos trabalhos de Whitehead e Quicke (1964) que expõem no método lignina Klason (LK) como critica que exista contaminação com proteína no resíduo. A lignina solúvel para LDA é subestimada devido à solubilização de até 50% da lignina presente em gramíneas tropicais e valores de 2 a 4 vezes inferiores foram encontrados quando comparados

com a metodologia lignina Klason (JUNG; MERTENS; PAYNE, 1997; LOWRY et al., 1994). Desta maneira, a perda foi menor no método LK, possivelmente pelo tipo de material pré-extraído utilizado, tais como a fibra em detergente neutro (SEWALT; OLIVEIRA; GLASSER, 1996) ou parede celular livre de amido (HATFIELD et al., 1994).

O método LDA subestima os teores de lignina devido à parcial solubilização em solução de detergente ácido (KONDO; MIZUNO; KATO, 1987; SHIMOJO; GOTO, 1984). Hatfield et al. (1994) compararam os dois métodos e destacaram que a maior diferença entre esses procedimentos é sequência na qual a concentração de ácido e temperatura são utilizadas na hidrólise dos polissacarídeos e consideraram que, principalmente para gramíneas, o método de lignina Klason é mais adequado que a LDA. Por outro lado, o procedimento da lignina Klason, desenvolvido para determinar lignina em madeiras, não é adequado para forrageiras com alto teor proteico (VAN SOEST, 1994). A razão do emprego da solução de detergente ácido está na remoção de proteína da preparação de parede celular usada para o método Klason.

Em relação os métodos baseados nas propriedades ópticas dos materiais analisados, as vantagens da espectrofotometria por raios infravermelhos seriam a rapidez nas determinações e nenhuma outra manipulação das amostras é necessária, além da moagem (SHENK; WESTERHAUS; HOOVER, 1979). No entanto, esse método requer a construção de curvas de calibração para cada elemento, e ainda assim, poderiam não funcionar adequadamente, mesmo para amostras similares (REEVES III, 1988). Dentre os fatores que afetam a reprodução dos resultados, incluem-se a espécie da planta, o método de preservação e a interação entre os constituintes vegetais (SHENK; WESTERHAUS; HOOVER, 1979). A correta escolha do comprimento de onda para cada tipo de material analisado é de fundamental importância (NORRIS et al., 1976). Outra fonte potencial de erro, apesar de poder ser evitada pela adequada manipulação das amostras, é o artefato de “Maillard”, que é produzido em uma série de reações quando os alimentos são excessivamente aquecidos, principalmente na presença de umidade (JOHNSON et al., 1962; VAN SOEST, 1964).

Morrison (1972a,b) apresentou um método para a quantificação de lignina em plantas forrageiras, baseado no trabalho de Johnson et al. (1961), desenvolvido

originariamente para estimar lignina em amostras de madeira. Através do isolamento de uma preparação de parede celular bruta, os compostos fenólicos solúveis que interferem na leitura ultravioleta, são removidos, e apenas a lignina permanece como único composto aromático. A lignina presente na preparação de parede celular é então solubilizada em uma solução a 25% de brometo de acetila em ácido acético glacial, originando a lignina solúvel em brometo de acetila (LBA) e acido acético, que é lida no comprimento de onda de 280 nm. Entretanto, todo método espectrofotométrico requer o emprego de um padrão de referência, com o qual as leituras de densidade óptica possam ser comparadas (FENGEL; WEGENER, 1984). Tanto Johnson et al. (1961) como Morrison (1972a,b) compararam as leituras de absorbância, através de equações de regressão, com teores de lignina ácida determinados para as mesmas amostras. Chesson (1981) empregou a indulina como padrão para estimar o conteúdo total de compostos fenólicos em palhadas de cereais. Jonhson et al. (1961) já tinham sugerido que outras preparações de lignina poderiam ser empregadas como padrões, tais como a lignina nativa de Brauns (BRAUNS, 1952), lignina enzimaticamente, ou ainda lignina extraída por solventes (BJORKMAN, 1956). Brillovet e Riochet (1983) empregaram lignina “Kraft” de faia nas determinações do conteúdo de LBA em tremoço. Sharma et al. (1986) e Al-Ani e Smith (1988) calcularam os valores de LBA tendo como base a absorbância ultravioleta do guaiacol e do ácido ferúlico, respectivamente. A lignina nativa de Brauns, extraída da alfafa, foi empregada por Fukushima et al. (1991) na obtenção dos teores de lignina desta leguminosa. Iiyama e Wallis (1990) além de escolherem como padrões preparações moídas de lignina provenientes de palhadas de trigo e de arroz, recomendaram também o emprego de um fator numérico nos cálculos de determinação ultravioleta da lignina, o coeficiente específico de absorção, estabelecido neste caso em 20 g^{-1}.litro.cm^{-1}. Lowry et al. (1994) tentaram empregar a LDA como padrão de referência, com resultados infrutíferos, pelo simples fato da LDA ser insolúvel na solução de brometo de acetila.

No entanto, essa variedade de opções de padrões de referência levou a sérios questionamentos quanto à confiabilidade e praticidade do método espectrofotométrico. Um procedimento desenvolvido por Bjorkman (1956) isolou a lignina do pó da serragem de madeira por extração com solução aquosa de dioxano, após extensa passagem do material em moinhos de bolas, contendo solução de

tolueno. Outras modificações nesta metodologia foram propostas, entretanto, a maioria lida com outros solventes. O moinho de bolas torna-se desnecessário se um ácido diluído for empregado conjuntamente com solvente para lignina, tais como dioxano ou metanol (CURVELO, 1992). A lignina resultante, conhecida por lignina dioxano ou lignina Pepper, é recuperada com rendimento em torno de 40 a 100% da lignina Klason, dependendo do tipo da madeira e tempo de hidrólise (PEPPER; BAYLIS; ADLER, 1959). Estas formas de lignina podem apresentar modificações na estrutura em relação à lignina originalmente presente na planta (SJÖSTRÖM, 1993).

Objetivando contornar esses problemas e oferecer um procedimento analítico mais confiável, Fukushima e Dehority (2000) desenvolveram um padrão de referência, obtido através da extração da lignina do material vegetal com o reagente brometo de acetila e curvas-padrão foram desenvolvidas para cada tipo de lignina isolada. Apesar de factível o emprego dessa forma de lignina, Fukushima e Hatfield (2001) demonstraram que a lignina extraída com dioxano ácida (LDiox) continha menores teores de contaminantes, particularmente carboidratos, e essa forma alternativa de lignina foi empregada como padrão de referência nas leituras espectrofotométricas, o que resultou em concentrações de lignina mais consistentes entre si.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Departamento de Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP), campus da USP Fernando Costa. As analises fibrosas foram feitas em duplicata, no laboratório de Lignina. As amostras de material verde foram colhidas em boa quantidade e pesadas. Primeiramente retirou-se uma pequena parte para determinação de matéria seca, em estufa à 105°C. O material verde foi separado em quatro porções, a primeira porção foi seca a 55°C em estufa de circulação forçada de ar, a segunda porção foi seca a 55°C em uma estufa sem circulação de ar. No preparo das amostras com ventilação forçada, a temperatura utilizada foi de no máximo de 60ºC. A terceira porção foi seca a 80°C, as amostras secas com temperaturas de 55 °C e 80 °C sem ventilação foram cobertas com um prato de pyrex (isto para dificultar a evaporação da água do material vegetal e aumentar a concentração dos compostos de Maillard) e uma quarta porção seca por liofilização, para efeitos de comparação com a secagem convencional com e sem ventilação forçada. Após secagem, o material foi moído em moinho laboratorial e armazenado em frascos, até o momento das análises e ensaios de degradabilidade. Uma parte foi moída em moinho de bolas, por 10 minutos, para analisar a solubilização da lignina em relação ao tamanho das partículas da amostra.

As análises feitas neste estudo foram: matéria seca (MS), parede celular (PC), fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA); os teores de lignina foram determinados pelos seguintes procedimentos: lignina detergente ácido (LDA), Lignina detergente ácido livre de cinzas (LDAc) lignina Klason (LK), lignina Klason livre de cinzas (Lkc), lignina brometo de acetila (LBA) e modificações da técnica LBA: lignina brometo de acetila com ultrasom para auxiliar a dissolver as partículas (LBA/ULTR), lignina brometo de acetila utilizando PC moída em moinho de bolas (LBAM) e por ultimo para avaliar se era possível utilizar FDN como preparação fibrosa ao invés da PC, lignina brometo de acetila na FDN (LBAFDN).

3.1 MATERIAIS FIBROSOS

Os capins utilizados neste estudo foram cultivados no campo agrostológico da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, no Campus Fernando Costa, e colhidos em dois estádios de maturidade sendo classificados de acordo com a emergência da panícula floral: início da emergência das panículas (plantas colhidas entre 75 e 90 dias após plantio), e total florescimento (capins colhidos entre 87 e 107 dias).

3.1.1 Gramíneas

As espécies forrageiras utilizadas desse estudo foram: *Panicum maximum* cv. (Capim Colonião), *Brachiaria brizantha* cv. MG5, *Brachiaria decumbens* cv. IPEAN, *Pennisetum purpureum* cv. Napier, Cynodon nlemfuensis (Grama Estrela Africana), *Paspalum plicatulum* (capim cuiabano) e *Setaria anceps* (capim-kazungula),

3.1.2 Leguminosas

As espécies de leguminosas utilizadas nesse estudo foram: *Neonotonia wightii* (Soja Perene), *Neonotonia wightii* (Soja Perene Tinaroo), Leucena (*Leucaena leucocephala*), *Pueraria sp* (Kudzu tropical), *Cajanus cajan* (Guandu) e *Medicago sativa* (Alfafa Crioula).

3.2 ANÁLISES QUÍMICAS

As análises bromatológicas seguiram os preceitos contidos em Silva e Queiroz (2002), sendo que a fibra em detergente neutro, fibra detergente ácido e a

lignina detergente ácido foram determinadas de acordo com Van Soest et al. (1991). A técnica lignina Klason seguiu o protocolo laboratorial descrito por Hatfield et al. (1994). O método espectrofotométrico foi realizado de acordo com a técnica descrita por Fukushima e Kerley (2011) com algumas modificações, onde o padrão de referência é representado por uma equação de regressão que engloba a média de coeficientes de extinção de 17 amostras purificadas de lignina:

$$X = \frac{(Y - 0{,}0009)}{23{,}077}$$

Onde X é a concentração de lignina (mg/mL), Y é a leitura da densidade óptica da amostra desconhecida, 0,0009 é o valor médio do intercepto e 23,077 é a média dos coeficientes de extinção das curvas de calibração de 17 amostras de lignina (FUKUSHIMA; KERLEY, 2011). O valor X resultante é multiplicado pelo conteúdo de PC (ou outra preparação fibrosa que vier a substituí-lo como, por exemplo, a FDN) e dividido pelo peso da amostra inicial.

3.3 DEGRADABILIDADE IN VITRO

No ensaio de degradabilidade *in vitro*, as amostras vegetais (em triplicatas) foram incubadas em solução mineral e em líquido ruminal por 48 horas, seguida por digestão péptica também por 48 horas, adaptado de acordo com a descrição de Tilley e Terry (1963). Na solução mineral foi empregada a técnica de aceleração da anaerobiose do meio de cultura, preconizada por Fukushima et al. (2002). A degradabilidade *in vitro* foi o ensaio biológico mais plausível de execução, devido ao elevado número de amostras.

3.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

No que se refere aos dados de lignina, o delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com duas repetições. As concentrações de lignina obtidas

pelos métodos analíticos foram analisadas pelo teste *F*, e as médias dos tratamentos comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. Regressão linear simples foi executada para medir os efeitos principais entre os métodos de lignina usando PROC GLM do SAS (SAS, 2003). Coeficientes de correlação entre concentrações de lignina e degradabilidade foram obtidos através de PROC CORR.

Para o ensaio de degradabilidade *in vitro,* o delineamento experimental foi o de blocos ao acaso, sendo três os blocos, cada um representando uma semana. Os doadores de líquido ruminal foram bovinos fistulados no rúmen recebendo dieta à base de volumoso (70 a 80%), constituído de capim e/ou silagem de milho e/ou cana-de-açúcar, mais concentrado (20 a 30%). As comparações entre as médias dos tratamentos foram feitas pelo teste de Tukey, ao nível de 5%, após análise de variância.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 COMPOSIÇÃO BROMATOLÓGICA

Segundo o (VAN SOEST, 1994), o teor de matéria seca (MS) das forrageiras aumenta à medida que se avança o estádio de maturidade. O acréscimo da matéria seca das plantas deve-se principalmente ao aumento dos componentes estruturais da mesma (CHURCH, 1977). O aumento do teor de PC, FDN e FDA das forrageiras está diretamente relacionado ao estádio de maturidade. Estes componentes fibrosos mostraram aumento ao longo dos dois cortes para todas as espécies (na maior parte dos casos), como pode ser observado pelos resultados obtidos neste trabalho (Tabelas 1 a 10) (VAN SOEST, 1994). A parede celular é composta por polissacarídeos estruturais, especialmente celulose e hemicelulose (PATERSON; BELYEA; BOWMAN, 1994), além da lignina e pectina. O aumento na concentração de parede celular durante o desenvolvimento da planta particularmente no caule resulta do espessamento das paredes primária e secundária, onde a concentração de pectina decresce enquanto a de celulose, hemicelulose e lignina aumentam (JUNG; ENGELS, 2002).

Tabela 1 - Composição bromatológica *Brachiaria brizanta* cv. MG5, medias nos dois estádios de maturidade (inicio e total florescimento) e quatro temperaturas de pre-secagem

	IF				TF			
Espécie	**PC**	**FDN**	**FDA**	**FS**	**PC**	**FDN**	**FDA**	**FS**
B. brizantha cv. MG-5 55°C C/V.	794,3	710,4	417,8	83,9	795,5	726,8	427,9	68,8
B. brizantha cv. MG-5 Liofilizado.	809,0	682,7	392,2	126,3	807,9	703,5	427,9	104,4
B. brizantha cv. MG-5 55°C S/V.	779,1	752,8	438,1	26,3	802,0	728,3	447,4	73,6
B. brizantha cv. MG-5 80°C.	787,1	738,4	457,1	48,7	793,4	736,1	471,8	57,4
media	792,4	721,1	426,3	71,3	799,7	723,7	443,8	76,0
dp	12,7	31,0	27,8	43,7	6,6	14,1	20,8	20,1

PC-Parede celular, FDN-Fibra em detergente neutro, FDA-Fibra em detergente acido, FS-Fibra solúvel.

*Valores expressos na matéria seca (g/kg).

Tabela 2 - Composição bromatológica *Brachiaria decunvens* cv. IPEAN, medias nos dois estádios de maturidade (inicio e total florescimento) e quatro temperaturas de pre-ecagem

	IF				TF			
Espécie	**PC**	**FDN**	**FDA**	**FS**	**PC**	**FDN**	**FDA**	**FS**
B. decumbens cv. IPEAN 55°C C/V.	771,5	704,9	388,1	66,5	773,3	724,3	424,2	49,0
B. decumbens cv. IPEAN Lio.	822,9	733,8	400,0	89,2	827,3	723,0	411,9	104,3
B. decumbens cv. IPEAN 55°C S/V.	761,6	740,2	403,7	21,4	825,2	736,5	442,5	88,7
B. decumbens cv. IPEAN 80° C.	777,2	769,4	416,0	7,8	802,3	779,1	461,8	23,2
Media	783,3	737,1	402,0	46,2	807,1	740,7	435,1	66,3
dp	27,2	26,5	11,5	38,1	25,2	26,3	21,8	37,0

PC-Parede celular, FDN-Fibra em detergente neutro, FDA-Fibra em detergente acido, FS-Fibra solúvel.

*Valores expressos na matéria seca (g/kg).

Tabela 3 - Composição bromatológica *Cynodon nlemfuensis* (Grama Estrela Africana), medias nos dois estádios de maturidade (inicio e total florescimento) e quatro temperaturas de pre-secage

	IF				TF			
Espécie	**PC**	**FDN**	**FDA**	**FS**	**PC**	**FDN**	**FDA**	**FS**
C. *nlemfuensis* (Grama Estrela Africana) 55°C C/V.	753,0	712,4	386,0	40,6	785,0	747,9	415,2	37,2
C. *nlemfuensis* (Grama Estrela Africana) Lio.	812,6	716,4	405,7	96,2	834,6	707,5	402,8	127,1
C. *nlemfuensis* (Grama Estrela Africana) 55°C S/V.	770,7	741,9	397,3	28,8	778,2	739,0	405,8	39,1
C. *nlemfuensis* (Grama Estrela Africana) 80°C.	765,6	756,1	425,7	9,4	784,6	735,8	408,4	48,8
media	775,5	731,7	403,7	43,7	795,6	732,5	408,0	63,1
dp	25,9	20,9	16,8	37,3	26,2	17,5	5,3	43,0

PC-Parede celular, FDN-Fibra em detergente neutro, FDA-Fibra em detergente acido, FS-Fibra solúvel.

*Valores expressos na matéria seca (g/kg).

Na tabela 4 encontramos o mesmo comportamento observado nas tabelas anteriores, aumento das preparações fibrosas PC, FDN e FDA conforme o aumento da maturidade da planta.

Tabela 4 - Composição bromatológica *Panicum maximum* (Capim colonião), medias nos dois estádios de maturidade (inicio e total florescimento) e quatro temperaturas de pre-secagem.

	IF				TF			
Espécie	**PC**	**FDN**	**FDA**	**FS**	**PC**	**FDN**	**FDA**	**FS**
P. maximum (Capim Colonião) 55° C C/V.	803,4	734,3	450,0	69,1	831,4	758,3	473,4	73,1
P. maximum (Capim Colonião) Lio.	813,0	660,9	418,7	152,1	852,4	713,4	451,2	139,0
P. maximum (Capim Colonião) 55° C S/V.	808,5	746,7	457,5	61,8	808,6	746,3	462,4	62,3
P. maximum (Capim Colonião) 80°C.	803,2	761,7	491,3	41,5	823,7	779,0	476,1	44,6
Media	807,0	725,9	454,4	81,2	829,0	749,3	465,8	79,7
dp	4,7	44,8	29,8	48,7	18,2	27,5	11,4	41,2

PC-Parede celular, FDN-Fibra em detergente neutro, FDA-Fibra em detergente acido, FS-Fibra solúvel.

*Valores expressos na matéria seca (g/kg).

Tabela 5 - Composição bromatológica *Paspalum plicatulum* (capim cuiabano), medias nos dois estádios de maturidade (inicio e total florescimento) e quatro temperaturas de pre-secagem.

	IF				TF			
Espécie	**PC**	**FDN**	**FDA**	**FS**	**PC**	**FDN**	**FDA**	**FS**
P. plicatulum (capim cuiabano) 55° C C/V	793,0	739,6	408,0	53,4	809,2	743,0	426,2	66,2
P. plicatulum (capim cuiabano) Liofilizado.	836,7	730,0	404,8	106,7	836,4	725,9	428,8	110,6
P. plicatulum (capim cuiabano) 55°C S/V	799,8	714,7	410,4	85,1	814,9	773,4	455,8	41,5
P. plicatulum (capim cuiabano) 80°C.	793,4	755,1	460,8	38,4	812,9	754,5	432,1	58,4
media	805,7	734,8	421,0	70,9	818,3	749,2	435,7	69,1
dp	20,9	16,9	26,6	30,8	12,3	20,0	13,6	29,5

PC-Parede celular, FDN-Fibra em detergente neutro, FDA-Fibra em detergente acido, FS-Fibra solúvel.

*Valores expressos na matéria seca (g/kg).

Tabela 6 - Composição bromatológica Penisetum *purpureum* cv. Napier, medias nos dois estádios de maturidade (inicio e total florescimento) e quatro temperaturas de pre-secagem

	IF				TF			
Espécie	**PC**	**FDN**	**FDA**	**FS**	**PC**	**FDN**	**FDA**	**FS**
P. purpureum cv Napier (Capim elefante) 55°C C/V	774,0	741,4	430,0	32,6	803,6	780,3	480,7	23,4
P. purpureum cv Napier (Capim elefante) Liofilizado.	779,4	695,8	388,4	83,6	858,5	741,7	469,1	116,8
P. purpureum cv Napier (Capim elefante) 55°C S/V	776,7	701,1	428,7	75,6	810,3	757,1	450,2	53,2
P. purpureum cv Napier (Capim elefante) 80°C	786,9	727,6	423,4	59,3	793,6	743,2	464,7	50,4
media	779,2	716,5	417,6	62,8	816,5	755,6	466,2	60,9
dp	5,6	21,7	19,7	22,5	28,8	17,9	12,6	39,6

PC-Parede celular, FDN-Fibra em detergente neutro, FDA-Fibra em detergente acido, FS-Fibra solúvel.

*Valores expressos na matéria seca (g/kg).

Tabela 7 - Composição bromatológica *Setaria anceps*(capim-kazungula), medias nos dois estádios de maturidade (inicio e total florescimento) e quatro temperaturas de pre-secagem

	IF				TF			
Espécie	**PC**	**FDN**	**FDA**	**FS**	**PC**	**FDN**	**FDA**	**FS**
S. anceps (capim kazungula) 55°C C/V	794,5	750,0	452,5	44,4	815,8	756,4	448,6	59,4
S. anceps (capim kazungula) Liofilizado.	836,0	750,7	462,6	85,3	846,9	749,9	461,2	97,1
S. anceps (capim kazungula) 55°C S/V	775,3	731,9	405,6	43,4	789,6	747,1	444,4	42,5
S. anceps(capim kazungula) 80°C.	768,2	714,2	393,2	54,0	796,4	770,7	451,4	25,7
media	793,5	736,7	428,5	56,8	812,2	756,0	451,4	56,2
dp	30,4	17,3	34,2	19,6	25,7	10,6	7,1	30,5

PC-Parede celular, FDN-Fibra em detergente neutro, FDA-Fibra em detergente acido, FS-Fibra solúvel.

*Valores expressos na matéria seca (g/kg).

Propomos estimar os teores de fibra solúvel (FS – conjunto que engloba pectina, ß-glucanos, galactanas, gomas, etc. que são os carboidratos solúveis na solução de detergente neutro) como FS = PC – FDN. Nas tabelas 8, 9 e 10 os teores de FS, no geral, aumentaram a medida que a maturidade da planta aumentou, estas particularidades concordam com a literatura de o aumento da matéria seca na

medida que amadurecem, ou seja que enquanto a planta fica mais madura vai ficando mais fibrosa.

Tabela 8 - Composição bromatológica *Cajanus cajan* (Guandu), medias nos dois estádios de maturidade (inicio e total florescimento) e quatro temperaturas de pre-secagem

	IF				TF			
Espécie	**PC**	**FDN**	**FDA**	**FS**	**PC**	**FDN**	**FDA**	**FS**
C. cajan (Guandu) 55°C C/V	742,0	591,6	336,3	150,4	806,5	629,8	435,4	176,7
C. cajan (Guandu) Liofilizado.	745,7	597,9	428,8	147,8	736,7	598,2	373,6	138,5
C. cajan (Guandu) 55°C S/V.	734,3	634,1	449,6	100,2	744,7	618,4	438,8	126,2
C. cajan (Guandu) 80°C.	727,7	667,1	545,0	60,7	733,2	613,6	397,5	119,6
Media	737,4	622,6	439,9	114,8	755,3	615,0	411,3	140,3
dp	8,0	35,0	85,6	42,8	34,5	13,1	31,4	25,5

PC-Parede celular, FDN-Fibra em detergente neutro, FDA-Fibra em detergente acido, FS-Fibra solúvel.

*Valores expressos na matéria seca (g/kg).

Sabe-se que a preparação fibrosa PC preserva a totalidade dos componentes da parede celular vegetal enquanto que a preparação de solução de detergente neutro, para obter FDN, solubiliza e remove certos polissacarídeos (como já mencionado), por isso pode se concluir que os valores de PC sejam maiores que os valores registrados para FDN. O mesmo acontece com a solução de detergente ácido, que remove a hemicelulose, se espera que os valores de FDA sejam inferiores aos valores de FDN e PC. Observa-se uma diferença entre FDN e FDA devido à solubilização da hemicelulose, fração não presente na FDA, mas sim na FDN (VAN SOEST; ROBERTS; LEWIS, 1991). Neste trabalho é possível observar este raciocínio já que o rendimento de PC foi superior aos valores obtidos para FDN e FDA, para todas as espécies (tabelas 1 a 10). Na tabela 10, se apresentam 4 leguminosas que foram incluídas no segundo estudo para a otimização do método lignina brometo de acetila.

Tabela 9 - Composição bromatológica de *Medicago sativa* (Alfafa Crioula), medias nos dois estádios de maturidade (inicio e total florescimento) e quatro temperaturas de pre-secagem

	IF				TF			
Espécie	**PC**	**FDN**	**FDA**	**FS**	**PC**	**FDN**	**FDA**	**FS**
M. sativa (Alfafa Crioula) 55º C/V.	674,4	578,9	375,7	95,5	680,3	595,8	339,8	84,5
M. sativa (Alfafa Crioula) Liofilizado	749,2	545,3	361,5	203,9	753,6	615,3	429,0	138,3
M. sativa (Alfafa Crioula) 55°C S/V.	708,3	604,3	397,1	104,0	718,3	636,8	483,5	81,5
M. sativa (Alfafa Crioula) (IF) 80°C.	612,4	560,9	455,8	51,5	628,9	539,1	440,9	89,8
Media	686,1	572,4	397,5	113,7	695,3	596,7	423,3	98,5
dp	57,9	41,9	60,4	64,3	53,4	25,3	41,5	26,7

PC-Parede celular, FDN-Fibra em detergente neutro, FDA-Fibra em detergente acido, FS-Fibra solúvel.

*Valores expressos na matéria seca (g/kg).

Na tabela 10 pode-se observar que preparações fibrosas de quatro leguminosas que foram incluídas para o segundo ensaio, tiveram comportamento semelhante à das plantas forrageiras anteriormente descritas.

Tabela 10 - Composição bromatológica de quatro (4) leguminosas, medias nos dois estádios de maturidade (inicio e total florescimento) e uma temperatura de pre-secagem

	IF				TF			
Espécie	**PC**	**FDN**	**FDA**	**FS**	**PC**	**FDN**	**FDA**	**FS**
Neonotonia wightii (Soja Perene) 55°C C/ V.	682,3	559,9	314,3	122,4	693,9	602,9	326,8	91,0
Neonotonia wightii (Soja Perene Tinaroo) 55°C C/V.	681,5	554,2	319,8	127,2	675,1	576,5	318,6	98,6
*Leucena (*Leucaena leucocephala*) 55°C C/V.*	628,2	555,5	306,6	72,7	631,3	566,6	251,8	64,7
Pueraria (Kudzu tropical) IF 55°C C/V.	679,0	561,1	315,0	117,9	701,1	588,9	339,2	112,2
Media	667,7	557,7	313,9	110,0	675,4	583,7	309,1	91,6
dp	26,39	3,345	5,454	25,2	31,33	15,69	39,11	19,98

PC-Parede celular, FDN-Fibra em detergente neutro, FDA-Fibra em detergente acido, FS-Fibra solúvel.

*Valores expressos na matéria seca (g/kg).

4.2 TEMPERATURAS

Neste primeiro estudo foi observado efeito na pré-secagem utilizando o processo da liofilização. Os dados, a nosso ver, não são confiáveis; pois no procedimento o material acumulou umidade (houve em alguns casos desenvolvimento de fungos) e teve que ser colocado em uma estufa a 55°C com circulação de ar por 24 horas, tanto para gramíneas como para leguminosas; entretanto optamos por apresentar esses dados no presente trabalho, por se tratar de mais uma opção, quando bem realizada (Tabelas 11 e 12). Esta constatação ajudou a descartar este tipo de procedimento, e de outras duas temperaturas para a segunda parte do trabalho.

Valores de parede celular (PC) (g/kg MS) de sete gramíneas colhidas em dois estádios de maturidade: inicio de florescimento (IF) e total florescimento (TF), e pre-secadas com quatro temperaturas diferentes.

Tabela 11 - Valores de Parede celular (P.C) (g/kg da M.S) de sete gramíneas colhidas em dois estádios de maturidade inicio de florescimento ou 75 dias após o corte de uniformidade (IF), total florescimento 95 dias após o corte de florescimento (TF) e pre-secadas com 4 temperaturas diferentes

	Estádios de maturidade							
	IF				**TF**			
Especie	**55°C C/V**	**LIO**	**55°C S/V**	**80ºC**	**55°C C/V**	**LIO**	**55°C S/V**	**80ºC**
B. brizantha cv. MG-5	794,3	809,0	779,1	787,1	795,5	807,9	802,0	793,4
B. decumbens cv. IPEAN	771,5	822,9	761,6	777,2	773,3	827,3	825,2	802,3
C. nlemfuensis (Grama Estrela Africana)	753,0	812,6	770,7	765,6	785,0	834,6	778,2	784,6
P. maximum capim Colonião.	803,4	813,0	808,5	803,2	831,4	852,4	808,6	823,7
P. plicatulum capim cuiabano	793,0	836,7	799,8	793,4	809,2	836,4	814,9	812,9
P. purpureum cv Napier capim elefante	774,0	779,4	776,7	786,9	803,6	858,5	810,3	793,6
S. anceps c apim kazungula	794,5	836,0	775,3	768,2	815,8	846,9	789,6	796,4
Medias	783,4B	815,7A	781,7B	783,1B	802,0B	837,7A	804,1B	801,0B
dp	17,7	19,5	16,6	13,6	19,4	17,0	15,9	13,3

Temperaturas de pre-secagem, 55°C C/V estufa com ventilação forçada, Liofilizada, 55°C S/V estufa sem ventilação forçada, 80°C estufa sem ventilação forçada.

*Valores expressos na matéria seca (g/kg).

Médias seguidas por letras distintas diferem significativamente entre si (P<0,05) pelo teste de Tukey.

Tabela 12 - Valores de Parede celular (P.C) (g/kg da M.S) de duas leguminosas colhidas em dois estádios de maturidade inicio de florescimento ou 75 dias após o corte de uniformidade (IF), total florescimento 95 dias após o corte de florescimento (TF) e pre-secadas com 4 temperaturas diferentes

	Estádios de maturidade							
	IF				**TF**			
Especie	**55°C C/V**	**LIO**	**55°C S/V**	**80ºC**	**55°C C/V**	**LIO**	**55°C S/V**	**80ºC**
C. cajan (Guandu)	742,0	745,7	734,3	727,7	806,5	736,7	744,7	733,2
M. sativa (Alfafa Crioula)	674,4	749,2	708,3	612,4	680,3	753,6	718,3	628,9
Medias	708,2B	747,5A	721,3B	670,1B	743,4B	745,1A	731,5B	681,0B
dp	47,8	2,5	18,3	81,5	89,2	11,9	18,7	73,8

Temperaturas de pre-secagem, 55°C C/V estufa com ventilação forçada, Liofilizada, 55°C S/V estufa sem ventilação forçada, 80°C estufa sem ventilação forçada.

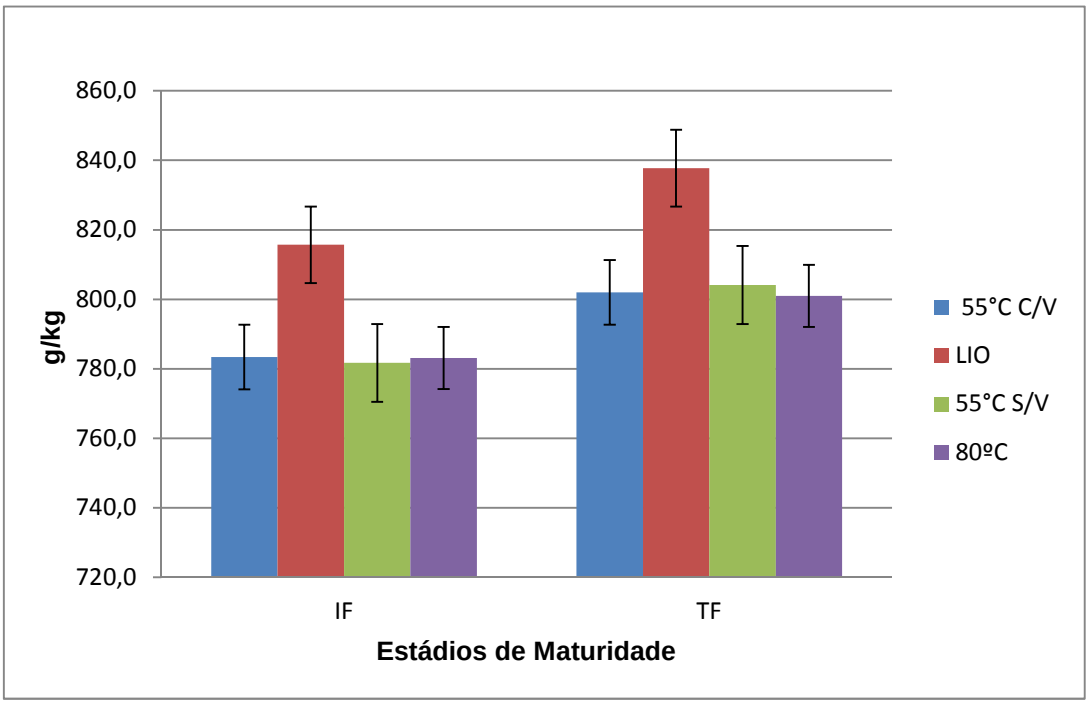
*Valores expressos na matéria seca (g/kg).

Médias seguidas por letras distintas diferem significativamente entre si (P<0,05) pelo teste de Tukey.

Nas Figuras 1 e 2 é possível observar as diferenças dos resultados de PC nos diferentes tratamentos empregados. A Figura 1 mostra que os resultados obtidos nas gramíneas foi bem marcante a diferença no tratamento liofilização.

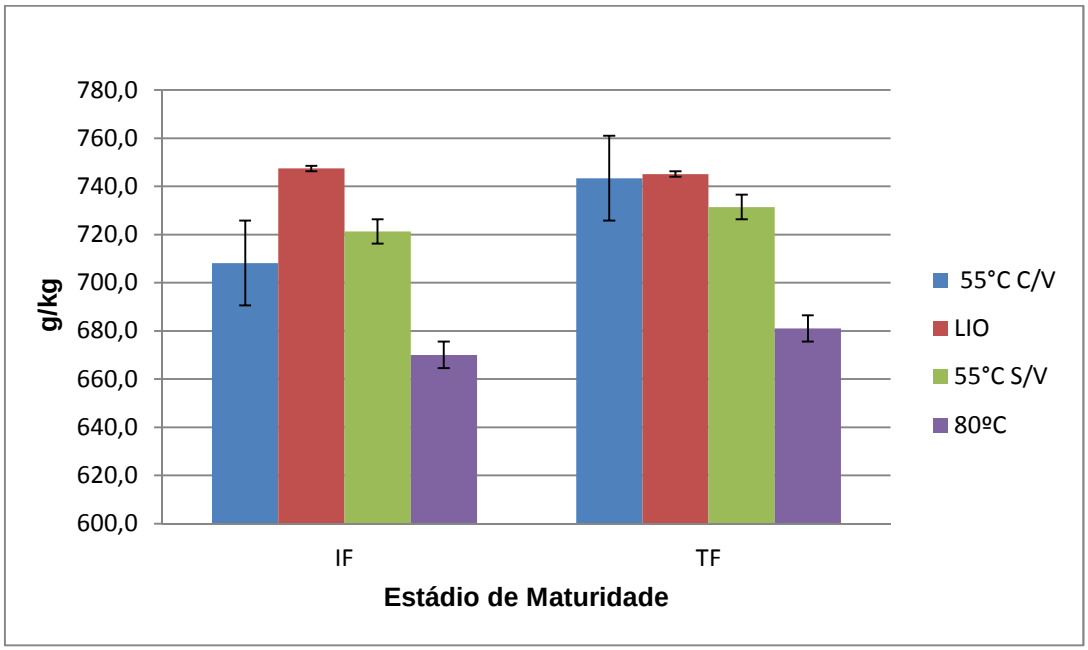
.

Figura 1 - Médias dos teores de parede celular (PC) em gramíneas.



O procedimento de liofilização foi o que teve menores teores de PC, mas possivelmente devido a erros de técnica, dando diferença significativa entre gramíneas e leguminosas. Já na Figura 2 podemos observar as medias da PC para leguminosas.

Figura 2 - Médias dos teores de parede celular (PC) em leguminosas



A tabela 13 mostra os resultados do procedimento de extração de FDN em gramíneas.

Tabela 13 - Valores de Fibra detergente neutro (FDN) (g/kg da M.S) de sete gramíneas colhidas em dois estádios de maturidade inicio de florescimento ou 75 dias após o corte de uniformidade (IF), total florescimento 95 dias após o corte de florescimento (TF), pre-secadas com 4 temperaturas

	Estádios de maturidade							
	IF				**TF**			
Especie	**55°C C/V**	**LIO**	**55°C S/V**	**80ºC**	**55°C C/V**	**LIO**	**55°C S/V**	**80ºC**
B. brizantha cv. MG-5	710,4	682,7	752,8	738,4	726,8	703,5	728,3	736,1
B. decumbens cv. IPEAN	704,9	733,8	740,2	769,4	724,3	723,0	736,5	779,1
C. nlemfuensis (Grama Estrela Africana)	712,4	716,4	741,9	756,1	747,9	707,5	739,0	735,8
P. maximum capim Colonião.	734,3	660,9	746,7	761,7	758,3	713,4	746,3	779,0
P. plicatulum capim cuiabano	739,6	730,0	714,7	755,1	743,0	725,9	773,4	754,5
P. purpureum cv Napier capim elefante	741,4	695,8	701,1	727,6	780,3	741,7	757,1	743,2
S. anceps capim kazungula	750,0	750,7	731,9	714,2	756,4	749,9	747,1	770,7
Medias	727,6AB	710,0AB	732,8A	746,1B	748,1AB	723,6AB	746,8A	756,9A
dp	17,9	31,7	18,5	19,9	19,4	17,3	14,8	19,3

Temperaturas de pre-secagem, 55°C C/V estufa com ventilação forçada, Liofilizada, 55°C S/V estufa sem ventilação forçada, 80°C estufa sem ventilação forçada.

*Valores expressos na matéria seca (g/kg).

Médias seguidas por letras distintas diferem significativamente entre si (P<0,05) pelo teste de Tukey.

Com estes resultados da liofilização e de outras duas temperaturas, sem ventilação forçada, optou-se pela temperatura, a recomendada pela literatura, que é a secagem convencional em estufa calibrada de ventilação forçada 60±5°C (AOAC, 1995). Objetivos eram, além da constatação de possível aumento artificial nos teores de FDA e LDA em função do surgimento dos artefatos de Maillard, verificar se esses artefatos interfeririam na quantificação da lignina pelo método espectrofotométrico, a LBA. Na Figura 3 podemos observar as médias para a preparação fibrosa FDN e na Figura 4 FDA.

Figura 3 - Médias de fibra detergente neutro (FDN) em gramíneas

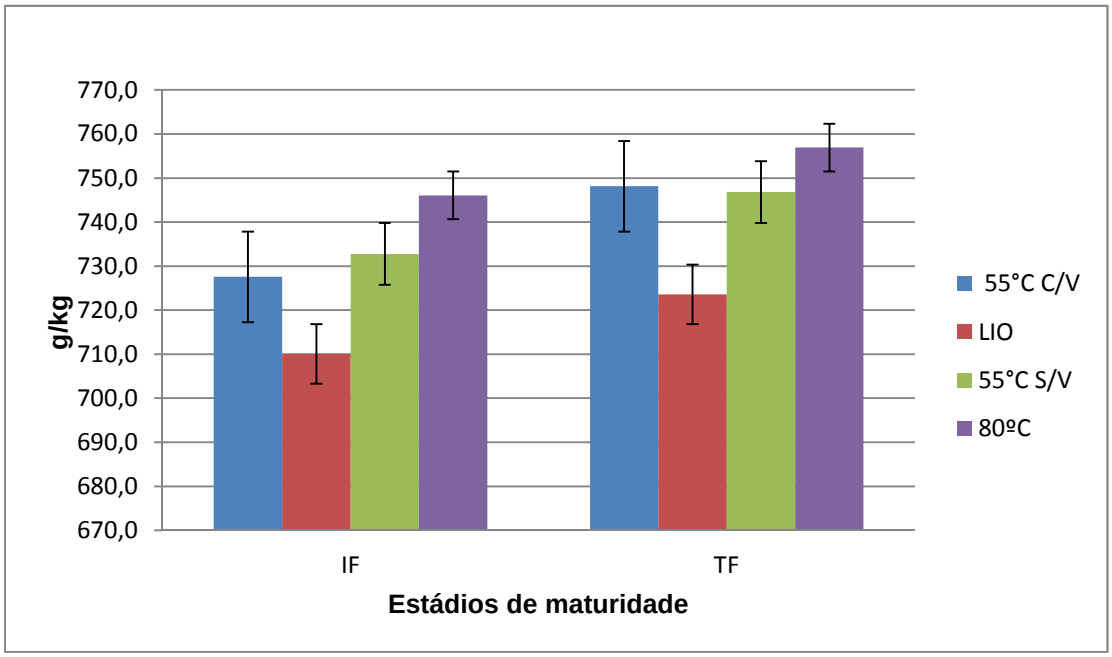
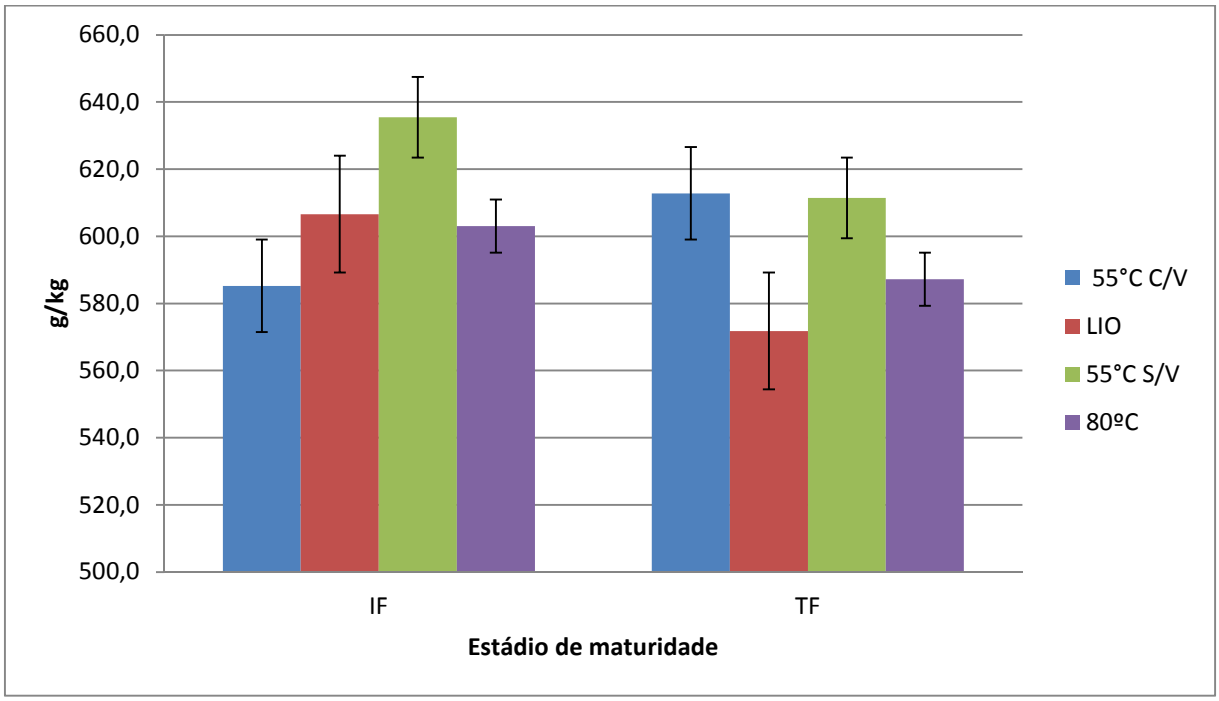


Figura 4 – Médias de fibra em detergente neutro (FDN) em leguminosas.



Na Tabela 14, os resultados mostram que as leguminosas não se comportaram de acordo ao descrito na literatura já que cerca de 80% da MS é

composta por parede celular (PC). Por tanto, é possível que o aumento na concentração de MS esteja acompanhado por um aumento nos valores de PC e consequentemente nos valores de fibra (FDN-FDA). É de se esperar também, que os rendimentos de PC aumentem conforme avança o estádio de maturidade das plantas (SAVIOLI; FUKUSHIMA, 2000).

Tabela 14 - Valores de Fibra detergente neutro (FDN) (g/kg da M.S) de duas leguminosas colhidas em dois estados de maturidade inicio de florescimento ou 75 dias após o corte de uniformidade (IF), total florescimento 95 dias após o corte de florescimento (TF), pre-secadas com 4 temperaturas

	Estádios de maturidade							
	IF				**TF**			
Especie	**55°C C/V**	**LIO**	**55°C S/V**	**80ºC**	**55°C C/V**	**LIO**	**55°C S/V**	**80ºC**
C. cajan (Guandu)	591,6	597,9	634,1	667,1	629,8	598,2	618,4	613,6
M. sativa (Alfalfa Crioula)	578,9	615,3	636,8	539,1	595,8	545,3	604,3	560,9
Media	585,2	606,6	635,4	603,1	612,8	571,8	611,4	587,2
dp	9,0	12,3	1,9	90,5	24,0	37,4	10,0	37,3

Temperaturas de pre-secagem, 55°C C/V estufa com ventilação forçada, Liofilizada, 55°C S/V estufa sem ventilação forçada, 80°C estufa sem ventilação forçada.

*Valores expressos na matéria seca (g/kg).

Médias seguidas por letras distintas, diferem significativamente entre si (P<0,05) pelo teste de Tukey.

A Tabela 15 mostra os valores de fibra em detergente acido (FDA) para gramíneas, e para leguminosas na Tabela 16.

Tabela 15 - Valores de Fibra detergente acido (FDA) (g/kg da M.S) de sete gramíneas colhidas em dois estádios de maturidade inicio de florescimento ou 75 dias após o corte de uniformidade (IF), total florescimento 95 dias após o corte de florescimento (TF), pre-secadas com 4 temperaturas diferentes

	Estádios de maturidade							
	IF				**TF**			
Especie	**55°C C/V**	**LIO**	**55°C S/V**	**80ºC**	**55°C C/V**	**LIO**	**55°C S/V**	**80ºC**
B. brizantha cv. MG-5	417,8	392,2	438,1	457,1	427,9	427,9	447,4	471,8
B. decumbens cv. IPEAN	388,1	400,0	403,7	416,0	424,2	411,9	442,5	461,8
C. nlemfuensis (Grama Estrela Africana)	386,0	405,7	397,3	425,7	415,2	402,8	405,8	408,4
P. maximum capim Colonião.	450,0	418,7	457,5	491,3	473,4	451,2	462,4	476,1
P. plicatulum capim cuiabano	408,0	404,8	410,4	460,8	426,2	428,8	455,8	432,1
P. purpureum cv Napier capim elefante	430,0	388,4	428,7	423,4	480,7	469,1	450,2	464,7
S. anceps capim kazungula	452,5	462,6	405,6	393,2	448,6	461,2	444,4	451,4
Medias	418,9B	410,3B	420,2BA	438,2A	442,3B	436,1B	444,1BA	452,3A
dp	27,0	25,1	22,0	33,1	25,8	25,1	18,2	24,3

Temperaturas de pre-secagem, 55°C C/V estufa com ventilação forçada, Liofilizada, 55°C S/V estufa sem ventilação forçada, 80°C estufa sem ventilação forçada.

*Valores expressos na matéria seca (g/kg).

Médias seguidas por letras distintas diferem significativamente entre si (P<0,05) pelo teste de Tukey.

Tabela 16 - Valores de Fibra detergente acido (FDA) (g/kg da M.S) de duas leguminosas colhidas em dois estádios de maturidade inicio de florescimento ou 75 dias após o corte de uniformidade (IF), total florescimento 95 dias após o corte de florescimento (TF), pre-secadas com 4 temperaturas diferentes

	Estádios de maturidade							
	IF				**TF**			
Espécie	**55°C C/V**	**LIO**	**55°C S/V**	**80ºC**	**55°C C/V**	**LIO**	**55°C S/V**	**80ºC**
C. cajan (Guandu)	336,3	373,6	438,8	397,5	435,4	428,8	449,6	545,0
M. sativa (Alfafa Crioula)	375,7	361,5	397,1	455,8	339,8	429,0	483,5	440,9
Media	356,0B	367,5B	418,0BA	426,6A	387,6B	428,9B	466,5BA	492,9A
dp	67,6	0,2	24,0	73,6	27,8	8,6	29,4	41,2

Temperaturas de pre-secagem, 55°C C/V estufa com ventilação forçada, Liofilizada, 55°C S/V estufa sem ventilação forçada, 80°C estufa sem ventilação forçada.

*Valores expressos na matéria seca (g/kg).

Médias seguidas por letras distintas, diferem significativamente entre si (P<0,05) pelo teste de Tukey.

A lignina detergente ácido consta nas Tabelas 17 e 18. Já nas temperaturas que não receberam circulação de ar, houve um aumento dos teores de LDA, particularmente aqueles materiais submetidos à temperatura de 80°C. Os

componentes de Maillard são mensurados juntamente com a lignina, quando esta é mensurada pelo método de lignina detergente acido (VAN SOEST, 1994) e evidenciam que as frações de proteína podem ser alteradas quando submetidas a temperaturas acima de 60°C, gerando dados errôneos acerca da composição dos alimentos e influencia negativamente no balanceamento de dietas.

Tabela 17 - Valores de Lignina detergente acido (LDA) (g/kg da M.S) de sete gramíneas colhidas em dois estádios de maturidade inicio de florescimento ou 75 dias após o corte de uniformidade (IF), total florescimento 95 dias após o corte de florescimento (TF), pre-secadas com 4 temperaturas

	Estádios de maturidade							
	IF				**TF**			
Especie	**55°C C/V**	**LIO**	**55°C S/V**	**80ºC**	**55°C C/V**	**LIO**	**55°C S/V**	**80ºC**
B. brizantha	53,6	49,9	55,6	73,4	58,0	57,2	67,5	81,7
B. decumbens	52,7	48,9	46,4	99,8	53,8	52,2	72,0	92,2
C. nlemfuensis	62,6	70,6	56,2	97,8	67,4	76,3	68,2	70,8
P. maximum	65,6	57,9	82,4	104,1	89,6	68,6	76,1	78,1
P. plicatulum	53,6	45,2	61,1	101,6	51,9	56,5	73,5	78,7
P. purpureum	75,6	58,1	79,8	78,3	66,2	108,4	76,5	96,3
S. anceps	57,4	76,8	51,1	54,8	62,0	69,1	59,7	66,6
Medias	60,2A	58,2A	61,8A	87,1B	64,1A	69,7A	70,5A	80,6B
dp	8,4	11,7	14,0	18,6	12,7	19,1	5,9	10,7

Temperaturas de pre-secagem, 55°C C/V estufa com ventilaçao forazada, Liofilizada, 55°C S/V estufa sem ventilação forzada, 80°C estufa sem ventilação forzada.

*Valores expressos na matéria seca (g/kg).

Médias seguidas por letras distintas diferem significativamente entre si (P<0,05) pelo teste de Tukey.

Tabela 18 - Valores de Lignina detergente acido (LDA) (g/kg da M.S) de sete gramíneas colhidas em dois estádios de maturidade inicio de florescimento ou 75 dias após o corte de uniformidade (IF), total florescimento 95 dias após o corte de florescimento (TF), pre-secadas com 4 temperaturas

	Estádios de maturidade							
	IF				**TF**			
Espécie	**55°C C/V**	**LIO**	**55°C S/V**	**80ºC**	**55°C C/V**	**LIO**	**55°C S/V**	**80ºC**
C. cajan (Guandu)	111,2	145,6	218,9	175,2	202,9	193,7	206,4	296,6
M. sativa (Alfafa Crioula)	82,8	95,0	105,0	154,5	101,0	117,7	143,0	163,8
Media	106,1A	120,3A	161,9AB	164,9B	142,8A	155,7A	174,7AB	230,2B
dp	7,2	35,8	80,5	14,6	84,9	53,8	44,9	93,9

Temperaturas de pre-secagem, 55°C C/V estufa com ventilação foçada, Liofilizada, 55°C S/V estufa sem ventilação forçada, 80°C estufa sem ventilação forçada.

*Valores expressos na matéria seca (g/kg).

Médias seguidas por letras distintas diferem significativamente entre si (P<0,05) pelo teste de Tukey.

Assim decidiu-se continuar o estudo com a temperatura de 55°C com ventilação forçada, descartando-se as outras temperaturas. Os resultados do segundo estudo são apresentados na Tabela 19, que mostra os componentes bromatológicos de sete gramíneas e seis leguminosas pré-secas em estufa a 55°C, com ventilação de ar. Os teores numéricos de PC, FDN e FDA aumentaram com o amadurecimento e a LDA, em alguns casos, diminuiu com amadurecer da planta. Uma explicação possível, afora a variabilidade biológica, foi o relativamente curto intervalo entre os cortes. Esperado mais alguns dias para o segundo corte, poderia evidenciar melhor o efeito da maturidade.

Tabela 19 - Teores bromatológicos (g/kg da M.S) de sete gramíneas e seis leguminosas colhidas em dois estados de maturidade inicio de florescimento ou 75 dias após o corte de uniformidade (IF), e total florescimento 95 dias após o corte de uniformidade (TF) 35 dias a pôs o corte de inicio de florescimento.

	Estádios de maturidade									
	IF					**TF**				
Espécie	**PC**	**FDN**	**FDA**	**FS**	**LDA**	**PC**	**FDN**	**FDA**	**FS**	**LDA**
B. *brizantha*	794,3	710,4	417,8	83,9	53,6	795,5	726,8	427,9	68,8	58,0
B. *decumbens*	771,5	704,9	388,1	66,5	52,7	773,3	724,3	424,2	49,0	53,8
C. *nlemfuensis*	753,0	712,4	386,0	40,6	62,6	785,0	747,9	415,2	37,2	67,4
P. *maximum*	803,4	734,3	450,0	69,1	65,6	831,4	758,3	473,4	73,1	89,6
P. *plicatulum*	793,0	739,6	408,0	53,4	53,6	809,2	743,0	426,2	66,2	51,9
P. *purpureum*	774,0	741,4	430,0	32,6	75,6	803,6	780,3	480,7	23,4	66,2
S. *anceps*	794,5	750,0	452,5	44,4	57,4	815,8	756,4	448,6	59,4	62,0
C. cajan	742,0	591,6	336,3	150,4	187,4	806,5	629,8	435,4	176,7	299,0
M. sativa	674,4	578,9	339,8	78,6	130,8	680,3	595,8	375,7	101,4	165,6
Neonotonia wightii	682,3	559,9	314,3	122,4	128,5	693,9	602,9	326,8	91,0	141,7
Neonotonia wightii **	681,5	554,2	319,8	127,2	139,7	675,1	576,5	318,6	98,6	139,2
Leucena	628,2	555,5	306,6	72,7	227,2	631,3	566,6	251,8	64,7	170,9
Pueraria	679,0	561,1	315,0	117,9	105,6	701,1	588,9	339,2	112,2	125,3
Media	736,2	653,4	374,2	81,5	103,1	754,0	676,7	395,7	78,6	114,7
dp	59,3	83,8	54,5	37,1	56,7	67,2	84,2	68,2	39,1	70,7

(P.C) Parede celular, (FDN) fibra detergente neutro, (FDA) fibra detergente acido, (FS) fibra soluvel e (LDA) lignina detergente acido.

*Valores expressos na matéria seca (g/kg). ** Variedade Tinaroo

Médias seguidas por letras distintas, diferem significativamente entre si (P<0,05) pelo teste de Tukey.

4.3 LIGNINA

Os resultados deste segundo estudo concordam com os resultados reportados por Fuzeto (2003) e por, Fukushima et., al. *(*2004) apresentando menores teores de LDA nos dois estádios de maturidade para as gramíneas e leguminosas (Tabela 20).

Tabela 20 - Valores de lignina (g/kg da M.S) de sete gramíneas colhidas em dois estados de maturidade inicio de florescimento ou 75 dias após o corte de uniformidade (IF), total florescimento 95 dias após o corte de florescimento (TF)

	Estádio de maturidade											
	LBA				**LDA**				**LK**			
	MS		**FDN**		**MS**		**FDN**		**MS**		**FDN**	
Especie	**IF**	**TF**	**IF**	**TF**	**IF**	**TF**	**IF**	**TF**	**IF**	**TF**	**IF**	**TF**
B. brizantha	104,8	71,3	147,6	98,0	53,6	58,0	75,4	79,7	127,1	129,1	178,9	177,5
B. decumbens	93,5	103,4	132,8	142,8	52,7	53,8	75,0	74,3	122,6	127,1	174,3	175,4
C. nlemfuensis	129,3	104,7	181,5	140,0	62,6	67,4	87,8	90,1	154,4	178,1	216,8	238,1
P. maximum	115,9	126,2	157,9	166,4	65,6	89,6	89,4	118,1	151,0	150,3	205,6	198,0
P. plicatulum	115,4	111,9	156,0	150,6	53,6	51,9	72,6	69,9	153,1	138,2	207,0	185,9
P. purpureum	116,6	116,8	157,4	149,7	75,6	66,2	102,0	84,9	181,2	186,3	244,1	238,3
S. anceps	115,6	114,5	154,1	151,3	57,4	62,0	76,4	82,0	133,7	166,0	178,3	219,5
C. cajan	35,8	56,8	56,9	96,0	187,4	299,0	188,0	321,8	230,2	380,3	389,2	603,4
M. sativa	40,1	63,8	67,3	110,1	130,8	165,6	137,9	174,3	132,9	170,2	224,2	294,3
Neonotonia wightii	39,1	37,8	69,8	62,6	128,5	141,7	130,8	133,2	238,9	284,1	426,6	471,1
Neonotonia wightii **	45,0	50,7	81,5	87,9	139,7	139,2	136,1	137,6	247,2	367,5	445,8	641,8
Leucena	51,1	50,5	91,9	89,1	227,2	170,9	213,8	162,4	318,1	352,0	572,8	621,6
Pueraria (Kudzu tropical)	29,5	33,4	52,7	56,7	105,6	125,3	116,5	127,5	303,9	238,4	541,9	406,5
Media	79,4	80,1	115,9	115,5	103,1	114,7	115,5	127,4	191,9	220,6	308,1	344,0
dp	39,0	33,4	46,4	36,6	56,7	70,7	45,0	67,8	68,2	94,0	146,0	181,6

(LBA) lignina brometo de acetila, (LDA) lignina detergente acido e (LK) lignina klason

*Valores expressos na matéria seca e na FDN (g/kg).

Médias seguidas por letras distintas diferem significativamente entre si (P<0,05) pelo teste de Tukey.

O método LDA subestima os teores de lignina, devido solubilização parcial da mesma na solução de detergente ácido (KONDO; MIZUNO; KATO, 1987), ou então na solução de ácido sulfúrico a 72% (HATFIELD et al., 1994; SHIMOJO;

GOTO, 1984). Jung e Fahey (1983) sugeriram que as soluções de detergente ácido e de detergente neutro podem remover alguma lignina verdadeira. Esta visão considera todos os fenólicos de parede celular, incluindo os ésteres dos ácidos ferúlico e p-coumárico, como parte da lignina (JUNG; DEETZ, 1993),

Figura 5 - Média dos teores de lignina provenientes de amostras de forragens em dois estádios de maturidade feitas da matéria seca.

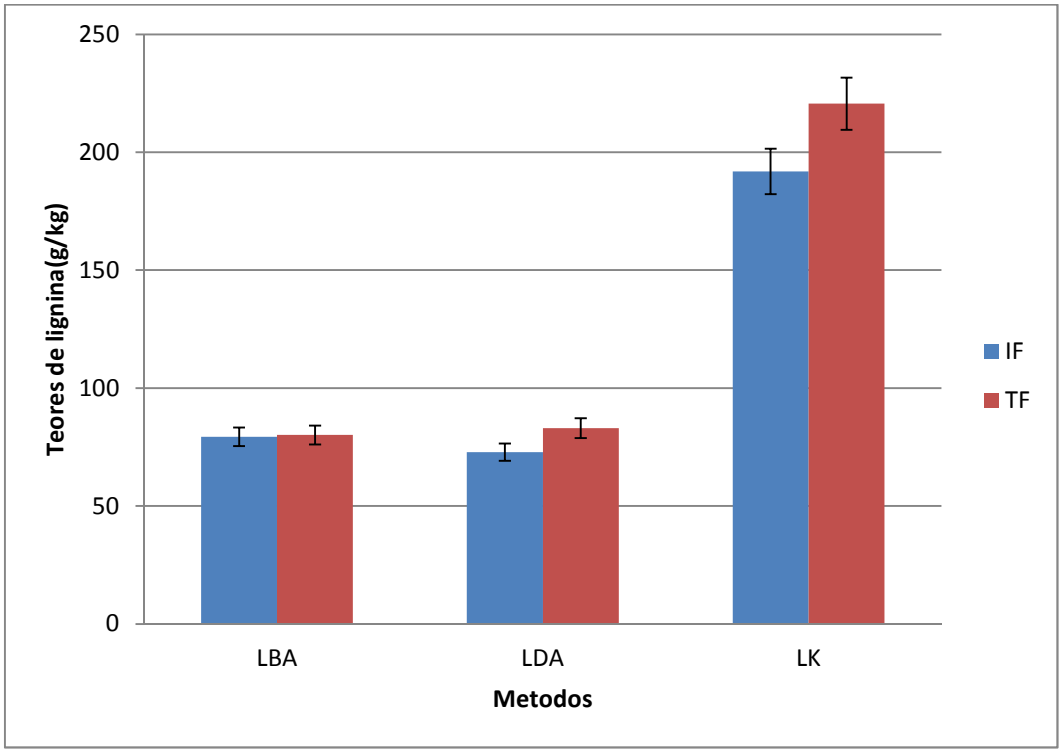
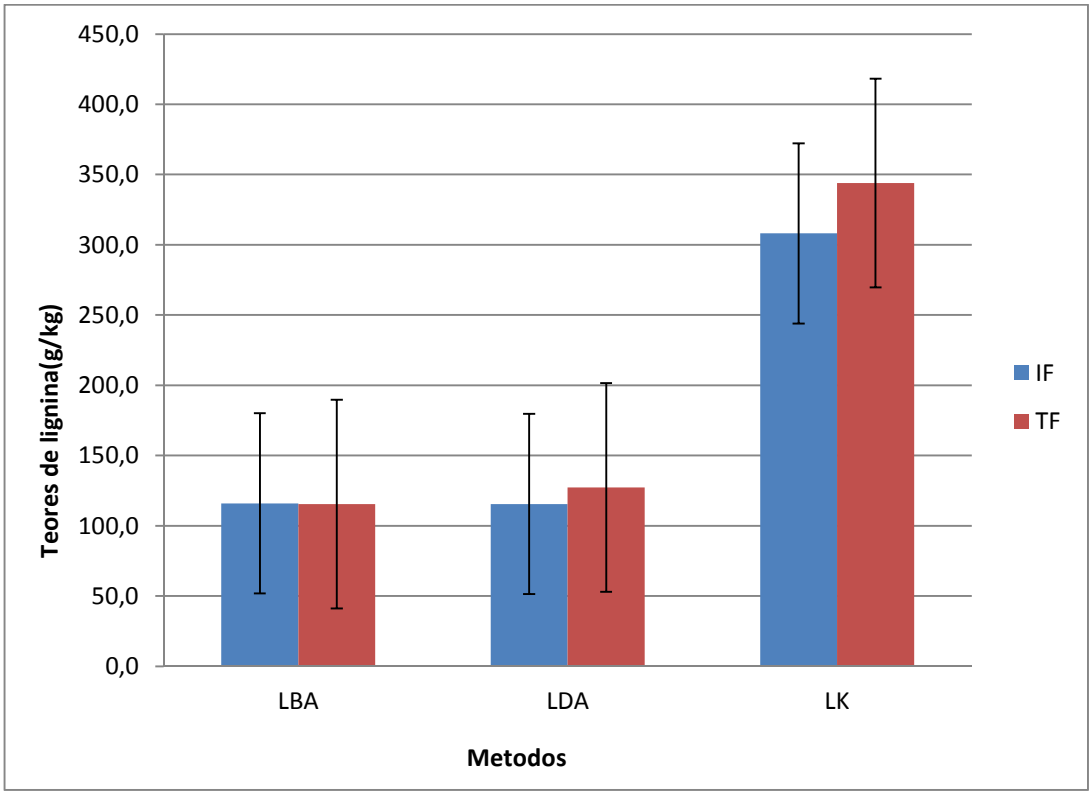


Figura 6 - Média dos teores de lignina provenientes de amostras de forragens em dois estádios de maturidade feitas da preparação fibrosa da FDN.



Tal observação pode ser constatada graficamente na Figura 5 e nas tabelas 21 e 22, nota-se que, nos métodos lignina Klason e LBA, os teores de lignina aumentaram à medida que avançou o estádio de maturidade das espécies forrageiras, como reportado na literatura, a principal limitação do método LK para forragens é a inclusão de proteína no resíduo insolúvel, resultando em valores artificiais para a lignina (VAN SOEST, 1967). De acordo com Hatfield et al. (1994), o teor de nitrogênio nos resíduos de LK foi sempre maior que nos de LDA. A lignina Klason aumenta os valores nos capins em até três vezes acima da lignina detergente ácido (VAN SOEST, 1994).

Van Soest (1963a) empregou a solução de detergente ácido para obter uma preparação lignocelulósica isenta de proteína, a fibra em detergente ácido (FDA), objetivando tratá-la com ácido sulfúrico 72%, ao qual denominou de lignina detergente ácido. Van Soest procurou por uma preparação isenta de proteína, uma vez que uma das principais críticas ao método LK, é a contaminação proteica no

resíduo de lignina (WHITEHEAD; QUICKE, 1964). O método LK, largamente empregado para mensurar lignina em madeiras, usa a preparação parede celular bruta como substrato ao tratamento com ácido sulfúrico 72%, já que a parede celular de madeiras, e consequentemente a lignina, é virtualmente livre de proteínas. Porém, não é o caso da parede celular de plantas forrageiras que apresentam proteína, o que representa sérios obstáculos ao método LK (VAN SOEST, 1994).

Tabela 21 - Valores de lignina (g/kg da M.S) de gramíneas e leguminosas colhidas em dois estádios de maturidade início de florescimento ou 75 dias após o corte de uniformidade (IF), total florescimento 95 dias após o corte de florescimento (TF).

Método	INICIO		TOTAL		Média	EPM	Probabilidade	
	Leguminosa	Gramínea	Leguminosa	Gramínea			Época	Especie
LDA	83,00	60,15	89,82	64,14	74,28	12,13	0,285	<0,0001
LK	270,22	146,15	273,73	153,50	210,9	61,08	0,798	<0,0001
LBAC	40,09	113,02	48,83	106,97	77,23	32,77	0,503	<0,0001
LBAM	38,79	90,29	42,95	98,11	67,54	26,66	0,332	<0,0001
LBAU	50,29	101,67	51,34	105,76	77,27	26,45	0,372	<0,0001

Na tabela 21 observase menores valores em todos os métodos comparados com os da tabela 22, possivelmente devido a que na preparação fibrosa detergente neutro (FDN), a lignina é mais concentrada por isso os valores altos para todos os métodos, dando diferença significativa pelo teste de tukey entre gramíneas e leguminosas para todos as metodologias.

Tabela 22 - Valores de lignina (g/kg da FDN) de gramíneas e leguminosas colhidas em dois estádios de maturidade início de florescimento ou 75 dias após o corte de uniformidade (IF), total florescimento 95 dias após o corte de florescimento (TF).

Método	INICIO		TOTAL		Média	EPM	Probabilidade	
	Leguminosa	Gramínea	Leguminosa	Gramínea			Época	Espécie
LDA	130,32	82,65	153,83	85,57	113,09	28,98	0,123	<0,0001
LK	469,11	200,71	470,75	204,67	336,31	133,62	0,903	<0,0001
LBAFDN	70,01	155,32	83,73	142,68	112,94	36,07	0,950	<0,0001
LBAM	68,00	124,14	73,80	136,46	100,6	29,7	0,320	<0,0001
LBAU	87,46	139,77	88,03	141,28	114,14	26,39	0,787	<0,0001

4.4CORRELAÇÕES ENTRE A DIGESTIBILIDADE E O TEOR DE LIGNINA

Uma das melhores ferramentas para a caracterização de um método analítico é a correlação entre o teor de lignina, medido por um determinado método analítico, e um ensaio de degradabilidade (*in vitro)*. A determinação do real valor de lignina pode ser útil para estimar a extensão da digestão da fibra e a exatidão química com que esses nutrientes são determinados, que quanto maior, melhor será o grau de correlação com a medida de valor nutritivo sendo investigada (AKIN et al., 1977). O grau de correlação existente entre a degradabilidade e o parâmetro sendo medido é muitas vezes empregado para avaliar procedimentos analíticos; se bem que o grau de correlação seja muitas vezes um critério insatisfatório, este índice reflete a praticidade de se obter a estimativa mais acurada do valor nutritivo a partir de dados da composição bromatológica (VAN SOEST, 1994).

Tabela 23 Valores de degradabilidade *in vitro* dos diferentes métodos de extração de lignina expressos na Matéria seca (MS)

Método	**DIVFDN**	**DIVMS**	**EPM**
LDA	0,39702	0,25812	0,0982
	0,0446	0,203	
LK	0,32642	0,09759	0,1618
	0,1036	0,6353	
LBAC	-0,70889	-0,5251	0,1300
	<0,0001	0,0059	
LBAUL	-0,74814	-0,57275	0,1240
	<0,0001	0.0022	
LBAMUL	-0,62995	-0,44827	0,1285
	0,0006	0,0216	

Todos os valores estão expressos na Matéria seca (MS) (g/kh MS).

Tabela 24- Valores de degradabilidade *in vitro* dos diferentes métodos de extração de lignina expressos na fibra detergente neutro (FDN)

Método	**DIVFDN**	**DIVMS**	**EPM**
LDA	0,1044	-0,11398	0,1544
	0,6118	0,5793	
LK	0,46234	0,23684	0,1595
	0,0174	0,2441	
LBAFDN	-0,64815	-0,46706	0,1280
	0,0003	0,0161	
LBAUL	-0,69393	-0,51899	0,1237
	<0,0001	0,0066	
LBAMUL	-0,54031	-0,36374	0,1249
	0,0044	0,0678	

Todos os valores dos métodos estão expressos na (FDN).

Na Tabela 23 é possível observar a correlação dos diferentes métodos de extração da lignina sendo o método lignina brometo de acetila com ultrasonificador LBAUL e lignina brometo de acetila comum LBAC foram os que obtiveram melhor correlação, e os métodos LK e LDA obtiveram menor correlação nas duas DIVMS e DIVFDN. Os valores de lignina nos métodos testados estão expressos na matéria seca. Já na Tabela 24, onde os valores foram expressos na FDN os tratamentos LBAUL e LBAC, foram os que melhor tiveram correlação com a DIVFDN, mas o método da LDA teve uma boa correlação na DIVMS, sendo o método LK quem teve piores correlações.

5 CONCLUSÕES

Ainda que os resultados deste estudo mostrem diferenças entre as metodologias de lignina, as correlações entre os métodos LBAUL com degradabilidade, DIVMS e DIVFDN, foram altas, assim como para o método LBA comum na DIVFDN. Obtendo correlações baixas nas metodologias LK e LDA tanto na DIVMS quanto na DIVFDN. O método LBA precisa ser mais estudado aumentando as espécies forrageiras testadas e também investigar a lignina como marcador interno para ruminantes alimentados com pastagens. Entre os métodos de lignina, o LBA é o método que gasta menor tempo de analise e, por isso, deve ser incluído mais frequentemente em analises de bromatológicas.

REFERÊNCIAS

AKIN, D. E.; ROBINSON, E. L.; BARTON II, F. E.; HIMMELSBACH, D. S. Change with maturity in anatomy, histochemistry, chemistry and tissue digestibility of bermuda grass parts. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**., v. 25, p. 179-186, 1977.

AL-ANI, F.; SMITH, J. E. Effect of chemical pretreatments on the fermentation and ultimate digestibility of bagasse by Phanerochaete chrysosporium. **Journal of Science Food Agriculture**., v. 42, p. 19-28, 1988.

ALBRECHT, K. A.; WEDIN, W. F.; BUXTON, D.R. Cell-wall composition and digestibility of alfalfa stems and leaves. **Crop Science,** v. 27, n. 4, p. 735-741, 1987.

ASSOCIATION OF OFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). **Official Methods of Analysis**. 15th ed. Arlintong, Texas: AOAC, 1005. p. 1117.

BJORKMAN, A. Studies on finely divided wood: extration with neutral solvents. **Svensk Papperstidning**, v. 59, p. 477, 1956.

BARON-EPEL, O.; GRARYAL, P. K.; SCHINDLER, M. Pectin as mediators wall porosity in soybean cells. **Planta**, Berlin, v. 175, p. 389-395, 1988.

BARTON II, F. E.; AKIN, D. E. Digestibility of delignified forage cell walls. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 25, p. 1299-1303, 1977.

BUXTON, D. R.; BRASCHE, M. R. Digestibility of structural carbohydrates in-cool-season grain and legume forages. **Crop Science Journal**, Madison, v. 31, p. 1338-1345, 1991.

BUXTON, D. R.; HORNSTEIN, J. S. Cell-wall concentration and components in stratified canopies of alfalfa, birdsfoot-trefoil, and red-clover. **Crop Science Journal**, v. 26, n.1, p.180-184, Jan-Feb 1986.

BUXTON, D. R.; MERTENS, D. R.; FISHER, D. S. In: Cool - season forage grasses. **Agronomic Monograph**., v. 34, p. 229, 1996.

BRAUNS, F. E. **The chemistry of lignin**. New York: Academic Press, 1952.

BRILLOVET, J. M.; RIOCHET, D. Cell wall polysaccharides and lignin in cotyledons and hulls of seeds from various lupin *(Lupinus L.)* species. **Journal of Science and Food Agriculture**., v. 34, p. 861-868, 1983.

CAMM, E. L.; TOWERS, G. H. N. Phenylalanine ammonia lyase. **Phytochemistry**, Oxford, v. 12, n. 1, p. 961, 1973.

CARPITA, N. C.; GILBEAUT, D. M. Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with physical properties of the cell wall during growth. **The Plant Journal**, Oxford, v. 3, n. 1, p. 1-30, 1993.

CARPITA, N. C.; MCCANN, M. The cell wall. In: BUCHAMAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. **Biochemistry molecular biology of plants**. Rockville: American Society of Plant Physiologistsp, 2000. p. 52-109.

CEREDA, M. P.; SARMENTO, S. B. S.; WOSIACKI, G.; ABBUD, N. S. A mandioca (Manihot escuelenta, C.) cultivar IAPAR-19 Pionera 3: características culinárias. **Arquivos de Biologia e Tecnologia,** v. 33, n. 3, p. 511-525, 1990.

CHESSON, A. Effects of sodium hydroxide on cereal straws in relation to the enhanced degradation of structural polysaccharides by rumen microorganisms. **Journal of Science Food and Agriculture**, v. 32, p. 745-758, 1981.

CHESSON, A.; MONRO, J. A. Legume pectic substance and their degradation in the ovine rumen. **Journal of Science Food and Agriculture.**, v. 33, n. 9, p. 852-859, 1982.

CHRISTIAN, K. R. Detergent method for total lignin in herbage. **Field Station Records**. CSIRO, Melbourne, v. 10, n. 3, p. 29-34, 1971.

CHURCH, D. C. The classification and importance of ruminant animals. In:_____. **The ruminant animal**: digestive physiology and nutrition. Englewood Cliffs: Prentice may, 1988. p. 1-13.

CURVELO, A. A. S. Organosolv lignins from *Pinnus caribaea hondurensis*. In: BRAZILIAN SYMPOSIUM ON THE CHEMISTRY OF LIGNINS AND OTHER WOOD COMPONENTS, 1., 1992, Campinas. **Proceedings… Universidade Estadual de Campinas 1992**. p. 44-55.

DEHORITY, B. A.; JOHNSON, R. R. Effect of particle size upon the in vitro cellulose digestibility of forages by rumen bacteria. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 44, n. 12, p. 2242-2249, 1961.

DEHORITY, B. A.; JOHNSON, R. R.; CONRAD, H. R. Digestibility of forage hemicellulose and pectin by rumen bacteria in vitro and the effect of lignification thereon. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 4, n. 5, p. 508-512, 1962.

DETMANN, E. Validação de equações preditivas da fração indigestível da fibra em detergente neutro em gramíneas tropicais. **Revista Brasileira de Zootecnia.**, Viçosa, v. 33, n. 6, p. 1866-1875, 2004. Suplemento 1.

ELLIS, G. H.; MATRONE, G.; MAYNARD, L. A. A 72 percent H_2SO_4 method for the determination of lignin and its use in animal nutrition studies. **Journal of Animal Science**, Albany, v. 5, n. 1, p. 285, 1946.

EUCLIDES, V. P. B. Valor alimentício de espécies forrageiras do gênero Panicum. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO DA PASTAGEM, 12., 1995, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: FEALQ, 1995. p. 245-273.

FAICHNEY, G. J. The use of markers to partition digestion within the gastrointestinal tract of ruminants. In: MCDONALD, I. W.; WARNER, A. C. I. **Digestion and Metabolism in the Ruminant**. Armidale: Univ. New England Publ. Unit, 1975. p. 277-291.

FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood:** chemistry, ultrastructure, reactions. Berlin: Walter de Gruyter, 1984. p. 132-191.

FIGUEIREDO-RIBEIRO, R. C. L.; DIETRICH, S. M. C.; CHU, E. P.; CARVALHO, M. A. M.; VIEIRA, C. C. J.; GRAZIANO, T. T. Reserve carbohydrates in underground organs of native Brazilian plants. **Revista Brasileira de Botanica,** v. 9, p. 159-166, 1988.

FORD, C. W. Effect of partial delignification on the *in vitro* digestibility of cell wall polysaccharides in *Digitaria decumbens* (Pangola grass). **Australian Journal of Agriculture Research.**, Melbourne, v. 29, p. 1157, 1978.

FUKUSHIMA, R. S. **Modification of a colorimetric analysis for lignin and its use in studying the inhibitory effect of lignin on forage digestion by ruminal microorganisms.** 1989. 125 p. Thesis (Ph.D. in Animal Nutrition) - Ohio State University, Columbus, 1989.

FUKUSHIMA, R. S.; DEHORITY, B. A. Feasibility of using lignin isolated from forages by solubilization in acetyl bromide as a standard for lignin analyses. **Journal of Animal Science**., v. 78, p. 3135-3143, 2000.

FUKUSHIMA, R. S.; DEHORITY, B. A.; LOERCH, S. C. Modification of a colorimetric analysis for lignin and its use in studying the inhibitory effect of lignin on forage digestion by rumen microorganisms. **Journal of Animal Science**., v. 69, p. 295-304, 1991.

FUKUSHIMA, R. S.; HATFIELD, R. D. Extraction and isolation of lignin for utilization as a standard to determine lignin concentration using the acetyl bromide spectrophotometric method. **Journal of Food Chemists**., v. 46, p. 3133-3139, 2001.

FUKUSHIMA, R. S.; HATFIELD, R. D. A spectrophotometric method to determine lignin concentration in vegetable samples by utilizing a lignin extracted with acidic dioxane as a standard and comparison with other analytical methods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 52, n. 12, p. 3713-3720, 2004.

FUKUSHIMA, R. S.; KERLEY, M. S. Use of lignin extracted from different plant sources as standards in spectrophotometric acetyl bromide lignin method. **Journal of Agriculture Food Chemistry**., v. 59, p. 3505-3509, 2011.

FUKUSHIMA, R. S.; KERLEY, M. S.; RAMOS, M. H.; POTTER, J. H.; KALLENBACH, R. L. Comparison of acetyl bromide lignin with acid detergent lignin and Klason lignin and correlation with in vitro forage degradability. **Animal Feed Science and Tecnology**, v. 201, p. 25-37, 2015.

FUKUSHIMA, R. S.; SAVIOLI, N. M. F. Correlação entre digestibilidade “in vitro” da parede celular e três métodos analíticos para a avaliação quantitativa da lignina. **Revista Brasilera de Zootecnia**., v. 30, p. 302-309, 2001.

FUKUSHIMA, R. S.; WEIMER, P. J.; KUNZ, D. A. Photocatalytic interaction of resazurin N-oxide with cysteine optimizes preparation of anaerobic culture media. **Anaerobe**, Amsterdam, v. 8, n. 1, p. 29-34, 2002

GIGER, S. Revue sur les methodes de dosage de la lignine utilisees en alimentation animale. **Annales de Zootechnie**, Paris, v. 34, n. 3, p. 85-122, 1985.

GLASER, A. N.; NIKAIDO, H. Microbial polysaccharides and polyesters. In: _____. **Microbial biotechnology**: fundamentals of applied microbiology. New York: W. H. Freeman, 1995. p. 265-272.

GOERING, H. K. Digestibility of roughage materials ensiled with sodium chlorite. **Journal of Dairy Science.**, Champaign, v. 56, n. 2, p. 233, 1973.

GUILLON, E. Structural characterization and iron (III) binding ability of dimeric and polymeric lignin models**. Journal of Colloid and Interface Science,** New York, v. 239, n. 1, p. 39-48, 2001.

HALL, M. B.; HOOVER, W. B.; JENNINGS, J. P.; WEBSTER, T. K. M. A method for partitioning neutral detergente-soluble carbohydrates. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 79, n. 15, p. 2079-2086, 1999.

HATFIELD, R. D. A comparison of the insoluble residues produced by the klason lignin and acid detergent lignin procedures. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 65, n. 1, p. 51-58, 1994.

HIGUCHI, T.; ITO, Y.; KAWAMURA, I. p-Hydroxyphenylpropane component of grass lignin and role of tyrosine-ammonia lyase in its formation. **Phytochemistry**, Oxford, v. 6, n. 1, p. 875, 1967.

HOFMANN, R. R. Anatomy of the gastrointestinal tract. In: CHURCH, D. C. (Ed.). **The ruminant animal**: digestive physiology and nutrition. Englewood Cliffs: Prentice Hall, 1988. p. 14-43.

HOOVER, W. H.; STOKES, S. R. Balancing carbohydrate and proteins for optimum rumen microbial yield. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 74, p. 3630-3644, 1991.

IIYAMA, K.; WALLIS, A. F. A. Determination of lignin in herbaceous plants by an improved acetyl bromide procedure. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 51, n. 5, p. 145-161, 1990.

JOHNSON, D. B. Relationship of in vitro cellulose digestibility of undried and dried mixed forages to their in vivo dry matter digestibility. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 45, p. 250-252, 1962.

JOHNSON, D. B.; MOORE, W. E.; ZANK, L. C. The spectrophotometric determination of lignin in small wood samples. **TAPPI**, New York, v. 44, n. 11, p. 793-798, 1961.

JUNG, H. G.; DEETZ, D. A. Cell wall lignification and degradability. In: JUNG, H. G. (Ed.). **Forage cell wall structure and digestibility**. Madison: ASA; CSSA; SSSA, 1993. p. 315-343.

JUNG, H. G.; ENGELS, F. M. Alfafa stem tissues cell wall deposition, composition, and degradability. **Crop Science**, Madison, v. 62, p. 524-534, 2002.

JUNG, H. G.; MERTENS, D. R.; PAYNE, A. J. Correlation of acid detergent lignin and Klason lignin with digestibility of forage dry matter and neutral detergent fiber. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 80, n. 8, p. 1622-1628, 1997.

JUNG, H. G.; VOGEL, K. P. Influence of lignin on digestibility of forage cell wall material. **Journal of Animal Science**., v. 62, p. 1703-1712, 1986.

KONDO, T.; MIZUNO, K.; KATO, T. Some characteristics of forage plant lignin. **Japan Agricultural Research Quarterly**., v. 21, p. 47-52, 1987.

LOWRY, J. B.; CONLAN, A. C.; SCHLINK, A. C.; MCSWEENEY, C. S. Acid detergent dispersible lignin in tropical grasses. **Journal of Science Food Agriculture**., v. 65, p. 41-49, 1994.

MARTINS, S. I. F. S.; JONGEN, W. M. F.; VAN BEKEL, M. A. J. S. A review of Maillard reation in food and implication to kinetik modelling. **Trends in Food Science,** v. 11, p. 364-373, 2001.

MOORE, K. J.; HATFIELD, R. D. Carbohydrate and forage quality. In: FAREY, G. C. (Ed.). **Forage quality evaluation and utilization**. Madison: ASA, 1994. p. 229-280.

MORRISON, I. M. A semi-micro method for the determination of lignin and its use in predicting the digestibility of forage crops. **Journal of Science Food Agriculture**., v. 23, p. 455-463, 1972a.

MORRISON, I. M. Improvements in the acetyl bromide technique to determine lignin and digestibility and its application to legumes. **Journal of Science Food Agriculture**., v. 23, p. 1463-1469, 1972b.

MOWAT, D. N.; KWAIN, M. L.; WINCH, J. E. Lignification and in vitro cell wall digestibility of plant parts. **Canadian Journal Plant Science** ., v. 49, p. 499-504, 1969.

NAMIKI, M.; HAIASHI, T. Formation of novel free radical products in na early stage of Maillard reation. **Progress in Food and Nutrition Science Journal**., v. 5, p. 81-91. 1981.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL (NRC). **Nutrient requirements of dairy cattle**. 7th. ed. Washington, DC: National Academy Press, 2001. 381 p.

NELSON, C. J.; MOSER, L. E. Plant factors affecting forage quality. In: FAHEY, G. C. **Forage quality, evaluation, and utilization.** Madison, American Society of Agronomy, 1994.

NOCEK, J. E.; RUSSELL, J. B. Protein and energy as an integrated system: relationship of ruminal protein and carbohydrate availability to microbial synthesis and milk production. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 71, p. 2070-2107, 1991.

NORRIS, K. H. Predicting forage quality by infrared reflectance spectroscopy. **Journal of Animal Science**, Albany, v. 43, n. 1, p. 889-897, 1976.

NUNES, S. C.; BATISTA, A. O. Implicações da rreaçao de Maillard nos alimentos e nos sistemas biológicos. **Revista Portuguesa de Ciências Veterianarias,** v. 96, p. 53-59, 2001.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; MITCHELL, D. New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products. **Process Biochemistry**, Amsterdam, v. 35, p. 1153-1169, 2000.

PATERSON, J. A.; BELYEA, R. L.; BOWMAN J. P. The impact of forage quality and supplementation regimen on ruminant intake and performance. In: FAHEY JUNIOR, G. C. (Ed.). **Forage quality, evaluation, and utilization**. Madison: ASA, 1994. p. 59-114.

PATTON, A. R.; GIESEKER, L. Seasonal changes in the lignin and cellulose content of some Montana grasses. **Journal of Animal Science**, Albany, v. 1, n. 1, p. 22-26, 1942.

PEPPER, J. M.; BAYLIS, P. E. T.; ADLER, E. The isolation and properties of lignins obtained by acidolysis of spruce and aspen woods in dioxane-water medium. **Canadian Journal of Chemistry** ., v. 37, p. 1241-1248, 1959.

QUEIROZ, M. A. A.; FUKUSHIMA, R. S.; GOMIDE, C. A.; BRAGA, M. R. Substitution of crude cell-wall for neutral detergent fiber in the equations of the Cornell Net Carbohydrate and Protein system suggest creation of a specific fractions: application to sunflower *(Helianthus anuus L.)* **Animal,** v. 2, p. 1087-1092, 2008.

REEVES III, J. B. Near infrared spectroscopic analysis of lignin components in sodium chlorite-treated and untreated forages and forage by-products. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 71, n. 2, p. 388-397, 1988.

RUSSELL, J. B.; RYCHLIK, J. L. Factors that alter rumen microbial ecology. **Science,** v. 292, n. 5519, p. 1119-1122, 2001.

SARKANEN, K. V.; LUDWIG, C. H. (Ed.). **Lignins**: occurrence, formation, structure and reactions. New York: Wiley Interscience, 1971.

SAVIOLI, N. M. F.; FUKUSHIMA, R. S. Extração da lignina com o reagente brometo de acetila: influência da espécie forrageira, estádio de maturidade e parte da planta. **Revista Brasilera de Zootecnia**., v. 29, p. 1320-1332, 2000.

SEWALT, V. J. H.; OLIVEIRA, W.; GLASSER, W. G. Lignin impact on fibre degradation: a model study using cellulosic hydrogels. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 71, n. 2, p. 204-208, 1996.

SHARMA, H. S. S. Compositional analysis of neutral detergent, acid detergent, lignin and humus fractions of mushroom compost. **Thermochimica Acta**, Amsterdam, v. 285, n. 2, p. 211-220, 1996.

SHARMA, U.; BRILLOVET, J. M.; SCALBERT, A.; MONTIES, B. Studies on a brittle stem mutant of rice, Oriza sativa L., characterization of lignin fractions, associated phenolic acids and polysaccharides from rice stem. **Agronomie**, v. 6, p. 265-271, 1986.

SHENK, J. S.; WESTERHAUS, M. O.; HOOVER, M. R. Analysis of forages by infrared reflectance. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 62, n. 2, p. 807-812, 1979.

SHIMOJO, M.; GOTO, I. A study on the relation between disappearance of dry matter and acetyl bromide lignin of tropical grass. **Japanese Journal of Zootechnical Science**, Tokyo, v. 55, n. 3, p. 838, 1984.

SJOSTROM, E. **Wood chemistry, fundamentals and applications**. 2nd ed. New York, London: Academic Press, 1993.

SMITH, D. Yield and chemical composition of leaves and stems of alfalfa at intervals up shoots. **Journal of Agricultural and Food Chemistry,** v. 18, n. 4, p. 652-656, 1970.

SILVA, D. J.; QUEIROZ, A. C. Análise de alimentos. **Métodos químicos e biológicos.** 3. ed. Viçosa: UFV, 2002. 235 p.

THEANDER, O.; WESTERLUND, E. A. Studies on dietary fibre. 3. Improved procedures for analysis on dietary fibre**. Journal Agriculture Food Chemistry**., v. 34, p. 330-336, Mar-Apr. 1986.

TILLEY, J. M. A.; TERRY, R. A. A two-stage technique for the “in vitro” digestion of forage crops**. Journal British Grassland Society** , v. 18, p. 104, 1963.

VAN SOEST, P. J. Development of a comprehensive system of feed analysis and its application to forages. **Journal of Animal Science,** Albany, v. 26, n. 1, p. 119-128, 1967.

VAN SOEST, P. J. **Nutritional ecology of the ruminant**. 2nd. ed. Ithaca: Cornell University Press, 1994.

VAN SOEST, P. J. Use of detergents in the analysis of fibrous foods. II. A rapid method for the determination of fibre and lignin. **Journal of the AOAC**, Arlington, v. 46, n. 1, p. 829-835, 1963.

VAN SOEST, P. J. Use of detergents in the analysis of fibrous foods. II. A rapid method for the determination of fibre and lignin. **Journal Association of Analytical. Chemistry**., v. 46, p. 829-835, 1964.

VAN SOEST, P. J.; ROBERTS, J. B.; LEWIS, B. A. Methods for dietary fibre, neutral detergent fibre and non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition**. Journal of Dairy Science**., v. 74, p. 3583–3597, 1991.

VAN SOEST, P. J.; WINE, R. H. The determination of lignin and cellulose in acid-detergent fibre with permanganate. **Journal Association of Analytical. Chemistry**., v. 52, p. 780-785, 1968.

VAN SOEST, P. J.; WINE, R. H. Use of detergents in analysis of fibrous feeds. 4. Determination of plant cell-wall constituents. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v. 50, n. 1, p. 50-55, 1967.

WHITEHEAD, D. L.; QUICKE, G. V. A comparison of six methods of estimating lignin in grass hay. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 15, p. 417-422, 1964.