ALEJANDRO VARGAS VELÁSQUEZ

Comparação dos métodos lignina detergente ácido (LDA), lignina permanganato de potássio (LPer), lignina Klason (LK) e lignina brometo de acetila (LBA) na determinação do teor de lignina em plantas forrageiras e correlação com digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS)

PIRASSUNUNGA

2012

ALEJANDRO VARGAS VELÁSQUEZ

Comparação dos métodos lignina detergente ácido (LDA), lignina permanganato de potássio (LPer), lignina Klason (LK) e lignina brometo de acetila (LBA) na determinação do teor de lignina em plantas forrageiras e correlação com digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS)

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 título de Mestre em Ciências.

Departamento:

Nutrição e Produção Animal

Área de concentração:

Nutrição e Produção Animal

Orientador:

Prof. Dr. Romualdo Shigueo Fukushima

De acordo: _____

Orientador

Pirassununga

2013

Nº CLASSIFICAÇÃO
Nº TOMBO 033529

Obs: A versão original se encontra disponível na Biblioteca da FMVZ/USP

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.2691
FMVZ

Velásquez, Alejandro Vargas

Comparação dos métodos lignina detergente ácido (LDA), lignina permanganato de potássio (LPer), lignina Klason (LK) e lignina brometo de acetila (LBA) na determinação do teor de lignina em plantas forrageiras e correlação com digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS) / Alejandro Vargas Velásquez. -- 2012.
79 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Nutrição e Produção Animal, Pirassununga, 2013.

Programa de Pós-Graduação: Nutrição e Produção Animal.

Área de concentração: Nutrição e Produção Animal.

Orientadora: Prof. Dr. Romualdo Shiguelo Fukushima.

1. Lignina brometo de acetila. 2. Digestibilidade. 3. Forragens. 4. Lignina detergente ácido.
I. Título.

BIOÉTICA

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

PARECER

Interessado: **Alejandro Vargas Velásquez**

Assunto: **Protocolo de experimentação adotado em experimento animal**

A Comissão de Ética no uso de animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo analisou o projeto intitulado: "Comparação dos métodos lignina detergente ácido (LDA), lignina permanganato de potássio (LPer), lignina Klason (LK) e lignina brometo de acetila (LBA) para determinação *in vitro* da matéria seca (DIVMS)", protocolado sob o número 2826/2012, utilizando 3 (três) bovinos fistulados no rúmen, como doadores de líquido ruminal, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Romualdo Shigueo Fukushima, e constatou que o mesmo foi realizado de acordo com os princípios de ética adotados por esta Comissão.

São Paulo, 9 de novembro de 2012.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, nº87
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
São Paulo/SP – Brasil
05508-270

Fone: + 55 11 3091-7671/7676/0904
Fax: +55 11 3032-2224 / 3091-7757
E-mail: fmvz@usp.br
<http://www.fmvz.usp.br>

*Aos meus pais, Glória e Edgar, e a toda minha
família dedico esta obra com carinho. Pelo exemplo
e por me ensinar a atirar alto*

AGRADECIMENTOS

A minha mãe, por me ensinar o gosto pelo conhecimento.

Ao meu pai, por me ensinar que qualquer objetivo é atingível com trabalho.

A meus Tios, Álvaro e Hernán Dario, por sempre acreditar em mim e me apoiar.

Ao Professor Romualdo, pela oportunidade e a contribuição ao meu crescimento científico e intelectual.

Aos Professores do VNP, pelo conhecimento transmitido.

Aos funcionários do VNP, Dom Pedro, Simi, Arí, Gilson, João Paulo, Alessandra e Fabia que sempre estiveram prestes a ajudar e ensinar.

Aos meus colegas do VNP, pela convivência e amizade que permitem ser feliz longe de casa.

Ao Brasil, maravilhoso país cheio de oportunidades.

RESUMO

VELÁSQUEZ, A. V. **Comparação dos métodos lignina detergente ácido (LDA), lignina permanganato de potássio (LPer), lignina Klason (LK) e lignina brometo de acetila (LBA) na determinação do teor de lignina em plantas forrageiras e correlação com digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS).** [Comparison between acid detergent lignin (ADL), potassium permanganate lignin (PerL), Klason lignin (KL) and acetyl bromide lignin (ABL) methods, for the determination of lignin in forage plants, and correlation with *in vitro* digestibility (IVDM)]. 2013. 79 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

O desempenho animal pode ser melhorado pelo incremento na digestibilidade dos alimentos. Um dos elementos neste processo é a acurada caracterização da composição química. Objetivando avaliar quatro métodos para determinar o teor de lignina, foram estudadas cinco gramíneas: *Brachiaria brizantha* cv. Marandú, *Brachiaria brizantha* cv. Xaraés (MG-5), *Panicum maximum* cv. Mombaça, *Pennisetum purpureum* cv. Cameroon e *Pennisetum purpureum* cv. Napier. As frações fibrosas da parede celular (PC), fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA) aumentaram conforme as plantas amadureceram, refletindo as mudanças na composição dos componentes da parede celular (celulose, hemicelulose e lignina). Os valores de PC foram superiores aos da FDN indicando solubilização da pectina e outros oligossacarídeos da parede celular na solução de detergente neutro. O método LDA apresentou os menores teores de lignina, evidenciando a solubilização de parte da lignina na solução de detergente ácido. Os resultados de LPer foram maiores que os de LDA, que pode ser devido à oxidação da celulose e pectina pelo permanganato de potássio. Os teores de LK foram maiores que os de LDA possivelmente por contaminação protéica, mas, menores que os de LPer. Os teores de LBA foram maiores que os outros três métodos. A digestibilidade acompanhou, de forma inversa, o estágio de maturidade das plantas. A digestibilidade *in vitro* apresentou forte correlação negativa com os teores de lignina para todos os métodos, menos para LPer. Encontrou-se um valor de relação de 2,23, entre os métodos LDA e LBA, que, ao ser aplicado, nos teores de LDA, resultou em reta similar ao da LBA. Chama a atenção como este valor de 2,23 é muito próximo ao 2,4 utilizado nas equações B₂ e C das frações de carboidratos do “Cornell Net Carbohydrate & Protein System” e nas equações do National Research Council de 1996, para corrigir o teor de lignina. O método LBA é um método fácil e

conveniente para determinar a concentração de lignina em forrageiras e uma boa opção para uso rotineiro nas análises de laboratório.

Palavras-chave: Lignina brometo de acetila. Digestibilidade. Forragens. Lignina detergente ácido.

ABSTRACT

VELÁSQUEZ, A. V. **Comparison between acid detergent lignin (ADL), potassium permanganate lignin (PerL), Klason lignin (KL) and acetyl bromide lignin (ABL) methods, for the determination of lignin in forage plants, and correlation with *in vitro* digestibility (IVDM).** [Comparação dos métodos lignina detergente ácido (LDA), lignina permanganato de potássio (LPer), lignina Klason (LK) e lignina brometo de acetila (LBA) na determinação do teor de lignina em plantas forrageiras e correlação com digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS)]. 2013. 79 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Animal performance can be improved by enhancing feed digestibility. One of the elements for this process is an accurate characterization of feedstuff chemical composition. With the objective of evaluating four methods used today for lignin determination, five grasses were used: *Brachiaria brizantha* cv. Marandú, *Brachiaria brizantha* cv. Xaraés (MG-5), *Panicum maximum* cv. Mombaça, *Pennisetum purpureum* cv. Cameroon e *Pennisetum purpureum* cv. Napier, All fibrous fractions, neutral detergent fiber (NDF), acid detergent fiber (ADF) and cell wall (CW), increased as the plants matured, reflecting the changes in the CW composition (cellulose, hemicellulose and lignin). The values obtained for CW were higher than those obtained for NDF, indicating solubilization of pectin and other cell wall oligosaccharides in the neutral detergent solution. The ADL method produced the lowest lignin values, reflecting lignin solubilization by the acid detergent solution. PerL results were higher than those of ADL, possibly due to hemicellulose and pectin oxidation by potassium permanganate. The values for KL were higher than those of ADL, possibly due to protein contamination, but were lower than PerL values. ABL values were the highest among all methods. Digestibility inversely followed plant maturity throughout the study. *In vitro* dry matter digestibility showed high negative correlation with lignin contents. A 2,23 ratio between ADL and ABL methods was found, which when applied to ADL values, resulted in a curve similar to ABL method curve. It is interesting to note that, this value of 2,23 is very close to the 2,4 used in carbohydrate fractions B₂ and C of the “Cornell Net Carbohydrate & Protein System”, for the correction of lignin content. The ABL method is easy and convenient for total lignin content determination in forages.

Keywords: Acetyl bromide lignin. Digestibility. Forages. Acid detergent lignin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Distribuição dos componentes da parede celular vegetal	31
Figura 2 - Estrutura da lignina natural e sua forma acetilada após o tratamento com solução de brometo de acetila a 25%	37
Figura 3 - Teores de DIVMS (g/kg) para todas as espécies nos 7 estádios de maturidade	55
Figura 4 - Teores de lignina (g/kg) em <i>Brachiaria brizantha</i> cv. Marandú e erro padrão da média	56
Figura 5 - Teores de lignina (g/kg) em <i>Brachiaria brizantha</i> cv. Xaraés e erro padrão da média	56
Figura 6 - Teores de lignina (g/kg) em <i>Panicum maximum</i> cv. Mombaça e erro padrão da média	56
Figura 7 - Teores de lignina (g/kg) em <i>Pennisetum purpureum</i> cv. Cameroon e erro padrão da média	57
Figura 8 - Teores de lignina (g/kg) em <i>Pennisetum purpureum</i> cv. Napier e erro padrão da média	57
Figura 9 - Médias do teor de lignina (g/kg) e a digestibilidade <i>in vitro</i> da MS	59
Figura 10 - Dispersão dos teores de LBA, LDA, LK e LPer	62
Figura 11 - Dispersão dos teores de LBA, LDA e LDA*2.23	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição Bromatológica <i>Brachiaria brizantha</i> cv. Marandú. Médias nos 7 estádios de maturidade	43
Tabela 2 - Composição Bromatológica <i>Brachiaria brizantha</i> cv. Xaraés. Médias nos 7 estádios de maturidade	43
Tabela 3 - Composição Bromatológica <i>Panicum maximum</i> cv. Mombaça Médias nos 7 estádios de maturidade	44
Tabela 4 - Composição Bromatológica <i>Pennisetum purpureum</i> cv. Cameroon. Médias nos 7 estádios de maturidade	44
Tabela 5 - Composição Bromatológica <i>Pennisetum purpureum</i> cv. Napier. Médias nos 7 estádios de maturidade	45
Tabela 6 - Médias de FDN, FDNcp, PC, PCcp e FS nos 7 cortes de maturidade e o erro padrão da média	48
Tabela 7 - Teores de lignina em <i>Brachiaria brizantha</i> cv. Marandú. Média nos 7 estádios de maturidade	49
Tabela 8 - Teores de lignina em <i>Brachiaria brizantha</i> cv. Xaraés. Média nos 7 estádios de maturidade	50
Tabela 9 - Teores de lignina em <i>Panicum maximum</i> cv. Mombaça. Média nos 7 estádios de maturidade	50
Tabela 10 - Teores de lignina em <i>Pennisetum purpureum</i> cv. Cameroon. Média nos 7 estádios de maturidade	51
Tabela 11 - Teores de lignina em <i>Pennisetum purpureum</i> cv. Napier. Média nos 7 estádios de maturidade	51
Tabela 12 - Valores de digestibilidade in vitro da matéria seca (DIVMS). Média dos 7 cortes para cada espécie e erro padrão da média	58

Tabela 13 - Correlação entre a digestibilidade in vitro da matéria seca e os 4 métodos analíticos nas amostras de 5 espécies em 7 estádios de maturação	59

SUMÁRIO

1 INTRODUCCION	15
2 REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1 Parede celular	18
2.2 Carboidratos	20
2.2.1 Fibrosos	21
2.2.2 Não fibroso	23
2.3 O sistema detergente e as equações do “Cornell Net Carbohydrate & Protein System”	25
2.4 Lignina	29
2.4.1 Biossíntese	29
2.4.2 Composição	30
2.4.3 Importância da Lignina	31
2.4.4 Métodos para quantificar o conteúdo de lignina	34
3 MATERIAIS E MÉTODOS	39
3.1 Material Vegetal	39
3.2 Análises bromatológicas	39
3.3 Digestibilidade <i>in vitro</i>	41
3.4 Análises estatísticas	41
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
4.1 Composição química	42
4.2 Ligninas	49
4.3 Correlação entre digestibilidade <i>in vitro</i> e teor de lignina	57

4.4 Relação entre os teores de lignina	61
5 CONCLUSÕES	65
REFERÊNCIAS	66

1 INTRODUÇÃO

Os ruminantes são altamente dependentes de forragens para a obtenção de energia e grande parte desta energia está presente na parede celular vegetal. Entretanto, a utilização desta fonte de energia será limitada se substancial porção do alimento não é digerida e for excretada nas fezes. Desde 1988 a lignina tem sido considerado o fator primário limitante da degradação da parede celular ao constituir uma barreira física para o acesso dos microrganismos ruminais. O desempenho animal pode ser melhorado, incrementando a digestibilidade dos alimentos, parâmetro chave para qualidade dos mesmos. A digestibilidade dos alimentos pode ser melhorada com programas de seleção que permitam modificar a estrutura da parede celular e aumentar a disponibilidade relativa de energia para os microrganismos que habitam o trato gastrointestinal dos animais herbívoros (CASLER, 2001). O refinamento dos balanços nas dietas de bovinos é uma importante forma de otimizar a produção animal, mas para conseguir esse refinamento é necessário uma acurada caracterização da composição dos alimentos. Por isto, os alimentos são submetidos rotineiramente a análises químicas que permitam avaliar a qualidade nutricional e as propriedades nutritivas individuais de cada um deles.

A fibra é constituída por substâncias insolúveis, parcialmente digeríveis, que ocupam espaço no trato gastrointestinal dos animais (VAN SOEST, 1994; MERTENS, 1996). Os componentes solúveis dos alimentos difundem-se pela fase líquida do rúmen e, em geral, aumentam sua pressão osmótica e consequentemente retenção de líquidos, o que culmina em aumento de sua taxa de passagem (BERCHIELLI; PIRES; OLIVEIRA, 2011).

Na indústria de produção do etanol também existe interesse crescente na correta determinação dos componentes da fibra. A principal forma de produção de etanol a partir de biomassa celulósica baseia-se na conversão de glucose, provindo da celulose, a etanol por meio de leveduras (SUN; CHENG, 2002). As tecnologias mais atuais também incluem a conversão de polissacarídeos hemicelulósicos e pécnicos a etanol, na procura de maior eficiência no sistema. Esta tecnologia é geralmente

denominada de etanol de segunda geração. A mensuração acurada destes polissacarídeos da parede celular é necessária para determinar a eficiência do sistema e identificar cultivares superiores para produção de combustível. Devido à constatação de que a lignina presente na parede celular limita a disponibilidade destes polissacarídeos para a quebra enzimática (MANSFIELD; MOONEY; SADDLER, 1999), sua correta quantificação é de importância para a indústria de biocombustíveis.

A lignina é um polímero fenólico complexo presente na parede celular das plantas. A lignificação da parede celular vegetal é o processo bioquímico no qual se forma este complexo denominado lignina (SARKANEN; LUDWIG, 1971). Do ponto de vista funcional, as ligninas conferem força à parede celular, facilitam o transporte de água e impedem a degradação dos carboidratos da parede celular, atuando assim como uma importante linha de defesa contra patógenos, insetos e outros herbívoros. O principal papel da lignina é o de dar sustentação à planta.

Há mais de 50 anos, sabe-se que suas unidades fenólicas são derivadas de três álcoois cinâmicos: p-coumaril, coniferil e sinapil (SARKANEN; LUDWIG, 1971). Para conhecer sua função exata e os mecanismos que estão envolvidos na inibição da digestão dos carboidratos estruturais da parede celular, a determinação da quantidade de lignina é fundamental. Existem vários procedimentos analíticos para a determinação do teor de lignina, porém, estes procedimentos regra geral produzem resultados conflitantes. Os procedimentos mais comumente utilizados podem ser classificados dentro de duas categorias: aqueles que removem os constituintes da parede celular exceto a lignina e aqueles que oxidam o polímero de lignina tirando-o da estrutura da parede celular.

Na primeira categoria, o resultado é um resíduo ácido, insolúvel (lignina), após solubilização/hidrólise em ácido sulfúrico dos polissacarídeos da parede celular, como no caso da lignina detergente ácido (LDA) e a lignina Klason (LK) (VAN SOEST, 1963b). Entretanto, os resultados obtidos por estes métodos podem estar subestimados por causa da solubilização parcial da lignina na solução de detergente ácido (KONDO, MIZUNO; KATO, 1987) ou na solução de ácido sulfúrico 72% (HATFIELD et al., 1994). Na segunda categoria, a lignina pode ser determinada por diferença após a reação com um agente oxidante como o permanganato de

potássio. Este procedimento não utiliza reagentes tão corrosivos quanto o ácido sulfúrico 72%, porém, o permanganato pode oxidar também outras substâncias fenólicas insaturadas (taninos, pigmentos, proteínas) que não são completamente removidas durante a obtenção da preparação fibrosa (tratamento com solução de detergente ácido), e são mensurados como sendo lignina (VANSOEST; WINE, 1968).

Um método alternativo para a quantificação do conteúdo de lignina em madeiras (JOHNSON; MOORE, 1961) e em forragens (MORRISON, 1972) foi proposto, e se baseia na solubilização da lignina numa solução a 25% de brometo de acetila em ácido acético glacial para posteriormente calcular a concentração da lignina por meio da técnica de espectrofotometria na região UV à 280 nm. Alguns métodos não invasivos como NIRS (near infrared spectroscopy) e NMR (nuclear magnetic resonance spectroscopy) têm sido utilizados com o intuito de caracterizar a molécula em seus diferentes componentes, mas seu uso não é generalizado devido a algumas desvantagens tais como o alto custo dos equipamentos e a complexidade dos procedimentos. Apesar dos vários métodos disponíveis, nenhum poderia ser considerado como método padrão para todo tipo de materiais. Com o crescente interesse na alteração da quantidade e composição da lignina, visando maior eficiência em termos de digestibilidade de forragens e obtenção de polpa celulósica para as indústrias de papel, surge a pergunta, qual seria o método mais indicado para a mensuração de lignina? Esta escolha deve ser feita com base na precisão do método, principalmente, a facilidade e tempo de análise e o custo por amostra, entre outros fatores. O objetivo deste estudo foi avaliar os métodos LDA, LPer e LK para determinar lignina em plantas forrageiras e comparar estes resultados contra os obtidos pelo método lignina brometo de acetila (LBA). A hipótese do estudo foi que o método LBA teria maior precisão nos resultados ao compara-lo contra os outros métodos testados.

2 REVISÃO DE LITERATURA

A revisão aborda tópicos relativos aos quatro métodos analíticos, lignina brometo de acetila, lignina detergente ácido, lignina Klason e lignina permanganato de potássio, assim como a correlação dos métodos com a digestibilidade *in vitro* da matéria seca.

2.1 PAREDE CELULAR

A correta estimativa da concentração de parede celular (PC) contida em uma forragem é de vital importância devido à grande participação da mesma, entre 25% a 80%, na matéria seca. O conteúdo de PC está correlacionado com o consumo e a digestibilidade das forragens, mais ou menos 50% desta fração é prontamente digerida pelo animal, assim, a parede celular é um fator regulador da qualidade das forragens (BUXTON; HORNSTEIN, 1986; PATERSON et al., 1994).

O valor nutritivo das plantas forrageiras é determinado pela sua composição química, principalmente pelos teores de proteína bruta (PB) e dos componentes da parede celular, responsáveis diretos pela digestibilidade da matéria seca (EUCLIDES; FIGUEIREDO; EUCLIDES, 1995; NUSSIO; MANZANO; PEDREIRA, 1998). A qualidade da forrageira, segundo Hatfield (1992), está relacionada com a deposição de parede celular, o teor de carboidratos estruturais e a composição destes. Van Soest (1994), classificou os polissacarídeos associados à parede celular das plantas em dois grupos, segundo suas associações biológicas e a disponibilidade nutricional. O primeiro grupo, dos carboidratos não estruturais, foram os polissacarídeos que não apresentavam ligações covalentes à matriz lignificada e portanto eram mais solúveis e completamente fermentescíveis no rúmen, e o segundo grupo, dos carboidratos estruturais, eram aqueles que apresentavam alguma ligação covalente à matriz lignificada e portanto, eram parcial ou totalmente indigestíveis.

Os principais polissacarídeos estruturais da PC são a celulose e a hemicelulose (PATERSON; BELYEA; BOWMAN et al., 1998) e estes aumentam sua participação na composição da PC à medida que a planta amadurece. A parede celular é um dos principais responsáveis pela redução na degradabilidade dos tecidos das hastes de plantas forrageiras (JUNG; ENGELS, 2002), devido à deposição crescente de lignina enquanto estas amadurecem (ALBRECHT; WEDIN; BUXTON, 1987), e segue concentração decrescente da base até o topo da planta (SMITH, 1970; BUXTON; HORNSTEIN, 1986). Este aumento no conteúdo de lignina resulta do espessamento das paredes primária e secundária, 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 intensidade (NELSON; MOSER, 1994) devido a que estas não participam na sustentação da planta.

Os métodos utilizados para a estimativa da fibra e concentração de lignina são baseados na extração dos componentes solúveis, a proteína e outros materiais, como minerais. Muitos estudos sobre o desenvolvimento de métodos para isolamento dos componentes da parede celular têm sido publicados (SHARMA, 1996) e, segundo Van Soest e Wine (1967), estes métodos permitem um meio conveniente para estudar as proporções dos componentes da fibra. Entre os métodos mais utilizados, destacam-se a fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA) que foram propostos pelos autores (VAN SOEST, 1967; VAN SOEST; WINE, 1967), e são até hoje, referência nas análises de composição química de forragens e resíduos da agroindústria.

A FDN representa o conteúdo de celulose, hemicelulose, lignina, proteína e cinzas da parede celular das plantas, enquanto que a FDA é essencialmente celulose, lignina e cinzas insolúveis em detergente ácido (SHARMA, 1996). A FDN é extraída após solubilização do conteúdo celular em solução neutra (pH 7) de lauril sulfato de sódio, o que resulta em um resíduo fibroso com os principais componentes da parede celular. Este procedimento é uma extração não hidrolítica que recupera a matriz insolúvel. Os contaminantes comumente encontrados nesta preparação fibrosa são amido, queratina (quando se usam produtos de origem animal) e minerais. O amido é eliminado pelo pré-tratamento, ou tratamento concomitante com amilases (VAN SOEST; ROBERTSON; LEWIS, 1991). Se o amido não é removido

ocasiona dificuldade na filtragem, o que incrementa a chance de erros durante a análise. Atualmente, há disponibilidade comercial de amilases termo resistentes específicas que hidrolisam o amido a oligossacarídeos, e em combinação com uréia conseguem atacar os amidos mais resistentes e insolúveis (VAN SOEST, 1994).

A FDA é obtida através da extração do material vegetal com soluções ácidas fortes de detergentes quaternários (brometo cetil trimetil amônio) O resíduo resultante é comumente usado na estimativa sequencial de lignina, cutina, celulose, nitrogênio indigestível e sílica (VAN SOEST, 1994). Por este motivo, o uso da FDA como preditor da digestibilidade não teria nenhuma base teórica e só encontraria suporte nas associações estatísticas.

Mais recentemente, Queiroz et al. (2008), propuseram a preparação fibrosa chamada de parede celular, (PC), que melhor refletiria a matriz da parede celular vegetal em sua totalidade. Isto devido que na PC se preservam a pectina e outros polissacarídeos, como (β -glucanos, galactanos e gomas), que são dissolvidos pela solução de detergente neutro (HALL; HOOVER; JENNINGS, 1999).

2.2 CARBOIDRATOS

Em vários países do mundo, mas especialmente no Brasil, as pastagens constituem uma importante fonte de energia para os ruminantes. Por isso torna-se necessário o estudo e caracterização minuciosa dos carboidratos já que são importantes fontes de energia do planeta para as diversas espécies. Os carboidratos são as substâncias orgânicas mais abundantes da biosfera e constituem a principal fonte de energia para os primeiros níveis tróficos da cadeia alimentar (LEHNINGER; NELSON; COX, 1993). Estes compostos se distribuem amplamente entre plantas e animais, e grosseiramente, podem ser classificados em carboidratos fibrosos e carboidratos não fibrosos. De outra forma, podem ser divididos em carboidratos estruturais, aqueles que participam na sustentação da planta, e carboidratos não estruturais, aqueles que se encontram dissolvidos no citoplasma das células vegetais. Nas plantas, os carboidratos são produzidos durante a fotossíntese e

podem ter diversas funções dentro da delas. Alguns, como o amido cumprem funções de reserva energética enquanto outros como a celulose e a hemicelulose participam diretamente no aparato de sustentação da planta.

2.2.1 Carboidratos Fibrosos

Entre os animais, são os herbívoros, os que apresentam maior eficiência na utilização da energia potencial química contida nas fontes de carboidratos fibrosos, o que confere aos ruminantes domésticos papéis de importância destacada na alimentação da humanidade (HOFMANN; RIES, 1988; VAN SOEST, 1994; CHURCH; HELMER; FITZGERALD et al., 1998). Os carboidratos fibrosos são aqueles que constituem a parede celular vegetal e representam as principais fontes de energia disponível para a alimentação de herbívoros. A vantagem digestiva dos ruminantes surge da capacidade para degradar estes carboidratos fibrosos por meio de enzimas microbianas no rúmen e no intestino grosso, o que disponibiliza a energia contida neles para o animal que os consome. Os animais não-ruminantes, ao não possuírem rúmen, não podem degradar estes compostos energéticos com suas enzimas tissulares. Além do aporte energético, estes materiais fibrosos tem uma importante função no trato gastrointestinal dos animais ao formar uma matriz que serve como “lastro” da digesta.

Os carboidratos fibroso não são, de forma geral, materiais com características nutricionais, químicas ou físicas bem definidas (VAN SOEST; ROBERTSON; LEWIS, 1991). Estes apresentam ligações químicas com outras moléculas, como por exemplo, a lignina o que lhes confere vários graus de complexidade. Segundo Dehority, Conrad e Johnson (1962), a molécula de lignina esta intimamente associada aos carboidratos fibrosos da parede celular, e é por isso que inibe acentuadamente a digestão da fibra por formar uma barreira física que impede o acesso das enzimas microbianas. À medida em que a planta amadurece, a relação folha/caule diminui o que resulta em diminuição dos componentes potencialmente digestíveis (carboidratos solúveis, proteína, etc.) e em aumento nas concentrações de celulose, hemicelulose e lignina, fenômeno que implica menor digestibilidade da

matéria seca (EUCLIDES; FIGUEIREDO; EUCLIDES,1995). Fisher, Burns e Pond (1989), introduziram o conceito de índice de fermentabilidade área-superfície, para o qual levaram em consideração algumas variações na espessura da parede entre células e área superficial para digestão. Wilson e Merterns (1995), expandiram este conceito e acrescentaram que, nas células com fibras lignificadas, a parede potencialmente digestível poderá ser acessada somente através do lúmen e não da superfície externa da célula. Esta hipótese de Wilson e Mertens (1995) relata a ação de bactérias sobre a digestão da parede celular, mas, realçam a atenção sobre a alta população de fungos anaeróbicos no rúmen que podem ter uma melhor capacidade para se fixar na parede secundária por meio de “ganchos” (HO; ABDULLAH; JALALUDIN, 1988) e ao romper a parede, reduziriam algumas das limitações físicas que esta impõe à digestão.

Na parede celular dos tecidos vasculares das plantas, as microfibras de celulose localizam-se em uma matriz amorfa de hemicelulose e lignina. A junção destes três polímeros, que se ligam entre si por forças não covalentes e ligações covalentes, se conhece como lignocelulose e pode representar 90% ou mais, do peso da parede celular vegetal. A proporção de cada um dos polímeros varia com a espécie, a idade da planta, e entre 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 molécula de celulose é constituída por unidades de D-glicose unidas por ligações tipo β -1, 4 glicosídicas, altamente organizadas, o que confere a este polímero suas características estruturais e que, dependendo do grau de ordenamento das fibras, dificulta substancialmente a hidrólise deste polímero. O grau de ordenamento das fibrilas (estrutura cristalina) aparenta ter um papel mais determinante do que a existência de ligações β -1, 4, na resistência desta molécula à hidrólise bacteriana. Os autores, (CARPITA; GIBEAUT, 1993), observaram que as regiões que apresentam estruturas menos ordenadas (amorfas) seriam mais susceptíveis à ação de enzimas bacterianas e, portanto, mais susceptíveis à hidrólise. Van Soest (1994), observou que considerar a molécula de celulose como um β -glucano puro, não permitiria entender a ampla gama de características naturais que apresenta este composto, que na maioria dos casos encontra-se unido à hemicelulose e lignina. A simplicidade dos métodos gravimétricos auxilia na adoção na rotina laboratorial,

mesmo que estes métodos não revelam muito sobre o material isolado. Esta situação é tolerável quando se trabalha com fibras que sejam bem conhecidas, como das leguminosas e das gramíneas de uso rotineiro na produção animal, porém, para materiais cujas características não estejam completamente esclarecidas, esta situação é insatisfatória e pode conduzir a erros.

Várias alternativas têm sido propostas para explicar as variações no valor nutritivo da celulose. A mais aceita é que este valor está regulado negativamente pela relação lignina:celulose. O maior contraste é entre o algodão e as celuloses vegetais, os quais são não lignificados e em teoria totalmente digestíveis, porém apresentam taxas de digestão muito variáveis (VAN SOEST, 1994). A celulose pura, como β -glucano cristalino, é raridade na natureza e só se encontra em fibras altamente especializadas, por exemplo, no algodão.

A hemicelulose é uma macromolécula, que apresenta menor peso molecular do que a celulose, e é formada por diversos tipos de açúcares como hexoses, pentoses, ácidos urônicos, etc. Segundo o material que a compõe, esta pode ser classificada como xilana, manana, arabinoxilana, arabinogalactana ou arabana. Em vários resíduos agroindustriais, utilizados na alimentação animal, e em madeiras duras a hemicelulose apresenta alto conteúdo de xilanas unidas por ligações β -1, 4, com ramificações a outros carboidratos (PEREIRA JR, 1999).

2.2.2 Carboidratos Não Fibrosos

Os carboidratos não fibrosos são aqueles que se encontram solúveis no conteúdo celular, tais como açúcares simples, e estão constituídos principalmente por monossacarídeos, dissacarídeos e oligossacarídeos. Estes, ao contrário dos carboidratos fibrosos são rapidamente degradados pelos microrganismos ruminais. Entre os monossacarídeos encontram-se a glicose, frutose, galactose, manose, xilose, ramnose, arabinose, entre outros. Estas moléculas simples juntam-se para dar origem a dissacarídeos, oligossacarídeos e polissacarídeos como a sacarose,

rafinose, estaquiose, β -glucanos, etc. (FIGUEIREDO-RIBEIRO; DIETRICH; CHU et al., 1988).

O amido e a pectina têm sido considerados como os principais polissacarídeos não fibrosos (MOORE; HATFIELD, 1994), muito embora exista controvérsia sobre a inclusão da pectina neste grupo. Considerando a pectina como o cimento entre as lamelas, e entre as paredes primária e secundária da parede celular, não é possível negar a função estrutural que ela desempenha. Por outro lado, similarmente ao amido, a pectina apresenta elevada taxa de degradação ruminal, porém, menor que a dos carboidratos solúveis. Devido a sua alta e rápida digestibilidade, a pectina tem sido classificada como carboidrato não fibroso e desta forma alocada junto aos carboidratos solúveis do conteúdo celular (VANSOEST, ROBERTSON *et al.*, 1991). Em comparação, a celulose e a hemicelulose que cumprem funções estruturais, apresentam menor potencial para degradação ruminal do que a pectina, mesmo em tempo limitado de incubação (BUXTON; BRASCHE, 1991). Alguns subprodutos da agroindústria são particularmente ricos em pectina e existe um crescente interesse por compreender melhor esta complexa molécula.

Como a celulose, a hemicelulose e a lignina, a pectina não é degradada pelas enzimas animais (VANSOEST, ROBERTSON; LEWIS, 1991; HALL, 1997). 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).

Os principais componentes das pectinas são o ácido galacturônico, que forma homopolímeros compostos por α -(1 - 4)-D-ácido galacturônico, e as ramnogalacturanas (também conhecidas como ácido poligalacturônico), que são heteropolímeros constituídos por α -(1 - 2)-L-ramnose- α -(1 - 4)-D-ácido galacturônico (SALISBURY E ROSS, 1991). Além do ácido galacturônico, galactose e ramnose, as moléculas de pectina podem ser constituídas por glicose, xilose e arabinose (LEWIS E CORNELL, 1993). A constituição em açúcares das moléculas de pectina é variável (BEN-GHEDALIA; YOUSEF; MIRON, 1989) e os diversos açúcares podem estar ligados entre si por até 20 tipos de ligações covalentes diferentes, o que torna o estudo tridimensional desta molécula bastante difícil

(HATFIELD; WEIMER, 1995). Não foi demonstrada nenhuma ligação covalente entre a pectina e a lignina, mesmo com o avanço da maturidade do vegetal (HALL; CORNELL, 1994), e segundo Van Soest (1994), a ausência destas ligações da pectina com matriz lignificada é comprovada pela fácil solubilização na solução de detergente neutro.

O amido é o polissacarídeo mais importante no mundo já que fornece entre 70% a 80% das calorias consumidas pelos humanos. Independentemente da sua fonte de origem, é tradicionalmente empregado nas indústrias alimentícias, metalúrgica, de mineração, de construção, cosmética, farmacêutica, de papel e papelão, têxtil, etc. (CEREDA; SARMENTO; WOSIACKI et al., 1989). Este composto se deposita nos órgãos de reserva das plantas (grãos, tubérculos e raízes) e constitui-se em grânulos compactos de amilose e amilopectina (CEREDA; SARMENTO; WOSIACKI et al., 1989). O amido é formado por numerosas moléculas de glicose unidas linearmente entre si por ligações α -1, 4, e por algumas ligações α -1,6 que são pontos de ramificação. A hidrólise total deste composto libera moléculas de glicose, enquanto sua hidrólise parcial produz moléculas de dextrina e maltose (PANDEY; SOCCOL; NIGAM et al., 2000).

As duas enzimas que hidrolisam o amido são a α e β amilase. Alpha amilase, cliva as cadeias de amido aleatoriamente e degrada tanto amilose quanto amilopectina. Beta amilase cliva as unidades finais das cadeias de amido e degrada amilose, porém sua atividade contra amilopectina esta limitada as cadeias laterais.

2.3 O SISTEMA DETERGENTE E AS EQUAÇÕES DO “CORNELL NET CARBOHYDRATE & PROTEIN SYSTEM”

Para garantir o máximo aproveitamento dos nutrientes contidos nas plantas forrageiras, estas devem ser cuidadosamente avaliadas quanto ao seu valor nutritivo. Estes nutrientes podem ser aproveitados pelos ruminantes e transformados em produtos para o consumo humano. Vários métodos e sistemas têm sido

desenvolvidos ao longo dos séculos XX e XXI para a avaliação e mensuração destas propriedades nutritivas das plantas forrageiras.

Até os anos 60, o sistema Proximal, também conhecido como Sistema Weende ou fibra bruta, foi o mais utilizado para caracterizar os carboidratos estruturais. Na década de 60, pesquisadores da Cornell University, liderados pelo Professor Peter J. Van Soest, propuseram a caracterização das plantas forrageiras em uma porção solúvel e uma insolúvel em detergentes. Isto devido ao fato que o sistema Weende apresentou-se insatisfatório ao longo do tempo, por não reconhecer as diversas frações de carboidratos, nem as diferentes características de solubilidade e degradação entre eles, além de erros associados à metodologia (VAN SOEST, 1994). No sistema de detergentes da Cornell University, utiliza-se o cetiltrimetil amônio brometo para obter o resíduo insolúvel denominado fibra em detergente ácido (FDA) (VANSOEST, 1963a), e utiliza-se o lauril sulfato de sódio para obter o resíduo insolúvel denominado fibra em detergente neutro (FDN) (VAN SOEST, 1967).

A FDN, como já mencionado anteriormente, é composta por celulose, hemicelulose e lignina, e é utilizada amplamente na nutrição de ruminantes para diversas finalidades, entre elas a formulação de rações, estimativas de consumo e avaliação do conteúdo energético de forragens. A importância desta fração fibrosa foi relatada por (MERTENS, 1994), ao apontar que, a FDN tem grande efeito sobre o consumo voluntário de alimento oferecido aos animais, especialmente nos ruminantes. Esta conceituação de que a FDN é representativa da parede celular vegetal, é debatida por alguns pesquisadores, uma vez que a solução de detergente neutro solubiliza a pectina e outros oligossacarídeos, eliminando-as na fração solúvel. Ao contrário da FDN, a preparação parede celular (PC) proposta por Fukushima e Hatfield (2001), mantém praticamente íntegra a parede celular vegetal.

A FDA é usada principalmente como substrato para as determinações do teor de lignina pelos métodos gravimétricos de lignina detergente ácido (VAN SOEST, 1963b) e lignina permanganato de potássio (VAN SOEST; WINE, 1968). A FDA, pelo fato de ser composta essencialmente por celulose e lignina pode ser utilizada para determinar o conteúdo de hemicelulose (HCL), empregando a diferença aritmética: $FDN - FDA = HCL$. Porém, não é raro observar valores negativos ao utilizar a

formula supracitada, especialmente em alimentos ricos em pectina (VAN SOEST; ROBERTSON; LEWIS, 1991) ou em leguminosas pelo alto conteúdo de proteínas (VAN SOEST, 1994).

Devido à incapacidade do sistema detergente para reconhecer as diversas frações de carboidratos, com diferentes solubilidades e características de degradação distintas, foi proposto o “Cornell Net Carbohydrate & Protein System” (CNCPS) (FOX; SNIFFEN; O’CONNOR et al., 1992; RUSSELL; O’CONNOR; FOX et al., 1992; SNIFFEN; O’CONNOR; VAN SOEST et al., 1992). Este sistema utiliza equações para estimar a digestão e passagem das diversas frações de carboidratos e proteína considerando a dinâmica ruminal. As equações do CNCPS dividem o ecossistema ruminal em microrganismos que fermentam carboidratos estruturais (aqueles contidos na parede celular) e em microrganismos que fermentam carboidratos não estruturais (amido, pectina, açúcares, etc.). A concentração destes carboidratos afetará diretamente a produção de proteína microbiana (RUSSELL; O’CONNOR; FOX et al., 1992). No nível dois do CNCPS, os carboidratos totais são fracionados em estruturais e não estruturais, e o conteúdo é calculado a partir de dados de FDN, corrigidos para teores de cinzas e proteína (FOX; SNIFFEN; O’CONNOR et al., 1992). O fracionamento de carboidratos e proteínas é uma das melhores ferramentas para maximizar a eficiência microbiana, já que as fontes de carboidratos aportam energia e esqueletos carbônicos para os microrganismos ruminais, enquanto a proteína é fonte de nitrogênio (COELHO DA SILVA; LEÃO, 1979). Segundo Nocek, Russell e Fallon et al. (1988), taxa de digestão do alimento no rúmen e, particularmente, o sincronismo entre a taxa de digestão das proteínas e dos carboidratos pode ter importante efeito sobre os produtos finais da fermentação e, conseqüentemente, sobre a produção animal. Portanto, é de crucial importância a correta avaliação das frações de carboidratos e detalhada caracterização deles.

Para estimar o conteúdo de carboidratos totais (CHO) utiliza-se a fórmula:

$$\text{CHO (MS\%)} = 100 - [\text{PB (MS\%)} + \text{EE (MS\%)} + \text{MM (MS\%)} + \text{Lig (MS\%)}]$$

(Fukushima – informação pessoal)

E dentro dos carboidratos totais, Sniffen e O’Connor et al. (1992) propuseram quatro frações de carboidratos com base na taxa de degradação ruminal e na

disponibilidade dos nutrientes de cada fração. As frações, com base no teor de CHO, são: A, B₁, B₂ e C.

A fração A, é composta principalmente pelos carboidratos solúveis e é rapidamente degradada no rúmen.

$$A \text{ (CHO\%)} = [100 - \text{amido (CNE\%)}] \times [100 - B_2 - C] / 100$$

O conteúdo de amido calcula-se em base nos carboidratos não-estruturais (CNE), que são solúveis em solução de detergente neutro, e constituem principalmente as frações A e B₁.

$$\text{CNE (MS\%)} = 100 - [\text{PB (MS\%)} + \text{FDNcp (MS\%)} + \text{EE (MS\%)} + \text{MM (MS\%)}]$$

A fração B₁ apresenta taxa de degradação maior que a sua taxa de passagem, e é composta por amido e pectina.

$$B_1 \text{ (CHO\%)} = \text{amido (CNE\%)} \times [100 - B_2 - C] / 100$$

A fração B₂ está ligada à parede celular vegetal e apresenta disponibilidade ruminal lenta, e portanto sua extensão e degradação pode ser afetada pela taxa de passagem. É composta pelos carboidratos estruturais da parede celular.

$$B_2 \text{ (CHO\%)} = 100 \times [\text{FDNcp (MS\%)} - \text{PBFDN (PB\%)} \times 0,01 \times \text{PB (MS\%)} - \text{FDNcp (MS\%)} \times 0,01 \times \text{lignina (FDNcp\%)} \times 2,4] / \text{CHO (MS\%)}$$

A fração C é composta pela lignina e outros componentes indisponíveis da parede celular.

$$C \text{ (CHO\%)} = 100 \times [\text{FDNcp (MS\%)} \times 0,01 \times \text{lignina (FDNcp\%)} \times 2,4] / \text{CHO (MS\%)}$$

Tanto a equação B₂ como a equação C do CNCPS, expressa o conteúdo de lignina com base na FDN livre de cinzas e proteína (FDNcp), e este valor é multiplicado por um fator de correção de 2,4, originado a partir de um estudo de Chandler e Jewell et al. (1980). Neste estudo, Chandler e Jewell et al. (1980), fermentaram alguns materiais lignocelulósicos (incluindo fezes de animais herbívoros) por 90 ou 120 dias, e após este longo período de incubação, observaram que o teor de carboidratos recalcitrantes à degradação foi de, na média, 2,4 vezes o teor de lignina.

Queiroz e Fukushima et al. (2008), questionaram a inclusão da pectina na fração B₁ do CNCPS e a colocaram na fração A, junto aos carboidratos solúveis da parede celular, também denominados fibra solúvel (FS), e então, propuseram que esta fração fosse composta exclusivamente pelo amido.

$$B_1 \text{ (CHO\%)} = \text{amido (MS\%)} / \text{CHO}$$

Ao mesmo tempo sugeriram a criação de uma nova equação para alojar a pectina, que na realidade engloba outros oligossacarídeos solúveis na solução de detergente neutro, tais como β -glucanos, fructosanas, gomas, etc., conceitualmente denominada de fibra solúvel (FS). Esta equação emprega os resultados dos métodos para determinar o teor de fibra.

$$B_2 \text{ (CHO\%)} = (\text{PCcp} - \text{FDNcp}) / \text{CHO}$$

Neste mesmo trabalho, também propuseram uma equação simplificada da equação C do CNCPS, na qual o conteúdo de lignina é expresso com base na matéria seca, ao invés de FDN livre de cinzas e proteína (FDNcp), com os mesmos resultados.

$$C \text{ (CHO\%)} = 100 \times [\text{lignina (MS\%)} \times 2,4] / \text{CHO (MS\%)}$$

As três equações propostas pelos autores supracitados são menos laboriosas do que suas contrapartes do CNCPS, e a preparação fibrosa FDN é usada para se estimar o teor de FS.

2.4 LIGNINA

2.4.1 Biossíntese

A lignina é sintetizada nas estruturas vasculares das plantas por meio de uma série de reações em cadeia que começam com CO₂ e H₂O e originam o ácido shikímico, que posteriormente, é convertido em L-fenilalanina (SARKANEN; LUDWIG, 1971). A fenilalanina via a fenilalanina amônia-liase, enzima reguladora do metabolismo

fenólico nas células vegetais, é convertida em ácido cinâmico, que é precursor do ácido p-coumárico (CAMM; TOWERS, 1973). O ácido p-coumárico, pela ação de enzimas específicas, produz os outros dois componentes mais comuns da lignina, os ácidos ferúlico e sinápico. Finalmente, uma polimerização enzimática destas unidades fenilpropanóides 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 ácido cinâmico em ácido p-coumárico é um passo opcional em gramíneas já que estas espécies vegetais são as únicas que conseguem utilizar outro amino ácido aromático, diferente da fenilalanina, para confeccionar a lignina. Numa reação catalisada pela enzima tirosina amônia-liase, a L-tirosina é convertida em ácido p-coumárico, fornecendo assim substrato para lignificação (HIGUCHI; ITO; KAWAMURA, 1967).

2.4.2 Composição

Como foi mencionado anteriormente, a lignina é um polímero fenólico resistente à hidrólise química e enzimática no rúmen. Sua principal função é a de suporte e sustentação da planta. Ela age como substância cimentante dos polissacarídeos da parede celular, porém, também confere resistência mecânica e proteção contra agentes patógenos externos, tanto química quanto fisicamente (HIGUCHI, 1980). Algumas características da lignina, como sua complexa estrutura e tamanho não definido, a insolubilidade em diversos solventes e a resistência a várias substâncias hidrolíticas dificultam o isolamento deste polímero.

A molécula de lignina apresenta uma estrutura condensada com ligações covalentes carbono-carbono e ligações do tipo éter, que são ligações químicas consideradas fortes, o que explica a resistência deste polímero à ação hidrolítica dos ácidos e álcalis, que por sua vez retarda o desenvolvimento de técnicas laboratoriais para quantificar este composto (VAN SOEST, 1967).

Depois da celulose, a lignina é o polímero orgânico mais abundante no planeta e por isto têm recebido especial interesse de grupos de pesquisa ao redor do mundo. Para atender a sua função de proteção contra ataques bacterianos, especialmente durante a fase de crescimento da planta, a molécula de lignina associa-se estreitamente com os carboidratos da parede celular formando um revestimento protetor sobre a estrutura de celulose-hemicelulose na célula vegetal (NUNES, 1998).

Os pesquisadores têm desenvolvido vários programas que visam o aumento da digestão da parede celular por meio da criação de genótipos com menor teor de lignina, ou mudança na composição da parede celular por meio de engenharia genética (exemplo: menor ligação-éster fenólica), ou pela criação de microrganismos ruminais geneticamente modificados que tenham maior atividade celulolítica ou que possuam enzimas esterase fenólicas (BERCHIELLI; PIRES; OLIVEIRA, 2011).

Figura 3 – Distribuição dos componentes da parede celular vegetal

Fonte: VELÁSQUEZ, 2012

Na figura 1, observa-se a disposição dos componentes da parede celular. Enquanto a lignina envolve as estruturas da parede celular, as fibras de hemicelulose se entrecruzam com as fibrilas de celulose que compõem a parede. Os grânulos de amido estão distribuídos entre as fibras da parede celular, sendo que, encontram-se em maior quantidade na parede celular de leguminosas do que de gramíneas.

2.4.3 Importância da Lignina

Jung e Deetz (1993) citaram 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 elucidados. Por exemplo, quando as gramíneas apresentam menores concentrações de lignina do que as leguminosas, a inibição à degradação é a mesma (MOWAT; KWAIN; WINCH, 1969). Outro exemplo reside na constatação de que em forrageiras jovens um pequeno acréscimo na concentração de lignina acarreta em significativo efeito negativo na digestibilidade, enquanto que nas forrageiras maduras, que possuem elevados teores de lignina, aumento na concentração de lignina resulta em pequenos decréscimos na digestibilidade (JUNG; VOGEL, 1986). Para o mesmo autor, a relação entre a lignina e a digestibilidade da parede celular não é linear, e sim curvilínea ou possivelmente quadrática, onde os efeitos inibitórios da lignina sobre a digestibilidade são mais intensos em baixas concentrações, quando a planta forrageira ainda é imatura, e conforme a forrageira amadurece, os efeitos deletérios são diminuídos proporcionalmente, ainda que a concentração de lignina aumente. Deve-se também considerar o arranjo espacial da lignina na parede celular, uma vez que a lignina de leguminosas tende a apresentar-se mais condensada (GORDON, 1975). Em gramíneas, quando os microrganismos têm acesso à parede secundária, como em casos em que a estrutura dos tecidos lignificados é destruída pelo isolamento ou a moagem, a digestão não sofre nenhum impedimento da lignificação. A situação é diferente porque a lignina está mais confinada no xilema e as células tubulares, e não se dissemina através dos diferentes tecidos como em gramíneas (WILSON; MERTENS, 1995). Segundo Van Soest (1994), as ligninas possuem diferenças em suas composições de ácidos fenólicos. Por exemplo, nas observações de Fukushima e Hatfield (2004), a lignina de madeiras duras apresentou proporções variáveis dos núcleos coniferíficos e sinapílicos, enquanto que as gramíneas possuem, além destes núcleos, unidades p-coumarílicas. As observações destes autores mostram ainda que em madeiras moles, como por exemplo, o pinheiro, a lignina apresenta quase 100% de sua composição como núcleos coniferíficos.

Vale observar que várias das observações dos autores supracitados basearam-se no método LDA, que sabidamente remove parte da lignina durante a preparação de

FDA, especialmente em gramíneas, o que poderia explicar esses resultados (mais detalhes serão apresentados em próximas seções). Os estudos de Ramos, Fukushima e Kerley et al.¹, utilizando o método LBA, mostraram que as curvas entre a lignina e a digestibilidade são exatamente iguais para gramíneas e para leguminosas; e como a diferença na composição da lignina entre estes dois gêneros vegetais está amplamente reportada, a semelhança das curvas derruba a teoria de inibição diferenciada pela composição do polímero de lignina. O fenômeno da inibição da lignina sobre a digestibilidade ainda precisa de mais estudos, porém, Grabber, Ralph e Hatfield et al., (1997) apontaram que o tipo de lignina não afeta o grau de inibição da lignina sobre a digestibilidade da matéria seca. Akin et al. (1991), constataram que as maiores digestibilidades de colmos e de folhas do milheto [*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.] modificado geneticamente (mutante), para baixa concentração de lignina, comparado ao milheto normal, foram devidas à rápida digestão das porções facilmente digestíveis das células do que à digestão das maiores porções rígidas, com parede espessa e estruturas com tecidos lignificados. Ramos, Fukushima e Kerley et al.¹ reportaram que o fator pre-ponderante na ação inibitória da lignina é a concentração desta na matriz da parede celular.

Apesar de existirem várias metodologias sendo utilizados para a determinação de lignina, os resultados obtidos são conflitantes entre si. Várias teorias têm sido propostas para explicar estas diferenças, ou baseadas na solubilização de parte da lignina durante o procedimento, ou pela mensuração de outras substâncias que resistem à solubilização ácida e são mensuradas como lignina. Como estas metodologias tem fornecido resultados contraditórios para uma mesma amostra, pode-se questionar a validade de algumas afirmações feitas no passado, que se basearam nas concentrações de lignina obtidas pelos métodos LDA, LK ou LPer. Se o método analítico fornece informações com menor exatidão, as conclusões baseadas nestes dados também estarão, obviamente, erradas. Por exemplo, como já citado anteriormente, (JUNG; VOGEL, 1986; MOORE; JUNG, 2001) observaram a existência de uma associação exponencial entre o teor de lignina e a digestibilidade da parede celular, o que insinua que a lignina na parede celular imatura (baixo teor)

---

¹ Trabalho submetido para publicação na Revista Animal Feed Science and Technology para ser publicado em 2012.

protege mais os carboidratos do que são protegidos na parede celular madura (altamente lignificada).

Não apenas o teor de lignina aumenta com a maturidade, é possível que a lignina presente nas folhas seja diferente daquela presente no caule das plantas (SAVIOLI; FUKUSHIMA, 2000). Também existem indícios de que ocorrem modificações estruturais na molécula de lignina ao longo dos estádios de maturidade (FUKUSHIMA; DEHORITY, 2000). Tais eventos poderiam explicar as diferenças na digestibilidade entre as frações da planta bem como a influência do estágio de maturidade.

2.4.4 Métodos para quantificar o conteúdo de lignina

As metodologias disponíveis para quantificar o teor de lignina em plantas forrageiras geralmente se dividem em dois grupos segundo sua natureza, os métodos gravimétricos e os métodos não gravimétricos. O grupo dos métodos gravimétricos está representado pelos procedimentos: lignina detergente ácido (LDA) preconizado por Van Soest (1963b), lignina permanganato de potássio (LPer) descrito por Van Soest e Wine (1968), e o método lignina Klason (LK) (THEANDER; WESTERLUND, 1986). Porém, estes métodos de natureza gravimétrica nem sempre refletem o real valor da lignina (FUKUSHIMA; HATFIELD, 2004).

A determinação do valor real de lignina pode ser útil para estimar a extensão da digestão da fibra (BARTON; AKIN, 1977). Van Soest (1963b) utilizou a solução de detergente ácido para obter a FDA, preparação lignino-celulósica isenta de proteína, com o objetivo de tratá-la com ácido sulfúrico 72% e hidrolisar os componentes da parede celular exceto a lignina. Denominou este método como lignina detergente ácido (LDA). A busca de Van Soest por uma preparação fibrosa livre de proteína estava baseada nos trabalhos de Whitehead e Quicke (1964) que apresentaram como crítica principal ao método de lignina Klason (LK), o fato de existir contaminação protéica no resíduo de lignina.

O método LDA frequentemente subestima os teores de lignina devido à solubilização de até 50% dela na solução de detergente ácido (KONDO; MIZUNO; KATO, 1987), ou então na solução de ácido sulfúrico 72% (HATFIELD; JUNG; RALPH et al., 1994). Esta constatação é observada especialmente em gramíneas (LOWRY; CONLAN; SCHLINK et al., 1994). Tanto o método LDA como o LK tem produzido resultados conflitantes para as mesmas amostras de plantas forrageiras, apesar de ambos se basearem no mesmo princípio da hidrólise ácida dos componentes da parede celular (HATFIELD; JUNG; RALPH et al., 1994). Além da perda de parte da lignina, os resultados destes métodos podem sofrer alterações em função de contaminantes insolúveis (FUKUSHIMA, 1989) e, portanto, não refletir a quantidade real do polímero presente nas amostras. Ao empregar a solução de detergente ácido para obter uma preparação fibrosa isenta de proteínas, Van Soest (1963b), pretendia evitar a contaminação protéica no resíduo, principal crítica levantada contra o método LK (WHITEHEAD; QUICKE, 1964), especialmente quando utilizada para análise em leguminosas pelo alto teor de proteína nestas espécies (VAN SOEST, 1994).

O método LK foi desenvolvido para ser utilizado na determinação do teor de lignina em madeiras. Este método utiliza a preparação fibrosa fibra dietética ou parede celular bruta como substrato a ser hidrolisado com ácido sulfúrico 72%. A fibra dietética é obtida segundo Theander e Westerlund (1986), após o tratamento sucessivo das amostras com as enzimas amilase e amilo-glicosidase em tampão fosfato e finalmente com álcool etílico 80%. A PC contém proteínas, geralmente chamada de extensinas, que tem função estrutural dentro da matriz da parede celular e tem-se sugerido que podem estar enlaçadas à lignina (WHITMORE, 1982). As extensinas são compostos ricos em hidroxiprolina, mas também apresentam elevado conteúdo de alanina, serina e treonina (DARVILL; MCNEIL; DARVILL et al., 1980). Esta composição característica de amino ácidos e a impossibilidade de extrair grande parte da proteína das paredes celulares, sob condições não degradáveis, indicam que esta proteína é um componente primário na estrutura da parede celular vegetal (ESCOLA SENAI, 1988).

A parede celular de madeiras, e consequentemente sua lignina, é livre de proteínas (ESCOLA SENAI, 1988), porém, este não é o caso da parede celular de plantas forrageiras, especialmente de leguminosas que apresentam altos teores de proteína,

o que representa um sério obstáculo ao método LK (VAN SOEST, 1994). Os autores (VAN SOEST; WINE, 1967; YOUNG; LAI, 1971) apontaram que a principal limitação ao uso do método LK em plantas forrageiras era a inclusão de proteínas no resíduo insolúvel. Algumas alternativas para contornar o problema foram propostas como, por exemplo, tratamento da amostra com enzimas proteolíticas que ajudassem a remover o material protéico (ARMITAGE; ASHWORTH; FERGUSON, 1948; SULLIVAN, 1959) ou mensuração do conteúdo protéico no resíduo para calcular as devidas correções (THOMAS; ARMSTRONG, 1949). Entretanto, a primeira alternativa não demonstrou ser eficiente e a segunda pressupõe mais trabalho e tempo para as análises.

É desejável quantificar proteína nos resíduos de LDA e LK (HATFIELD; JUNG; RALPH et al., 1994). Também é aconselhável que se quantifique teor de cinzas nestes resíduos (JUNG; MERTENS; PAYNE, 1997; JUNG; VAREL; WEIMER et al., 1999). Udén, Robinson e Wiseman (2005), reportaram que a presença de material mineral na LDA poderia ser explicada pelo fato de que a sílica é parcialmente solubilizada pela solução de detergente neutro, mas é quantitativamente recuperada na solução de detergente ácido e pode contribuir aumentando os teores de LDA. Outro possível contaminante nos resíduos de LDA e LK é a cutina (VAN SOEST, 1994; FUKUSHIMA, 1989). A cutina é composta por ésteres hidroxilados de ácidos graxos e álcoois de cadeia longa e permanece no resíduo de FDA. A cutina pode ser determinada tratando sequencialmente a FDA com ácido sulfúrico a 72% e depois com solução de permanganato de potássio (VAN SOEST; WINE, 1968; VAN SOEST, 1994).

O método lignina brometo de acetila foi inicialmente proposto por Johnson e Moore (1961), para ser usado em madeiras e posteriormente modificado por Morrison (1972). Este procedimento resulta na formação de derivados de acetil com grupos OH não substituídos dentro do polímero de lignina, e a substituição dos grupos OH nos carbono- α pelo brometo, desta forma, liberando a molécula de lignina solúvel em ácido acético (Figura 2).

Figura 4 - Estrutura da lignina natural e sua forma acetilada após o tratamento com solução de brometo de acetila a 25%

Fonte: Adaptado de: (Hatfield e Fukushima, 2005)

O método é baseado na absorção da radiação ultravioleta pelo complexo de brometo acetil-lignina em valores de 280 nm e várias modificações têm sido sugeridas desde que foi proposto. Morrison (1972), introduziu as etapas de filtragem para remover a “turbidez” causada principalmente por proteínas que permaneciam insolúveis nas soluções ácidas. Este fenômeno se apresenta principalmente em materiais herbáceos que possuem maiores concentrações de proteína do que as madeiras, o que pode interferir na absorção da luz UV. Outra dúvida que pudesse surgir, está relacionada com a composição da lignina influenciando a absorbância UV. Iiyama e Wallis (1989) mostraram que as leituras do comprimento de onda (280 nm) tanto para madeiras moles (lignina do tipo guaiacil) quanto para madeiras duras (mistura de núcleo guaiacil e siringil) era similar após o tratamento com brometo de acetila, indicando que o tipo de monômero não interfere com o máximo de UV. Chang, Chandra e Berleth et al., (2008), mostraram essencialmente os mesmos coeficientes de extinção para diferentes cultivares de *Arabidopsis thaliana*, que oscilaram entre 22.96 a 23.60 $\text{g}^{-1} \text{L cm}^{-1}$. Estes cultivares possuíam diversas combinações de monômeros siringil/guaiacil, o que confirma a observação anterior de que o tipo de monômero não interfere na absorbância das amostras.

Iiyama e Wallis (1989), sugeriram o uso do ácido perclórico na solução para garantir a completa solubilização da parede celular, mas Hatfield, Ralph e Grabber (1999), aconselharam o contrário ao uso devido às constatações de que este ácido exacerbava a degradação de xilanas na solução de brometo de acetila 25%, o que

podia levar a erros nas leituras de absorbância. Este método vem despertando o interesse de pesquisadores durante as últimas duas décadas e os estudos têm sido dirigidos a colher informações que validem e padronizem os resultados e permitam que o uso do método torne-se comum nos laboratórios ao redor do mundo.

As três metodologias discutidas até agora (LDA, LK e LPer) são as mais utilizadas atualmente, particularmente o método LDA em produção animal. Porém outros procedimentos analíticos já foram utilizados para tentar melhor quantificar o teor de lignina em plantas forrageiras. Por exemplo, (IIYAMA; LAM; STONE, 1990; BILLA; TOLLIER; MONTIES, 1996) tentaram quantificar ácidos e aldeídos fenólicos individuais após oxidação alcalina com nitrobenzeno, mas este procedimento só estima parcialmente os monômeros e exige correções matemáticas para o total de fenóis que compõem a lignina (IIYAMA; WALLIS, 1989). Ao oxidarem a molécula de lignina com nitrobenzeno, Fukushima e Hatfield (2001), não obtiveram a totalidade da lignina medida através da somatória dos seus componentes principais. Lu e Ralph (1997, 1998), também não conseguiram hidrolisar a totalidade dos blocos consecutivos da lignina ao empregar o procedimento de clivagem com brometo de acetila. Outra técnica empregada é a de ressonância magnética nuclear, um instrumento analítico de alto valor já que fornece informações detalhadas e específicas sobre os componentes moleculares da lignina e possíveis substâncias contaminantes da mesma (RALPH; HATFIELD; GRABBER, 1998; FUKUSHIMA; HATFIELD, 2003). Entretanto, esta técnica é de caráter qualitativo e não permite fazer avaliações quantitativas. O grande obstáculo para avaliar a acurácia dos métodos analíticos é a falta de um material de referencia certificado, o que exige o emprego de meios auxiliares.

Possivelmente as melhores ferramentas coadjuvantes para auxiliar na determinação de um método analítico adequado, sejam os ensaios de digestibilidade (*in vitro*, *in vivo* ou *in situ*) através da correlação estatística (regressão) com os teores de lignina, medida pelos métodos analíticos a avaliar. Este estudo utilizou o procedimento de digestibilidade *in vitro*, devido ao elevado numero de amostras, facilidade de execução e grande fidelidade para expressar os fenômenos observados em estudos de digestibilidade *in vivo* (REINHART; SUNVOLD, 1996).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Departamento de Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP), no Campus de Pirassununga.

3.1 MATERIAL VEGETAL

Foram utilizadas cinco espécies vegetais da família das gramíneas, colhidas entre setembro e novembro de 2010, no Campo Agrostológico da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, no Campus de Pirassununga. Após o corte de nivelamento, de 5 cm acima do solo, cada canteiro (9 m²) recebeu uma adubação de cobertura utilizando uma formulação 20-05-20 (NPK) na quantidade de 300 g para cada canteiro.

Foram utilizadas 5 espécies forrageiras: *Brachiaria brizantha* cv. Marandú, *Brachiaria brizantha* cv. Xaraés (MG-5), *Panicum maximum* cv. Mombaça, *Pennisetum purpureum* cv. Cameroon e *Pennisetum purpureum* cv. Napier. As plantas foram colhidas em sete estádios de maturação, em intervalos de 15 dias entre cortes, sendo: pré-florescimento 1 (35 dias), pré-florescimento 2 (50 dias), início de florescimento (65 dias), florescimento total (80 dias), pós-florescimento 1 (95 dias), pós-florescimento 2 (110 dias) e pós-florescimento 3 (125 dias).

3.2 ANÁLISES BROMATOLÓGICAS

As análises, em duplicata, foram realizadas no Laboratório de Lignina do Departamento de Nutrição e Produção Animal da FMVZ-USP, no Campus de Pirassununga.

As amostras de material verde foram colhidas e pesadas, e delas retirou-se uma sub-amostra para a determinação de matéria seca, em estufa a 105°C. O restante

das amostras foi colocada em estufa com circulação forçada de ar, regulada a 65°C para sua desidratação. Após a secagem, até constatar peso constante (aprox. 48 horas), as amostras foram moídas em um moinho laboratorial tipo Wiley munido de peneira 0,5 mm. Uma vez moídas, as amostras foram armazenadas em potes de vidro até o momento das análises e os ensaios de digestibilidade.

As seguintes análises foram feitas: matéria mineral (MM), parede celular (PC), fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA), fibra em detergente neutro livre de cinzas e proteína (FDNcp), parede celular livre de cinzas e proteína (PCcp); foram determinados os teores de lignina em detergente ácido (LDA), lignina permanganato de potássio (LPer), lignina Klason (LK), lignina brometo de acetila (LBA) e a digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS).

A PC foi determinada segundo o protocolo proposto por (Fukushima e Hatfield, 2001), o qual utiliza a destilação de solventes fracos que por meio de um aparelho de soxlet fazem a lavagem das amostras para retirar o conteúdo celular. As determinações de FDN, FDA e LDA realizaram-se segundo (VAN SOEST; ROBERTSON; LEWIS, 1991) num determinador de fibra TE-149 (TECNAL, São Paulo, Brasil). Nas amostras vegetais e nas FDN e PC, o conteúdo de cinzas (minerais) foi determinado por combustão em forno mufla (MARCONI, São Paulo, Brasil) a 450°C, e a proteína bruta ($N \times 6,25$) foi medida utilizando um destilador de nitrogênio TE 036/1 (TECNAL, São Paulo, Brasil). Os teores de lignina permanganato de potássio foram determinados segundo (VAN SOEST; WINE, 1968), e a determinação de lignina Klason foi realizada de acordo com (HATFIELD; JUNG; RALPH, et al., 1994). A quantificação de lignina brometo de acetila seguiu a técnica descrita por Fukushima e Kerley (2011), onde o padrão de referência foi representado por uma equação de regressão derivada da média de coeficientes de extinção de 17 amostras purificadas de lignina, oriundas de diversas plantas, de amostras de madeiras a gramíneas, passando por leguminosas, e incluindo-se 3 amostras de ligninas comerciais.

A hemicelulose (HCLS) foi calculada pela diferença aritmética entre FDN e FDA ($HCLS = FDN - FDA$), e a celulose (CLS) pela diferença entre FDA isenta de cinzas e proteína e os teores de LBA ($CLS = FDA - LBA$).

3.3 DIGESTIBILIDADE IN VITRO

Aproximadamente 500 mg de amostra pre-seca foi colocada em saquinhos confeccionados com tecido sintético que se caracteriza por possuir porosidade relativamente uniforme, denominada comercialmente de tecido-não-tecido gramatura 120 (TNT 120). As amostras foram incubadas em solução McDougall e líquido ruminal, relação 4:1, durante 48 horas e a seguir as amostras foram digeridas em solução de pepsina e ácido clorídrico por mais 48 horas (TILLEY; TERRY, 1963). Para acelerar a anaerobiose na solução de McDougall para o meio de cultura, foi empregada a técnica preconizada por (FUKUSHIMA; WEIMER; KUNZ, 2002).

3.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com duas repetições para todas as análises. A análise de variância e as correlações entre os teores de lignina e a digestibilidade *in vitro* da matéria seca foram obtidos utilizando o PROC GLM e o PROC CORR, respectivamente, do software estatístico SAS (SAS, 2009), versão 9.1. As comparações entre as médias dos tratamentos foram realizadas pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. Devido à existência de interação entre o método analítico *versus* espécie e *versus* corte decidiu-se comparar as metodologias entre elas dentro de cada espécie, o que tinha maior relevância frente ao principal objetivo deste estudo.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 COMPOSIÇÃO QUÍMICA

O aumento no teor de matéria seca (MS) das plantas deve-se principalmente ao aumento dos componentes estruturais na parede celular (CHURCH; POND, 1977). A elevação do teor de MS das forrageiras está relacionada ao avanço do estágio de maturidade. O teor de MS mostrou elevação ao longo dos sete (7) cortes para todas as espécies (Tabelas 1 a 5). A parede celular é composta por polissacarídeos estruturais, particularmente celulose e hemicelulose (PATERSON; BELYEA; BOWMAN et al., 1994), além de pectina, lignina e outros compostos em menores quantidades. Na medida em que a planta amadurece e se desenvolve, a concentração de parede celular aumenta pela maior proporção de caule na biomassa total da planta, que resulta do espessamento das paredes primária e secundária (WILSON, 1994), onde a concentração de pectina decresce enquanto a de celulose, hemicelulose e lignina aumentam (JUNG; ENGELS, 2002). Nas folhas, devido ao fato de que estas não têm participação na sustentação da planta, este aumento da parede celular é de menor magnitude (NELSON; MOSER, 1994).

Cerca de 80% da MS é composta por parede celular (PC). Portanto, é previsível que o aumento no teor de MS seja acompanhado por um aumento nos valores de PC. É de se esperar também, que os rendimentos de PC aumentem conforme avança o estágio de maturidade das plantas (SAVIOLI; FUKUSHIMA, 2000). Os valores de PC obtidos ficaram entre 68,5% e 86,8% nas diferentes espécies e estádios de maturidade (Tabelas 1 a 5). Os valores observados estão próximos aos reportados por (SAVIOLI; FUKUSHIMA; LIMA et al., 2000) que observaram teores de PC entre 68% a 79%, no caule e nas folhas de diferentes gramíneas, em dois estádios de maturidade.

Tabela 1 Composição Bromatológica *Brachiaria brizantha* cv. Marandú. Médias nos 7 estádios de maturidade.

	MS	PC	FDN	FDA	CLS	HCLS	FDNcp	PCcp
Dias	g/kg							
35	914,1	691,9	555,6	484,4	330,3	71,2	481,2	586,7
50	919,1	731,3	604,7	516,6	337,3	88,1	543,8	645,1
65	922,4	745,6	619,7	529,5	339,4	90,2	565,6	666,5
80	923,5	759,3	639,4	530,5	370,1	108,9	595,7	692,6
95	941,9	770,8	657,1	540,5	377,2	116,5	621,8	720,1
110	956,8	779,1	663,4	541,2	394,3	122,1	632,6	729,9
125	957,3	780,2	668,5	545,9	420,3	122,6	640,1	736,0
	MS - Matéria seca, PC - parede celular, FDN - fibra em detergente neutro, FDA - fibra em detergente ácido, CLS - celulose, HCLS - hemicelulose, FDNcp -fibra em detergente neutro livre de cinzas e proteína, PCcp - parede celular livre de cinzas e proteína							
	** Todos os valores estão expressos com base na matéria seca							

Tabela 2 Composição Bromatológica *Brachiaria brizantha* cv. Xaraés. Médias nos 7 estádios de maturidade.

	MS	PC	FDN	FDA	CLS	HCLS	FDNcp	PCcp
Dias	g/kg							
35	912,1	759,0	700,8	495,4	359,8	205,3	636,2	695,1
50	923,1	775,9	729,3	520,7	371,3	208,6	688,7	722,5
65	955,6	791,4	752,8	534,1	383,6	218,7	718,8	747,0
80	956,5	820,4	783,8	558,9	408,2	224,9	753,8	782,2
95	959,3	831,6	797,7	571,7	416,0	225,9	769,1	795,0
110	964,8	848,0	820,6	594,0	426,7	226,6	799,4	822,2
125	965,4	868,1	843,6	605,6	449,2	238,0	827,1	845,3
	MS - Matéria seca, PC - parede celular, FDN - fibra em detergente neutro, FDA - fibra em detergente ácido, CLS - celulose, HCLS - hemicelulose, FDNcp -fibra em detergente neutro livre de cinzas e proteína, PCcp - parede celular livre de cinzas e proteína							
	** Todos os valores estão expressos com base na matéria seca							

Tabela 5 Composição Bromatológica *Pennisetum purpureum* cv. Napier nos 7 estádios de maturidade.

	MS	PC	FDN	FDA	CLS	HCLS	FDNcp	PCcp
Dias	g/kg							
35	903,7	752,4	698,2	510,2	340,8	179,0	613,6	671,0
50	909,0	759,7	702,5	521,4	342,3	181,1	642,0	688,5
65	921,6	769,4	722,4	528,1	362,8	194,3	667,8	704,0
80	941,4	772,3	734,6	538,6	371,2	196,0	693,7	726,4
95	955,8	787,2	749,8	546,2	399,2	203,6	716,8	741,3
110	958,1	805,6	768,4	556,4	405,4	212,0	738,6	762,2
125	958,3	820,9	787,5	568,3	416,7	219,2	764,2	785,2
MS - Matéria seca, PC - parede celular, FDN - fibra em detergente neutro, FDA - fibra em detergente ácido, CLS - celulose, HCLS - hemicelulose, FDNcp -fibra em detergente neutro livre de cinzas e proteína, PCcp - parede celular livre de cinzas e proteína								
** Todos os valores estão expressos com base na matéria seca								

Considerando que a preparação fibrosa PC preserva quase a totalidade dos componentes da parede celular enquanto que a solução de detergente neutro, utilizada para obter a FDN, solubiliza e remove substâncias pécicas e outros oligossacarídeos (como os β -glucanos, fructosanas, gomas, etc.), pode-se prever que os valores de PC sejam maiores que os valores registrados para os teores de FDN. Pela diferença PC – FDN é possível estimar o teor de carboidratos solúveis na solução de detergente neutro, fração essa que se pode denominar de fibra solúvel (HALL; LARSON, 2004). Da mesma forma, como a solução de detergente ácido remove a hemicelulose, é de esperar que os valores de FDA sejam inferiores aos valores de FDN e PC. A diferença observada entre FDN e FDA deve-se em maior parte solubilização da hemicelulose, constituinte este que não está presente na fração FDA, mas sim na FDN (VANSOEST; ROBERTSON; LEWIS, 1991). Estas observações foram constatadas nas análises do presente estudo, onde o rendimento de PC foi superior aos valores obtidos para fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA), para todas as espécies (Tabelas 1 a 5). Os valores médios variaram entre 68,52% a 86,81%, 55,57% a 84,36% e 48,54% a 61,26% para PC, FDN e FDA, respectivamente. Os teores de FDN e FDA observados correspondem com as observações de Malafaia, Valadares Filho e Vieira et al., (1998), as de Ribeiro, Pereira e Valadares Filho (2001) e as de Bacha (2006) que observou valores entre 58,9% a 80,6% para a FDN e 31% a 56% para a FDA, em diferentes gramíneas tropicais em dois estádios de maturação.

Baseados nas afirmações de Van Soest, Robertson e Lewis, (1991), previamente citadas, é possível obter o teor de hemicelulose a partir da diferença entre FDN e FDA. Os valores obtidos estiveram entre 7,13% e 23,8% e acompanharam a tendência de elevação das frações fibrosas ao aumentar conforme aumenta a maturidade da planta (Tabelas 1 a 5). Porém, é importante considerar estes valores como presuntivos já que a FDA pode apresentar alguns resíduos de outras pentosanas (MORRISON, 1983), e o fato de que a FDN não contém pectina, enquanto que a FDA apresenta sim esta fração, e podem conduzir a valores que não reflitam o teor de hemicelulose com fidelidade (QUEIROZ; FUKUSHIMA; GOMIDE et al., 2006). Outra importante diferença entre FDN e FDA, observada por Van Soest (1969), reside na preservação das frações protéicas na primeira, o que pode levar a superestimar o teor em amostras com alto teor de proteína. Já na FDA, a proteína contida na parede celular é solubilizada pelo detergente de cetil trimetil amônio brometo (VAN SOEST; WINE, 1967; YOUNG; LAI, 1971). O cetil trimetil amônio brometo é incluído na solução de detergente ácido especificamente para a remoção da proteína no método LDA (VAN SOEST; ROBERTSON; LEWIS, 1991). Van Soest (1963b), propôs então a FDA como substrato que seria mais adequado para a determinação quantitativa do teor de lignina, via hidrólise ácida com solução concentrada 72% de ácido sulfúrico. Esta metodologia gravimétrica, a lignina detergente ácido (LDA), é a mais empregada atualmente no mundo nas áreas de Agronomia e Ciência Animal. Muito embora, vários estudos (FUKUSHIMA; SAVIOLI, 2001; FUKUSHIMA; HATFIELD, 2004; HATFIELD; FUKUSHIMA, 2005) tenham reportado que os valores obtidos por meio do emprego dela são inferiores e apresentam maior variabilidade do que os valores obtidos por metodologias espectrofotométricas mais recentemente desenvolvidas, mudanças nos hábitos são normalmente lentas, particularmente na comunidade científica.

Os teores de celulose, da mesma maneira que ocorreu com a hemicelulose, aumentaram conforme as plantas amadureceram, variando de 33,03% a 44,92% entre todas as espécies (Tabelas 1 a 5). O aumento de todas as frações fibrosas (FDN, FDA, PC) ao longo do tempo e os valores crescentes de seus respectivos componentes (celulose, hemicelulose e lignina) permite observar a contribuição dos componentes fibrosos na MS da planta.

Nas equações da Cornell Net Carbohydrate and Protein System, as frações FDN são inseridas livres de cinzas e proteína motivo pelo qual o mesmo procedimento foi adotado para PC. Aderindo a este preceito, determinou-se o teor de cinzas e proteína na FDN e na PC, sendo possível calcular a fibra em detergente neutro livre de cinzas e proteína (FDNcp) e a parede celular livre de cinzas e proteína (PCcp) (Tabelas 1 a 5). Constatou-se que a concentração destes compostos, em gramíneas, é pequena. Os valores médios obtidos neste estudo oscilaram entre 48,12% a 82,72% e entre 58,67% a 84,53% para FDNcp e PCcp, respectivamente. Ao subtrair estes valores de FDNcp e PCcp dos seus respectivos valores de FDN e PC, observam-se valores entre 3,36% a 5,39% e entre 4,07% a 6,87% de resíduo de cinzas e proteína, para FDN e PC, respectivamente.

No caso das gramíneas, a correção para cinzas e proteína parece não ser muito importante pelas quantidades relativamente pequenas presentes nas amostras de FDN e PC, porém em amostras de leguminosas, que são ricas em proteínas (UDÉN, 2006) observou teores de proteína bruta (PB) na FDN mais elevados. Neste sentido, devido ao fato da proteína ser considerado um contaminante na fração fibrosa, Goering, Smith e Van Soest, (1973), propuseram o uso de sulfito de sódio no intuito de remover a proteína da parede celular.

Tabela 6 - Médias de FDN, FDNcp, PC, PCcp e FS nos 7 cortes de maturidade e o erro padrão da média

	Preparação Fibrosa (g/kg)					
Dias	FDN	FDNcp	PC	PCcp	FS	EPM
35	652,9 C, b	575,6 D, c	722,1 D, a	638,4 E, b	62,8	0,0113
50	688,4 BC, b	629,7 CB, c	751,6 C, a	679,1 D, b	49,4	0,0093
65	706,6 B, b	657,1 B, c	765,0 BC, a	701,4 CD, b	44,3	0,0089
80	724,2 A, b	681,9 B, c	777,7 B, a	723,3 BC, b	41,4	0,0089
95	739,3 A, bc	702,2 AB, c	790,6 A, a	741,6 B, b	39,4	0,0081
110	756,0 A, bc	724,9 A, bc	803,6 A, a	763,0 AB, ac	38,1	0,0084
125	771,3 A, ac	745,7 A, bc	815,1 A, a	780,4 A, ab	34,7	0,0093
EPM	0,0077	0,0093	0,0049	0,0071		

FDN - fibra detergente neutro, FDNcp - fibra detergente neutro isenta de cinzas e proteína, PC - parede celular, PCcp - parede celular isenta de cinzas e proteína, FS - fibra solúvel

Todos os valores estão expressos com base na matéria seca

Médias, dentro de colunas, seguidas por letras maiúsculas diferentes diferem significativamente $P < 0.05$ (Tukey)

Médias, dentro de linhas, seguidas por letras minúsculas diferentes diferem significativamente $P < 0.05$ (Tukey)

EPM = erro padrão da média

Na tabela 6, encontram-se as médias dos valores de FDN, FDNcp, PC e PCcp nos sete estádios de maturidade. É possível observar para todos os cortes que houve diferença significativa ($P = 0,05$) entre os valores de FDN e PC, o que suporta as afirmações de vários autores que reportam perda da pectina e outros componentes da parede celular na solução de detergente neutro. Também, observa-se como existe diferença significativa ($P = 0,05$) entre os teores de FDN e FDNcp no primeiros 4 cortes, e entre PC e PCcp nos primeiros 5 cortes. As correções de cinzas e proteína nas preparações fibrosas FDN e PC são feitas simplesmente pelo fato de cinzas e proteína não serem consideradas fibras, no sentido dietético, muito embora a proteína tenha papel estrutural dentro da parede celular.

Bacha (2006) e Queiroz, Fukushima e Gomide, (2008), substituíram a fração FDNcp pela preparação PCcp nas equações de Cornell (CNCPS) que estimam as frações de carboidratos dos alimentos e verificaram que esta substituição é possível. Uma importante conclusão destes trabalhos foi a possibilidade de se estimar a fração carboidrato solúvel na solução de detergente neutro, a fibra solúvel (FS) que inclui a pectina, β -glucanos, fructosanas, gomas, etc., usando a relação $FS = PCcp - FDNcp$. O procedimento PC proposto por Fukushima e Hatfield (2001) não solubiliza esta fração.

4.2 LIGNINAS

Os resultados deste estudo corroboraram com os resultados reportados por Fuzeto (2003) e por, Fukushima e Hatfield (2004). O método de LDA apresentou os menores teores de lignina nos sete estádios de maturidade para todas as espécies, variando de 50,1 g/kg a 139,8 g/kg (Tabelas 7 a 11). Isto faz sentido na luz dos argumentos apresentados anteriormente neste documento, que baseado nas observações e resultados de vários autores (KONDO; MIZUNO; KATO, 1987; LOWRY; CONLAN; SCHLINK et al., 1994; MOORE; JUNG, 2001; HATFIELD; FUKUSHIMA, 2005), sustentam a tese da solubilização parcial da lignina na solução de detergente ácido. Estudos (JUNG; FAHEY, 1983) sugeriram que a solução de detergente ácido poderia remover parte da lignina verdadeira, especificamente

aquela associada fração da hemicelulose. Esta visão considera que os fenólicos da parede celular, incluindo ésteres dos ácidos ferúlico e p-coumárico, formam parte da lignina (JUNG; DEETZ, 1993), o que é alvo de discussões.

Tabela 7 - Teores de lignina em *Brachiaria brizantha* cv. Marandú. Média nos 7 estádios de maturidade.

	LBA	LDA	LK	LPer	EPM
Dias	g/kg				
35	145,0 F, a	61,0 G, b	71,5 E, b	65,5 D, b	13,083
50	155,3 EF, a	65,5 F, b	83,4 D, c	98,3 C, d	12,783
65	155,8 E, a	72,6 E, b	89,0 D, c	110,8 B, d	11,829
80	179,6 D, a	83,9 D, b	101,0 C, c	141,1 A, d	14,083
95	199,6 C, a	93,3 C, b	116,2 B, c	94,4 C, b	16,464
110	217,7 B, a	102,0 B, b	128,4 A, c	107,1 B, b	17,703
125	248,7 A, a	114,8 A, b	137,6 A, c	117,3 B, b	20,867
EPM	0,9813	0,5100	0,6345	0,6113	
¹ LBA - lignina brometo de acetila, LDA - lignina detergente ácido, LK - lignina Klason, Lper - lignina permanganato de potássio, EPM - erro padrão da média					
² Todos os valores estão expressos com base na matéria seca					
Médias, dentro de colunas, seguidas por letras maiúsculas diferentes diferem significativamente P < 0.05 (Tukey)					
Médias, dentro de linhas, seguidas por letras minúsculas diferentes diferem significativamente P < 0.05 (Tukey)					

Tabela 8 - Teores de lignina em *Brachiaria brizantha* cv. Xaraés. Média nos 7 estádios de maturidade.

	LBA	LDA	LK	LPer	EPM
Dias	g/kg				
35	128,4 F, a	53,3 E, b	63,6 E, b	94,9 B, c	1,1582
50	167,5 E, a	69,4 D, b	82,6 D, c	92,3 B, d	1,4420
65	173,8 E, a	72,2 D, b	96,3 C, c	111,8 C, d	1,4209
80	220,2 D, a	94,7 C, b	114,4 B, b	99,4 B, b	1,9497
95	247,1 C, a	120,2 B, b	121,5 B, b	144,0 AC, c	1,9807
110	260,0 B, a	125,1 B, b	136,2 A, b	159,7 A, c	2,0180
125	279,6 A, a	139,8 A, b	142,1 A, b	166,8 A, c	2,1703
EPM	1,4312	0,8434	0,7557	0,8446	
¹ LBA - lignina brometo de acetila, LDA - lignina detergente ácido, LK - lignina Klason, Lper - lignina permanganato de potássio, EPM - erro padrão da média					
² Todos os valores estão expressos com base na matéria seca					
Médias, dentro de colunas, seguidas por letras maiúsculas diferentes diferem significativamente P < 0.05 (Tukey)					
Médias, dentro de linhas, seguidas por letras minúsculas diferentes diferem significativamente P < 0.05 (Tukey)					

Tabela 9 - Teores de lignina em *Panicum maximum* cv. Mombaça. Média nos 7 estádios de maturidade.

	LBA	LDA	LK	LPer	EPM
Dias	g/kg				
35	118,5 G, a	50,1 E, c	66,0 F, b	74,6 C, b	0,9824
50	148,9 F, a	62,4 DE, b	77,2 E, c	83,1 BC, c	1,2569
65	165,1 E, a	68,8 CD, b	83,5 E, b	113,1 B, c	1,4054
80	183,6 D, a	79,6 C, b	98,0 D, b	134,7 AB, c	1,5169
95	201,0 C, a	95,6 B, b	107,0 C, c	139,5 AB, d	1,5499
110	217,6 B, a	102,1 B, b	122,4 B, c	143,3 AB, d	1,6533
125	244,5 A, a	119,5 A, b	144,4 A, b	147,6 A, b	1,8468
EPM	1,1017	0,6398	0,7037	0,8092	
¹ LBA - lignina brometo de acetila, LDA - lignina detergente ácido, LK - lignina Klason, Lper - lignina permanganato de potássio, EPM - erro padrão da média					
² Todos os valores estão expressos com base na matéria seca					
Médias, dentro de colunas, seguidas por letras maiúsculas diferentes diferem significativamente P < 0.05 (Tukey)					
Médias, dentro de linhas, seguidas por letras minúsculas diferentes diferem significativamente P < 0.05 (Tukey)					

Tabela 10 - Teores de lignina em *Pennisetum purpureum* cv. Cameroon. Média nos 7 estádios de maturidade.

	LBA	LDA	LK	LPer	EPM
Dias	g/kg				
35	136,2 G, a	61,1 FD, b	70,4 F, c	93,5 B, d	1,0989
50	168,4 F, a	78,5 ED, b	83,0 E, c	136,1 B, b	1,4202
65	176,0 E, a	79,2 EC, b	93,9 E, c	139,7 C, d	1,4458
80	190,2 D, a	81,9 C, b	114,5 D, c	155,1 A, d	1,5545
95	220,9 C, a	94,6 B, b	119,6 C, c	159,0 A, d	1,8058
110	246,0 B, a	115,5 B, b	123,1 B, c	160,7 A, d	1,9596
125	260,5 A, a	126,4 A, c	143,3 A, cd	162,0 A, d	1,9908
EPM	1,1478	0,5915	0,6551	0,6547	
¹ LBA - lignina brometo de acetila, LDA - lignina detergente ácido, LK - lignina Klason, Lper - lignina permanganato de potássio, EPM - erro padrão da média					
² Todos os valores estão expressos com base na matéria seca					
Médias, dentro de colunas, seguidas por letras maiúsculas diferentes diferem significativamente P < 0.05 (Tukey)					
Médias, dentro de linhas, seguidas por letras minúsculas diferentes diferem significativamente P < 0.05 (Tukey)					

Tabela 11 - Teores de lignina em *Pennisetum purpureum* cv. Napier. Média nos 7 estádios de maturidade.

	LBA	LDA	LK	LPer	EPM
Dias	g/kg				
35	143,3 G, a	65,5 F, b	76,6 F, b	97,1 D, c	1,1410
50	159,8 F, a	74,9 E, b	84,1 E, b	113,0 D, c	1,2691
65	177,9 E, a	80,3 DE, b	99,0 D, c	135,7 C, d	1,4113
80	198,3 D, a	84,5 D, b	117,5 C, c	143,1 C, d	1,5749
95	224,8 C, a	97,5 C, b	127,1 B, c	148,5 AC, d	1,7862
110	240,3 B, a	107,1 B, b	131,6 B, c	159,6 AC, d	1,9001
125	263,1 A, a	120,9 A, b	151,5 A, c	165,8 A, d	2,012
EPM	1,1294	0,5020	0,6984	0,6563	
¹ LBA - lignina brometo de acetila, LDA - lignina detergente ácido, LK - lignina Klason, Lper - lignina permanganato de potássio, EPM - erro padrão da média					
² Todos os valores estão expressos com base na matéria seca					
Médias, dentro de colunas, seguidas por letras maiúsculas diferentes diferem significativamente P < 0.05 (Tukey)					
Médias, dentro de linhas, seguidas por letras minúsculas diferentes diferem significativamente P < 0.05 (Tukey)					

A concentração de lignina determinada pelo método LPer, obtida pela oxidação da molécula de lignina em solução concentrada de permanganato de potássio (VANSOEST; WINE, 1968), variaram de 65,5 g/kg a 166,8 g/kg (Tabelas 7 a 11). Os dados do presente estudo concordam com os valores obtidos por Traxler, Fox e Van Soest et al., (1998). Estes autores também observaram valores maiores para LPer do que para LDA. Entretanto, contrariamente ao que é imputado ao método LDA, os teores de LPer podem estar artificialmente elevados por outros componentes da parede celular (hemicelulose e pectina) que também podem ser atacados pela solução de permanganato de potássio, especialmente em gramíneas imaturas (VANSOEST; WINE, 1968). As observações de Barton e Akin (1977) confirmaram estas afirmações, que reportaram que parte da hemicelulose e alguns tecidos do mesófilo de *Festuca sp.* foram oxidados pela solução de permanganato de potássio. Por outro lado, Goering, Smith e Van Soest et al., (1973) indicaram que partículas alimentares grandes não são atingidas uniformemente pelos reagentes, o que resulta em valores mais baixos para o composto em questão. Ainda assim, esta técnica continua sendo utilizada por pesquisadores que tem ressalvas em lidar com soluções altamente corrosivas, como é o caso de ácido sulfúrico a 72%. A técnica de LPer é utilizada pelas indústrias de papel e celulose, onde a lignina presente em pastas não-branqueadas é oxidada pelo permanganato de potássio, sendo que o consumo deste reagente durante o processo fornece uma estimativa do teor de lignina ainda presente na pasta celulósica (ESCOLA SENAI, 1988).

Neste estudo, os valores para LK variaram de 63,6 g/kg a 151,5 g/kg. (Hatfield, Jung *et al.*, 1994) apontaram que a lignina Klason poderia apresentar valores até 3 vezes acima da lignina detergente ácido, o que podia ser causado por contaminação proteica ou que os carboidratos estruturais não foram totalmente digeridos, ou simplesmente pela solubilização de parte da lignina no método de LDA (HATFIELD; JUNG; RALPH *et al.*, 1994).

A lignina é comumente vista dentro da parede celular como ligada à hemicelulose numa estrutura tridimensional onde se intercalam micro fibrilas de celulose (WEIMER, 1992). A dissolução da matriz de hemicelulose pela solução de detergente ácido deixa a lignina num arranjo aberto e laxo do qual alguns agregados moleculares podem ser removidos por dispersão e posteriormente perdidos na lavagem (LOWRY; CONLAN; SCHLINK *et al.*, 1994). Esta constatação também foi apresentada por Fukushima, Kerley e Porter *et al.*, (2012).

O método espectroscópico, lignina brometo de acetila (LBA), foi proposto para a quantificação de lignina em madeiras (JOHNSON; MOORE, 1961) e posteriormente para forragens (MORRISON, 1972) como alternativa aos métodos disponíveis na época. Neste método, a lignina é solubilizada numa solução de 25% brometo de acetila e 75% ácido acético glacial, e posteriormente é realizada a leitura em 280 nm em um espectrofotômetro. Entretanto, o método carecia de um padrão de referência confiável para desenvolver as curvas de calibração, com as quais seriam comparadas as leituras de absorbância. Isto representava um sério entrave, pois todo método espectrofotométrico pressupõe a existência de um padrão (FENGEL; WEGENER, 1984). Diversos materiais já foram empregados como padrões por diversos autores: Indulina (BACON; CHESSON; GORDON, 1981), lignina “kraft” (BRILLOUET; RIOCHET, 1983), guaiacol (SHARMA; BRILLOVET; 1986), ácido ferúlico (AL-ANI e SMITH, 1988), lignina nativa (FUKUSHIMA; DEHORITY; LOERCH, 1991) e lignina brometo de acetila (FUKUSHIMA; DEHORITY, 2000), entre outros. A necessidade de uma curva de calibração impediu a adoção rotineira deste método (FUKUSHIMA; DEHORITY, 2000) o que levou Fukushima e Hatfield (2001, 2004) a proporem como padrão a lignina extraída com dioxano. Os autores demonstraram que a lignina extraída com solução ácida de dioxano continha teores menores de contaminantes, especialmente carboidratos e proteínas. O uso desta lignina como padrão de referência nas leituras espectrofotométricas resultou em

concentrações de lignina mais consistentes para as plantas estudadas. Apesar do processo funcionar satisfatoriamente, este requer que a lignina seja extraída de cada amostra para a construção das curvas de calibração o que representa uma desvantagem pelo tempo e custo, limitando o uso da metodologia. Mais recentemente, procurando contornar esta desvantagem, os autores (FUKUSHIMA; KERLEY, 2011) propuseram uma equação de regressão, obtida a partir das curvas de calibração de várias plantas, que pode ser utilizada para determinar o conteúdo de lignina em qualquer espécie vegetal independentemente da sua origem botânica. Os teores de lignina aferidos pelo método de LBA foram maiores que os valores obtidos pelos outros três métodos nos sete estádios de maturidade para todas as espécies, variando de 118,5 g/kg a 279,6 g/kg (Tabelas 7 a 11). Entretanto deve-se ter em mente que, estes maiores valores podem ser provenientes de ésteres de ácidos hidroxicinâmicos fracamente ligados à parede celular da planta (FAHEY; JUNG, 1983). Os ácidos cinâmicos esterificados (principalmente p-coumárico e ferúlico) estão ligados à estrutura da lignina e muitas vezes fazem pontes covalentes com a hemicelulose (HARRIS; HARTLEY, 1976) o que poderia explicar as elevadas absorbâncias de luz ultravioleta observadas no método LBA (MORRISON; STEWART, 1995). Como a presença destes ácidos fenólicos é maior em gramíneas (JUNG; DEETZ, 1993) poderia se pensar que este seria o motivo para que as leituras de absorbância em leguminosas sejam menores que em gramíneas devido às concentrações mínimas de ácidos fenólicos nas leguminosas (RALPH, 2010; VANHOLME; DEMEDTS; MORREEL et al., 2010). Entretanto, se o procedimento de LBA quantifica os ácidos fenólicos esterificados junto com a lignina condensada ainda é uma questão a ser definida. Porém, esta hipótese parece improvável já que uma das etapas do método LBA utiliza etanol para o tratamento das amostras. É sabido que o etanol solubiliza compostos fenólicos de baixo peso molecular (conhecidos como lignina nativa de Braun) que não devem ser confundidos com lignina original (KIRK; OBST, 1988). Outra evidência foi reportada por Fukushima e Savioli (2001) que observaram maiores coeficientes de correlação da MS negativos com a digestibilidade *in vitro* ($r^2 = -0,94$ e $-0,82$) em gramíneas do que em leguminosas. Isto sugere que os fenólicos cinâmicos debilmente ligados não são quantificados pelo método LBA, pois tenderia a fornecer valores mais baixos nos índices de correlação com a digestibilidade. E é reforçado pela observação de que

fragmentos de lignina solúvel provavelmente são digeridos pelas bactérias ruminais (FUKUSHIMA; DEHORITY; LOERCH, 1991).

Outro questionamento reside no fato do método LBA, por ser um método espectroscópico, também poderia detectar outros compostos fenólicos que absorvem UV na região de 282 nm, muito próximo ao comprimento de onda que a lignina absorve, como por exemplo, proteína, taninos e flavonóides. Entretanto, o método LBA preconiza o uso de uma preparação fibrosa à qual se denominou de parede celular bruta. Durante a preparação deste material, taninos e flavonóides são removidos (MORRISON, 1972). Portanto, estes compostos não seriam problemas para o método LBA. Relativo à possível interferência da proteína da parede celular nas leituras de absorbância, Morrison ao analisar o precipitado formado após a centrifugação da PC digerida na solução de brometo de acetila a 25%, concluíram que este estava formado quase totalmente por proteínas. Em outras palavras, a proteína é insolúvel no reagente brometo de acetila. Os resultados de Fukushima (dados não publicados) concordaram com as afirmações de Morrison, ao determinar o conteúdo de proteína no precipitado resultante da digestão e centrifugação da PC com solução de brometo de acetila a 25%, observarem valores entre 515,4 a 693,0 g/kg neste resíduo. O sedimento restante era constituído de cinzas. Sendo assim, estas substâncias provavelmente não interferirão com a densidade ótica para determinação do teor de lignina.

Os valores de digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS), obtidos neste estudo, variaram de 31,48% a 57,06% (Figura 3). A digestibilidade acompanhou, de forma inversa, o estágio de maturidade das plantas ao longo dos 7 cortes. Conforme os teores de lignina aumentavam com o passar do tempo os valores de digestibilidade decresciam, o que sustenta as observações de vários autores, previamente citados neste documento, no que se refere às mudanças fisiológicas na composição das forrageiras à medida que amadurecem com relação à degradação microbiana.

Figura 3 - Valores de DIVMS (g/kg) para todas as espécies nos 7 estádios de maturidade

De longa data é conhecido o fato de que a lignina aumenta sua concentração à medida que as plantas amadurecem e precisam de maior sustentação. Tal observação foi constatada neste estudo e é apresentada graficamente (Figura 3). É importante ressaltar que, independentemente do método empregado para quantificar a lignina, os teores deste polímero aumentaram à medida que avançou o estágio de maturidade das espécies forrageiras (Figuras 4 a 8).

Figura 4 - Valores de lignina (g/kg) em *Brachiaria brizantha* cv. Marandú e erro padrão da média

Figura 5 - Valores de lignina (g/kg) em *Brachiaria brizantha* cv. Xaraés e erro padrão da média

Figura 6 - Valores de lignina (g/kg) em *Panicum maximum* cv. Mombaça e erro padrão da média

Figura 7 - Valores de lignina (g/kg) em *Pennisetum purpureum* cv. Cameroon e erro padrão da média

4.3 CORRELAÇÃO ENTRE DIGESTIBILIDADE IN VITRO E TEOR DE LIGNINA

A correlação estatística entre o teor de lignina, medido por um determinado método analítico, e um ensaio de digestibilidade (*in vitro*, neste caso) é uma das melhores ferramentas que auxiliam na caracterização de um método analítico. A exatidão química com que os nutrientes de uma amostra são determinados melhora o grau de correlação entre os nutrientes e a medida de valor nutritivo sendo investigada (FONNESBECK; HARRIS; KEARL, 1975). O grau de correlação existente entre a digestibilidade 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; ROBERTSON, 1980).

Os valores de digestibilidade *in vitro* da MS (DIVMS) diminuíram significativamente ($P < 0.05$) à medida que a maturidade das plantas avançou, em todas as espécies (Tabela 12).

Tabela 12 - Valores de digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS). Média dos 7 cortes para cada espécie e erro padrão da média

Especie	g/kg							EPM
	1	2	3	4	5	6	7	
<i>Brachiaria brizantha</i> cv. Marandú	552,3 A, a	551,5 A, a	520,2 A, ac	485,5 A, c	407,0 A, d	345,0 A, e	325,9 A, e	2,4953
<i>Brachiaria brizantha</i> cv. Xaraés	511,7 B, a	514,3 B, a	469,0 B, ac	445,3 B, c	441,3 A, c	401,1 A, b	337,0 A, d	2,4845
<i>Panicum maximum</i> cv. Mombaça	538,2 A, a	532,1 A, a	524,5 A, a	524,0 A, a	433,4 A, c	400,8 A, cd	357,7 A, d	1,9667
<i>Pennisetum purpureum</i> cv. Cameroon	566,1 A, a	513,7 B, b	457,6 B, c	406,6 B, d	364,6 B, e	318,4 B, f	314,8 A, f	2,5484
<i>Pennisetum purpureum</i> cv. Napier	570,7 A, a	525,4 A, a	464,2 B, b	417,5 B, b	370,1 B, c	322,2 B, c	322,2 A, c	1,6502
EPM	0,8381	0,5577	0,9837	1,5226	1,2368	1,4123	0,6478	
Todos os valores estão expressos com base na matéria seca								
Médias, dentro de colunas, seguidas por letras maiúsculas diferentes diferem significativamente P < 0.05 (Tukey)								
Médias, dentro de linhas, seguidas por letras minúsculas diferentes diferem significativamente P < 0.05 (Tukey)								
EPM = erro padrão da média								

Para todas as amostras, analisadas pelos diferentes métodos, os teores de lignina foram negativamente correlacionados com a digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS) (Tabela 13).

Tabela 13 - Correlação entre a digestibilidade in vitro da matéria seca e os 4 métodos analíticos nas amostras de 5 espécies em 7 estádios de maturação

	LDA	LPer	LK	LBA
Coeficiente de correlação de Pearson e nível significância ¹				
Especie				
<i>Brachiaria brizantha</i> cv. Marandú	-0.9720	-0.3162	-0.9599	-0.9633
	< .0001	0.2708	< .0001	< .0001
<i>Brachiaria brizantha</i> cv. Xaraés (MG5)	-0.8767	-0.8015	-0.8676	-0.8737
	< .0001	0.0010	0.0001	< .0001
<i>Panicum maximum</i> cv. Mombaça	-0.8968	-0.6716	-0.9191	-0.8857
	< .0001	0.0085	< .0001	< .0001
<i>Penissetum purpureum</i> cv. Cameroon	-0.9174	-0.8486	-0.9578	-0.9648
	< .0001	0.0001	< .0001	< .0001
<i>Penissetum purpureum</i> cv. Napier	-0.9130	-0.9155	-0.9574	-0.9541
	< .0001	< .0001	< .0001	< .0001
Todas as especies	-0.8505	-0.6804	-0.9130	-0.8883
	< .0001	< .0001	< .0001	< .0001
Lignina detergente ácido (LDA), lignina permanganato de potássio (Lper), lignina Klason (LK), lignina brometo de acetila (LBA)				
¹ r = Coeficiente de Correlação de Pearson				

Todas as amostras, a exceção da lignina permanganato de potássio (LPer), apresentaram correlações altas (> 85%) e em todos os casos foram significativas ($r < 0.05$), sendo que na maioria dos casos foram altamente significativas ($r < 0.0001$) (Tabela 13). Já que a concentração de lignina esta associada, de forma linear, à digestibilidade da MS (DIVMS) (MERTENS, 2009; WEIMER; STEVENSON; MERTENS et al., 2011). As altas correlações observadas neste estudo permitem inferir que os resultados obtidos por três dos quatro métodos variaram uniformemente dentro das gramíneas e dentro dos estádios de maturidade. A LPer não estimou de forma confiável a digestibilidade nas gramíneas deste estudo. Isto pode ter sido causado pela interferência de substâncias como pectina, taninos e flavonóides que são solubilizadas pela solução de permanganato de potássio (VANSOEST; WINE, 1968). Em um experimento paralelo conduzido por nós, foi quantificado o teor de taninos e fenóis totais em 12 gramíneas (gêneros *Brachiaria* (6), *Panicum* (4), *Cynodon* (1)) e 7 leguminosas (gêneros *Cajanus*, *Teramnus*, *Stylosanthes*, *Leucaena*, *Galactia*, *Medicago*, *Neonotonia*). Os valores variaram de 9,5 g/kg a 35,5 g/kg da MS para gramíneas e de 11,3 g/kg a 80,6 g/kg da MS em leguminosas, e que se fossem oxidados pelo permanganato de K, poderiam figurar um artefato da técnica da LPer. De acordo com o pressuposto de Van Soest e Wine (1968), estes compostos fenólicos poderiam representar viés principalmente em

plantas taníferas. Quanto à potencial interferência da pectina, gramíneas são plantas que apresentam relativamente baixos teores desta substância. A tabela 6, da página 46, mostra os teores de fibra solúvel (FS) variando de 34,7 g/kg a 62,8 g/kg da MS; considerando que provavelmente a pectina perfaz mais que a metade do total de FS, a pectina pode impactar os valores de LPer, fato que deve ser levado em consideração quando se usa essa técnica.

Muito embora os métodos LDA e LK tenham produzido diferentes valores de lignina, eles foram similares quanto à correlação com a digestibilidade e por tanto, podem estimar a digestibilidade de forrageiras com a mesma acurácia. Resultados similares foram obtidos por Jung, Mertens e Payne (1997). Hatfield, Jung e Ralph et al., (1994), também encontraram concentrações diversas entre LDA e LK, mas sugeriram que o método LK poderia fornecer valores mais acurados do total de lignina em plantas forrageiras. Fukushima e Hatfield (2004), compararam os métodos LDA, LPer, LK e LBA e observaram que o método LBA consistentemente produziu altas correlações negativas com a digestibilidade *in vitro* tanto da MS como da PC. Este trabalho exemplifica o que tem sido discutido de que os diferentes métodos analíticos fornecem diferentes resultados para a mesma amostra.

Outra constatação consistentemente reportada é que no método LDA, as gramíneas e as leguminosas mostram diferentes inclinações da reta entre o teor de lignina e a DIVMS, sendo a curva mais acentuada para as gramíneas (VAN SOEST, 1964; TOMLIN; JOHNSON; DEHORITY, 1965; KONDO; MIZUNO; KATO, 1987; VAN SOEST, 1994). Esta observação levou alguns autores (MOWAT; KWAIN; WINCH, 1969) a hipotetizarem que a lignina das gramíneas é mais inibitória à digestão do que a lignina das leguminosas. Segundo Moore e Jung (2001), esta hipótese deve ser considerada suspeita, uma vez que foi obtida com o método LDA que sabidamente subestima a concentração de lignina, mais severamente em gramíneas do que em leguminosas. Em outras palavras, a aparente inibição da lignina sobre a digestão da parede celular, maior para gramíneas que para leguminosas, pode ser simplesmente explicada pela subestimação da concentração de lignina de gramíneas pelo método LDA (LOWRY; CONLAN; SCHLINK et al., 1994). Dados recentes (Ramos, Fukushima e Kerley et al.¹ mostraram que, quando se utiliza o método LDA, a inclinação da reta de gramíneas é bem mais acentuada (-10,24) do que a inclinação de leguminosas (- 4,26); entretanto, quando se usou o método LBA,

a digestibilidade de gramíneas e leguminosas tiveram exatamente as mesmas inclinações da reta, - 4,26 e - 4,11 para gramíneas e leguminosas, respectivamente. Em outras palavras, as ligninas de gramíneas e leguminosas são igualmente inibitórias à digestão. Essa igualdade na ação inibitória da lignina pode rejeitar algumas das teorias que tentavam explicar a inibição diferenciada entre a lignina de gramíneas e de leguminosas, como por exemplo, diferenças na composição fenólica da lignina de gramíneas e leguminosas; diferente distribuição espacial da lignina na parede celular de gramíneas e leguminosas, ou ainda, que a presença de ligações covalentes, do tipo éster, entre ácidos hidroxicinâmicos da lignina e os carboidratos da parede celular de gramíneas teria papel importante na inibição.

4.4 RELAÇÃO ENTRE OS TEORES DE LIGNINA

Ao analisar a dispersão dos dados de lignina nos métodos LBA, LDA e LK, pode-se observar que são relativamente uniformes. Em outras palavras, pode-se verificar que a variabilidade dos resultados obtidos por cada método foi baixa e uniforme (Figura 10), de tal maneira que essas observações poderiam explicar os altos índices de correlação com a DIVMS.

Dentre os métodos estudados, houve maior variabilidade numérica nos dados da LBA. Isto poderia ser explicado devido ao fato que este procedimento é relativamente novo e pouco estudado. Maior precisão na técnica possivelmente melhoraria os índices de variabilidade. Essa maior variabilidade, em todos os métodos, acentuou-se à medida que as plantas amadureceram. O processo de lignificação varia entre as espécies e na medida em que a planta amadurece, aumenta e o conteúdo de lignina e aumenta também a variabilidade das amostras.

As curvas de LDA e LK caminharam praticamente juntas ao longo da maturidade. A LBA, além de apresentar valores maiores, registrou um aumento pouco mais intenso com a maturidade. É possível que o método LBA tenha tido a aptidão de captar a totalidade da lignina em plantas mais maduras. Como anteriormente mencionado, fatores externos à lignina, como interferência de taninos, flavonoides, proteína e ácidos hidroxicinâmicos podem ser descartados. Mais estudos deverão ser conduzidos para verificar se este fenômeno se repete.

A razão entre os teores de LBA e LDA foi, na média, igual a 2,23 (Figura 11). A relação LBA/LDA sugere que na LDA houve solubilização de parte da lignina pela solução de detergente ácido na razão de 2,23. Supondo-se que a análise pela LBA seja o método mais acurado, observa-se que quando se aplica este fator de correção nos dados LDA, a curva é idêntica à LBA (Figura 11).

A razão encontrada entre LBA/LDA (2,23) e a coincidência no paralelismo entre as duas curvas após a supracitada correção, traz à luz outra constatação. Pesquisadores da Cornell University ao lançarem as equações das frações de carboidratos, no modelo da Cornell Net Carbohydrate & Protein System, mais especificamente no que diz respeito à equação C, da parede celular indigestível, multiplicaram o termo lignina desta equação por um fator igual a 2,4. A justificativa é que este valor foi resultado de um trabalho de Chandler e Jewell, (1980), que observaram que após extenso período (90-120 dias) de fermentação de alguns substratos, entre eles amostras de fezes de animais herbívoros, a razão entre o carboidrato recalcitrante à degradação e a quantidade de lignina era de 2,4 na média. Quando esta equação foi posta em prática pelos pesquisadores de Cornell University, verificou-se que a correção da lignina por este fator foi o que melhor se adequou ao observado relativo à parede celular indisponível. Especula-se aqui se esse fator de correção não estaria, na realidade, encobrindo a falha do método LDA de solubilizar parcialmente a lignina, especialmente em gramíneas. Este valor de 2,4 é bem próximo ao observado neste estudo (2,23). Em outro estudo, Fukushima e Hatfield (2004) trabalhando com gramíneas, observaram valores de LDA de 62,0 g/kg e valores de LBA de 142,3 g/kg. Ao aplicar a relação LBA/LDA, obtiveram um valor de correção de 2,3. Isto sugere fortemente a teoria de subestimativa do teor de lignina no uso da LDA.

Neste contexto, o uso da LBA pode ser uma boa alternativa para prever a utilização da forragem devido à sua alta correlação com a digestibilidade. É importante anotar que, as altas correlações negativas observadas, entre o método de lignina e a digestibilidade, aparecem quando o exame é feito entre forragens de diferentes maturidades, porém, quando a maturidade das plantas é similar, a lignina e a digestibilidade frequentemente não estão correlacionadas (JUNG; VOGEL, 1992; HATFIELD; JUNG; RALPH et al., 1994). Isto sugere que o teor de lignina pode ser uma excelente medida de qualidade no mercado de forragens e formulação de rações, mas, num programa reprodutivo de plantas, onde a maturidade e a concentração de lignina são similares para todas as amostras, a concentração de lignina pode não estar tão fortemente correlacionada à digestibilidade (JUNG; ALLEN, 1995).

5 CONCLUSÕES

Mesmo que os resultados deste estudo mostrem novamente diferentes resultados nas metodologias de lignina, vale chamar a atenção ao fato de que as correlações entre os métodos e DIVMS foram altas, não só para LBA, mas também para LK e LDA. Porém, tanto a LK quanto a LDA utilizam-se de ácidos fortes que requerem adequada manipulação; além disso, recomenda-se medir proteína e cinzas nos resíduos de lignina, o que aumenta substancialmente o tempo de análise, e na LBA não é necessário realizar nenhum tipo de correção uma vez finalizado o procedimento. Recomendam-se maiores estudos, diversificando espécies forrageiras, particularmente a questão dos valores supostamente mais baixos de LBA nas leguminosas bem como definir com maior acurácia a questão de possível interferência dos ácidos hidroxicinâmicos éster ligados à estrutura da lignina de gramíneas. O método LBA é conveniente para determinar a concentração total de lignina em plantas forrageiras e uma boa opção para uso rotineiro nas análises de laboratório.

REFERÊNCIAS

AL-ANI, F.; SMITH, J. E. Effect of chemical pretreatments on the fermentation and ultimate digestibility of bagasse by *Phanerochaete chrysosporium*. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 42, n. 1, 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. ISSN 0011-183X. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A1987J178600027>. Acesso em: 2 fev. 2012.

ARMITAGE, E. R.; ASHWORTH, R. D.; FERGUSON, W. S. The determination of lignin in plant material of high protein content. **Journal of the Society of Chemical Industry-London**, v. 67, n. 6, p. 241-243, 1948. ISSN 0368-4075. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A1948YE82900012>. Acesso em: 4 abr. 2012.

BACHA, C. B. **Determinação do teor de lignina em amostras de gramíneas ao longo do crescimento através de três métodos analíticos e implicações com as equações de Cornell Net Carbohydrate and Protein System**: 2006. 83 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2006.

BACON, J. S. D.; CHESSON, A.; GORDON, A. H. Deacetylation and enhancement of digestibility. **Agriculture and Environment**, v. 6, n. 2-3, p. 115-126, 1981. ISSN 0304-1131. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A1981MQ53800004>. Acesso em: 5 ago. 2012.

BARTON, F. E.; AKIN, D. E. Digestibility of de-lignified forage cell-walls. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 25, n. 6, 1977. ISSN 0021-8561. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A1977EC00700019>. Acesso em: 28 ago. 2011.

BEN-GHEDALIA, D.; YOUSEF, E.; MIRON, J. The effects of starch-and-pectin rich diets on quantitative aspects of digestion in sheep. **Animal Feed Science and Technology**, v. 24 n. 3-4, p. 289-298, 1989.

BERCHIELLI, T. T.; PIRES, A. V.; OLIVEIRA, S. G. Nutrição de ruminantes. In: BERCHIELLI, T. T.; PIRES, A. V.; OLIVEIRA, S. G. **Nutrição de ruminantes**. 2. ed. Jaboticabal: FUNEP, 2011 2011.

BILLA, E.; TOLLIER, M. T.; MONTIES, B. Characterization of the monomeric composition of in situ wheat straw lignins by alkaline nitrobenzene oxidation: effect of temperature and reaction time. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 72, n. 1, p. 250-256, 1996.

BRILLOUET, J. M.; RIOCHET, D. Cell-wall polysaccharides and lignin in cotyledons and hulls of seeds from various lupin (*Lupinus L*) species. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 34, n. 8, p. 861-868, 1983. ISSN 0022-5142. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A1983RE00300013>. Acesso em: 26 jul. 2012

BUXTON, D. R.; BRASCHE, M. R. Digestibility of structural carbohydrates in cool-season grass and legume forages. **Crop Science**, v. 31, n. 5, p. 1338-1345, Sep-Oct. 1991. ISSN 0011-183X. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A1991GH12300052>. Acesso em: 30 ago. 2012.

BUXTON, D. R.; HORNSTEIN, J. S. Cell-wall concentration and components in stratified canopies of alfalfa, birdsfoot-trefoil, and red-clover. **Crop Science**, v. 26, n. 1, p. 180-184, Jan-Feb 1986. ISSN 0011-183X. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A1986AYW0900043>. Acesso em: 15 ago. 2012

BUXTON, D. R.; RUSSELL, J. R. Lignin constituents and cell-wall digestibility of grass and legume stems. **Crop Science**, v. 28, n. 3, p. 553-558, May-Jun 1988. ISSN 0011-183X. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A1988N309900025>. Acesso em: 13 mar. 2012

CAMM, E. L.; TOWERS, G. H. N. PHENYLALANINE AMMONIA-LYASE. **Phytochemistry**, v. 12, n. 5, p. 961-973, 1973. ISSN 0031-9422. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A1973P479100001>. Acesso em: 17 nov. 2011.

CARPITA, N. C.; GIBEAUT, D. M. Structural models of primary-cell walls in flowering plants - consistency of molecular-structure with the physical-properties of the walls during growth. **Plant Journal**, v. 3, n. 1, p. 1-30, Jan 1993. ISSN 0960-7412. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A1993KJ19500001>. Acesso em: 13 set. 2012.

CASLER, M. D. Breeding forage crops for increased nutritional value. **Advances in Agronomy**, v. 71, p. 51-71, 2001. ISSN 0065-2113. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000165288800002>. Acesso em: 24 out. 2011.

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

CHANDLER, J. A.; JEWELL, W. J. PREDICTING METHANE FERMENTATION BIODEGRADABILITY. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 22, p. 93-107, 1980. ISSN 0006-3592. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A1980KT01700010>. Acesso em: 14 mai. 2012.

CHANG, X. F.; CHANDRA, R.; BERLETH, T.; BEATSON, R. P. Rapid, microscale, acetyl bromide-based method for high-throughput determination of lignin content in *Arabidopsis thaliana*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 16, p. 6825-6834, Aug. 2008. ISSN 0021-8561. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000258633700007>. Acesso em: 17 set. 2011

CHESSON, A.; MONRO, J. A. Legume pectic substances and their degradation in the ovine rumen. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 33, n. 9, p. 852-859, 1982. ISSN 0022-5142. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A1982PN30100006>. Acesso em: 14 jan. 2012.

CHURCH, T.; HELMER, D.; FITZGERALD, D.; DZIKOWSKI, P. Research initiatives on environmental impacts of intensive livestock operations. **Advances in Pork Production**, Vol 9, 1998. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000074667600008>. Acesso em: 19 set. 2012.

CHURCH, D. C.; POND, W. G. Basic animal nutrition and feeding. In: CHURCH, D. C.; POND, W. G. **Basic animal nutrition and feeding**. New York, USA: John Wiley and Sons Press, 1998.

COELHO DA SILVA, J. F. C.; LEÃO, M. I. Fundamentos de nutrição de ruminantes. In: COELHO DA SILVA, J. F. C.; LEÃO, M. I. **Fundamentos de nutrição de ruminantes**, Piracicaba: Livroceres, v. 1, 1979.

DARVILL, J. E. et al. Structure of plant-cell walls .11. glucuronoarabinoxylan, a 2nd hemicellulose in the primary-cell walls of suspension-cultured sycamore cells. **Plant Physiology**, v. 66, n. 6, p. 1135-1139, 1980. ISSN 0032-0889. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A1980KW32000024>. Acesso em: 6 nov. 2011.

DEHORITY, B. A.; JOHNSON, R. R.; CONRAD, H. R. Digestibility of forage hemicellulose and pectin by rumen bacteria in vitro and effect of lignification thereon. **Journal of Dairy Science**, v. 45, n. 4, p. 508-512, 1962. ISSN 0022-0302. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A19624623B00006>. Acesso em: 21 jan. 2012.

ESCOLA SENAI "Theobaldo De Nigris" e Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo. Celulose e Papel, v. 1, In: PHILIP, P.; D'ALMEIDA, M. L. O. (Ed.). **Tecnologia de fabricação da pasta celulósica**. 2. ed. São Paulo: ITP, 1988.

EUCLIDES, K.; FIGUEIREDO, G. R.; EUCLIDES, V. P. B. Production efficiency of beef-cows with different milk-yield potentials. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 30, n. 7, p. 1003-1007, Jul 1995. ISSN 0100-204X. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A1995TB08100016>. Acesso em: 20 jun. 2012.

FAHEY, G. C.; JUNG, H. G. Lignin as a marker in digestion studies - a review. **Journal of Animal Science**, v. 57, n. 1, p. 220-225, 1983. ISSN 0021-8812. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A1983QZ55800026>. Acesso em: 28 fev. 2012.

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 Botânica**, v. 9, p. 159-166, 1986.

FISHER, D. S.; BURNS, J. C.; POND, K. R. Kinetics of invitro cell-wall disappearance and invivo digestion. **Agronomy Journal**, v. 81, n. 1, p. 25-33, Jan-Feb 1989. ISSN 0002-1962. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A1989T197300005>. Acesso em: 31 mai. 2012.

FENGEL, D.; WEGENER, G. Wood, chemistry, ultrastructure and reactions. In: FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood, chemistry, ultrastructure and reactions**. Berlin: Walter de Gruyter, 1984.

FONNESBECK, P. V.; HARRIS, L. E.; KEARL, L. C. Estimating de from chemical-analyses. **Journal of Animal Science**, v. 41, n. 1, p. 1150-1184, 1975. ISSN 0021-8812. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A1975AH59500306>. Acesso em: 15 set. 2011.

FOX, D. G.; SNIFFEN, C. J.; O'CONNOR, J. D.; RUSSELL, J. B.; VAN SOEST, P. J. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets .3. Cattle requirements and diet adequacy. **Journal of Animal Science**, v. 70, n. 11, p. 3578-3596, Nov. 1992. ISSN 0021-8812. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A1992JW09000037>. Acesso em: 11 abr. 2012.

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**. Thesis (Ph.D. in Animal Nutrition) - The Ohio State University, Columbus, OH: OSU, 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, n. 12, p. 3135-3143, Dec. 2000. ISSN 0021-8812. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000165918900017>. Acesso em: 4 fev. 2011.

FUKUSHIMA, R. S.; DEHORITY, B. A.; LOERCH, S. C. Modification of a colorimetric analysis for lignin and its use in studying the inhibitory effects of lignin on forage digestion by ruminal microorganisms. **Journal of Animal Science**, v. 69, n. 1, p. 295-304, Jan. 1991. ISSN 0021-8812. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A1991FW97700037>. Acesso em: 21 jan. 2012.

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 Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 7, p. 3133-3139, Jul. 2001. ISSN 0021-8561. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000170043400001>. Acesso em: 3 out. 2011.

_____. Phenolic composition of dioxane lignins as determined by nitrobenzene oxidative reaction. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 38, n. 3, p. 373-378, Mar. 2003. ISSN 0100-204X. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000182200500006>. Acesso em: 16 set. 2012.

_____. Comparison of the acetyl bromide spectrophotometric method with other analytical lignin methods for determining lignin concentration in forage samples. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 12, p. 3713-3720, Jun. 16 2004. ISSN 0021-8561. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000221963100006>. Acesso em: 8 abr. 2012.

FUKUSHIMA, R. S.; KERLEY, M. S. Use of lignin extracted from different plant sources as standards in the spectrophotometric acetyl bromide lignin method. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 8, p. 3505-3509, Apr. 27 2011. ISSN 0021-8561. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000289613500005>. Acesso em: 25 jun. 2012.

FUKUSHIMA, R. S.; KERLEY, M.S.; PORTER, J. H.; KALLEMBACK, R. Presença de lignina potencialmente solúvel na solução de detergente ácido. In: PRADA E SILVA, L. F.; DOS SANTOS, M. V.; GOBESSO, A. A. O.; GAMEIRO, A. H.; FUKUSHIMA, R. S., **Novos Desafios da Pesquisa em Nutrição e Produção Animal**. Pirassununga, SP: 5D, 2012.

FUKUSHIMA, R. S.; SAVIOLI, N. M. D. Correlation between in vitro cell wall digestibility and three analytical methods for quantifying lignin. **Revista Brasileira De Zootecnia-Brazilian Journal of Animal Science**, v. 30, n. 2, p. 302-309, Mar-Apr. 2001. ISSN 1516-3598. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000202837400003>. Acesso em: 12 jan. 2012.

FUKUSHIMA, R. S.; WEIMER, P. J.; KUNZ, D. A. Photocatalytic interaction of resazurin N-oxide with cysteine optimizes preparation of anaerobic culture media. **Anaerobe**, v. 8, n. 1, p. 1169-1175, Feb. 2002. ISSN 1075-9964. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000176684900005>. Acesso em: 27 nov. 2011.

FUZETO, A. P. **Determinação do teor de lignina em amostras vegetais através de três métodos analíticos e correlação com digestibilidade in vitro**. Dissertação (Mestrado em Nutrição Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2003. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/10/10135/tde-17092007-165756/>>. Acesso em: 14 nov. 2011.

GLAZER, A. N.; NIKAIIDO, H. Microbial Biotechnology: Fundamentals of Applied Microbiology. **Microbial biotechnology: fundamentals of applied microbiology**. New York: WH Freeman and Company, 1995.

GOERING, H. K.; SMITH, L. W.; VAN SOEST, P. J.; GORDON, C. H. Digestibility of roughage materials ensiled with sodium chlorite. **Journal of Dairy Science**, v. 56, n. 2, p. 233-240, 1973. ISSN 0022-0302. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A1973O935600016>. Acesso em: 28 jul. 2012.

GORDON, A. J. Comparison of some chemical and physical-properties of alkali lignins from grass and lucerne hays before and after digestion by sheep. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 26, n. 10, p. 1551-1559, 1975. ISSN 0022-5142. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A1975AY87000013>. Acesso em: 10 mai. 2012.

GRABBER, J. H.; RALPH, J.; HATFIELD, R. D.; QUIDEAU, S. P-hydroxyphenyl, guaiacyl, and syringyl lignins have similar inhibitory effects on wall degradability. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, n. 7, p. 2530-2532, Jul. 1997. ISSN 0021-8561. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A1997XL45500029>. Acesso em: 1 ago. 2012.

HALL, M. B.; CORNELL, U. PECTIN - The structural non-structural carbohydrate. In: CORNELL NUTRITION CONFERENCE FOR FEED MANUFACTURERS, **1994, Rochester. Proceedings...**, 1994. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A1994BC07D00003 >. Acesso em: 3 ago. 2012.

HALL, M. B.; HOOVER, W. B.; JENNINGS, J.P.; WEBSTER, T.K.M. A method for partitioning neutral detergent-soluble carbohydrates. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 79, n. 15, p. 2079 - 2086, Dec. 1999. ISSN 0022-5142. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000084669500004>. Acesso em: 8 abr. 2011.

HALL, M. B.; LARSON, C. C. Ruminal protein metabolites and fibre fermentation differ among nonfibre carbohydrate and protein sources. **Journal of Animal and Feed Sciences**, v. 13, p. 311-322, 2004. ISSN 1230-1388. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000223610500018>. Acesso em: 6 fev. 2012.

HARRIS, P. J.; HARTLEY, R. D. Detection of bound ferulic acid in cell-walls of gramineae by ultraviolet fluorescence microscopy. **Nature**, v. 259, n. 5543, p. 508-506, 1976. ISSN 0028-0836. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A1976BE90400052>. Acesso em: 4 nov. 2011.

HATFIELD, R. D.; RALPH, J.; GRABBER, J. H. Cell wall cross-linking by ferulates and diferulates in grasses. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 79, n. 3, p. 2351-2358, 1999.

HATFIELD, R.; FUKUSHIMA, R. S. Can lignin be accurately measured? **Crop Science**, v. 45, n. 3, p. 832-839, May-Jun. 2005. ISSN 0011-183X. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000229105700004>. Acesso em: 24 out. 2012.

HATFIELD, R. D. Carbohydrate-composition of alfalfa cell-walls isolated from stem sections differing in maturity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 40, n. 3, p. 424-430, Mar. 1992. ISSN 0021-8561. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A1992HK05400012>. Acesso em: 15 jan. 2012.

HATFIELD, R. D.; JUNG, H. J.; RALPH, J.; BUXTON, D. R.; WEIMER, P. J. A comparison of the insoluble residues produced by the klason lignin and acid detergent lignin procedures. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 65, n. 1, p. 51-58, May 1994. ISSN 0022-5142. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A1994NK96500008>. Acesso em: 11 jan. 2012.

HATFIELD, R. D.; WEIMER, P. J. Degradation characteristics of isolated and in-situ cell-wall lucerne pectic polysaccharides by mixed ruminal microbes. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 69, n. 2, p. 185-196, Oct. 1995. ISSN 0022-5142. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A1995RY54800007>. Acesso em: 23 jan. 2012.

HIGUCHI, T.; ITO, Y.; KAWAMURA, I. P-Hydroxyphenylpropane component of grass lignin and role of tyrosine-ammonia lyase in its formation. **Phytochemistry**, v. 6, n. 6, p. 875-881, 1967. ISSN 0031-9422. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A19679431100015>. Acesso em: 2 ago. 2012.

HIGUCHI, T. Microbial degradation of dilignols as lignin model, In: KIRK, T. K.; HIGUCHI, T.; CHANG, H. M. **Lignin biodegradation: microbiology, chemistry, and potential applications**. Boca Raton, FL: CRC Press, v. 1, 1980.

HO, Y. W.; ABDULLAH, N.; JALALUDIN, S. Penetrating structures of anaerobic rumen fungi in cattle and swamp buffalo. **Journal of General Microbiology**, v. 134, p. 177-181, Jan. 1988. ISSN 0022-1287. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A1988L624000021>. Acesso em: 5 mai. 2012.

HOFMANN, L.; RIES, R. E. Vegetation and animal production from reclaimed mined land pastures. **Agronomy Journal**, v. 80, n. 1, p. 40-44, Jan-Feb. 1988. ISSN 0002-1962. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A1988L934600009>. Acesso em: 8 dic. 2011.

IYAMA, K.; LAM, T. B. T.; STONE, B. A. Phenolic-acid bridges between polysaccharides and lignin in wheat internodes. **Phytochemistry**, v. 29, n. 3, p. 733-737, 1990. ISSN 0031-9422. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A1990CU56000007>. Acesso em: 15 dic. 2011.

IYAMA, K.; WALLIS, A. F. A. Effect of acetyl bromide treatment on the ultraviolet-spectra of lignin model compounds. **Holzforschung**, v. 43, n. 5, p. 309-316, Oct. 1989. ISSN 0018-3830. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A1989AW40700006>. Acesso em: 20 ago. 2012.

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

JUNG, H. G.; ALLEN, M. S. Characteristics of plant-cell walls affecting intake and digestibility of forages by ruminants. **Journal of Animal Science**, v. 73, n. 9, p. 2774-2790, Sep. 1995. ISSN 0021-8812. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A1995RV36400033>. Acesso em: 26 abr. 2012.

JUNG, H. G.; DEETZ, D. A. Cell-wall lignification and degradability. In: JUNG, H. J.; BUXTON, D. R.; HATFIELD, R. D.; RALPH, J. **Forage cell wall structure and digestibility**. Madison, WI: Eds. ASA-CSSA-SSSA, 1993. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A1993BY63Z00013>. Acesso em: 27 fev. 2012.

JUNG, H. G.; ENGELS, F. M. Alfalfa stem tissues: Cell wall deposition, composition, and degradability. **Crop Science**, v. 42, n. 2, p. 524-534, Mar-Apr. 2002. ISSN 0011-183X. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000174093500030>. Acesso em: 19 jan. 2012.

JUNG, H. G.; FAHEY, G. C. Nutritional implications of phenolic monomers and lignin - a review. **Journal of Animal Science**, v. 57, n. 1, p. 206-219, 1983. ISSN 0021-8812. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A1983QZ55800025>. Acesso em: 29 jan. 2012.

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**, v. 80, n. 8, p. 1622-1628, Aug 1997. ISSN 0022-0302. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A1997XT45200018>. Acesso em: 14 mai. 2012.

JUNG, H. G.; VOGEL, K. P. Influence of lignin on digestibility of forage cell-wall material. **Journal of Animal Science**, v. 62, n. 6, p. 1703-1712, Jun. 1986. ISSN 0021-8812. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A1986C813700026>. Acesso em: 22 out. 2012.

JUNG, H. J.; VAREL, V. H.; WEIMER, P. J.; RALPH, J. Accuracy of Klason lignin and acid detergent lignin methods as assessed by bomb calorimetry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, n. 5, p. 2005-2008, May 1999. ISSN 0021-8561. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000080427200035>. Acesso em: 17 jan. 2012.

JUNG, H. J.; VOGEL, K. P. Lignification of switchgrass (*panicum-virgatum*) and big bluestem (*andropogon-gerardii*) plant-parts during maturation and its effect on fiber degradability. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 59, n. 2, p. 169-176, 1992. ISSN 0022-5142. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A1992JG75900005>. Acesso em: 20 jan. 2012.

KIRK, T. K.; OBST, J. R. Lignin determination. **Methods in Enzymology**, v. 161, p. 87-101, 1988. ISSN 0076-6879. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A1988R319100012>. Acesso em: 19 fev. 2012.

KONDO, T.; MIZUNO, K.; KATO, T. Some characteristics of forage plant lignin. **Jarq-Japan Agricultural Research Quarterly**, v. 21, n. 1, Jul. 1987. ISSN 0021-3551. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A1987J949700008>. Acesso em: 11 dez. 2011.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. Principios de Bioquímica. In: LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica**. 2. ed. São Paulo: Sarvier, 1995.

LEWIS, B. A.; CORNELL, U. Fiber chemistry, an historical-perspective. **1993 In: CORNELL NUTRITION CONFERENCE FOR FEED MANUFACTURERS, 1993**, Madison, WI: **Proceedings...**, 1993. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A1993BZ42N00001>. Acesso em: 22 mar. 2012.

LOWRY, J. B.; CONLAN, L. L.; SCHLINK, A. C.; McSWEENEY, C. S. Acid detergent dispersible lignin in tropical grasses. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 65, n. 1, p. 41-49, May 1994. ISSN 0022-5142. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A1994NK96500007>. Acesso em: 23 mai. 2012.

LU, F.; RALPH, J. The DFRC method for lignin analysis. 2. Monomers from isolated lignin. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 46, n. 46, p. 547-552, 1998.

LU, F.; RALPH, J. Derivatization followed by reductive cleavage (DFRC method). A new method for lignin analysis: protocol for analysis of DFRC monomers. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 45, n. 2, p. 125-128, 1997.

MALAFAIA, P. A. M.; VALADARES, S. C. F.; VIEIRA, A. M.; SILVA, J. F. C.; PEREIRA, J. C. Determination of carbohydrate fractions that constitute the total carbohydrates and ruminal kinetics of neutral detergent fiber in some ruminant feeds. **Revista Brasileira De Zootecnia-Brazilian Journal of Animal Science**, v. 27, n. 4, p. 790-796, Jul-Aug. 1998. ISSN 0100-4859. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000076957700025>. Acesso em: 29 jul. 2011.

MANSFIELD, S. D.; MOONEY, C.; SADDLER, J. N. Substrate and enzyme characteristics that limit cellulose hydrolysis. **Biotechnology Progress**, v. 15, n. 5, Sep-Oct. 1999. ISSN 8756-7938. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000082936200004>. Acesso em: 1 nov. 2012.

MERTENS, D. R. Regulation of forage intake. In: FAHEY, G. C. **Forage Quality, Evaluation, and Utilization**. Madison, WI: American Society of Agronomy, 1994. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A1994BA14N00011>. Acesso em: 3 nov. 2011.

_____. Using fiber and carbohydrate analysis to formulate dairy rations. **Journal of Animal Science**, v.80, n. 2, p. 373-378, 1996.

_____. Impact of NDF Content and Digestibility on Dairy Cow Performance. **Advances in Dairy Technology**, v. 21, p. 191-201, 2009. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000266158400016>. Acesso em:12 jan. 2012.

MOORE, K. J.; HATFIELD, R. D. Carbohydrates and forage quality. In: FAHEY, G. C. **Forage Quality, Evaluation, and Utilization**. Madison, WI: American Society of Agronomy, 1994. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A1994BA14N00006>. Acesso em:12 dez. 2011.

MOORE, K. J.; JUNG, H. J. G. Lignin and fiber digestion. **Journal of Range Management**, v. 54, n. 4, p. 420-439, Jul. 2001. ISSN 0022-409X. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000169679200016 >. Acesso em: 11 jan. 2012.

MORRISON, I. M. Semi-micro method for determination of lignin and its use in predicting digestibility of forage crops. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 23, n. 6, p. 455-463, 1972. ISSN 0022-5142. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A1972M999400019>. Acesso em: 27 jun. 2012.

_____. The effect of physical and chemical treatments on the degradation of wheat and barley straws by rumen liquor-pepsin and pepsin-cellulase systems. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 34, n. 12, p. 1323-1329, 1983. ISSN 0022-5142. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A1983RV34400002>. Acesso em: 14 set. 2012.

MORRISON, I. M.; STEWART, D. Determination of lignin in the presence of ester-bound substituted cinnamic-acids by a modified acetyl bromide procedure. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 69, n. 2, p. 151-157, Oct. 1995. ISSN 0022-5142. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A1995RY54800003>. Acesso em: 27 jun. 2012.

MOWAT, D. N.; KWAIN, M. L.; WINCH, J. E. Lignification and in vitro cell wall digestibility of plant parts. **Canadian Journal of Plant Science**, v. 49, n. 4, p. 499-504, 1969. ISSN 0008-4220. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A1969D507900017>. Acesso em: 4 fev. 2012.

NELSON, C. J.; MOSER, L. E. Plant factors affecting forage quality. In: FAHEY, G. C. **Forage Quality, Evaluation, and Utilization**. Madison, WI: American Society of Agronomy, 1994. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A1994BA14N00003>. Acesso em: 20 mai. 2012.

NOCEK, J. E.; RUSSELL, J. B.; FALLON, J. B. Influence of chemical drying agent and surfactant on drying time and ruminal nutrient digestion of 1st-cutting alfalfa hay. **Agronomy Journal**, v. 80, n. 3, p. 525-532, May-Jun. 1988. ISSN 0002-1962. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A1988N558800026>. Acesso em: 30 jun. 2011.

NUNES, I. J. Cálculo e avaliação de rações e suplementos. In: NUNES, I. J. **Cálculo e avaliação de rações e suplementos**. Belo Horizonte: EP-MVZ, 1998.

NUSSIO, L.G.; MANZANO, R.P.; PEDREIRA, C.G.S. Valor alimentício em plantas do gênero *Cynodon*. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO DA PASTAGEM, 1998, Piracicaba: Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz, 1998.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; SOCCOL, V. T. Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 74, n. 1, p. 69-80, Aug. 2000. ISSN 0960-8524. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000086842700008>. Acesso em: 23 mai. 2012.

PATERSON, J. A.; BELYEA, R. L.; BOWMAN, J.P.; KERLEY, M. S.; WILLIAMS, J. E. The impact of forage quality and supplementation regimen on ruminant animal intake and performance. In: FAHEY, G. C. **Forage quality, evaluation and utilization**. Madison, WI: American Society of Agronomy, 1994.

QUEIROZ, M. A. A.; FUKUSHIMA, R. S.; GOMIDE, C. A.; BRAGA, M. R. Substitution of crude cell wall for neutral detergent fibre in the equations of the Cornell Net Carbohydrate and Protein System that predict carbohydrate fractions: application to sunflower (*Helianthus annuus* L.). **Animal**. England, v. 2, p. 1087-1092, 2008.

QUEIROZ, M. A. A.; FUKUSHIMA, R. S.; GOMIDE, C. A.; BRAGA, M. R. Substitution of neutral detergent fiber for crude cell wall in the equations that estimate carbohydrate fractions of the Cornell system suggest creation of a specific fraction for pectin(1). **Canadian Journal of Animal Science**, v. 86, n. 4, p. 599, Dec. 2006. ISSN 0008-3984. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000245387200120>. Acesso em: 27 out. 2011.

RALPH, J. Hydroxycinnamates in lignification. **Phytochemistry**, v. 9, p. 65-83, 2010.

RALPH, J.; HATFIELD, R. D.; GRABBER, J. H.; JUNG, H. G.; QUIDEAU, S.; HELM, R. F. Cell wall cross-linking in grasses by ferulates and diferulates. In: LEWIS, N. G.; SARKANEN, S. **Lignin and lignin biosynthesis**. Washington, DC: American Chemical Society, 1998.

REINHART, G. A.; SUNVOLD, G. D. In vitro fermentation as a predictor of fiber utilization. In: IAMS INTERNATIONAL NUTRITION SYMPOSIUM, 1996, Wilmington. **Proceedings...** Wilmington: Orange Frazer Press, 1996.

RIBEIRO, K. G.; PEREIRA, O. G.; VALADARES, S. C. F.; GARCIA, R.; CABRAL, L. S. Characterization of the protein and the carbohydrate fractions, and the respective degradation rates of Tifton 85 bermudagrass hays at different regrowth ages. **Revista Brasileira De Zootecnia-Brazilian Journal of Animal Science**, v. 30, n. 2, p. 589-595, Mar-Apr. 2001. ISSN 1516-3598. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000202837400040>. Acesso em: 27 jan. 2012.

RUSSELL, J. B.; O'CONNOR, J. D.; FOX, D. G.; VAN SOEST, P. J.; SNIFFEN, C. J. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets .1. Ruminant fermentation. **Journal of Animal Science**, v. 70, n. 11, p. 3551-3561, Nov. 1992. ISSN 0021-8812. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A1992JW09000035>. Acesso em: 14 jul. 2012.

RUSSELL, J. B.; RYCHLIK, J. L. Factors that alter rumen microbial ecology. **Science**, v. 292, n. 5519, p. 1119-1122, May 11 2001. ISSN 0036-8075. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000168609200047>. Acesso em: 27 nov. 2011.

SALISBURY, F. B.; ROSS, C. W. Plant Physiology. Fourth Edition. In: SALISBURY, F. B.; ROSS, C. W. **Plant physiology**. 4. ed. California: Wadsworth Publishing Company, 1991.

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

SAVIOLI, M. M. D.; FUKUSHIMA, R. S. Extraction of lignin through the acetyl bromide reagent: Influence of forage species, maturity stage and plant fraction. **Revista Brasileira De Zootecnia-Brazilian Journal of Animal Science**, v. 29, n. 6, p. 1969-1981, Nov-Dec. 2000. ISSN 1516-3598. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000176458800008>. Acesso em: 14 nov. 2011.

SAVIOLI, N. M. F.; FUKUSHIMA, R. S.; LIMA, C. G.; GOMIDO, C. A. Yield and spectrophotometric pattern of lignin extracted from cell wall, neutral detergent fiber or acid detergent fiber. **Revista Brasileira De Zootecnia-Brazilian Journal of Animal Science**, v. 29, n. 4, p. 988-996, Jul-Aug. 2000. ISSN 1516-3598. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000176457900007>. Acesso em: 5 out. 2012.

SHARMA, H. S. S. Compositional analysis of neutral detergent, acid detergent, lignin and humus fractions of mushroom compost. **Thermochimica Acta**, 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**, Paris, v. 6, p. 265-271, 1986.

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. ISSN 0021-8561. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A1970G822000025>. Acesso em: 15 jan. 2011.

SNIFFEN, C. J.; O'CONNOR, J. D.; VAN SOEST, P. J.; FO, D. G.; RUSSELL, J. B. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets .2. Carbohydrate and protein availability. **Journal of Animal Science**, v. 70, n. 11, p. 3562-3577, Nov. 1992. ISSN 0021-8812. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A1992JW09000036>. Acesso em: 25 fev. 2012.

SULLIVAN, J. T. A rapid method for the determination of acid-insoluble lignin in forages and its relation to digestibility. **Journal of Animal Science**, v. 18, n. 4, p. 1292-1298, 1959. ISSN 0021-8812. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A1959WM02800014>. Acesso em: 4 fev. 2012.

SUN, Y.; CHENG, J. Y. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. **Bioresource Technology**, v. 83, n. 1, p. 1-11, May 2002. ISSN 0960-8524. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000175355300001 >. Acesso em: 25 out. 2012.

THEANDER, O.; WESTERLUND, E. A. Studies on dietary fiber .3. improved procedures for analysis of dietary fiber. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 34, n. 2, p. 330-336, Mar-Apr. 1986. ISSN 0021-8561. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A1986A702200046>. Acesso em: 11 jan. 2012.

TILLEY, J. A.; TERRY, R. A. Two stages techniques for in vitro digestion of forage crops. **Journal of British Grassland Society**, v.18, p.104-111, 1963.

THOMAS, B.; ARMSTRONG, D. G. A study of some methods at present used for the determination of lignin. **Journal of Agricultural Science**, v. 39, n. 4, p. 335-346, 1949. ISSN 0021-8596. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A1949XY95100005>. Acesso em: 3 jul. 2012.

TOMLIN, D. C.; JOHNSON, R. R.; DEHORITY, B. A. Relationship of lignification to in vitro cellulose digestibility of grasses and legumes. **Journal of Animal Science**, v. 24, n. 1, p. 161-165, 1965. ISSN 0021-8812. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A19656212200030>. Acesso em: 1 out. 2011.

TRAXLER, M. J.; FOX, D. G.; VAN SOEST, P. J.; PELL, A. N.; LASCANO, C. E.; LANNA, D. P.; MOORE, J. E.; LANA, R. P.; VELÉZ, M.; FLORES, A. Predicting forage indigestible NDF from lignin concentration. **Journal of Animal Science**, v. 76, n. 5, p. 1469-1480, May 1998. ISSN 0021-8812. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000073765000028>. Acesso em: 7 mai. 2012.

UDÉN, P. Recovery of insoluble fibre fractions by filtration and centrifugation. **Animal Feed Science and Technology**, v. 129, n. 3-4, p. 316-328, Sep. 2006. ISSN 0377-8401. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000240041100011>. Acesso em: 11 fev. 2012.

UDÉN, P.; ROBINSON, P. H.; WISEMAN, J. Use of detergent system terminology and criteria for submission of manuscripts on new, or revised, analytical methods as well as descriptive information on feed analysis and/or variability. **Animal Feed Science and Technology**, v. 118, n. 3-4, p. 181-186, Feb. 2005. ISSN 0377-8401. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000226784900001>. Acesso em: 16 jan. 2012.

VAN SOEST, P. J. Nutritional ecology of the ruminant. Second edition. In: VAN SOEST, P. J. **Nutritional ecology of the ruminant**. 2. ed. Ithaca, NY: Cornell University Press, 1994. Disponível em: <Go to ISI>://ZOOREC:ZOOR13300069348>. Acesso em: 10 mar. 2012.

VANHOLME, R.; DEMEDTS, B.; MORREEL, K.; RALPH, J.; BOERJAN, W. Lignin Biosynthesis and Structure. **Plant Physiology**, v. 153, n. 3, p. 895-905, Jul 2010. ISSN 0032-0889. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000279400200001>. Acesso em: 1 out. 2012.

VANSOEST, P. J. Feeds - Use of detergents in analysis of fibrous feeds .1. Preparation of fiber residues of low nitrogen content. **Journal of the Association of Official Agricultural Chemists**, v. 46, n. 5, p. 825-829, 1963a. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A19632881B00026>. Acesso em: 1 ago. 2012.

_____. Use of detergents in analysis of fibrous feeds .2. a rapid method for determination of fiber and lignin. **Journal of the Association of Official Agricultural Chemists**, v. 46, n. 5, p. 829-835, 1963b. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A19632881B00027>. Acesso em: 22 ago. 2011.

_____. Symposium on nutrition + forage + pastures - new chemical procedures for evaluating forages. **Journal of Animal Science**, v. 23, n. 3, p. 838-845, 1964. ISSN 0021-8812. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A19643675B00302>. Acesso em: 28 mar. 2012.

_____. Development of a comprehensive system of feed analyses and its application to forages. **Journal of Animal Science**, v. 26, n. 1, p. 119-128, 1967. ISSN 0021-8812. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A19678852600022>. Acesso em: 22 jan. 2011.

_____. Composition, maturity, and nutritive value for forages. **Advances in Chemistry Series**, n. 95, p. 357-364, 1969. ISSN 0065-2393. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A1969G195500017>. Acesso em: 14 abr. 2012.

VAN SOEST, P. J.; ROBERTSON, J. B. Systems of analysis for evaluating fibrous feeds. In: PIGDEN, W. J.; BALCH, C. C.; GRAHAM, M. **Standardization of analytical methodology for feeds**. Ottawa: International Development Research Center, 1980.

VANSOEST, P. J.; ROBERTSON, J. B.; LEWIS, B. A. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. **Journal of Dairy Science**, v. 74, n. 10, p. 3583-3597, Oct 1991. ISSN 0022-0302. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A1991GJ36600040>. Acesso em: 8 jan. 2012.

VANSOEST, 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. ISSN 0004-5756. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A19678945400011>. Acesso em: 15 jan. 2012.

_____. Determination of lignin and cellulose in acid-detergent fiber with permanganate. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v. 51, n. 4, p. 780-785, 1968. ISSN 0004-5756. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A1968B501400013>. Acesso em: 29 mai. 2012.

WEIMER, P. J. Cellulose degradation by ruminal microorganisms. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 12, n. 3, p. 189-223, 1992. ISSN 0738-8551. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A1992HZ31400001>. Acesso em: 14 ago. 2012.

WEIMER, P. J.; STEVENSON, D. M.; MERTENS, D. R.; HALL, M. B. Fiber digestion, VFA production, and microbial population changes during in vitro ruminal fermentations of mixed rations by monensin-adapted and unadapted microbes.

Animal Feed Science and Technology, v. 169, n. 1-2, p. 68-78, Oct. 2011. ISSN 0377-8401. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000295445500008>. Acesso em: 2 jul. 2012.

WHITEHEAD, D. L.; QUICKE, G. V. Comparison of 6 methods of estimating lignin in grass hay. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 15, n. 6, p. 417-422, 1964. ISSN 0022-5142. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A19647032B00013>. Acesso em: 23 jan. 2012.

WHITMORE, F. W. Lignin-protein complex in cell-walls of pinus-elliottii - amino-acid constituents. **Phytochemistry**, v. 21, n. 2, p. 315-318, 1982. ISSN 0031-9422. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A1982NE65600013>. Acesso em: 15 out. 2011.

WILSON, J. R. Cell-wall characteristics in relation to forage digestion by ruminants. **Journal of Agricultural Science**, v. 122, p. 173-182, Apr. 1994. ISSN 0021-8596. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A1994NG41100001>. Acesso em: 11 set. 2012.

WILSON, J. R.; MERTENS, D. R. Cell-wall Accessibility and cell structure limitations to microbial digestion of forage. **Crop Science**, v. 35, n. 1, p. 251-259, Jan-Feb. 1995. ISSN 0011-183X. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A1995PZ54000046>. Acesso em: 2 fev. 2012.

YOUNG, R. A.; LAI, Y. Z. Kinetic analysis of alkaline degradation of amylose and cotton. **Abstracts of Papers of the American Chemical Society**, p. 15248-15256, 1971. N. Special. ISSN 0065-7727. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A1971K156400545>. Acesso em: 14 nov. 2011.