

ADRIANA PAULA FUZETO

DEDALUS - Acervo - FMVZ



11300023799

Determinação do teor de lignina em amostras vegetais através de três métodos analíticos e correlação com digestibilidade *in vitro*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Nutrição Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de mestre em Medicina Veterinária.

Departamento

Nutrição e Produção Animal

Área de concentração

Nutrição Animal

Orientador

Prof. Dr. Romualdo Shigueo Fukushima

FMVZ - 022707



10 16183

N.º CLASSIFICAÇÃO
T. 1227
11 12
11 12
N.º TOMBO
022707

546W011338153

Pirassununga
2003

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.1277 Fuzeto, Adriana Paula
FMVZ Determinação do teor de lignina em amostras vegetais através de três métodos analíticos e correlação com digestibilidade *in vitro* / Adriana Paula Fuzeto. - Pirassununga : A. P. Fuzeto, 2003.
73 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Nutrição e Produção Animal, 2003.

Programa de Pós-graduação: Nutrição Animal.
Área de concentração: Nutrição Animal.

Orientador: Prof. Dr. Romualdo Shigueo Fukushima.

1. Bambu. 2. Forragem. 3. Lignina. 4. Madeira. I. Título.

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome do autor: FUZETO, Adriana Paula

Título: Determinação do teor de lignina em amostras vegetais através de três métodos analíticos e correlação com digestibilidade *in vitro*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Nutrição Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de mestre em Medicina Veterinária.

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

À minha família: Inácio, Dilva, Eliane,
Vamila e o mais novo integrante João
Vitor; que são os espelhos de meus
valores e conduta.

AGRADECIMENTOS

À DEUS, “que concedeu aos homens a ciência e lhes entregou como herança a lei da vida” (Eclesiástico, 17)”, minha eterna gratidão por ter me dado as maiores virtudes: determinação e fé. Por ter me mostrado o caminho através de suas palavras, em todos os momentos em que eu o procurava;

À minha família, pelo apoio e confiança em meus passos, pelo amor e amizade dedicadas no decorrer de toda a minha vida; meu imenso agradecimento por terem me ensinado que o trabalho, determinação e honestidade são características primordiais no crescimento humano;

Ao Prof. Dr. Romualdo Shigueo Fukushima, pela credibilidade a mim depositada; pelo esforço, competência e seriedade que pontuam suas atividades e que nunca estiveram ausentes para a realização deste trabalho;

Aos meus amigos Plínio Luiz Silvestrini Júnior e Ellen Moronte, àqueles no qual o companheirismo é algo nato de suas personalidades, tão dignas, tão sinceras; minha eterna gratidão pelos anos de convivência e amizade fidedigna. “O amigo: um ser que a vida não explica...”;

Ao meu namorado e amigo Carlos Augusto, a quem tenho muito admiração, por toda sua ajuda, carinho e palavras de apoio de que precisei;

Aos companheiros do Laboratório de Bromatologia: Simi, Gilson, Isabel e Ari, pelo auxílio em minhas dúvidas “bromatológicas” e pelas risadas e momentos de descontração;

À Lourdes, Alessandra, Maria Lúcia, Zequinha, Zeca, Rui, Bigode, meus sinceros agradecimentos por toda a ajuda que me deram;

À colega do Departamento de Zootecnia (ZAZ), Roseli Lacerda, pelas valiosas dicas e sugestões;

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ/USP) e à Comissão de Pós-Graduação, pela oportunidade da realização deste curso;

Aos meus eternos amigos do bar *Bodeguita*: Luizinho, Taici, Guilherme, Jú, Renan, Suim, Mirella, André, Syllas, Odete, Samuel, Tiago, Thiago, Ximbica, Folinho; por terem me incentivado e me proporcionado grandes momentos de inesquecíveis alegrias;

À todos da Destilaria Irmãos Baldin & Cia Ltda, que acreditaram na minha capacidade profissional e me deram oportunidade de demonstrá-la;

À todos os alunos e companheiros do curso de Mestrado em Nutrição Animal da Faculdade de Medicina Veterinária/USP.

*Jesus disse: "O reino de Deus está dentro de você e ao seu redor
e não em prédios de madeiras ou pedra.*

*Corte um pedaço de madeira
e lá estarei, levante uma pedra e me encontraráás."*

(As máximas secretas de Jesus Vivente)

*"Você atinge seus objetivos
na mesma proporção em que batalha por eles."*

RESUMO

FUZETO, A. P. **Determinação do teor de lignina em amostras vegetais através de três métodos analíticos e correlação com digestibilidade *in vitro***. [Determination of lignin concentration in vegetable samples through three analytical procedures and correlation with *in vitro* digestibility]. 2003. 73 f. Dissertação (Mestrado em Nutrição Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2003.

A digestibilidade *in vitro* da matéria seca e da parede celular, de diferentes amostras vegetais arranjadas em três grupos: forragens, madeiras ou bambus, foi correlacionada com os teores de lignina estimados por três métodos analíticos. Os métodos empregados foram: lignina em detergente ácido (LDA), lignina Klason (LK) e lignina permanganato de potássio (LPer). Os teores de lignina foram diferentes entre os métodos, para as mesmas amostras analisadas, sendo no geral maiores para LK e LPer. Para quase todas as amostras, os teores de lignina foram negativamente correlacionados com a digestibilidade *in vitro* da matéria seca e da parede celular. O método LDA estimou razoavelmente bem a digestibilidade de forrageiras e bambus, seguindo-se a LPer. A LK não estimou bem a digestibilidade de gramíneas. Quanto às madeiras, nenhum dos três métodos foi um bom indicador da digestibilidade, mesmo o método LK, tradicionalmente usado para madeiras. Conclui-se que, nenhum dos três métodos foi totalmente satisfatório, sugerindo que a determinação analítica da lignina seja mais profundamente estudada.

Palavras-chave: bambu, forragem, lignina em detergente ácido, lignina Klason, lignina permanganato de potássio, madeira.

ABSTRACT

FUZETO, A. P. **Determination of lignin concentration in vegetable samples through three analytical procedures and correlation with *in vitro* digestibility.** [Determinação do teor de lignina em amostras vegetais através de três métodos analíticos e correlação com digestibilidade *in vitro*]. 2003. 73 f. Dissertação (Mestrado em Nutrição Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2003.

The *in vitro* digestibility either dry matter or cell wall of different vegetable samples arranged in three groups: forages, wood or bamboos was correlated with lignin concentration determined through three analytical methods. The employed methods were: acid detergent lignin (ADL), Klason lignin (KL) and potassium permanganate lignin (PerL). Lignin concentrations were different among the methods for the same samples, generally larger for KL and PerL. For almost all samples, lignin concentration was negatively correlated with *in vitro* digestibility of dry matter and cell wall. ADL method predicted digestibility of grasses and bamboos reasonably well, followed by PerL. KL content was not a good predictor of grass digestibility. Concerning woods, none of the three methods was a good predictor of digestibility, even the KL method, traditionally used for wood. It is concluded that none of the three methods was totally satisfactory, suggesting that analytical determination of lignin needs more research effort.

Key words: bamboo, grasses, acid detergent lignin, potassium permanganate lignin, Klason lignin, wood.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Biossíntese da molécula de lignina, a partir da glicose até os monômeros fenólicos componentes da macromolécula.....24
- Figura 2 - Monômeros fenólicos que compõe a lignina.....26

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Média \pm erro padrão da média dos teores de matéria seca (MS) e matéria mineral (MM), na planta intacta (pi) e na parede celular (pc), de cinco cultivares de forrageiras em estágio avançado de maturidade.....45
- Tabela 2 - Média \pm erro padrão da média dos teores de matéria seca (MS) e matéria mineral (MM), na planta intacta (pi) e na parede celular (pc), de seis espécies de madeira.....46
- Tabela 3 - Média \pm erro padrão da média dos teores de matéria seca (MS) e matéria mineral (MM), na planta intacta (pi) e na parede celular (pc), de seis espécies de bambu.....48
- Tabela 4 - Média \pm erro padrão da média dos teores de parede celular (PC), de fibra em detergente ácido (FDA) e hemicelulose de cinco cultivares de forrageiras em estágio avançado de maturidade, expressos em matéria seca (%).....49
- Tabela 5 - Média \pm erro padrão da média dos teores de parede celular (PC), de fibra em detergente ácido (FDA) e hemicelulose de seis espécies de madeira, expressos em matéria seca (%).....50
- Tabela 6 - Média \pm erro padrão da média dos teores de parede celular (PC), de fibra em detergente ácido (FDA) e hemicelulose de seis espécies de bambu, expressos em matéria seca (%).....51
- Tabela 7 - Média \pm erro padrão da média dos teores de lignina, provenientes de três procedimentos analíticos, celulose e cinzas de cinco cultivares de forrageiras em avançado estágio de maturidade, expressos em matéria seca (%).....53
- Tabela 8 - Média \pm erro padrão da média dos teores de lignina, provenientes de três procedimentos analíticos, celulose e cinzas de seis amostras de madeira, expressos em matéria seca (%).....54
- Tabela 9 - Média \pm erro padrão da média dos teores de lignina, provenientes de três procedimentos analíticos, celulose e cinzas de seis amostras de bambu, expressos em matéria seca (%).....55

Tabela 10 - Média \pm erro padrão da média da digestibilidade <i>in vitro</i> da matéria seca e da parede celular de cinco cultivares de forrageiras em estágio avançado de maturidade, expressos em matéria seca (%).....	59
Tabela 11 - Média \pm erro padrão da média da digestibilidade <i>in vitro</i> da matéria seca e da parede celular de seis espécies de madeira, expressos em matéria seca (%).....	61
Tabela 12 - Média \pm erro padrão da média da digestibilidade <i>in vitro</i> da matéria seca e da parede celular de seis espécies de bambu, expressos em matéria seca (%).....	63
Tabela 13 - Correlação entre os teores de lignina obtidos pelos três procedimentos analíticos e a digestibilidade <i>in vitro</i> da matéria seca e da parede celular de forrageiras, madeiras e bambus.....	64

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.1 Parede celular.....	16
2.2 Carboidratos estruturais.....	18
2.3 Lignina.....	20
2.3.1 Definição.....	20
2.3.2 Biossíntese da lignina.....	23
2.3.3 A importância da lignina.....	25
2.3.4 Métodos para quantificar os teores de lignina.....	31
3 MATERIAL E MÉTODO.....	36
3.1 Materiais lignocelulósicos.....	36
3.2 Análises bromatológicas.....	38
3.2.1 Preparação de parede celular.....	39
3.2.2 Determinação da matéria seca a 105°C e matéria mineral.....	39
3.2.3 Determinação da fibra em detergente ácido (FDA); lignina em detergente ácido (LDA) e lignina permanganato de potássio (LPer).....	40
3.2.4 Determinação da lignina Klason.....	42
3.2.5 Determinação da digestibilidade <i>in vitro</i>	43
3.3 Análises estatísticas.....	43
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	44
4.1 Digestibilidade <i>in vitro</i>	58
4.2 Correlação dos teores de lignina com a digestibilidade <i>in vitro</i>	62
5 CONCLUSÃO.....	66

1 INTRODUÇÃO

A lignina é o mais importante fator limitante da disponibilidade do material da parede celular das plantas para os animais herbívoros em um sistema de digestão anaeróbica (VAN SOEST, 1994). Ela é um componente não-carboidrato da parede celular dos vegetais, normalmente considerada indigestível pelo animais mamíferos (CRAMPTON; MAYNARD, 1938).

Assim, por inibir consideravelmente a digestibilidade dos constituintes da parede celular de plantas forrageiras, a lignina tem sido útil na estimativa da digestão da fibra (AKIN et al., 1977; JUNG; VOGEL, 1986). Para ser empregada com estas finalidades a lignina precisa ser determinada com elevados graus de precisão e acurácia (FAICHNEY, 1975). No entanto, os métodos corriqueiramente utilizados em laboratório para quantificar os teores de lignina, apresentam sérios entraves analíticos e em conseqüência apresentam diferentes resultados para as mesmas amostras analisadas (FUKUSHIMA; DEHORITY, 2000).

Os três métodos analíticos mais empregados para mensurar o teor de lignina são: a lignina em detergente ácido (LDA) preconizada por Van Soest (1963a), a lignina permanganato de potássio (LPer) de Van Soest e Wine (1968) e a lignina Klason (LK) desenvolvido por Theander e Westerlund (1986). No entanto, tais métodos de natureza gravimétrica apresentam sérios percalços e, muitas vezes, os resultados são mascarados por artefatos da técnica (FAICHNEY, 1975).

Embora sejam corriqueiramente utilizados, a pergunta é: “Qual destes métodos laboratoriais é o que está realmente determinando o verdadeiro teor de lignina?”.

Além da área zootécnica, a lignina é pesquisada na indústria de papel e celulose, pois interfere negativamente na confecção da pasta celulósica. Segundo D’Almeida (1988) a madeira é constituída de fibras em múltiplas camadas ligadas entre si por forças interfibrilares e pela lignina que age como ligante, portanto esta molécula precisa ser removida.

A produção brasileira de pasta celulósica baseia-se fundamentalmente em madeiras (cerca de 95%), sendo o eucalipto (*Eucalyptus* sp.) a principal matéria prima (65%), seguida pelo pinheiro (*Pinus* sp.). Outros produtos (sisal, rami, bagaço de cana, palhadas, bambu, etc.) respondem por menos de 5% do total.

Plantas forrageiras, particularmente gramíneas, possuem características não encontradas nas madeiras. Desta forma, os principais métodos analíticos para quantificar o teor de lignina em madeiras e polpas são ligeiramente diferentes daqueles empregados para plantas forrageiras.

Neste contexto, os objetivos deste trabalho foram o de determinar os teores de lignina das mais diversas amostras vegetais, através destes três métodos e correlacioná-los com um ensaio de determinação do valor nutritivo (digestibilidade *in vitro*). O grau de correlação existente entre a digestibilidade e o parâmetro medido é muitas vezes empregado para avaliar procedimentos analíticos. Embora 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).

2 REVISÃO DE LITERATURA

As forragens desempenham um papel importante na nutrição animal. A porção fibrosa, denominada parede celular, perfaz cerca de 30 a 80% da matéria seca da forragem e representa a principal fonte de energia para os ruminantes (HATFIELD et al., 1999). Porém menos que 50% desta fração é prontamente digerida pelo animal, assim, a parede celular é um fator controlador da qualidade das forragens.

2.1 Parede celular

O desempenho estrutural e funcional da parede celular das plantas, incluindo a utilização dos polissacarídeos pelos ruminantes, são controlados pela composição e organização dos componentes da parede celular. Segundo Hatfield (1992), a qualidade do caule de alfafa está relacionada com a deposição de parede celular, tais como o teor e composição de carboidratos estruturais. Corroborando com esta afirmação, Vallet et al. (1997) também ressalta o papel das ligações químicas com a molécula de lignina como fator de proteção física dos caules de alfafa.

A parede celular é composta de polissacarídeos estruturais, com variedade na composição e estrutura, ácidos hidroxicinâmicos, lignina, proteína, íons e água. As interações dos componentes, especialmente tipos de ligações covalentes, controle da organização da parede e integridade estrutural podem controlar a expansão da parede durante o crescimento e a degradação para a utilização pelos herbívoros (HATFIELD et al., 1999).

Muitos estudos sobre o desenvolvimento de métodos para isolamento dos componentes da parede celular têm sido publicados (SHARMA, 1996). Ênfase é colocada sobre a pureza das frações isoladas, na rapidez, economia e versatilidade da aplicação do método em pauta (VAN SOEST; WINE, 1968).

Os métodos utilizados para a estimativa da fibra e frações de lignina são baseados na simples extração dos componentes solúveis para remover proteína e outros materiais. Segundo Christian (1971) e Van Soest e Wine (1968), estes métodos permitem um meio conveniente para estudar as proporções dos componentes da fibra. Dentre os métodos mais comumente utilizados, estão a fibra em detergente neutro (FDN) e a fibra em detergente ácido (FDA). A FDN representa a celulose, hemicelulose e frações de lignina da parede celular das plantas, enquanto que a FDA é caracterizada pela presença de celulose e lignina (SHARMA, 1996).

Alguns métodos alternativos para a extração de parede celular têm sido utilizados recentemente, com o intuito de obter preparações de parede mais purificadas. Dentre estes, destaca-se o método de preparação de parede celular bruta (PCB), protocolado por Fukushima e Hatfield (2001), na qual são utilizados solventes orgânicos (etanol, clorofórmio e acetona) após extração hídrica a quente em aparelho de Soxhlet. De acordo com Fukushima e Savioli (2001), que estudaram

a extração de parede celular de plantas forrageiras pelos três métodos supracitados, os rendimentos de PCB e FDN foram próximos entre si e por sua vez superiores aos rendimentos de FDA. É de se esperar esta diferença, uma vez que a solução de detergente ácida solubiliza a hemicelulose; por outro lado, esta solução preserva a pectina enquanto que a solução de detergente neutro a solubiliza. Infusão em água quente como acontece na preparação de PC, remove apenas parte da pectina (FUKUSHIMA e HATFIELD, 2001). Em outras palavras, a diferença algébrica FDN – FDA para estimativa do teor de hemicelulose (VAN SOEST, 1994) pode induzir a erros naqueles materiais com substancial presença de pectina, como as leguminosas, polpa cítrica, etc.

Portanto, pressupõe-se que os diferentes procedimentos para a obtenção de parede celular induzem à modificações de ordem física ou química de tal maneira a interferir nas extrações e estas modificações podem ser dependentes da espécie botânica.

2.2 Carboidratos estruturais

Os carboidratos são amplamente distribuídos tanto nas plantas como nos animais. Nas plantas são produzidos por fotossíntese, como por exemplo a celulose e a hemicelulose que funcionam na estruturação física das plantas, e o amido que tem caráter de reserva. Esses carboidratos compreendem de 50 a 80% em peso da matéria seca das plantas.

Tais carboidratos podem ser classificados de diversas maneiras, como por exemplo baseado no número de unidades monoméricas: 1) monossacarídeos – glicose, frutose, galactose... 2) dissacarídeos – sacarose, lactose, maltose, celobiose... 3) oligossacarídeos – rafinose, estaquiose... 4) polissacarídeos – celulose, hemicelulose, amido, glicogênio, pectina...

A composição monomérica é um dos fatores determinantes das características nutritivas dos carboidratos, bem como a disponibilidade de utilização destes, como alimento pelos os animais. Por exemplo, a pectina, é rápida e extensivamente degradada a partir das matrizes das paredes, incluindo caules fortemente lignificados (CHESSON; MONRO, 1982). A degradação é rápida, mas não resulta em decréscimo do pH ruminal, o que é freqüentemente observado com amido rapidamente degradado (HATFIELD; WEIMER, 1995).

Quanto aos polissacarídeos estruturais presentes na parede celular, estes podem ter estruturas bem complexas (HATFIELD et al., 1999). Dentre os polissacarídeos destaca-se a celulose, que juntamente com a hemicelulose, formam o arcabouço da parede celular das plantas. Embora os carboidratos não sejam digeridos pelas enzimas tissulares dos animais eles são degradados pelas enzimas microbianas presentes no rúmen e no intestino grosso. Além disso, apresentam importante papel no trato gastro-intestinal dos animais por formar o “lastro” da digesta e do bolo fecal.

De forma geral, os carboidratos estruturais não são materiais com características nutricionais, químicas ou físicas uniformes (VAN SOEST et al., 1991). E estes apresentam vários padrões de complexidade que muitas vezes estão associados às ligações realizadas com outras moléculas, como por exemplo a lignina. Segundo vários pesquisadores, a molécula de lignina está intimamente

associada aos carboidratos estruturais da parede celular, inibindo acentuadamente a digestão da fibra (DEHORITY et al., 1961; JOHNSON; DEHORITY, 1962).

2.3 Lignina

A lignina é um complexo polímero fenólico, encontrado integralmente como componente da parede celular e não pode ser digerido pelas enzimas tissulares dos animais mamíferos (VAN SOEST, 1994). Sua concentração aumenta à medida que as plantas forrageiras amadurecem, interferindo substancialmente na degradação microbiana dos carboidratos estruturais da parede celular.

2.3.1 Definição

A lignina é a segunda mais abundante matéria orgânica renovável sobre a terra, imediatamente depois da celulose (GUILLON, 2001). A lignina pode ser definida de várias maneiras. A definição dos químicos que militam na área da madeira e papel e celulose é de eliminá-la do papel e ter utilização industrial para a mesma. A visão dos nutricionistas é estreitamente definida dentro do contexto da disponibilidade nutritiva. Enquanto que os botânicos e bioquímicos tendem a ver a legitimidade da lignina como um produto único com extrema importância biológica para as plantas.

Embora haja variações quanto à organização macromolecular da lignina, alguns autores a classificam em lignina *core* e lignina *non core*. No entanto, tal nomenclatura ainda apresenta problemas de consistência e não é unanimidade com outros autores. Entretanto, estes conceitos têm a vantagem de serem didáticos. Segue, portanto, uma breve descrição:

A lignina *core* é um termo empregado para distinguir o principal polímero de lignina, a parte central da molécula, oriunda após a extração dos fenólicos com solução alcalina fraca à temperatura ambiente. Os compostos fenólicos extraídos com solução alcalina representariam a lignina *non-core*, compreendida primordialmente pela fração ácido p-coumárico (JUNG; FAHEY, 1983). Outra visão é que a lignina insolúvel em detergente ácido (LDA) seria a lignina *core* (VAN SOEST, 1994).

Segundo Higuchi et al. (1967a), os ácidos p-coumárico e ferúlico podem ser considerados parte da estrutura da lignina. Entretanto, outros autores propuseram que todos os ácidos cinâmicos ligados à molécula de lignina através de ligações covalentes do tipo éter sejam considerados parte integrante da lignina e, por sua vez, aqueles ligados através de ligações éster deveriam ser excluídos (MORRISON; STEWART, 1995). Assim, é necessário distinguir todos os componentes fenólicos, suas localizações, e seus efeitos biológicos. Valendo-se desta premissa, a classificação da lignina pode ser assim definida:

Lignina *non core*: consiste de compostos fenólicos de baixo peso molecular, liberados da parede celular por hidrólise alcalina, e são representados principalmente por ácidos hidroxicinâmicos éster-ligados, tais como o ácido p-coumárico e o ácido ferúlico.

Lignina core: são polímeros fenilpropanóides da parede celular, altamente condensados e muito resistentes à degradação, devido às ligações químicas covalentes interunidades do tipo éter e C-C. Eles são compostos de unidades p-hidroxifenila (H), guaiacólica (G) e siringólica (S), em proporções diferentes de acordo com a sua origem filogenética. Estas se interligam numa malha complexa, resistente à hidrólise ácida e alcalina, e a vários complexos enzimáticos, inclusive as enzimas microbianas e tissulares do trato gastrointestinal dos animais superiores (VAN SOEST, 1994).

Outra classificação proposta, baseia-se na presença das unidades fenólicas: 1) lignina de madeira dura, formada principalmente de unidades G e S; 2) lignina de madeira mole, formada de unidades G; e 3) ligninas de gramíneas que compreendem as unidades G-S-H (FENGEL; WEGENER, 1984). A lignina de leguminosas comporta-se como uma lignina de madeira dura (como seria de se esperar), apresentando os núcleos guaiacólicos e siringílicos em proporções aproximadamente iguais (FUKUSHIMA; HATFIELD, 2003). Já o pinheiro (madeira mole) apresentou uma lignina constituída quase que exclusivamente de unidades guaiacólicas, como foi demonstrado por Fukushima e Hatfield (2001) após oxidação da lignina do pinheiro com nitrobenzeno em meio alcalino. O milho mostrou elevada concentração dos ácidos p-coumárico e ferúlico, enquanto que o “bromegrass” exibiu teores menores destes ácidos (FUKUSHIMA; HATFIELD, 2003). Tal fato também foi constatado por Fukushima e Hatfield (2001), em que estes compostos foram os prováveis responsáveis por ligeira elevação no espectrograma oriundo do milho em relação às outras plantas estudadas. O caule do milho apresentou substancial presença de ácido p-coumárico, que, segundo Ralph et al. (1994), se apresenta esterificado ao carbono γ da unidade fenilpropanóide.

No entanto, segundo Van Soest (1994), as unidades fenólicas são fatores de menor importância em tecidos altamente lignificados nos quais os fatores físicos da superfície são mais limitantes à entrada de microrganismos.

2.3.2 Biossíntese da lignina

O progresso no estudo deste polímero natural depende do isolamento e identificação das suas unidades construtoras (VAN SOEST, 1994). Para tal, alguns passos da via pela qual a lignina é sintetizada, são amplamente estudados por vários pesquisadores.

Na biossíntese, todos os compostos de lignina e seus parentes fenólicos – flavonas e isoflavonas – surgem da via do ácido shikímico. A via do ácido shikímico é uma rota sintética que exige boro para alguns passos na síntese de fenol e, de acordo com Lewis (1980) a deficiência de boro nas plantas tem sido incriminado como causador de uma lignificação ineficiente.

De forma mais específica, a lignina é biossintetizada nas plantas vasculares em um complexo encadeado de reações, começando pelo CO_2 e H_2O , originando o ácido shikímico e prosseguindo via o aminoácido aromático L-fenilalanina (Figura 1) (SARKANEN; LUDWIG, 1971). A fenilalanina amônia liase, que é uma enzima regulatória do metabolismo fenólico nas células vegetais, converte a fenilalanina no ácido trans-cinâmico (CAMM; TOWERS, 1973). As gramíneas são as únicas espécies vegetais que conseguem converter a L-tirosina, outro aminoácido aromático, para o ácido trans-p-coumárico e uma reação catalisada pela enzima

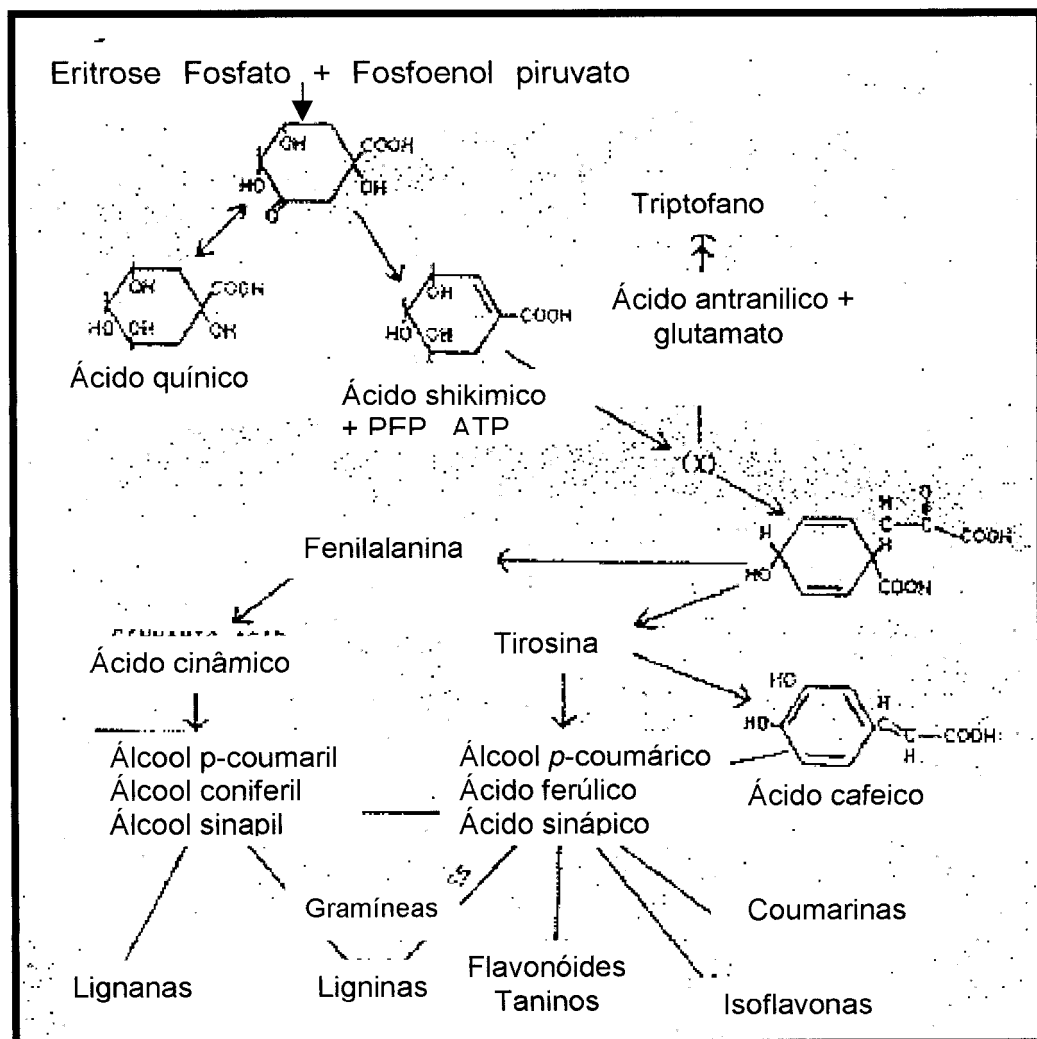


Figura 1 - Biossíntese da molécula de lignina, a partir de glicose até os monômeros fenólicos componentes da macromolécula (extraída VAN SOEST, 1994)

tirosina amônia liase (HIGUCHI et al., 1967b); portanto, as gramíneas podem utilizar qualquer dos dois aminoácidos para confeccionar lignina.

O ácido cinâmico é, posteriormente, hidroxilado para o ácido p-coumárico (passagem opcional para as gramíneas), que pelas ações sucessivas de enzimas específicas, produz os três mais comuns componentes deste polímero: os álcoois p-coumaril, coniferil e sinapil (Figura 2). Uma polimerização enzimática destas unidades fenil propanóides é o passo final da biossíntese das ligninas pelas plantas, sendo que a relativa porcentagem de cada monômero fenólico dentro da molécula é dependente da origem filogenética do vegetal (SARKANEM; LUDWIG, 1971).

2.3.3 A importância da lignina

De acordo com Jung e Deetz (1993) não apenas a concentração de lignina seria importante. A composição química poderia modificar a habilidade deste polímero em limitar a digestibilidade dos carboidratos da parede celular. Entretanto, os exatos mecanismos da ação inibitória da lignina sobre os carboidratos estruturais da parede celular ainda não estão completamente elucidados; veja-se o exemplo de gramíneas, que muito embora apresentem menores concentrações de lignina que as leguminosas, aparentemente a lignina de gramíneas inibe mais acentuadamente a digestão (MOWAT et al., 1969). Outro exemplo reside na constatação que forrageiras jovens, contendo baixas concentrações de lignina, um pequeno acréscimo na concentração de lignina acarreta em significativo efeito negativo na digestibilidade, enquanto que forrageiras maduras, que possuem elevados teores de

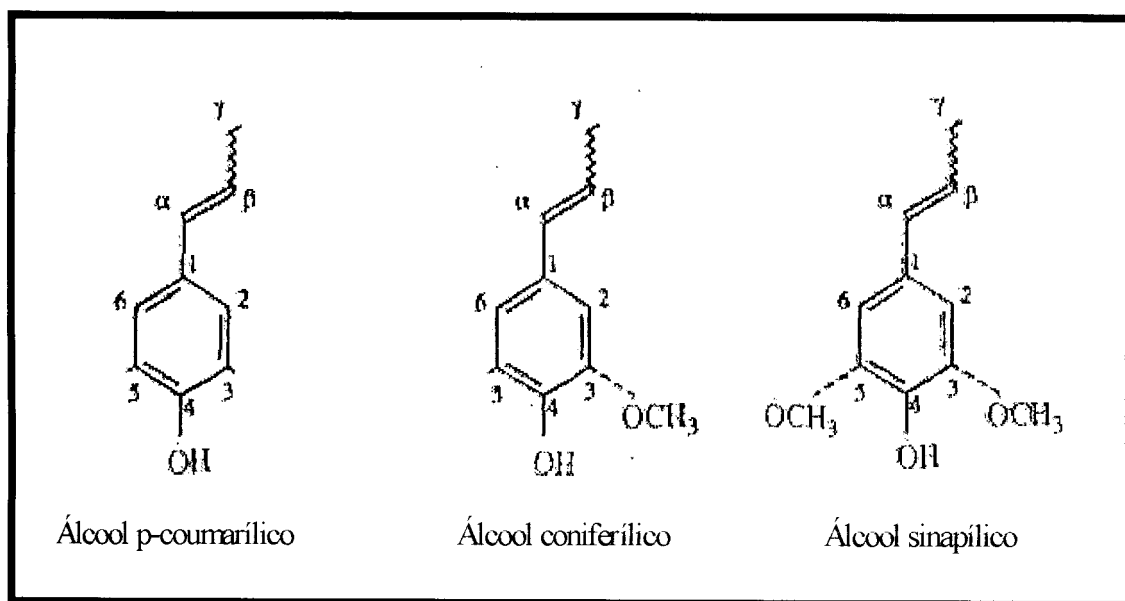


Figura 2 - Monômeros fenólicos que compõe a lignina

lignina, com subsequente aumento na concentração de lignina, mostram pequenos decréscimos na digestibilidade (JUNG; VOGEL, 1986).

Muito embora o teor de lignina de uma planta forrageira esteja altamente relacionado com a digestibilidade, mudanças puramente quantitativas na concentração de lignina tomadas isoladamente não conseguem explicar totalmente o decréscimo na digestibilidade. Devemos considerar que a medida que a plantas forrageiras amadurecem, o tipo e/ou qualidade da lignina sendo depositada na parede celular pode modificar-se gradualmente como foi sugerido por Fukushima (1996), ao examinar cromatogramas de lignina de gramíneas jovens e maduras. Jung e Deetz (1993) sugeriram que a razão núcleo guaiacílico/núcleo siringílico influencia a interação lignina-digestibilidade. O núcleo guaiacílico, pode fazer ligações cruzadas através dos seus dois radicais metoxila, enquanto os grupos siringílico, não; assim o guaiacílico pode ser esperado com tendo maior efeito detrimental sobre a digestibilidade, por formar uma “malha protetora” mais extensa.

Qual é o mecanismo de ação pela qual a lignina inibe a digestão dos carboidratos estruturais de parede celular? Diversos mecanismos têm sido propostos para explicar essa ação inibitória: Patton e Giesecker (1942) relataram três possíveis maneiras: 1) pela encrustação; 2) por ligações químicas, formando compostos indisponíveis; e 3) por inibição local das enzimas, devido à ação tóxica dos grupos fenólicos oriundos da degradação parcial da lignina. Baker e Harriss (1947), em observações microscópicas, verificaram que a lignina poderia, possivelmente, agir como uma barreira física entre os carboidratos estruturais e as enzimas microbianas. Esta teoria foi parcialmente substanciada pelos estudos de Dehority e Johnson (1961), que encontraram sensível aumento na digestão “in vitro” da celulose quando

o tamanho das partículas de plantas forrageiras foi reduzido pela técnica do moinho de bolas.

A encrustação pode ser um fator que afeta a disponibilidade dos polissacarídeos da parede celular. Embora haja consenso que a lignina afete a taxa e magnitude da digestão, a literatura vigente ainda é bastante confusa. Assim parece que a taxa e magnitude da digestão são associadas com o declínio da qualidade das forragens com a maturidade. Legumes e gramíneas de igual digestibilidade são particularmente diferentes (JUNG, 1983). A parede celular dos legumes contém aproximadamente duas vezes mais lignina do que a parede celular das gramíneas, mas fermenta mais rapidamente que gramíneas no mesmo estágio de crescimento. Supõe-se que a diferença seja resultante do maior teor de hemicelulose nas gramíneas, ou porque as respectivas ligninas sejam muito diferentes em suas constituições (VAN SOEST, 1994).

Outra possibilidade reside no método de determinação quantitativa da lignina; se as metodologias atualmente mais empregadas fornecem resultados contraditórios para uma mesma amostra, pode-se questionar a validade de certas afirmações baseadas em concentração de lignina, que foram feitas no passado (FUKUSHIMA¹, *in comunicação pessoal*), tais como a de Jung (1989, p. 35): “Embora gramíneas apresentem menores concentrações de lignina do que as leguminosas, quando consideradas numa mesma base percentual, a lignina de gramíneas é mais inibitória da digestão do que a lignina de leguminosas”

¹FUKUSHIMA, R. S. PhD. em Nutrição Animal; Prof. da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

Outra afirmação feita por Van Soest (1994) é “a associação da lignina e digestibilidade da parede celular não é linear, e sim curvilínea, onde os efeitos inibitórios da lignina sobre a digestibilidade são mais intensos em baixas concentrações e conforme a forrageira amadurece, os efeitos deletérios são diminuídos proporcionalmente, ainda que a concentração de lignina aumente”. Em ambas situações, se o método analítico fornece valores de lignina errôneos, logicamente conclusões baseadas nestes dados também serão infundadas.

Se, por outro lado, as concentrações de lignina foram corretamente determinadas, então pode-se dizer que a associação exponencial entre teor de lignina e a digestibilidade da parede celular insinua que a unidade de lignina em parede celulares imaturas (com baixa lignina) protege mais os carboidratos do que é protegido nas paredes celulares maduras altamente lignificadas (JUNG; VOGEL, 1986).

A correta quantificação da concentração de lignina em diversos produtos vegetais é importante ferramenta em vários segmentos do agro-negócio, como por exemplo, na nutrição de ruminantes e na indústria do papel e celulose. Portanto, além das forrageiras e gramíneas tradicionais, o conhecimento da concentração da lignina em outras amostras de diferentes procedências botânicas, deve ser conhecida.

Dentre outros materiais lignocelulósicos, merece especial destaque o bambu, uma planta lenhosa pertencente à família Gramineae. Além do bambu ser uma importante fonte alimentar para diversos povos asiáticos (na sua forma de broto) bem como de alguns animais exóticos (como o urso Panda), a sua utilização como matéria-prima para a celulose é prática de bastante sucesso em alguns países tropicais, como a China, Índia, Japão, Filipinas e até mesmo no Brasil.

No entanto, a principal matéria-prima nas indústrias de papel e celulose é a madeira. Esta é constituída de fibras em múltiplas camadas, ligadas entre si por forças interfibrilares e pela lignina que age como ligante (ASSUMPÇÃO et al., 1988).

Nas indústrias de papel e celulose, a madeira é submetida ao processo de polpação (cozimento a alta temperatura) com a finalidade de remover a lignina, e assim obter pastas deslignificadas (ROHELLA et al., 1996). Os dois principais processos alcalinos na produção de pastas químicas são o processo soda (utiliza-se de hidróxido de sódio) e o processo sulfato (hidróxido de sódio + sulfeto de sódio) (MACDONALD; FRANKLIN, 1969). Entretanto, a pasta oriunda por estes procedimentos é de cor marrom, contendo ainda substancial quantidade de lignina residual. Esta pasta necessita de outros equipamentos e mais reagentes químicos para branqueá-la.

O líquido resultante após o cozimento da madeira com os reagentes alcalinos, denomina-se licor preto, e contém alta concentração de lignina (ROHELLA et al., 1996). Para sua utilização industrial, no entanto, são necessários avanços adicionais. A lignina pura tem sido, recentemente, utilizada para confeccionar novos produtos como resinas, adesivos e polímeros.

Tanto para finalidades nutricionais como industriais, métodos de quantificação dos teores de lignina nas amostras vegetais com precisão e acurácia mostram-se de suma importância pois evita o desperdício de energia e reagentes; porém a maioria dos métodos empregados atualmente, carecem de resultados confiáveis.

2.3.4 Métodos para quantificar os teores de lignina

Os diversos métodos para quantificar os teores de lignina foram agrupadas por Giger (1985), em duas categorias: a) métodos gravimétricos e b) métodos não gravimétricos. O primeiro inclui o método da lignina insolúvel em solução a 72% de ácido sulfúrico (por exemplo, a lignina Klason e a lignina em detergente ácido) (ELLIS et al., 1946; VAN SOEST, 1963b); oxidação da lignina pelo clorito de sódio (COLLINGS et al., 1978); oxidação pelo permanganato de potássio (VAN SOEST; WINE, 1968); e solubilização da macromolécula em solução ácida de trietilenoglicol (EDWARDS, 1973). Os métodos não gravimétricos incluem aqueles baseados nas propriedades ópticas da lignina, tais como a lignina solúvel em brometo de acetila (JOHNSON et al., 1961; MORRISON, 1972a); e por espectroscopia de raios infravermelhos (NORRIS et al., 1976; REEVES III, 1988).

Para madeiras, continua largamente difundido o método Klason clássico, que consiste no tratamento da amostra, livre de extrativos, com ácido sulfúrico 72%, mas uma pequena parte da lignina pode se solubilizar, esse resíduo orgânico insolúvel isolado é chamado de lignina Klason (ROHELLA et al., 1996); cuja determinação pode-se efetuar através da medida da absorbância do filtrado ácido, no comprimento de onda de 205nm (D' ALMEIDA, 1988), o que não deixa de ser um sério inconveniente e altamente indesejável quando se deseja dados exatos sobre o teor de lignina.

No caso de pastas celulósicas não-branqueadas, os métodos mais comuns para a quantificação da lignina são baseados no permanganato de potássio: 1) Número de permanganato - a lignina é oxidada pelo permanganato de potássio,

enquanto que a celulose é muito pouco atacada; esse número também é chamado de número K, consiste no número de mL de uma solução 0,1N de KMnO_4 consumida por uma grama de pasta celulósica seca e fornece uma indicação do teor de lignina ainda presente na pasta e, conseqüentemente, do grau de cozimento efetuado e da quantidade de alvejante necessária em processo de branqueamento; 2) Número Kappa – o procedimento anterior tem sido criticado devido à variação que ocorre na quantidade de permanganato remanescente no final da reação, quando pastas com teores diferentes de lignina são analisadas. O número Kappa é exatamente o procedimento anterior, conduzido sob condições específicas, mas corrigido para um consumo relativo de 50% de permanganato.

Observe-se que nos dois procedimentos, é de suma importância a fixação de condições laboratoriais específicas e que devem ser sempre seguidas, sob pena de variabilidade dos resultados. Goering e Van Soest (1970), quanto ao emprego de KMnO_4 para estimar o teor de lignina em plantas forrageiras, também alertaram que as manobras laboratoriais deveriam ser conduzidas “de uma maneira” quanto ao teor presuntivo de lignina na amostra. Pressupõe-se que ainda haja espaço para um outro método analítico, que não apresente tantos percalços, mas que além de ser confiável, seja também de rápida execução.

Apesar dos métodos Klason e lignina em detergente ácido (LDA) basearem-se essencialmente na hidrólise ácida (solução de ácido sulfúrico a 72%) dos componentes da parede celular, exceto a lignina, estes tem produzidos resultados conflitantes para as mesmas amostras de plantas forrageiras (HATFIELD et al., 1994). Por exemplo, o método LDA tipicamente subestima os teores de lignina devido à parcial solubilização da mesma na solução de detergente ácido (KONDO et al., 1987; SHIMOJO; GOTO, 1984) ou pelo reagente ácido sulfúrico a 72%

(HATFIELD et al., 1994); a perda de lignina solúvel para LDA foi acima de 50% da lignina presente em gramíneas tropicais e valores 2 a 4 vezes inferiores foram encontrados quando contrastados com a metodologia lignina Klason (JUNG et al., 1997; LOWRY et al., 1994). Portanto, a perda é menor no método LK, uma das razões são o tipo do material pré-extraído utilizado, tais como a fibra em detergente neutro (SEWALT et al., 1996) ou parede celular livre de amido (HATFIELD et al., 1994). No entanto, os valores tanto de LDA como de Klason podem ser erroneamente determinados em função da presença de contaminantes insolúveis, tais como a cutina (FUKUSHIMA, 1989). Comparando os dois métodos, Hatfield et al. (1994) destacaram que a maior diferença entre esses dois procedimentos é seqüência na qual a concentração de ácido e temperatura são utilizadas para a hidrólise dos polissacarídeos e consideraram que, principalmente para gramíneas, o método de lignina Klason é mais adequado do que a LDA. Por outro lado, o procedimento da lignina Klason, desenvolvido para determinar lignina em madeiras, não é adequado para forrageiras com alto teor protéico (VAN SOEST, 1994). A razão do emprego da solução de detergente ácido reside na remoção de proteína da preparação de parede celular usada para o método Klason.

O método LPer apresenta resultados mais elevados dos teores de lignina, em relação aos obtidos pela LDA. Entretanto, contrariamente ao que é imputado ao método LDA, deve-se considerar que os teores de LPer possam estar artificialmente elevados, uma vez que outros componentes da parede celular (celulose e hemicelulose) podem ser atacados pela solução de permanganato de potássio, particularmente nas gramíneas imaturas (VAN SOEST; WINE, 1968).

Dentre os métodos baseados nas propriedades ópticas dos materiais analisados, tem-se a espectroscopia por raios infra-vermelhos e a absorção da luz

ultra-violeta. As vantagens da espectrofotometria por raios infra-vermelhos seriam a rapidez nas determinações e nenhuma outra manipulação das amostras é necessário, além da moagem (SHENK et al., 1979). No entanto, tal método requer a construção de curvas de calibração para cada elemento, e ainda assim, poderiam não funcionar adequadamente, mesmo para amostras de alimentos similares (REEVES III, 1988). Dentre os fatores que afetam a reprodutibilidade dos resultados, incluem-se a espécie da planta, o método de preservação e a interação entre os constituintes vegetais (SHENK et al., 1979).

Quanto ao método espectrofotométrico por raios UV, Johnson et al. (1961) o desenvolveram para determinar a lignina em madeiras. Tal procedimento foi estendido para analisar polpas derivadas de madeira e papéis (MARTON, 1967) e gramíneas e leguminosas (MORRISON, 1972a,b). Através do isolamento de uma preparação de parede celular, os compostos fenólicos solúveis que interferem com as leituras ultra-violeta, são removidos. Deve permanecer apenas a lignina, como único composto aromático. A preparação de parede celular é então solubilizada em uma solução a 25% de brometo de acetila (LSBA), em ácido acético glacial, que é lida no comprimento de onda a 280nm.

Entretanto, todo método espectrofotométrico requer o emprego de um padrão de referência, para com o qual as leituras de densidade óptica das amostras possam ser comparadas (FENGEL; WEGENER, 1984). Tanto Johnson et al. (1961) como Morrison (1972a,b) compararam as leituras de absorvância, através de equações de regressão, com os teores de lignina ácida determinadas para as mesmas amostras. Como mencionado anteriormente, o método da lignina ácida apresenta sérias falhas; isto significa, que transposição destes resultados através da equação de regressão para as leituras de absorvância, resultarão também em dados duvidosos.

Diversos materiais já foram empregados como padrões, para o método espectrofotométrico: Indulina (CHESSON, 1981), lignina "Kraft" (BRILLOVET; RIOCHET, 1983), guaiacol (SHARMA et al., 1986), ácido ferúlico (AL-ANI; SMITH, 1988) e lignina nativa (FUKUSHIMA et al., 1991). Iiyama e Wallis (1990) desenvolveram um coeficiente específico de absorção, numericamente igual a $20.0 \text{ g}^{-1} \times \text{litro} \times \text{cm}^{-1}$ baseados em amostras isoladas de lignina. Desafortunadamente este amplo leque de padrões de referência levou a sérios questionamentos quanto à exequibilidade, confiabilidade e praticidade do método espectrofotométrico.

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

3 MATERIAL E MÉTODO

O experimento foi conduzido no Departamento de Nutrição e Produção Animal, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Campus Pirassununga. O presente projeto de pesquisa foi desenvolvido no período de setembro de 2002 a abril de 2003.

3.1 Materiais lignocelulósicos

Foram ensaiados três grupos de materiais com distintas origens botânicas, onde o grupo 1 era composto por 5 cultivares de plantas forrageiras, oriundos do Campo Agrostológico da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo; o grupo 2 era constituído de 6 espécies de madeiras, provenientes do Instituto de Pesquisas Tecnológicas (IPT), Universidade de São Paulo, e o grupo 3 composto por 6 espécies de bambus colhidas no Instituto de Botânica de São Paulo.

As amostras de forrageiras foram colhidas em estágio de maturidade avançado, aproximadamente 90 dias após o corte de uniformização quando estas já haviam perdido todas as inflorescências e a folhagem apresentava-se 90% seca.

Estes materiais foram divididos em duas frações: caule e folha. São os seguintes os materiais vegetais estudados:

Grupo 1: Plantas forrageiras

Pennisetum purpureum Schum. cv. porto rico (caule);

Pennisetum purpureum Schum. cv. porto rico (folha);

Pennisetum purpureum Schum. cv. elefante anão (caule);

Pennisetum purpureum Schum. cv. elefante anão (folha);

Pennisetum purpureum Schum. cv. napier (caule);

Pennisetum purpureum Schum. cv. napier (folha);

Andropogon gayanus (caule);

Andropogon gayanus (folha);

Panicum maximum cv. tobiatã (caule);

Panicum maximum cv. tobiatã (folha).

Grupo 2: Madeiras:

Eucalyptus paniculata (cerne);

Eucalyptus paniculata (alburno);

Eucalyptus citriodora (cerne);

Eucalyptus citriodora (alburno);

Eucalyptus grandis (cerne);

Eucalyptus grandis (alburno);

Caesalpinia echinata Lam. (exemplar 13) (alburno);

Caesalpinia echinata Lam. (exemplar 76) (alburno);

Pinus elliotti (cerne e alburno misturados);

Anadenanthera peregrina (L.) Speg. (cerne).

Grupo 3: Bambus

Chusquea bambusoides (Raddi) Hack.;

Chusquea oxylepis (Hack.) Ekman.;

Bambusa bambos (L.) Voss.;

Bambusa vulgaris Schrad. ex J.C. Wendl.;

Phyllostachys sp.;

Merostachys burmanii Sendulsky.

Algumas amostras de madeiras também foram divididas em duas frações: cerne e alburno. O cerne é a parte central do tronco composto por células mortas e sem substâncias nutritivas de reserva, geralmente de coloração mais escura e maior rigidez. O alburno é a parte periférica e mais nova da madeira do tronco das árvores, de cor clara, onde as células realizam a condução de água.

Enquanto que dos bambus, somente o colmo foi colhido e analisado.

2 ANÁLISES BROMATOLÓGICAS

As análises foram realizadas no Laboratório de Bromatologia do Departamento de Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária Zootecnia da Universidade de São Paulo.

As amostras de madeira e forrageiras foram secas em estufa de ventilação forçada a 65°C durante 72 horas; enquanto que os bambus permaneceram por

intervalo de 96 horas. Em seguida todas as amostras foram moídas em moinho laboratorial modelo Wiley munido de peneira 0,5 mm e a seguir, acondicionadas em potes de vidro.

3.2.1 Preparação de parede celular

O protocolo de preparação da parede celular seguido foi o descrito por Fukushima e Hatfield (2001). A extração foi conduzida no aparato de Soxhlet e o material tratado sucessivamente com água, etanol, clorofórmio e acetona. A extração com cada solvente foi prolongada até que nenhuma coloração lixiviasse da amostra, portanto os períodos de extração foram diferentes para cada solvente. Assim, na extração com água, etanol, clorofórmio e acetona, as amostras permaneceram 32, 16, 8 e 8 horas, respectivamente. Após esse período, as amostras foram secas em estufa ventilada a 65°C durante 48 horas e pesadas para a obtenção do teor de parede celular.

3.2.2 Determinação da matéria seca a 105°C e matéria mineral

Para a determinação da matéria seca a 105°C, as amostras, após permanência em estufa a 65°C por 24 horas, foram acondicionadas em dessecador e depois pesadas em balança analítica. Um grama de cada amostra foi colocada em

um cadinho de porcelana, e acondicionada em estufa a 105°C por 24 horas. Após esse período, a amostra foi colocada em dessecador por 60 minutos e em seguida pesada. Após carbonização em mufla a 550°C, foi realizada a determinação da matéria mineral. As análises foram feitas em triplicata.

3.2.3 Determinação da fibra em detergente ácido (FDA); lignina em detergente ácido (LDA) e lignina permanganato de potássio (LPer)

As análises, em triplicatas, seguiram os preceitos da AOAC (1990). A avaliação de FDA foi realizada pelo micro método (GOERING; VAN SOEST, 1970), para tal foram pesados 0,350g de amostra bruta, secas em estufa a 65°C e trituradas em moinho munido de peneira 0,5mm. O emprego da solução de detergente ácido (FDA) para obter preparações de parede celular foi desenvolvido por Van Soest (1963b), para remover os outros componentes celulares que interferem na determinação do teor da fibra. Após a determinação da FDA as amostras foram tratadas com solução de ácido sulfúrico 72%, originando o resíduo insolúvel de lignina (GOERING; VAN SOEST, 1970). Para a determinação deste resíduo de lignina, denominado de lignina em detergente ácido (LDA), as amostras foram cobertas com ácido sulfúrico 72% e agitadas com bastão de vidro. Após uma hora, o ácido foi filtrado e as amostras novamente cobertas com ácido; esse procedimento foi repetido três vezes. Em seguida, as amostras foram filtradas em bomba a vácuo e lavadas com água quente até a completa neutralização; estas permaneceram em estufa 105°C por 12 horas e levadas a mufla a 550°C por 6

horas, para determinação da matéria mineral presente na amostra. O teor de FDA e LDA de todas as amostras foram calculados e corrigidos pelo teor de matéria seca 105°C.

Van Soest (1967) desenvolveu o método lignina em detergente ácido como uma alternativa ao método lignina Klason (LK). A LDA também utiliza ácido sulfúrico para a hidrólise dos polissacarídeos de parede celular, no entanto, a principal diferença reside na seqüência com que a concentração do ácido e a temperatura são utilizadas para a hidrólise dos polissacarídeos (HATFIELD et al., 1994).

Devido as suspeitas de que parte da lignina seja solubilizada na solução ácida, subestimando os valores para LDA, Van Soest (1968) desenvolveu o método da lignina em permanganato de potássio. Este método é fundamentado na oxidação da molécula de lignina pela solução concentrada de permanganato de potássio. No presente trabalho esta foi determinada de acordo com Van Soest e Wine (1968), no entanto, algumas modificações como o tempo de permanência das amostras na solução desmineralizante e número de vezes em que as amostras foram colocadas nessa solução, foram 5 vezes superior ao recomendado pelo protocolo original, principalmente para madeiras e bambus. No entanto, para as amostras de forrageiras o período e número de permanência foram cerca de 2 vezes a mais que o recomendado.

3.2.4 Determinação da lignina Klason

Este método também foi desenvolvido a priori para analisar o teor de lignina em madeiras (KIRK; OBST, 1988) e vem sendo adaptado para a aplicação em amostras de diversas origens botânicas.

Segundo Hatfield et al. (1994) neste processo também é necessário a remoção de interferentes celulares. Neste caso, é utilizado a preparação de parede celular bruta, extraída com solventes orgânicos, diferindo da LDA que utiliza a fibra em detergente ácido.

No presente trabalho, amostras de parede celular, em triplicata, foram previamente secas em estufa e submetidas a altas concentrações de ácido sulfúrico, em baixa temperatura, seguido por diluição do ácido e aplicação de calor (HATFIELD et al., 1994). Portanto, o método da lignina Klason apresenta dois estágios de hidrólise do ácido sulfúrico, diferindo da LDA (JUNG et al., 1997). No primeiro estágio, 0,1g das amostras são colocadas em contato com 1,5mL de ácido sulfúrico a 72% 12M frio e deixadas em temperatura ambiente por 90 minutos e agitadas em alta velocidade. No segundo estágio, são adicionados 9,75mL de água destilada e as amostras são hidrolizadas a 110°C, durante três horas. Após este período, estas são filtradas e deixadas em estufa 55°C por 48 horas.

3.2.5 Determinação da digestibilidade *in vitro*

Foram pesadas 0,5 gramas de cada amostra vegetal, em triplicatas, colocadas em tubos de digestão e incubadas em solução mineral e líquido ruminal por 48 horas em estufa de temperatura controlada a 39°C. Condições anaeróbicas da solução mineral foi obtida empregando-se a técnica de aceleração da redução do meio de cultura (FUKUSHIMA et al., 2002). Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 1800 rpm e incubadas, por igual período, em solução ácida contendo pepsina, de acordo com a descrição de Tilley e Terry (1963). O doador do líquido ruminal foi um bovino fistulado no rúmen mantido em regime de pasto.

3.3 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados de lignina provenientes dos três métodos analíticos, foram comparados utilizando-se o teste de Tukey, após Análise de Variância, ao nível de significância de 5%, testadas pelo procedimento GLM, opção *slice*. Devido à existência de interação entre método analítico *versus* material vegetal *versus* parte vegetal, optou-se por apresentar a análise estatística dentro da linha, por amostra, comparando-se as metodologias entre si. Os teores de lignina, provenientes dos três métodos analíticos, foram correlacionados com valores de digestibilidade, para cada grupo de amostras. As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do pacote estatístico SAS (STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM, 1985).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores de matéria seca (MS) das forrageiras não apresentaram substancial variação entre as frações caule e folha (Tabela 1), possivelmente porque foram colhidas em estágio avançado de maturidade. No entanto, a matéria mineral apresentou teores mais elevados para as folhas com valores variando entre 3,4 a 9,2%, enquanto que os caules exibiram teores de 0,4 e 1,9% na matéria seca. Esta constatação pode ser explicada, em virtude da maioria das reações químicas acontecerem nas folhas, particularmente as reações de fotossíntese, e estas necessitarem de maiores concentrações de minerais do que as encontradas no caule. Quanto à parede celular (PC) os teores de cinzas foram de 1,0 a 5,9% para a folha e de 0,0 a 0,9% para caule (Tabela 1). Constata-se que substancial parcela de MM foi lixiviada, possivelmente aquela presente no citossol, durante a preparação da parede celular.

Os teores de matéria mineral na matéria seca das madeiras, situaram-se entre 0,0 a 0,6 (Tabela 2). Uma constatação que causou espécie, foi a maior concentração de MM na PC em relação à MS de algumas amostras de madeira, uma vez que o teor de solúveis (conteúdo celular) nas madeiras é exíguo (Tabela 2). Pode-se especular que a madeira é composta, em sua maioria, de tecidos de baixa atividade metabólica, e os minerais ali localizados, na presença dos solventes utilizados na preparação da PC, poderiam se precipitar.

Tabela 1 - Média \pm erro padrão da média dos teores de matéria seca (MS) e matéria mineral (MM), na planta intacta (pi) e na parede celular (pc), de cinco cultivares de forrageiras em estágio avançado de maturidade

AMOSTRAS	MS (pi)	MM (pi)	MS (pc)	MM (pc)
<i>Pennisetum purpureum</i> Schum. cv. porto rico (caule)	98,5 $\pm 0,0$	1,0 $\pm 0,0$	99,3 $\pm 0,1$	0,2 $\pm 0,1$
<i>Pennisetum purpureum</i> Schum. cv. porto rico (folha)	97,8 $\pm 0,0$	3,4 $\pm 0,0$	95,1 $\pm 0,1$	1,1 $\pm 0,0$
<i>Pennisetum purpureum</i> Schum. cv. elef. anão (caule)	97,8 $\pm 0,0$	1,5 $\pm 0,0$	99,0 $\pm 0,0$	0,6 $\pm 0,0$
<i>Pennisetum purpureum</i> Schum. cv. elef. anão (folha)	98,2 $\pm 0,0$	9,2 $\pm 0,0$	97,8 $\pm 0,6$	5,9 $\pm 0,6$
<i>Pennisetum purpureum</i> Schum. cv. napier (caule)	97,1 $\pm 0,0$	0,4 $\pm 0,0$	97,6 $\pm 0,4$	0,3 $\pm 0,0$
<i>Pennisetum purpureum</i> Schum. cv. napier (folha)	99,7 $\pm 0,0$	5,3 $\pm 0,0$	97,1 $\pm 0,2$	1,3 $\pm 0,0$
<i>Andropogon gayanus</i> (caule)	98,9 $\pm 0,0$	1,2 $\pm 0,0$	99,0 $\pm 0,0$	0,0 $\pm 0,0$
<i>Andropogon gayanus</i> (folha)	97,9 $\pm 0,0$	5,7 $\pm 0,0$	97,4 $\pm 0,2$	1,0 $\pm 0,0$
<i>Panicum maximum</i> (Tobiatã) (caule)	99,8 $\pm 0,0$	1,9 $\pm 0,0$	98,0 $\pm 0,1$	0,9 $\pm 0,1$
<i>Panicum maximum</i> (Tobiatã) (folha)	98,5 $\pm 0,0$	5,0 $\pm 0,0$	98,6 $\pm 0,0$	1,4 $\pm 0,1$
Total	98,4 $\pm 0,1$	3,4 $\pm 0,4$	97,9 $\pm 0,2$	1,3 $\pm 0,3$

Tabela 2 - Média \pm erro padrão da média dos teores de matéria seca (MS) e matéria mineral (MM), na planta intacta (pi) e na parede celular (pc), de seis espécies de madeira

AMOSTRAS	MS (pi)	MM (pi)	MS (pc)	MM (pc)
<i>Eucalyptus paniculata</i> (cerne)	99,6 $\pm 0,3$	0,1 $\pm 0,1$	99,2 $\pm 0,4$	0,1 $\pm 0,0$
<i>Eucalyptus paniculata</i> (alburno)	99,4 $\pm 0,2$	0,4 $\pm 0,2$	98,6 $\pm 0,3$	0,3 $\pm 0,0$
<i>Eucalyptus citriodora</i> (cerne)	99,3 $\pm 0,7$	0,6 $\pm 0,7$	99,2 $\pm 0,2$	1,1 $\pm 0,0$
<i>Eucalyptus citriodora</i> (alburno)	98,9 $\pm 0,7$	0,3 $\pm 0,0$	99,0 $\pm 0,0$	0,0 $\pm 0,0$
<i>Eucalyptus grandis</i> (cerne)	99,1 $\pm 0,6$	0,0 $\pm 0,0$	99,6 $\pm 0,1$	0,0 $\pm 0,0$
<i>Eucalyptus grandis</i> (alburno)	99,7 $\pm 0,0$	0,0 $\pm 0,0$	99,5 $\pm 0,1$	0,0 $\pm 0,0$
<i>Caesalpinia echinata</i> Lam. 13C (alburno)	98,8 $\pm 0,0$	0,3 $\pm 0,0$	99,4 $\pm 0,4$	0,2 $\pm 0,0$
<i>Caesalpinia echinata</i> Lam. 76C (alburno)	98,9 $\pm 0,0$	0,0 $\pm 0,0$	99,2 $\pm 0,3$	0,3 $\pm 0,0$
<i>Pinus ellioti</i> (cerne + alburno)	99,5 $\pm 0,0$	0,0 $\pm 0,0$	99,7 $\pm 0,1$	0,0 $\pm 0,0$
<i>Anadenanthera</i> <i>peregrina</i> (L.) Speg. (cerne)	98,6 $\pm 0,0$	0,2 $\pm 0,0$	99,2 $\pm 0,3$	1,8 $\pm 0,0$
Total	99,2 $\pm 0,0$	0,2 $\pm 0,0$	99,3 $\pm 0,0$	0,4 $\pm 0,1$

Os valores de MM nas amostras de bambus, tendeu a seguir o comportamento demonstrado pelas gramíneas, onde resultados de MM mostraram-se maiores para MS em relação à PC (Tabela 3).

O rendimento da parede celular (PC) das forrageiras maduras, variou de 57,5% a 76,6% para a fração folha e de 63,5% a 83,7% para a fração caule, enquanto que o rendimento da fibra em detergente ácido (FDA) variou de 43,4% a 63,4% para a fração folha e de 40,2% a 63,1% para a fração caule (Tabela 4).

No grupo composto por amostras de madeiras, os rendimentos de PC foram maiores que os observados para gramíneas, variando de 84,0% a 94,3% com maiores valores apresentados pela fração alburno de *Caesalpinia echinata* Lam. 76C e pelo *Pinus ellioti* (cerne + alburno). Os teores de FDA, variaram de 72,9% a 88,9% (Tabela 5). Fukushima e Hatfield (no prelo) também reportaram que as madeiras eram compostas quase que exclusivamente por PC.

Nas amostras de bambus, os rendimentos de PC oscilaram entre 85,2% e 91,0%, enquanto que para a FDA estes valores ficaram entre 70,5% e 79,3% (Tabela 6).

Para todas as plantas, a preparação de parede celular mostrou valores mais elevados do que a FDA (Tabelas 4, 5 e 6). A diferença observada entre as preparações de PC e FDA deve-se provavelmente à solubilização da hemicelulose, constituinte que não está presente na fração FDA (GOERING; VAN SOEST, 1970). Os teores de hemicelulose podem ser obtidos pela diferença entre FDN e FDA; entretanto esses valores devem ser considerados presuntivos, uma vez que a FDA pode ainda apresentar resíduos de pentosanas (MORRISON, 1983), e por outro lado, deve-se considerar que a parede celular pode não apresentar a totalidade da

Tabela 3 - Média \pm erro padrão da média dos teores de matéria seca (MS) e matéria mineral (MM), na planta intacta (pi) e na parede celular (pc), de seis espécies de bambu

AMOSTRAS	MS (pi)	MM (pi)	MS (pc)	MM (pc)
<i>Chusquea bambusoides</i>	99,1 $\pm 0,0$	1,6 $\pm 0,0$	99,0 $\pm 0,3$	0,0 $\pm 0,0$
<i>Chusquea oxylepsis</i>	99,1 $\pm 0,0$	2,2 $\pm 0,0$	99,1 $\pm 0,1$	0,1 $\pm 0,0$
<i>Bambusa bambos</i>	97,5 $\pm 0,0$	3,6 $\pm 0,0$	99,2 $\pm 0,1$	0,0 $\pm 0,0$
<i>Bambusa vulgaris</i>	99,0 $\pm 0,0$	1,8 $\pm 0,0$	98,9 $\pm 0,1$	0,2 $\pm 0,0$
<i>Phyllostachys sp.</i>	98,0 $\pm 0,0$	1,1 $\pm 0,0$	98,3 $\pm 0,0$	0,0 $\pm 0,0$
<i>Merostachys burmanii</i>	98,8 $\pm 0,0$	0,0 $\pm 0,0$	98,9 $\pm 0,0$	0,0 $\pm 0,0$
Total	98,6 $\pm 0,1$	1,7 $\pm 0,2$	98,9 $\pm 0,0$	0,1 $\pm 0,0$

Tabela 4 - Média \pm erro padrão da média dos teores de parede celular (PC), de fibra em detergente ácido (FDA) e hemicelulose de cinco cultivares de forrageiras em estágio avançado de maturidade, expressos em matéria seca (%)

AMOSTRAS	PAREDE CELULAR	FDA	HEMICELULOSE (PC – FDA)
<i>Pennisetum purpureum</i> Schum. cv. porto rico (caule)	82,0 \pm 0,6	63,1 \pm 0,5	18,8
<i>Pennisetum purpureum</i> Schum. cv. porto rico (folha)	57,5 \pm 0,7	50,0 \pm 0,0	7,4
<i>Pennisetum purpureum</i> Schum. cv. elef. anão (caule)	63,5 \pm 0,9	40,2 \pm 0,2	23,2
<i>Pennisetum purpureum</i> Schum. cv. elef. anão (folha)	76,6 \pm 0,9	43,4 \pm 0,4	33,1
<i>Pennisetum purpureum</i> Schum. cv. napier (caule)	73,8 \pm 1,5	51,8 \pm 0,4	22,0
<i>Pennisetum purpureum</i> Schum. cv. napier (folha)	76,2 \pm 0,6	45,5 \pm 0,7	30,6
<i>Andropogon gayanus</i> (caule)	64,4 \pm 1,2	58,9 \pm 0,2	5,4
<i>Andropogon gayanus</i> (folha)	68,8 \pm 1,0	46,3 \pm 0,1	22,4
<i>Panicum maximum</i> (Tobiatã) (caule)	83,7 \pm 0,2	50,6 \pm 0,1	33,0
<i>Panicum maximum</i> (Tobiatã) (folha)	72,3 \pm 1,4	63,4 \pm 0,7	8,9
Total	71,9 \pm 1,4	51,3 \pm 0,8	20,5

Tabela 5 - Média \pm erro padrão da média dos teores de parede celular (PC), de fibra em detergente ácido (FDA) e hemicelulose de seis espécies de madeira, expressos em matéria seca (%)

AMOSTRAS	PAREDE CELULAR	FDA	HEMICELULOSE (PC – FDA)
<i>Eucalyptus paniculata</i> (cerne)	89,0 \pm 0,1	84,5 \pm 0,2	4,5
<i>Eucalyptus paniculata</i> (alburno)	92,4 \pm 1,4	83,2 \pm 0,2	9,1
<i>Eucalyptus citriodora</i> (cerne)	84,0 \pm 0,9	72,9 \pm 0,8	11,1
<i>Eucalyptus citriodora</i> (alburno)	90,1 \pm 0,7	83,5 \pm 1,4	6,5
<i>Eucalyptus grandis</i> (cerne)	90,2 \pm 0,7	86,4 \pm 0,6	3,8
<i>Eucalyptus grandis</i> (alburno)	94,2 \pm 0,5	88,9 \pm 0,3	5,3
<i>Caesalpinia echinata</i> Lam. 13C (alburno)	93,2 \pm 0,9	76,9 \pm 0,7	16,2
<i>Caesalpinia echinata</i> Lam. 76C (alburno)	94,3 \pm 0,0	75,0 \pm 0,5	19,3
<i>Pinus ellioti</i> (cerne + alburno)	94,3 \pm 1,5	74,9 \pm 0,5	19,4
<i>Anadenanthera peregrina</i> (L.) Speg. (cerne)	85,1 \pm 1,2	73,0 \pm 0,4	12,0
Total	90,7 \pm 0,6	80,4 \pm 1,0	10,7

Tabela 6 - Média \pm erro padrão da média dos teores de parede celular (PC), de fibra em detergente ácido (FDA) e hemicelulose de seis espécies de bambu, expressos em matéria seca (%)

AMOSTRAS	PAREDE CELULAR	FDA	HEMICELULOSE (PC – FDA)
<i>Chusquea bambusoides</i>	90,5 \pm 0,7	73,7 \pm 0,9	16,8
<i>Chusquea oxylepsis</i>	87,9 \pm 0,1	71,1 \pm 0,4	16,8
<i>Bambusa bambos</i>	85,2 \pm 0,6	70,5 \pm 0,3	14,7
<i>Bambusa vulgaris</i>	91,0 \pm 0,5	79,3 \pm 0,8	11,7
<i>Phyllostachys</i> sp.	88,8 \pm 0,2	73,3 \pm 0,4	15,4
<i>Merostachys burmanii</i>	90,2 \pm 0,7	72,0 \pm 0,9	18,2
Total	88,9 \pm 0,4	73,3 \pm 0,7	15,6

pectina, uma vez que a extração hídrica a quente remove parte dos carboidratos pécnicos.

De acordo com Van Soest (1963b), outra importante diferença existente entre PC e FDA reside na preservação das frações protéicas na primeira; a solução de detergente ácido utilizada objetiva dissolver a proteína contida na parede celular com BCTA (brometo cetil trimetilamônio), mas pode solubilizar parcialmente a lignina. No entanto, ainda permanece a questão se o nitrogênio é parte constituinte da molécula de lignina, ou se está presente na forma de proteína como contaminante da parede celular. O resíduo Klason original da madeira também contém pouco nitrogênio, promovendo o conceito de lignina como polímero não nitrogenado.

Regra geral, o método da lignina detergente ácido (LDA) foi o que apresentou os menores teores de lignina para todos os grupamentos vegetais, Fukushima e Hatfield (no prelo) também reportaram este mesmo achado.

O método lignina permanganato de potássio (LPer) tendeu a apresentar valores mais elevados do que a lignina Klason (LK) para as madeiras e bambus, enquanto que fenômeno inverso foi constatado para as gramíneas (Tabelas 7, 8 e 9). Dentro das gramíneas, a fração caule foi a que apresentou os teores mais elevados de lignina para todos os métodos; os métodos LDA e LPer mostraram esse fator variando de 1,5 a 2,8 enquanto que para o método LK, esse fator não ultrapassou a casa dos 1,2 (em alguns casos ficou abaixo da unidade), sugerindo possível contaminação protéica na fração foliar (Tabela 7). Os teores de lignina observados em LK foram maiores em relação aos apresentados pelo método LDA, este fato também foi observado por Hatfield et al. (1994) onde os valores de LK

Tabela 7 - Média \pm erro padrão da média dos teores de lignina, provenientes de três procedimentos analíticos, celulose e cinzas de cinco cultivares de forrageiras em avançado estágio de maturidade, expressos em matéria seca (%)

AMOSTRAS	LDA	LPer	LK	CELULOSE LPer	CINZAS LDA
<i>Pennisetum purpureum</i> Schum. cv. porto rico (caule)	12,3 \pm 0,2 ^c	30,0 \pm 0,5 ^b	21,3 \pm 0,5 ^a	9,3 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0
<i>Pennisetum purpureum</i> Schum. cv. porto rico (folha)	4,9 \pm 0,7 ^c	11,0 \pm 0,0 ^b	22,4 \pm 0,2 ^a	9,8 \pm 0,5	3,2 \pm 0,1
<i>Pennisetum purpureum</i> Schum. cv. elefante anão (caule)	8,5 \pm 0,0 ^c	13,8 \pm 0,0 ^b	22,5 \pm 0,9 ^a	15,6 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0
<i>Pennisetum purpureum</i> Schum. cv. elefante anão (folha)	5,5 \pm 0,2 ^c	5,5 \pm 0,2 ^b	18,3 \pm 0,7 ^a	5,3 \pm 0,0	2,7 \pm 0,3
<i>Pennisetum purpureum</i> Schum. cv. napier (caule)	9,7 \pm 0,3 ^c	8,4 \pm 0,0 ^b	23,0 \pm 1,1 ^a	14,2 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0
<i>Pennisetum purpureum</i> Schum. cv. napier (folha)	4,9 \pm 0,4 ^c	2,9 \pm 0,0 ^b	18,7 \pm 0,6 ^a	7,5 \pm 0,5	1,7 \pm 0,2
<i>Andropogon gayanus</i> (caule)	7,6 \pm 0,0 ^c	28,2 \pm 0,1 ^b	18,6 \pm 0,5 ^a	25,2 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0
<i>Andropogon gayanus</i> (folha)	4,7 \pm 0,2 ^c	10,6 \pm 0,1 ^b	21,3 \pm 0,5 ^a	8,0 \pm 0,3	3,1 \pm 0,3
<i>Panicum maximum</i> (Tobiatã) (caule)	13,5 \pm 0,6 ^c	21,5 \pm 1,2 ^b	22,5 \pm 0,5 ^b	0,7 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0
<i>Panicum maximum</i> (Tobiatã) (folha)	7,2 \pm 0,3 ^c	11,0 \pm 0,1 ^b	20,7 \pm 0,6 ^a	16,6 \pm 0,0	1,1 \pm 0,2
Total	7,4 \pm 0,5	14,3 \pm 1,6	20,98 \pm 0,3	11,2 \pm 1,2	1,1 \pm 0,2

a,b,c diferenças ($P < 0,05$) entre os procedimentos analíticos para os teores de lignina de uma mesma amostra.

Tabela 8 - Média \pm erro padrão da média dos teores de lignina, provenientes de três procedimentos analíticos, celulose e cinzas de seis amostras de madeira, expressos em matéria seca (%)

AMOSTRAS	LDA	LPer	LK	CELULOSE LPer	CINZAS LDA
<i>Eucalyptus paniculata</i> (cerne)	17,8 \pm 1,8 ^c	16,3 \pm 0,0 ^b	25,0 \pm 0,2 ^a	23,7 \pm 0,7	0,4 \pm 0,4
<i>Eucalyptus paniculata</i> (alburno)	13,4 \pm 1,2 ^c	33,3 \pm 0,7 ^b	25,2 \pm 0,7 ^a	37,5 \pm 0,1	0,0 \pm 0,0
<i>Eucalyptus citriodora</i> (cerne)	15,0 \pm 1,0 ^c	18,2 \pm 0,2 ^b	28,3 \pm 0,1 ^a	17,0 \pm 0,9	0,0 \pm 0,0
<i>Eucalyptus citriodora</i> (alburno)	11,9 \pm 0,7 ^c	37,1 \pm 0,2 ^b	23,9 \pm 0,2 ^a	27,9 \pm 0,2	0,0 \pm 0,0
<i>Eucalyptus grandis</i> (cerne)	21,0 \pm 0,2 ^c	45,3 \pm 0,7 ^b	30,5 \pm 1,4 ^a	32,2 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0
<i>Eucalyptus grandis</i> (alburno)	22,1 \pm 0,5 ^c	22,0 \pm 0,0 ^c	30,9 \pm 0,3 ^b	41,2 \pm 0,1	0,0 \pm 0,0
<i>Caesalpinia echinata</i> Lam. 13C (alburno)	17,9 \pm 0,6 ^c	31,5 \pm 0,1 ^b	25,9 \pm 0,2 ^a	42,1 \pm 0,1	0,0 \pm 0,0
<i>Caesalpinia echinata</i> Lam. 76C (alburno)	14,7 \pm 0,1 ^c	42,2 \pm 0,6 ^b	25,2 \pm 0,3 ^a	31,4 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0
<i>Pinus ellioti</i> (cerne + alburno)	27,1 \pm 0,1 ^c	46,4 \pm 0,0 ^b	28,4 \pm 0,1 ^a	41,1 \pm 1,6	0,0 \pm 0,0
<i>Anadenanthera peregrina</i> (L.) Speg. (cerne)	23,6 \pm 0,3 ^c	27,5 \pm 0,5 ^b	26,3 \pm 0,4 ^b	3,1 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0
Total	18,4 \pm 0,8 ^c	32,0 \pm 1,9 ^b	27,0 \pm 0,4 ^a	29,7 \pm 2,1	0,0 \pm 0,0

a,b,c diferenças (P<0,05) entre os procedimentos analíticos para os teores de lignina de uma mesma amostra.

Tabela 9 - Média \pm erro padrão da média dos teores de lignina, provenientes de três procedimentos analíticos, celulose e cinzas de seis amostras de bambu, expressos em matéria seca (%)

AMOSTRAS	LDA	LPer	LK	CELULOSE LPer	CINZAS LDA
<i>Chusquea bambusoides</i>	14,3 \pm 0,0 ^c	34,3 \pm 0,0 ^b	20,0 \pm 0,6 ^a	31,8 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0
<i>Chusquea oxylepsis</i>	13,7 \pm 0,2 ^c	25,6 \pm 0,6 ^b	21,2 \pm 0,9 ^a	24,0 \pm 0,2	0,0 \pm 0,0
<i>Bambusa bambos</i>	17,8 \pm 0,0 ^c	29,6 \pm 0,1 ^b	22,9 \pm 0,7 ^a	30,3 \pm 0,1	0,0 \pm 0,0
<i>Bambusa vulgaris</i>	19,3 \pm 0,0 ^c	70,2 \pm 0,2 ^b	23,4 \pm 0,7 ^a	46,8 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0
<i>Phyllostachys sp,</i>	21,9 \pm 0,4 ^c	23,9 \pm 0,1 ^b	24,5 \pm 0,0 ^b	26,7 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0
<i>Merostachys burmanii</i>	18,5 \pm 0,3 ^c	22,1 \pm 0,0 ^b	26,1 \pm 0,6 ^a	19,7 \pm 0,4	0,0 \pm 0,0
Total	17,6 \pm 0,6 ^c	34,3 \pm 4,0 ^b	23,0 \pm 0,5 ^a	29,9 \pm 2,0	0,0 \pm 0,0

a,b,c diferenças ($P < 0,05$) entre os procedimentos analíticos para os teores de lignina de uma mesma amostra. LDA: lignina detergente ácida; LPer: lignina permanganato de potássio; LK: lignina Klason

foram cerca de 2 a 3 vezes maiores que os de LDA, para as mesmas amostras de forragens. É considerado que a principal limitação do método LK para forrageiras é a inclusão de proteína no resíduo insolúvel, resultando em altos valores de lignina (LAI; SARKANEN, 1971; VAN SOEST, 1967). Kondo et al. (1987) também encontraram discrepância entre LK e LDA em amostras de forragens; estes concluíram que a principal diferença entre as concentrações dos resíduos gerados pelos dois métodos foram mais devidos à perda da lignina no método LDA do que pela incorporação de proteínas dentro dos resíduos de LK. De acordo com Hatfield et al. (1994), o teor de nitrogênio nos resíduos de LK foi sempre maior do que nos da LDA. Observe-se que na presente investigação, as maiores concentrações de LK foram justamente para as gramíneas. Esta foi a principal justificativa utilizada para o emprego de BCTA (VAN SOEST, 1963b).

Jung e Fahey (1983) sugeriram que o detergente ácido e o detergente neutro removem alguma lignina verdadeira. Esta visão considera todos os fenólicos de parede celular, incluindo os ésteres dos ácidos ferúlico e p-coumárico, como parte da lignina (JUNG; DEETZ, 1993). O método Klason pode recuperar muitas dessas frações, bem como outros componentes de interferência. A lignina Klason pode aumentar os valores nos capins em até 3 vezes acima da lignina detergente ácido (VAN SOEST, 1994).

Considere-se que uma fração da lignina é potencialmente solúvel na solução ácido sulfúrico, particularmente em gramíneas jovens (LOWRY et al., 1994).

O tecido foliar apresentou significativos teores de cinzas, enquanto que os caules foram zerados (Tabela 7). Estes resultados refletem a maior concentração de minerais, na fração foliar, em virtude das enzimas participantes das reações metabólicas, particularmente as fotossintéticas e as da respiração, que ocorrem na

mesma. Parte destas cinzas podem estar incorporadas na LDA das folhas, uma vez que pode haver contaminação de matéria mineral nas preparações de FDA (MERTENS, 1996). Salvo exceção do *Eucalyptus paniculata*, madeiras e bambus não apresentam teores de MM nas LDA. Esta observação vai de encontro ao fato de que estes materiais são majoritariamente constituídos de tecidos pouco ativos metabolicamente.

Diferentemente das gramíneas, para as madeiras e bambus o método LPer foi o que tendeu a fornecer valores mais elevados em relação à LK. A lignina de madeiras é virtualmente livre de nitrogênio (FUKUSHIMA; HATFIELD, 2001; VAN SOEST, 1994). Quanto à investigação da hipótese se a lignina presente no cerne ou alburno teria algum efeito sobre ataques de fungos ou cupins, os dados oferecidos pelos três procedimentos analíticos são de tal ordem discrepantes, que impossibilita uma conclusão razoável (Tabela 8).

Embora o método Klason seja apontado pela literatura como o mais indicado para a avaliação de madeiras (GUILLON, 2001; IYAMA; WALLIS, 1988; SUN et al., 2001), este não apresentou resultados conclusivos sobre as frações cerne e alburno.

No grupo composto pelos bambus, os valores de LDA também foram inferiores aos apresentados pela LPer e LK (Tabela 9). Muito embora as gramíneas empregadas neste experimento tivessem sido colhidas em avançado estágio de maturidade, o bambu, uma gramínea mesmo que lenhosa, teve o seu teor de lignina maior que o das gramíneas usualmente cultivadas para a alimentação de animais herbívoros.

Os teores de lignina ácida, no geral, foram mais baixos que os valores obtidos pela técnica do permanganato de potássio, fato também foi observado por Van Soest e Wine (1968) levando-os a especularem que resultados provenientes pelo

emprego deste último método, talvez estejam mais próximos de sua real concentração. No entanto, compostos fenólicos residuais (como os taninos, flavonóides) podem ser atacados pelo permanganato (VAN SOEST; WINE, 1968). Destaque-se o valor de LPer da *Bambusa vulgaris*, cuja análise foi repetida várias vezes: não há evidências que justifiquem esse dado, ainda mais considerando-se os resultados dos dois outros métodos (Tabela 9).

4.1 Digestibilidade *in vitro*

Quanto à determinação do valor nutritivo nas forrageiras, a digestibilidade *in vitro* do tecido foliar foi superior à do caule, tanto para matéria seca como para a parede celular (Tabela 10). A única exceção ficou por conta do *Pennisetum purpureum* cv. elefante anão; entretanto, observa-se que o teor de PC da folha foi substancialmente maior que no caule (Tabela 4), muito embora as concentrações de lignina estivessem dentro do padrão esperado (Tabela 7). Para as demais plantas, a principal razão residiria nas concentrações de lignina. Fukushima e Savioli (2001) também encontraram maiores teores de lignina no caule em relação à folha, quando empregaram três técnicas de quantificação da lignina.

De acordo com BUXTON et al. (1996), à medida que as forragens amadurecem, a concentração de parede celular aumenta em função do espessamento das paredes. Segundo VAN SOEST (1994) os caules exibem valores de digestibilidade menores que as folhas.

Tabela 10 - Média \pm erro padrão da média da digestibilidade *in vitro* da matéria seca e da parede celular de cinco cultivares de forrageiras em estágio avançado de maturidade, expressos em matéria seca (%)

AMOSTRAS	DIVMS	DIVPC
<i>Pennisetum purpureum</i> Schum. cv. porto rico (caule)	25,1 \pm 0,5 ^b	16,6 \pm 0,2 ^a
<i>Pennisetum purpureum</i> Schum. cv. porto rico (folha)	37,3 \pm 0,5 ^b	39,3 \pm 1,2 ^a
<i>Pennisetum purpureum</i> Schum. cv. elef. anão (caule)	47,3 \pm 1,7 ^b	25,2 \pm 0,3 ^a
<i>Pennisetum purpureum</i> Schum. cv. elef. anão (folha)	42,3 \pm 1,4 ^b	49,5 \pm 0,4 ^a
<i>Pennisetum purpureum</i> Schum. cv. napier (caule)	35,0 \pm 0,5 ^b	22,2 \pm 0,8 ^a
<i>Pennisetum purpureum</i> Schum. cv. napier (folha)	48,4 \pm 0,1 ^b	45,5 \pm 0,3 ^a
<i>Andropogon gayanus</i> (caule)	36,2 \pm 0,5 ^b	34,3 \pm 0,2 ^a
<i>Andropogon gayanus</i> (folha)	47,4 \pm 0,6 ^b	44,3 \pm 0,6 ^a
<i>Panicum maximum</i> (Tobiatã) (caule)	24,9 \pm 1,2 ^b	16,9 \pm 1,2 ^a
<i>Panicum maximum</i> (Tobiatã) (folha)	34,4 \pm 0,7 ^b	32,2 \pm 0,5 ^a
Total	37,8 \pm 1,5^b	32,6 \pm 2,1^a

Embora tal fato seja relacionado com as concentrações de lignina nas diferentes frações da planta, Savioli e Fukushima (2000) ressaltaram que é necessário também levar-se em conta que a lignina presente no caule é possivelmente diferente daquela presente na folha.

Na Tabela 10 também se observa que os dados da digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS) foram, no geral, superiores aos da parede celular (DIVPC), particularmente no que tange aos caules. A DIVPC das folhas foi superior ao do caule para os *Pennisetum purpureum* cv.porto rico e *Pennisetum purpureum* cv. elefante anão. Nas demais gramíneas a DIVPC das folhas embora menores, foram relativamente elevadas. Mais uma vez, a principal razão residiria na concentração de lignina na parede celular.

Como esperado, a digestibilidade das amostra de madeira foi muito baixa (Tabela 11). Nestes casos, não foi possível estabelecer elos firmes entre digestibilidade e teores de lignina mensurados por quaisquer dos três métodos. Por exemplo, a digestibilidade do alburno do *Eucalyptus grandis* foi aproximadamente três vezes inferior que a digestibilidade do respectivo cerne, entretanto a concentração de lignina, pelos métodos LDA e LK, foi praticamente idêntica. Outro exemplo, diz respeito ao *Eucalyptus paniculata*, onde a DIVMS do cerne e alburno foi próxima, mas o teor de LPer destas frações foi substancialmente diferente.

No entanto, também foram observadas diferenças significativas ($P < 0,05$) entre a digestibilidade global da matéria seca e da parede celular (Tabela 11). Estas observações não fazem muito sentido, uma vez que o teor de PC nas madeiras foi praticamente o mesmo que a quantidade de MS. Veja-se os exemplos de *Eucalyptus citriodora* (alburno) e *Anadenanthera peregrina*, onde a DIVMS foi mais que três vezes do que a DIVPC,

Tabela 11 - Média \pm erro padrão da média da digestibilidade *in vitro* da matéria seca e da parede celular de seis espécies de madeira, expressos em matéria seca (%)

AMOSTRAS	DIVMS	DIVPC
<i>Eucalyptus paniculata</i> (cerne)	4,4 \pm 0,2 ^b	3,4 \pm 0,3 ^b
<i>Eucalyptus paniculata</i> (alburno)	4,1 \pm 0,4 ^b	2,6 \pm 0,2 ^a
<i>Eucalyptus citriodora</i> (cerne)	7,5 \pm 0,3 ^b	3,7 \pm 0,1 ^a
<i>Eucalyptus citriodora</i> (alburno)	8,6 \pm 0,6 ^b	1,7 \pm 0,1 ^a
<i>Eucalyptus grandis</i> (cerne)	7,4 \pm 0,3 ^b	5,3 \pm 0,4 ^a
<i>Eucalyptus grandis</i> (alburno)	2,8 \pm 0,0 ^b	0,7 \pm 0,0 ^a
<i>Caesalpinia echinata</i> Lam. 13C (alburno)	5,2 \pm 0,2 ^b	5,4 \pm 0,2 ^b
<i>Caesalpinia echinata</i> Lam. 76C (alburno)	8,6 \pm 0,5 ^b	7,5 \pm 0,6 ^b
<i>Pinus ellioti</i> (cerne + alburno)	5,5 \pm 0,4 ^b	3,2 \pm 0,1 ^a
<i>Anadenanthera peregrina</i> (L.) Speg. (cerne)	9,6 \pm 0,4 ^b	3,0 \pm 0,5 ^a
Total	6,4 \pm 0,4^b	3,6 \pm 0,3^a

entretanto, a concentração de PC em ambas variou de 85 a 90%. De acordo com Van Soest (1964), a lignina exerce efeitos deletérios sobre a parede celular, e não no conteúdo celular.

As amostras de bambu, também diferiram significativamente ($P < 0,05$) quanto à digestibilidade da matéria seca e da parede celular (Tabela 12).

Embora os bambus sejam gramíneas, os seus colmos são lenhosos, portanto não surpreende que a digestibilidade foi inferior que as amostras do grupo 1. Observe-se que para as gramíneas, os dois capins que apresentaram as menores taxas de DIVMS e DIVPC (caules de *Pennisetum purpureum* cv. porto rico e *Pennisetum maximum*) foram também as amostras que mostraram os maiores teores de PC e LDA (Tabela 10, 11 e 12).

4.2 Correlação dos teores de lignina com a digestibilidade *in vitro*

Para quase todas as amostras, os teores de lignina mensurados pelas três técnicas foram negativamente correlacionados com a digestibilidade “in vitro”, tanto da matéria seca como da parede celular (Tabela 13).

À exceção da LK, as forrageiras mostraram de razoáveis a elevadas correlações, altamente significativas. Entretanto, para o grupo das madeiras, as correlações não foram significativas. O grupo dos bambus ficou numa posição intermediária. Em outras palavras, o método LDA estimou razoavelmente bem a digestibilidade de forrageiras e bambus, ficando em segundo lugar a LPer.

Tabela 12 - Média \pm erro padrão da média da digestibilidade *in vitro* da matéria seca e da parede celular de seis espécies de bambu, expressos em matéria seca (%)

AMOSTRAS	DIVMS	DIVPC
<i>Chusquea bambusoides</i>	9,9 \pm 0,6 ^b	7,1 \pm 0,7 ^a
<i>Chusquea oxylepsis</i>	11,3 \pm 0,6 ^b	7,1 \pm 0,8 ^a
<i>Bambusa bambos</i>	10,1 \pm 0,1 ^b	5,7 \pm 0,2 ^a
<i>Bambusa vulgaris</i>	5,8 \pm 0,0 ^b	1,3 \pm 0,3 ^a
<i>Phyllostachys sp.</i>	7,1 \pm 0,8 ^b	4,7 \pm 0,0 ^a
<i>Merostachys burmanii</i>	7,8 \pm 0,1 ^b	2,1 \pm 0,5 ^a
Total	8,7 \pm 0,4 ^b	4,7 \pm 0,5 ^a

Tabela 13 - Correlação entre os teores de lignina obtidos pelos três procedimentos analíticos e a digestibilidade *in vitro* da matéria seca e da parede celular de forrageiras, madeiras e bambus

AMOSTRAS	AMOSTRA BRUTA		PAREDE CELULAR	
	r *	P**	r *	P**
Grupo 1- Forrageiras				
LDA	- 0,804	0,0001	- 0,929	0,0001
LPer	- 0,672	0,0001	- 0,635	0,0001
LK	- 0,308	0,097	- 0,612	0,0001
Grupo 2- Madeiras				
LDA	- 0,129	0,496	- 0,122	0,520
LPer	0,304	0,102	0,404	0,027
LK	- 0,243	0,196	- 0,132	0,486
Grupo 3- Bambus				
LDA	- 0,795	0,0001	- 0,640	0,004
LPer	- 0,541	0,020	- 0,505	0,032
LK	- 0,613	0,007	- 0,719	0,001

* Índice de Correlação de Pearson; ** nível de significância; LDA= lignina detergente ácido; LPer= lignina permanganato de potássio; LK= lignina Klason

A LK não estimou bem a digestibilidade em gramíneas, possivelmente devido à interferência das proteínas. Quanto às madeiras, nenhum dos três métodos foi um bom indicador da digestibilidade, mesmo o método LK, que tradicionalmente é o método de escolha para quantificar lignina em madeiras. Aparentemente, a principal causa nas madeiras foi a baixa digestibilidade.

Pode-se conjecturar que esta baixa digestibilidade foi influenciada por outros fatores além da lignina ou então que a lignina não foi adequadamente quantificada por nenhum dos métodos. Entretanto, deve-se levar em consideração que os bambus apresentaram baixos coeficientes de digestibilidade e nem por isso as correlações foram insatisfatórias

Embora os métodos LDA e LPer tenham razoavelmente estimado a digestibilidade em forrageiras, para um amplo leque de amostras vegetais nenhum dos três métodos analíticos foi totalmente satisfatório. Portanto, mais estudos são necessários para a estimativa do teor de lignina em amostras vegetais, de forma a originar resultados mais conclusivos.

De forma geral, a ausência de precisão dos métodos utilizados para a determinação dos teores de lignina, estão refletidas nos resultados encontrados neste trabalho. Uma vez que, nenhum dos métodos apresentados, refletiram precisamente as concentrações de lignina para as amostras botânicas de diversas origens filogenéticas; dando vazão para a validação de novas metodologias com maior poder de acurácia na determinação dos teores desta molécula nos variados grupos vegetais.

5 CONCLUSÃO

Nas diferentes preparações de parede celular, o método parede celular bruta (PC) apresentou maiores rendimentos de parede celular, em relação à FDA. Esta observação sugere que a extração com solventes orgânicos remove menos substâncias do que o brometo cetil trimetilamônio, utilizado para as preparações de FDA e este detergente pode solubilizar parte da lignina da amostra, resultando em menores valores de lignina detergente ácido (LDA).

Regra geral, não houve concordância entre os três métodos para a mensuração dos teores de lignina, nos três grupos de amostras. Os métodos lignina permanganato de potássio (LPer) e lignina Klason (LK) foram os que apresentaram os dados mais elevados. No entanto, tais resultados devem ser vistos com ressalva, uma vez que estes podem estar mascarados por artefatos da técnica.

Embora os métodos LDA e LPer tenham razoavelmente estimado a digestibilidade em forrageiras, para um amplo leque de amostras vegetais, incluindo madeiras, nenhum dos três métodos analíticos foi totalmente satisfatório. Portanto, mais estudos são necessários para a estimativa do teor de lignina em amostras vegetais, de forma a originar resultados mais conclusivos.

REFERÊNCIAS

- AKIN, D. E.; ROBINSON, E. L.; BARTON, F. E.; HIMMELSBACH, D. S. Change with maturity in anatomy, histochemistry, chemistry and tissue digestibility of bermudagrass parts. **J. Agr. Food. Chem.**, v. 25, nº 1, p. 179-186, 1977.
- AL-ANI, F.; SMITH, J. E. Effect of chemical pretreatments on the fermentation and ultimate digestibility of bagasse by *Phanerochaete chrysosporium*. **J. Sci. Food Agric.**, v. 42, nº 6, p. 19-28, 1988.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS – AOAC. **Official methods of analysis**. 15 ed. Washington DC., 1990. 1298 p.
- ASSUMPÇÃO, R. M. V.; PINHO, M. R. R.; CAHEN, R.; PHILIPP, P. Polpação Química. In: D' ALMEIDA, M. L. O. (Ed.). **Celulose e papel: tecnologia de fabricação da pasta celulósica**. 2. ed. São Paulo: SENAI/IPT, 1988. v. 1, p. 612.
- BAKER, F.; HARRISS, S. T. The role of the microflora of the alimentary tract of Herbivora with special reference to ruminants. 2. Microbial digestion in the rumen (and caecum) with special reference to the decomposition of structural cellulose. **Nutr. Abstr. Revs.**, v.17, nº 8, p. 3, 1947.
- BRILLOVET, J. M.; RIOCHET, D. Cell wall polysaccharides and lignin in cotyledons and hulls of seeds from various lupin (*Lupinus sp.*) species. **J. Sci. Food Agric.**, v. 34, nº 12, p. 861-868, 1983.
- BUNGAY, H. **An early stage in the condensation of various monomers to form lignin**. 1996 (on line). Disponível em: [<http://www.esb.ucp.pt/bungah/sugar/lignin.htm>]. Acessado em: jun. 2001.
- BUXTON, D. R.; MERTENS, D. R.; FISHER, D. S. Cool-season forage grasses. **Agron. Monogr.**, v. 1, nº 34, p. 229, 1996.
- CAMM, E. L.; TOWERS, G. H. N. Phenylalanine ammonia lyase. **Phytochemistry**, v.12, nº 1, p. 961, 1973.
- CHESSON, A. Effects of sodium hydroxide on cereal straws in relation to the enhanced degradation of structural polysaccharides by rumen microorganisms. **J. Sci. Food. Agric.**, v. 32, nº 8, p. 745, 1981.

- CHESSON, A.; MONRO, J. Influence of plant phenolic acids on growth and cellulolytic activity of rumen bacteria. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v.44, nº 3, p. 597, 1982.
- CHRISTIAN, K. R. Field Stat. Rec. **CSIRO.**, v. 10, nº 3, p. 29-34, 1971.
- COLLINGS, G. F.; YOKOYAMA, M. T.; BERGEN, W. G. Lignin as determined by oxidation with sodium chlorite and a comparison with permanganate lignin. **J. Dairy Sci.**, v. 61, nº 8, p. 1156, 1978.
- CRAMPTON, E. W.; MAYNARD, L. A. The relation of cellulose and lignin content to the nutritive value of animal feeds. **J. Nutr.**, v. 15, nº 3, p. 383, 1938.
- D'ALMEIDA, M. L. O. (Ed.). **Celulose e papel: tecnologia de fabricação da pasta celulósica**. 2. ed. São Paulo: SENAI/IPT, 1988. v. 1, p. 427-512.
- DEHORITY, B. A.; JOHNSON, R. R. Effect of particle size upon the in vitro cellulose digestibility of forages by rumen bacteria. **J. Dairy Sci.**, v. 44, nº 12, p. 2242, 1961.
- EDWARDS, C. S. Determination of lignin and cellulose in forages by extraction with triethylene glycol. **J. Sci. Food Agric.**, v. 24, nº 12, p. 381, 1973.
- ELLIS, G. H.; MATRONE, G.; MAYNARD, L. A. A 72 percent H₂SO₄ method for the determination of lignin and its use in animal nutrition studies. **J. Anim. Sci.**, v. 5, nº 1, p. 285, 1946.
- FAICHNEY, G.J. The use of markers to partition digestion within the gastrointestinal tract of ruminants. In: McDONALD, I. W.; WARNER, A. C. I. (Ed.). **Digestion and metabolism in the ruminant**. Armidale: University of New England Publishing Unit, 1975. p. 277-291.
- FENGEL, D.; WEGENER, G. (Ed.). **Wood - chemistry, ultrastructure and reactions**. Berlin, Germany: Walter de Gruyter. 1984. p. 132-191.
- FUKUSHIMA, R. S. Extração da lignina através do brometo de acetila e seu emprego objetivando avaliação quantitativa da lignina de plantas. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 33., 1996, Fortaleza, CE. **Anais...** Fortaleza: [s.n.], 1996. v. 3, p.318-320.
- FUKUSHIMA, R. S. **Modification of a colorimetric analysis for lignin and its use in studying the inhibitory effect of lignin on forage digestion by ruminal microorganisms**. 1989. 125p. Thesis (Ph. D. in Animal Nutrition) – The Ohio State University, Columbus, OH: OSU, 1989.
- FUKUSHIMA, R. S.; DEHORITY, B. A.; LOERCH, S. C. Modification of a colorimetric analysis for lignin and its use in studying the inhibitory effect of lignin on forage digestion by rumen microorganisms. **J. Anim. Sci.**, v. 69, nº 1, p. 295, 1991.

- FUKUSHIMA, R. S.; DEHORITY, B. A. Feasibility of using lignin isolated from forages by solubilization in acetyl bromide as a standard for lignin analysis. **J. Anim. Sci.**, v. 78, nº 2, p. 3135-3143, 2000.
- FUKUSHIMA, R. S.; HATFIELD, R. D. Extraction and isolation of lignin for utilization as a standard to determine lignin concentration using the acetil bromide spectrophotometric method. **J. Agric. Food Chem.**, v. 49, nº 7, p. 3133-3139, 2001.
- FUKUSHIMA, R. S.; HATFIELD, R. D. Composição fenólica de ligninas dioxano determinadas pela reação oxidativa com o nitrobenzeno. **Pesq. Agropec. Bras.**, v. 38, nº 3, p. 373-378, 2003.
- FUKUSHIMA, R. S.; HATFIELD, R. D. A spectrophotometric method to determine lignin concentration in vegetable samples by utilizing a lignin extracted with acidic dioxane as a standart and comparison with other analytical methods. **J. Agric. Food Chem.**, (no prelo).
- FUKUSHIMA, R. S.; SAVIOLI, N. M. F. Correlação entre digestibilidade *in vitro* da parede celular e três métodos analíticos para a avaliação quantitativa da lignina. **Rev. Bras. Zootec.**, v. 2, nº 2, p. 302-309, 2001.
- FUKUSHIMA, R. S.; WEIMER, P. J.; KUNZ, D. A. Photocatalytic interation of resazurin N-oxide with cysteine optimizes preparation of anaerobic culture media. **Anaerobe.**, v. 8, nº 1, p. 29-34, 2002.
- GIGER, S. Revue sur les methodes de dosage de la lignine utilisees en alimentation animale. **Ann. Zootech.**, v. 34, nº 3, p. 85, 1985.
- GOERING, G. K.; VAN SOEST, P. J. (Ed.). **Forage fiber analysis (apparatus, reagents, procedures and some applications)**. Washington, DC., 1970. (USDA Agr. Handbook. nº 379).
- GUILLOIN, E. Structural characterization and iron (III) binding ability of dimeric and polymeric lignin models. **J. Colloid Interf. Sci.** v. 239, nº 1, p. 39-48, 2001.
- HATFIELD, R. D. Carbohydrate composition of alfalfa cell walls isolated from stem sections differing in maturity. **J. Agric. Food Chem.**, v. 40, nº 3, p. 424-430, 1992.
- HATFIELD, R. D.; JUNG, H. G.; RALPH, J.; BUXTON, D. R.; WEIMER, P. J. A comparison of the insoluble residues produced by the klason lignin and acid detergent lignin procedures. **J. Sci. Food Agric.**, v. 65, nº 1, p. 51-58, 1994.
- HATFIELD, R. D.; RALPH, J.; GRABBER, J. H. Cell walls strutral foundations: molecular basis for improving forage digestibilities. **Crop Science**, v. 39, nº 1, p. 27-37, 1999.
- HATFIELD, R. D.; WEIMER, P. J. Degradation characteristics of isolated and in situ cell wall lucerne pectic polysaccharides by mixed ruminal microbes. **J. Sci. Food Agric.**, v. 69, nº 1, p.185-196, 1995.

- HIGUCHI, T. Lignin structure and morphological distribution in plant cell walls. In: KIRK, T. K.; HIGUCHI, T.; CHANG, H. (Ed.). **Lignin biodegradation: microbiology, chemistry and potential applications**. Boca Raton, FL: CRC Press, 1980. v. 1, p. 2.
- 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° 1, p. 875, 1967a.
- HIGUCHI, T.; ITO, Y.; SHIMADA, M.; KAWAMURA, I. Chemical properties of milled wood lignin of grasses. **Phytochemistry**, v. 6, n° 1, p. 1551, 1967b.
- IYAMA, K.; WALLIS, A. F. A. An improved acetyl bromide procedure for determining lignin in woods and wood pulps. **Wood Sci. Technol.** v. 22, n° 3, p. 271-280, 1988.
- IYAMA, K.; WALLIS, A. F. A. Determination of lignin in herbaceous plants by an improved acetyl bromide procedure. **J. Sci. Food Agric.**, v. 51, n° 5, p. 145-161, 1990.
- JOHNSON, D. B.; DEHORITY, B. A.; CONRAD, H. R.; DAVIES, R. R. Relationship of in vitro cellulose digestibility of undired and dired mixed forages to their in vivo dry matter digestibility. **J. Dairy Sci.**, v. 4, n° 12, p. 250, 1962.
- JOHNSON, D. B.; MOORE, W. E.; ZANK, L. C. The spectrophometric determination of lignin in small wood samples. **TAPPI**, v. 44, n° 11, p. 793, 1961.
- JUNG, H. G. Forage lignins and their effects on fiber digestibility. **Agron. J.**, v. 81, n° 8, p. 33-38, 1989.
- JUNG, H. G.; DEETZ, D. A. Cell wall lignification and degradability. In: JUNG, H. G. (Ed.). **Forage cell wall structure and digestibility**. Madison, WI: ASA, CSSA and SSSA. 1993. p. 315-343.
- JUNG, H. G.; FAHEY JR, G. C. Effects of phenolic monomers on rat performance and metabolism. **J. Nutr.**, v. 113, n° 6, p. 546, 1983.
- 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. **J. Dairy Sci.**, v. 80, n° 8, p. 1622-1628, 1997.
- JUNG, H. G.; VOGEL, K. P. Influence of lignin on digestibility of forage cell wall material. **J. Anim. Sci.**, v. 62, n° 6, p. 1703, 1986.
- JUNG, H. G.; VOGEL, K. P. Lignification of switchgrass (*Panicum virgatum*) and big bluestem (*Andropogon gerardii*) plant parts during maturation and its effect on fibre degradability. **J. Sci. Food Agric.**, v. 59, n° 4, p. 169-176, 1992.
- KIRK, T. K.; OBST, J. R. Lignin determination. In: WILLIS, A.; KELLOGGS, S.T. (Ed.). **Methods in Enzimology**. San Diego, CA: Academic Press, 1988. v. 161, p. 87-101.

- KONDO, T.; MIZUNO, K.; KATO, T. Some characteristics of forage plant lignin. **Jpn. Agric. Res. Quart.**, v. 21, nº 1, p. 47-52. 1987.
- LAI, Y. Z.; SARKANEN, K. V. Isolation and structural studies. In: SARKANEN, K. V.; LUDWIG, C. H. (Ed.) **Lignins: occurrence, formation, structure and reactions**. New York, NY: Wiley Intersci. 1971. p.165.
- LEWIS, N.G.; YAMAMOTO, E. Lignina: Ocorrence, biogenesis and biodegradation. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.**, v. 41, nº 1, p. 455-496. 1980.
- LOWRY, J. B.; CONLAN, A. C.; SCHLINK, A. C.; MCSWEENEY, C. S. Acid detergent dispersible lignin in tropical grasses. **J. Sci. Food Agric.**, v. 65, nº 6, p. 41-49, 1994.
- MACDONALD, R. G.;FRANKLIN, J. N. (Ed.). **The pulping of wood**. New York: McGraw-Hill, 1969. v.1 (Pulp and paper manufacture).
- MARTON, J. Determination of lignin in small pulp and paper samples using the acetyl bromide method. **TAPPI**, v. 41, nº 6, p. 700-702, 1967.
- MERTENS, D. Using fiber and carbohydrate analyses to formulate dairy rations. In: SATTER, L. D. (Ed.) **Informational conference with dairy and forage industries**. Madison, WI: U.S. Dairy Forage Research Center, p. 81-92. 1996.
- MORRISON, I.M. A semi-micro method for the determination of lignin and its use in predicting the digestibility of forage crops. **J. Sci. Food Agric.**, v. 23, nº 1, p. 455, 1972a.
- MORRISON, I. M. Improvements in the acetyl bromide technique to determine lignin and digestibility and its application to legumes. **J. Sci. Food Agric.**, v. 23, nº 1, p. 1463, 1972b.
- MORRISON, I. M. The effect of physical and chemical treatments on the degradation of wheat and barley straws by rumen liquor-pepsin and pepsin-cellulose systems. **J. Sci. Food Agric.**, v. 34, nº 1, p. 1323, 1983.
- MORRISON, I. M.; STEWART, D. Determination of lignin in the presence of ester-bound substituted cinnamic acids by a modified acetyl bromide procedure. **J. Sci. Food Agric.**, v. 69, nº 4, p.151-157, 1995.
- MOWAT, D. N.; KWAIN, M. L.; WINCH, J. E. Lignification and in vitro cell wall digestibility of plants parts. **Can. J. Plant Sci.**, v. 49, nº 4, p. 499-504, 1969.
- NORRIS, K. H.; BARNES, R. F.; MOORE, J. E.; SHENK, J. S. Predicting forage quality by infrared reflectance spectroscopy. **J. Anim. Sci.**, v. 43, nº 1, p. 889, 1976.
- PATTON, A. R.; GIESEKER, L. Seasonal changes in the lignin and cellulose content of some Montana grasses. **J. Anim. Sci.**, v. 1, nº 1, p. 22, 1942.

- RALPH, J.; HATFIELD, R. D.; QUIDEAU, S.; HELM, R. F.; GRABBER, J. H.; JUNG, H. G. Pathway of p-coumaric acid incorporation into maize lignin as revealed by NMR. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 116, nº 21, p. 9448-9456, 1994.
- REEVES III, J. B. Near infrared spectroscopic analysis of lignin components in sodium chlorite-treated and untreated forages and forage by-products. **J. Dairy Sci.**, v. 71, nº 2, p. 388, 1988.
- ROHELLA, R. S. Thermal studies on isolated and purified lignin. **Thermochim Acta.** v. 287, nº 1, p. 131-138, 1996.
- SARKANEN, K. V.; LUDWIG, C. H. (Ed.). **Lignins: occurrence, formation, structure and reactions.** NY: Wiley Interscience, 1971.
- SAVIOLI, N. M. F.; FUKUSHIMA, R. S. Extração da lignina com o reagente brometo de acetila: influência da espécie forrageira, estágio de maturidade e parte da planta. **Rev. Bras. Zootec.**, v. 29, n. 6, p. 1969-1981, 2000.
- SEWALT, V. J. H.; OLIVEIRA, W.; GLASSER, W. G. Lignin impact on fibre degradation: A model study using cellulosic hydrogels. **J. Sci. Agr.** v. 71, nº 2, p. 204-208, 1996.
- SHARMA, U.; BRILLOVET, J. M.; SCALBERT, A.; MONTIES, B. Studies on a brittle stem mutant of rice, *Oriza sativa L.*, characterization of lignin fractions, associated phenolic acids and polysaccharides from rice stem. **Agronomie**, v. 6, nº 2, p. 265-271, 1986.
- SHARMA, H. S. S. Compositional analysis of neutral detergent, acid detergent, lignin and humus fractions of mushroom compost. **Thermochimica Acta.**, v. 285, nº 2, p. 211-220, 1996.
- SHENK, J. S.; WESTERHAUS, M. O.; HOOVER, M. R. Analysis of forages by infrared reflectance. **J. Dairy Sci.**, v. 62, nº 2, p. 807, 1979.
- SHIMOJO, M.; GOTO, I. A study on the relation between disappearance of dry matter and acetyl bromide lignin of tropical grass. **Jpn. J. Zootechn. Sci.**, v. 55, nº 3, p. 838, 1984.
- STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM INSTITUTE. INSTITUTE INC. **SAS user's guide: statistics.** 5 ed. Cary: SAS Institute, 1985. 956 p.
- SUN, R.; LU, Q.; SUN, X. F. Physico-chemical and thermal characterization of lignins from *Caligonum monogoliacum* and *Tamarix* spp. **Polymer Degradation and Stability**, v. 72, nº 1, p. 229-238, 2001.
- THEANDER, O.; WESTERLUND, E.A. Studies on dietary fibre. 3. Improved procedures for analysis on dietary fibre. **J. Agric. Food Chem.**, v. 34, nº 2, p. 330-336, 1986.

TILLEY, J. M. A.; TERRY, R. A. A two-stage technique for the *in vitro* digestion of forage crops. **J. Brit. Grassl. Soc.**, v. 18, n° 2, p. 104-111, 1963.

VALLET, C.; CHABBERT, B.; CZANINSKI, Y.; LEMAIRE, G.; MONTIES, B. Extractibility of structural carbohydrates and lignin deposition in maturing alfalfa internodes. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 21, n° 2, p. 201-206, 1997.

VAN SOEST, P. J. Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. I. Preparation of fiber residues of low nitrogen content. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, v. 46, n° 1, p. 825, 1963a.

VAN SOEST, P. J. Use of detergents in the analysis of fibrous foods. II. A rapid method for the determination of fibre and lignin. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, v. 46, n° 1, p. 829, 1963b.

VAN SOEST, P. J. Symposium on nutrition and forage and pastures: new chemical procedures for evaluating forages. **J. Anim. Sci.**, v. 23, n° 3, p. 838, 1964.

VAN SOEST, P. J. Development of a comprehensive system of feed analysis and its application to forages. **J. Anim. Sci.**, v. 26, n° 1, p. 119, 1967.

VAN SOEST, P. J.; WINE, R. H. The determination of lignin and cellulose in acid-detergent fibre with permanganate. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, v. 51, n° 4, p. 780, 1968.

VAN SOEST, P. J.; ROBERTSON, J. B. Systems of analysis for evaluating fibrous feeds. In: PIGDEN, W. J.; BALCH, C. C.; GRAHAM, M. (Ed.). **Standardization of analytical methodology for feeds**. Ottawa: International Development Research Center, 1980. p. 49-60.

VAN SOEST, P. J.; ROBERTSON, J. B.; LEWIS, B. A. Methods for dietary fibre, neutral detergent fibre and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. **J. Dairy Sci.**, v. 74, n° 2, p. 3583-3597, 1991.

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