**TEORES DE LIGNINA ESTIMADOS ATRAVÉS DO
MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO “LIGNINA
SOLÚVEL EM BROMETO DE ACETILA” DE
ALGUNS CULTIVARES DE AVEIA**

Roseli Sengling Lacerda

Dissertação de Mestrado apresentada à Comissão de Pós-Graduação da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da USP, em 17 de setembro de 2001 como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Zootecnia, na área de Concentração: Qualidade e Produtividade Animal.

Orientadora: Prof^a.Dr^a. *Catarina Abdalla Gomide*

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo

L131t

Lacerda, Roseli Sengling

Teores de lignina estimados através do método espectrofotométrico “lignina solúvel em brometo de acetila” de alguns cultivares de aveia / Roseli Sengling Lacerda – Pirassununga, 2001.
75 p.

Dissertação (Mestrado) -- Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos - Universidade de São Paulo, 2001.
Orientadora: Profa. Dra. Catarina Abdalla Gomide.

1. Aveia 2. Brometo de acetila 3. Lignina 4. Método espectrofotométrico 5. Parede celular I. Título.

*O MUNDO ESTÁ NAS MÃOS
DAQUELES QUE TEM CORAGEM
DE SONHAR, E CORRER O RISCO DE
VIVER SEUS SONHOS. CADA QUAL USA
SUA CRIATIVIDADE E SEU TALENTO.*

(Albert Schweitzer)

*“FOI PELA SABEDORIA QUE O SENHOR
CRIOU A TERRA, FOI COM INTELIGÊNCIA
QUE ELE FORMOU OS CÉUS, FOI PELA CIÊNCIA
QUE SE FENDERAM OS ABISMOS, POR ELE AS
NUVENS DESTILAM O ORVALHO”*

(Provérbios)

Aos meus pais

*A vocês que se doaram inteiros e renunciaram
aos seus sonhos para que eu pudesse realizar o
meu, meus sinceros agradecimentos.*

DEDICO

Ao meu esposo Hudson e ao

meu filho João Paulo, pelo

amor e carinho nesta caminhada.

AGRADECIMENTOS

À Professora Dr^a Catarina Abdalla Gomide, pela orientação, dedicação e apoio nessa jornada.

Ao Professor Dr. Romualdo Shigueo Fukushima, pela valiosa cooperação durante todo este trabalho.

À Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo (FZEA/USP) e a Comissão de Pós-Graduação, pela oportunidade para a realização deste curso e por contribuir com o enriquecimento da minha formação pessoal e profissional.

Aos Chefes do Departamento de Zootecnia (ZAZ) pela liberação para que pudéssemos cumprir os créditos e pela realização das análises laboratoriais.

Aos Professores Doutores Valdo Rodrigues Herling e José Carlos Machado Nogueira Filho pelas valiosas sugestões na qualificação.

Aos Professores Doutores César Gonçalves de Lima e Marcelo Landim Brizola, pela assessoria nas análises estatísticas e pela amizade.

Aos funcionários e amigos de laboratório, Raphael, e Marcos, pela amizade.

Às funcionárias e amigas da Secretaria, Érica, Estela e Conceição, pela colaboração, incentivo e amizade.

Ao estagiário Fábio Gallo pelos momentos de descontração, pela amizade e ajuda nas análises laboratoriais.

Aos amigos Ana Mônica, Cunha e Rosilda, pela valiosa colaboração, pelo incentivo, dedicação e compreensão, para que este trabalho pudesse ser realizado, meu muito obrigado.

Às amigas do Departamento de Nutrição e Produção Animal, Simi, Isabel e Lourdes, pelo incentivo, pela amizade e pela valiosa colaboração, meu muito obrigado.

Às colegas da pós-graduação, pelo companheirismo, especialmente Angélica, Juliana, Cecília e Edilene.

À colega de pós-graduação Elizângela, pela valiosa ajuda na construção dos gráficos.

Aos amigos Andréia e Renato pela amizade, incentivo, apoio e dedicação para que este trabalho pudesse ser realizado e pela ajuda na realização das análises laboratoriais, meu muito obrigado.

À toda minha família pelo incentivo, compreensão e apoio.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	II
LISTA DE TABELAS.....	VI
LISTA DE ABREVIATURAS.....	VIII
RESUMO.....	IX
ABSTRACT.....	X
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	4
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	15
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	20
5 CONCLUSÃO.....	60
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Monômeros de lignina.....	4
Figura 2	Estágios de condensação de vários monômeros que formam a lignina	5
Figura 3	Biossíntese da molécula de lignina, a partir da glicose até os monômeros fenólicos componentes da macromolécula.....	6
Figura 4	Modelos de estruturas de ligninas de plantas gimnospemas.....	7
Figura 5	Efeito das idades na densidade óptica da lignina dioxana extraída do caule da aveia (cultivar CTC1).....	34
Figura 6	Efeito das idades na densidade óptica da lignina dioxana extraída do caule da aveia (cultivar UFRGS7).....	34
Figura 7	Efeito das idades na densidade óptica da lignina dioxana extraída do caule da aveia (cultivar UFRGS18).....	35
Figura 8	Efeito das idades na densidade óptica da lignina dioxana extraída do caule da aveia (cultivar UPF15).....	35

Figura 9	Curvas padrão das ligninas dioxana do cultivar CTC1, em diferentes estádios de maturidade (45, 55 e 65 dias)	38
Figura 10	Curvas padrão das ligninas dioxana do cultivar UFRGS7, em diferentes estádios de maturidade (45, 55 e 65 dias)	39
Figura 11	Curvas padrão das lignina dioxana do cultivar UFRGS18, em diferentes estádios de maturidade (45, 55 e 65 dias)	40
Figura 12	Curvas padrão das ligninas dioxana do cultivar UPF15, em diferentes estádios de maturidade (45, 55 e 65 dias)	41
Figura 13	Espectrograma da lignina dioxana extraída do caule de aveia CTC1, aos 65 dias, no intervalo de comprimento de onda de 240 a 320 nm.....	42
Figura 14	Espectrograma da lignina dioxana extraída do caule de aveia CTC2, aos 65 dias, no intervalo de comprimento de onda de 240 a 320 nm.....	42
Figura 15	Espectrograma da lignina dioxana extraída do caule de aveia CTC3, aos 65 dias, no intervalo de comprimento de onda de 240 a 320 nm.....	42
Figura 16	Espectrograma da lignina dioxana extraída do caule de aveia UFRGS7, aos 65 dias, no intervalo de comprimento de onda de 240 a 320 nm.....	43
Figura 17	Espectrograma da lignina dioxana extraída do caule de aveia UFRGS10, aos 65 dias, no intervalo de comprimento de onda de 240 a 320 nm.....	43
Figura 18	Espectrograma da lignina dioxana extraída do caule de aveia UFRGS18, aos 65 dias, no intervalo de comprimento de onda de 240 a 320 nm.....	43

Figura 19	Espectrograma da lignina dioxana extraída do caule de aveia UPF14, aos 45 dias, no intervalo de comprimento de onda de 240 a 320 nm.....	44
Figura 20	Espectrograma da lignina dioxana extraída do caule de aveia UPF14, aos 55 dias, no intervalo de comprimento de onda de 240 a 320 nm.....	44
Figura 21	Espectrograma da lignina dioxana extraída do caule de aveia UPF14, aos 65 dias, no intervalo de comprimento de onda de 240 a 320 nm.....	44
Figura 22	Espectrograma da lignina dioxana extraída do caule de aveia UPF15, aos 65 dias, no intervalo de comprimento de onda de 240 a 320 nm.....	45
Figura 23	Comparação entre os quatro métodos analíticos para a determinação das ligninas, no estágio de maturidade (45 dias) da fração caule, expressos em matéria seca (%).	52
Figura 24	Comparação entre os quatro métodos analíticos para a determinação das ligninas, no estágio de maturidade (55 dias) da fração caule, expressos em matéria seca (%).	52
Figura 25	Comparação entre os quatro métodos analíticos para a determinação das ligninas, no estágio de maturidade (65 dias) da fração caule, expressos em matéria seca (%).	53
Figura 26	Comparação entre os quatro métodos analíticos para a determinação das ligninas, no estágio de maturidade (45 dias) da fração folha, expressos em matéria seca (%).	53
Figura 27	Comparação entre os quatro métodos analíticos para a determinação das ligninas, no estágio de maturidade (55 dias) da fração folha, expressos em matéria seca (%).	54

Figura 28	Comparação entre os quatro métodos analíticos para a determinação das ligninas, no estágio de maturidade (65 dias) da fração folha, expressos em matéria seca (%).	54
Figura 29	Comparação entre os quatro métodos analíticos para a determinação das ligninas, no estágio de maturidade (45 dias) da parte aérea, expressos em matéria seca (%).	55
Figura 30	Comparação entre os quatro métodos analíticos para a determinação das ligninas, no estágio de maturidade (55 dias) da parte aérea, expressos em matéria seca (%).	55
Figura 31	Comparação entre os quatro métodos analíticos para a determinação das ligninas, no estágio de maturidade (65 dias) da parte aérea, expressos na matéria seca (%).	56
Figura 32	Médias entre oito cultivares de aveia nos diversos estágios de maturidade, nos quatro métodos analíticos, para a determinação das ligninas, das três frações, expressos em matéria seca (%).	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Teores de parede celular bruta (PCB) de três frações para oito cultivares de aveia, em diferentes idades de corte, expressos em matéria seca (%).	21
Tabela 2	Teores de fibra em detergente neutro (FDN) de três frações para oito cultivares de aveia, em diferentes idades de corte, expressos em matéria seca (%).	22
Tabela 3	Teores de fibra em detergente ácido (FDA) de três frações para oito cultivares de aveia, em diferentes idades de corte, expressos em matéria seca (%).	23
Tabela 4	Rendimentos das ligninas dioxana ácida extraídas dos oito cultivares de aveia da fração caule, nos estádios de maturidade de 45, 55 e 65 dias de idade, expressos em matéria seca (%).	27
Tabela 5	Teores de proteína bruta (PB) e de carboidrato (CHO) nas LDiox de oito cultivares de aveia da fração caule, em diferentes estádios de maturidade, expressos em matéria seca (%).	29

Tabela 6	Valores de leitura óptica para as três frações vegetais (parte aérea, folha e caule) de oito cultivares de aveia, em diferentes idades de corte.....	31
Tabela 7	Sumário das equações de regressão obtidas a partir das curvas padrão das ligninas dioxana da fração caule de oito cultivares de aveia, em diferentes estádios de maturidade, expressos em matéria seca (%).	37
Tabela 8	Teores de lignina em detergente ácido (LDA), lignina permanganato de potássio (LPer), lignina solúvel em brometo de acetila (LSBA) para as três frações, de oito cultivares de aveia, aos 45 dias de idade de corte, expressos em matéria seca (%).	47
Tabela 9	Teores de lignina em detergente ácido (LDA), lignina permanganato de potássio (LPer), lignina solúvel em brometo de acetila (LSBA) para as três frações, de oito cultivares de aveia, aos 55 dias de idade de corte, expressos em matéria seca (%).	48
Tabela 10	Teores de lignina em detergente ácido (LDA), lignina permanganato de potássio (LPer), lignina solúvel em brometo de acetila (LSBA) para as três frações, de oito cultivares de aveia, aos 65 dias de idade de corte, expressos em matéria seca (%).	49
Tabela 11	Valores das razões entre quatro métodos para a determinação da lignina provenientes das frações vegetais (caule, folha e parte aérea) de oito cultivares de aveia, aos 45, 55 e 65 dias de idade de corte.....	58

LISTA DE ABREVIATURAS

C	Caule
CHO	Carboidratos
CTC	Centro de Treinamento Cotrijuí
FDA	Fibra em detergente ácido
FDN	Fibra em detergente neutro
Fl	Folha
LBrAc	Lignina brometo acetila
LDA	Lignina em detergente ácido
LDiox	Lignina dioxana
LK	Lignina Klason
LPer	Lignina permanganato de potássio
LSBA	Lignina solúvel em brometo de acetila
PB	Proteína bruta
PCB	Parede celular bruta
Pa	Parte aérea
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
UPF	Universidade de Passo Fundo

RESUMO

Para quantificar o teor de lignina em alguns cultivares de aveia, foi utilizado o método espectrofotométrico “lignina solúvel em brometo de acetila – LSBA”, onde a lignina é solubilizada em uma solução a 25% de brometo de acetila em ácido acético glacial e em seguida sua absorbância lida a 280 nm; como padrão de referência foi utilizada a lignina extraída da aveia através de uma solução ácida de dioxana. A quantificação da lignina foi realizada em oito cultivares de aveia, nas frações planta inteira, caule e folha, em três estádios de maturidade (45, 55 e 65 dias de idade). Os resultados obtidos foram comparados com três métodos gravimétricos: lignina detergente ácido (LDA), lignina permanganato de potássio (LPer) e lignina Klason (LK). Os quatro métodos estudados mostraram teores de lignina diferentes entre si. Os resultados de LSBA foram superiores para quase todos os cultivares, ocorrendo o inverso para a LDA. Houve uma pequena diferença em relação aos dias de corte, com dados superiores para LSBA, onde o caule apresentou maior variação em relação às demais frações.

As curvas de regressão e os espectrogramas indicaram presença de diferenças qualitativas entre as ligninas provenientes da aveia forrageira nos diferentes estádios de maturidade.

Palavras-chave: aveia, brometo de acetila, lignina, método espectrofotométrico, parede celular.

ABSTRACT

To quantify lignin content in some varieties of oat, it was employed the spectrophotometric method acetyl bromide soluble lignin – ABSL where lignin is dissolved into a 25% acetyl bromide solution in glacial acetic acid and its absorbance read at 280 nm; as a standard it was employed a, lignin extracted by mild acidic dioxane solution from the same sample. Lignin quantification was evaluated in eight oat cultivars, divided in three vegetable parts (whole plant, stem and leaf), and three different maturity stages (cuts at 45, 55 and 65 days). Obtained results were compared with three gravimetric methods: acid detergent lignin (ADL), potassium permanganate lignin (PerL) and Klason lignin (KL). All four methodologies yielded different results. Overall, ABSL yielded highest values whereas ADL yielded the lowest ones. There was a slight difference related to maturity, with higher values for ABSL, where stem fraction showed higher variation when comparing to the two other vegetable parts.

Regression equations and espectrograms indicated the presence of qualitative differences between lignins from at distinct maturity stages.

Key-words: acetyl bromide, cell wall, lignin, oats, spectrophotometric method.

1. INTRODUÇÃO

A lignina é um componente não-carboidrato da parede celular dos vegetais, normalmente considerada indigestível pelos animais mamíferos (CRAMPTON e MAYNARD, 1938) e também inibidora da digestibilidade da parede celular das plantas forrageiras, acentuando a sua ação à medida que o vegetal amadurece. A lignina, por mecanismos ainda discutíveis (DEHORITY e JOHNSON, 1961; HARTLEY e JONES, 1977; MORRISON, 1983), inibe consideravelmente a digestibilidade dos constituintes da parede celular de plantas forrageiras, e tem sido por essa razão, útil na estimativa da digestão da fibra (AKIN et al., 1977; JUNG e VOGEL, 1986).

A estimativa da concentração de lignina na parede celular de plantas forrageiras torna-se, portanto, essencial no estabelecimento do valor nutritivo destas.

No entanto, a determinação química da lignina tem sérios percalços e, muitas vezes, os resultados são mascarados por artefatos de técnica (VAN SOEST, 1964).

Três métodos analíticos para mensuração do teor de lignina em plantas forrageiras são os mais empregados na atualidade: a lignina em detergente ácido (LDA), a lignina permanganato de potássio (LPer) e a lignina Klason (LK). Nas duas primeiras técnicas, a amostra é previamente tratada com solução de detergente ácido, resultando na fibra em detergente ácido (FDA). Para a determinação da LDA, a FDA é submetida à digestão com solução concentrada de ácido sulfúrico a 72% (VAN SOEST, 1963a), no entanto, este método apresenta alguns inconvenientes, como mensurar cutina como sendo lignina (GOERING e VAN SOEST, 1970; FUKUSHIMA et al., 1991); amostras de LDA podem estar contaminadas com artefatos de “Maillard” (JOHNSON et al., 1962) e parte da lignina é potencialmente

solúvel na solução de ácido sulfúrico a 72% (IIYAMA e WALLIS, 1990; HATFIELD et al., 1994).

O método LPer também tem sido alvo de algumas críticas, pois não tratam uniformemente as partículas de tamanhos diversos (GOERING e VAN SOEST, 1970); a celulose pode ser parcialmente solubilizada se excessiva quantidade da solução de permanganato for empregada, particularmente em gramíneas imaturas (VAN SOEST e WINE, 1968); a hemicelulose e certos tecidos do mesófilo da fração fibra em detergente neutro de festuca foram removidos pelo tratamento oxidativo (BARTON II e AKIN, 1977). Entretanto, pelo fato do método LPer produzir geralmente resultados de maior magnitude quando comparada à técnica da LDA, VAN SOEST e WINE (1968) levantaram a hipótese de que os valores observados com o método LPer poderiam estar mais próximos da realidade.

A técnica de lignina Klason (LK), muito embora venha sendo amplamente empregada no mundo inteiro, também apresenta sérios obstáculos: a preparação final da lignina pode estar contaminada por proteínas (WHITEHEAD e QUICKE, 1964) e da mesma maneira que no método LDA, considerável fração da lignina é potencialmente solúvel na solução de ácido sulfúrico (MIGITA e KAWAMURA, 1944). Apesar dos métodos LDA e Klason (LK) 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). Estes métodos, embora relativamente fáceis, nem sempre fornecem dados seguros sobre o real teor de lignina

Um método alternativo para quantificar lignina foi proposto por MORRISON (1972a), que é baseado na solubilização da lignina numa solução a 25% de brometo de acetila em ácido acético glacial, o método da lignina solúvel em brometo de acetila (LSBA). A concentração de lignina é determinada por leitura da densidade óptica a 280nm. Entretanto, existe um entrave que é a ausência de um padrão de referência, pois todo método espectrofotométrico pressupõe a existência de um padrão (FENGEL e WEGENER, 1989). E o método em pauta vinha precisando de um padrão de referência confiável para desenvolver as curvas de calibração, com as quais as leituras de absorbância pudessem ser comparadas.

Recentemente, FUKUSHIMA e HATFIELD (2001) desenvolveram um novo padrão, obtido através da extração da lignina do material vegetal com solução ácida de dioxana (LDiox), e as curvas-padrão desenvolvidas para cada tipo de lignina isolada.

A LDiox tem como principal vantagem, de obter, em curto espaço de tempo, a fração lignina com alto rendimento e alto grau de pureza, adequando-se portanto, para a finalidade de padrão de referência.

Os objetivos do presente trabalho foi o de determinar as concentrações de lignina pelo método espectrofotométrico lignina solúvel em brometo de acetila, nos oito cultivares de aveia, em três estádios de maturidade e partes vegetais (planta inteira, caule e folha), sendo esses dados comparados com os métodos tradicionais de mensuração da lignina, a lignina detergente ácida, lignina permanganato de potássio e lignina Klason.

2. REVISÃO DA LITERATURA

A lignina é um complexo polímero fenólico, resistente à hidrólise e seu principal papel parece ser o de uma substância cimentante dos polissacarídeos da parede celular, tanto quimicamente como fisicamente, dando maior resistência mecânica aos vegetais bem como proteção contra agentes patógenos externos (HIGUCHI, 1980).

Estudiosos classificam as ligninas em três grupos, sendo: ligninas de gimnospermas, formadas pela desidrogenação enzimática do álcool coniferil; ligninas de angiospermas, formadas pela combinação dos álcoois coniferil e sinapil; e ligninas de gramíneas, formadas pela desidrogenação dos álcoois coniferil, sinapil e p-coumaril (GLASSER, 1980).

A lignina é formada pela remoção da água para criar a estrutura aromática de açúcar. Estas reações são irreversíveis. Existem vários monômeros possíveis para formar a lignina, e os tipos e proporções dependem da fonte da natureza (Figura 1).

Figura 1. Monômeros de lignina (HELM – capturado via internet em 11/09/2001).

Os grupos hidroxilas (OH) podem reagir mutuamente ou com o aldeído ou grupos cetona. Quando um OH reage com outro, uma ligação tipo éter é formada; se um OH reage com um aldeído, forma-se um hemiacetal, e se as reações do grupo OH for com uma cetona, forma-se o cetal (Figura 2).

Figura 2. Estágios de condensação de vários monômeros que formam a lignina (BUNGAY, 1996).

Existem vários grupos (mostrados em vermelho) que podem promover reações posteriores. Alguns simplesmente estendem o polímero enquanto outros estabelecem ligações cruzadas. O monômero na cor laranja (Figura 2), tem três dos seus grupos funcionais ligados a outros monômeros.

A lignina resiste ao ataque da maior parte dos microrganismos, e o processo anaeróbico não tende a atacar todo o anel aromático. A quebra aeróbica da lignina é lenta e pode levar muitos dias. A lignina é um cimento natural juntamente com a hemicelulose para explorar a resistência da celulose, embora conferindo flexibilidade.

A lignina é biossintetizada nas plantas vasculares em um complexo encadeado de reações, começando pelo CO_2 e H_2O , e originando os ácidos shikímico, prosseguindo via aminoácido aromático L-fenilalanina (SARKANEN e 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 e TOWERS, 1973). As gramíneas são as únicas espécies vegetais que conseguem converter a L-tirosina, outro aminoácido aromático, para o ácido trans-p-coumárico, numa reação catalizada pela enzima tirosina amônia liase (HIGUCHI et al., 1967a); portanto, as gramíneas podem utilizar qualquer dos dois aminoácidos para confeccionar lignina. BENNER et al. (1984) forneceram $[C^{14}]$ -fenilalanina para plantas aquáticas e verificaram que tanto a lignina como as proteínas estavam marcadas radioativamente.

O ácido cinâmico é, posteriormente, hidroxilado para o ácido p-coumárico (passagem opcional para gramíneas), que pelas ações sucessivas de enzimas específicas, produz os três mais comuns componentes deste polímero: álcoois p-coumaril, coniferil e sinapil (Figura 3). 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 (SARKANEN e LUDWIG, 1971).

Figura 3. Biossíntese da molécula de lignina, a partir de glicose até os monômeros fenólicos componentes da macromolécula (extraída VAN SOEST, 1994).

A Figura 4 ilustra uma possível estrutura de lignina de madeira (BRUNOW et al., 2001), diferentemente de outros polímeros naturais, esta macromolécula possui várias ramificações que se entrecruzam umas com as outras, conferindo-lhe particular resistência a diversos agentes químicos, físicos e biológicos.

Figura 4. Modelos de estruturas de lignina de plantas gimnospermas (BRUNOW et al., 2001).

A lignina é um dos componentes da parede celular mais associada à queda da digestibilidade dos nutrientes (VAN SOEST, 1963a; JUNG e VOGEL, 1986). A alta indigestibilidade da lignina, está associada à elevada concentração da mesma à medida que a planta amadurece; isto tem levado a presumir que a lignina é o

principal fator causador do baixo valor nutritivo das plantas forrageiras maduras (JUNG e FAHEY JR., 1983). Algumas das razões para explicar a natureza da lignina, são: a) sua estrutura compacta e insolubilidade na água; b) o arcabouço rígido devido às várias ligações covalentes entre átomos de carbono e as ligações do tipo éter; c) diferentemente de outros polímeros naturais, a lignina possui diversas formas de conexões inter-monoméricas (ZEIKUS, 1980).

GORDON (1975) citou que a lignina de leguminosas aparentemente possui estrutura mais condensada, sendo portanto, potencialmente menos reativa que a lignina de gramíneas. FUKUSHIMA et al (1991) sugeriram que a inibição da digestão da celulose de alfafa poderia ser resultante da ligação química entre lignina e os polissacarídeos estruturais ou da encrustação física.

Diversos mecanismos têm sido propostos visando explicar a ação inibitória da lignina na digestibilidade dos carboidratos estruturais da parede celular. PATTON e GIESEKER (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 particularmente substantiada 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.

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 o decréscimo na digestibilidade. Devemos também considerar que à medida que as plantas forrageiras amadurecem, o tipo e/ou qualidade da lignina sendo depositada na parede celular pode modificar-se gradualmente como foi sugerido por FUKUSHIMA (1996), ao examinar cromatogramas de lignina de gramíneas jovens e maduras.

MORRISON (1973) sugeriu que a interação da lignina com outros componentes da planta (por ex. lignina - hemicelulose), poderia estar de alguma maneira

relacionada com a inibição da digestão. As gramíneas contêm derivados do ácido cinâmico esterificados com a periferia da molécula da lignina, formando pontes entre esta e os carboidratos da parede celular (BESLE et al., 1994). Os ésteres de ácidos cinâmicos mais frequentemente isolados são os ácidos ferúlico e p-coumárico, que perfazem de 5 a 10% da lignina de gramíneas (HIGUCHI et al., 1967b). CHAVES et al. (1982) verificaram que os ácidos p-hidroxicinâmicos da parede celular de digitária (*Digitaria decumbens*), aumentavam paralelamente ao avanço da maturidade. JUNG e FAHEY JR. (1984) reportaram que o declínio na digestibilidade de carboidratos estruturais da festuca com a maturidade das plantas, correlacionou melhor com o incremento das concentrações dos ácidos p-coumárico e ferúlico do que com o teor de lignina. Confirmando esta sugestão, JUNG et al. (1983) extraíram maiores concentrações dos ácidos fenólicos p-coumárico e ferúlico com o amadurecimento da festuca (*Festuca arundinacea*), entretanto, similar efeito não foi observado para a alfafa (*Medicago sativa*) no estágio maduro. Esta poderia ser uma razão a explicar porque a lignina teve menor impacto na digestibilidade da matéria seca de leguminosas do que de gramíneas, com o avançar da maturidade (BUXTON et al., 1987). Estas observações poderiam sugerir que a associação entre os polissacarídeos da parede celular e a lignina têm importante papel na inibição da digestão microbiana (MORRISON, 1973; HARKIN, 1973).

Agentes oxidantes, como o peróxido de hidrogênio em meio alcalino, têm mostrado resultados positivos na melhoria da digestibilidade de diversos resíduos agro-industriais, agindo possivelmente na desestabilização da molécula da lignina (KERLEY et al., 1988; AMJED et al., 1992; WADHWA et al., 1993).

MANZANO et al. (2000) detectaram considerável aumento na digestibilidade da matéria seca e da matéria orgânica do bagaço de cana tratado com solução alcalina de sulfeto de sódio, tanto em comparações com bagaço “in natura” quanto com o bagaço tratado a pressão e vapor.

FORD (1978) relatou que em comparação com a arabinose, a extensão da digestão da xilose foi mais pronunciada após a deslignificação, o qual poderia sugerir que a lignina teve maior efeito protetor sobre as unidades xilose do que por sobre as unidades arabinose. A parede celular de gramínea tratada com hidróxido de sódio

mostrou índices mais elevados de digestibilidade do que a parede celular de leguminosa tratada da mesma maneira, o que poderia ser atribuída entre outras razões, à ruptura das ligações éster entre os ácidos fenólicos e os carboidratos, presentes nas gramíneas (HARTLEY e JONES, 1977). Reforçando ainda mais a teoria de que o efeito inibitório da lignina está associado às ligações covalentes entre esta e os carboidratos da parede celular, particularmente a hemicelulose, MORRISON (1983) verificou que a remoção da lignina por métodos químicos, melhorou a digestibilidade da hemicelulose em maior extensão do que a digestibilidade da celulose. Entretanto, em um estudo em que substâncias químicas não foram empregadas, JUNG e VOGEL (1986) não observaram evidências que pudessem dar apoio à hipótese de que a lignina tem maior efeito inibitório sobre a digestão da hemicelulose.

Embora o conhecimento da exata concentração de lignina seja um valioso instrumento na estimativa do valor nutritivo das plantas forrageiras, as determinações químicas são trabalhosas e produzem muitas vezes resíduos que podem conter mais artefato de técnica do que lignina verdadeira (VAN SOEST, 1964).

Descrições sobre as diversas análises químicas da lignina apareceram em uma revisão elaborada por GIGER (1985), que as classificou em duas principais categorias: a) métodos gravimétricos e b) métodos não gravimétricos. O primeiro grupo inclui o método da lignina insolúvel em solução a 72% de ácido sulfúrico - também conhecida por lignina ácida ou lignina “Klason” (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 e 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 técnica da lignina solúvel em brometo de acetila (JOHNSON et al., 1961; MORRISON, 1972b); e por espectroscopia dos raios infravermelhos (NORRIS et al., 1976; REEVES III, 1988).

O método da lignina insolúvel em ácido sulfúrico a 72% é baseado no princípio de que a lignina é insolúvel na solução aquosa de ácido sulfúrico, enquanto que

outros componentes celulares são removidos pelos pré-tratamentos ou então digeridos pela solução ácida. Uma das primeiras descrições foi aquela apresentada por ELLIS et al. (1946).

VAN SOEST (1963b) empregou a solução de detergente ácido (FDA) para obter preparações de parede celular antes do tratamento com ácido sulfúrico, ao qual o autor denominou de lignina em detergente ácido (LDA). Muito embora esta metodologia venha sendo amplamente empregada no mundo inteiro, ela apresenta sérios obstáculos. Por exemplo, a preparação final da lignina pode estar contaminada por proteínas (WHITEHEAD e QUICKE, 1964). O tratamento das amostras com enzimas proteolíticas ajudaria a remover este material proteináceo, entretanto, o processo não é completamente eficiente (ARMITAGE et al., 1948; THACKER, 1954; SULLIVAN, 1959). No entanto, como certas enzimas requerem pH alcalino para poderem operar eficazmente, existe a probabilidade de que certa parcela da lignina verdadeira possa ser perdida no decorrer da análise (VAN SOEST, 1964). Pelo emprego de uma solução de detergente em pH ácido, VAN SOEST (1963a) foi capaz de reduzir o teor protéico; porém, também neste caso, o nitrogênio não foi completamente removido (MOIR, 1972). Uma maneira para contornar esta interferência, seria a mensuração do conteúdo protéico e realização das devidas correções (THOMAS e ARMSTRONG, 1949).

Também este método mede cutina como sendo lignina, uma vez que a cutina é resistente à hidrólise pelo ácido sulfúrico a 72% (GOERING e VAN SOEST, 1970). FUKUSHIMA e DEHORITY (1995) observaram que na comparação entre lignina em detergente ácido e lignina solúvel em brometo de acetila, houve melhor concordância entre os valores, quando se corrigiu o fator cutina nas determinações de lignina em detergente ácido.

Talvez o mais sério percalço do procedimento da lignina ácida, seja o de que considerável fração da lignina é solúvel na solução de ácido sulfúrico (MIGITA e KAWAMURA, 1944). Estes autores reportaram que de 5 a 60% da lignina presente em várias amostras de madeira, foi solúvel na solução ácida. Trabalhando com lignina radioativamente marcada, CRAWFORD et al. (1980) observaram altos teores de fenóis marcados sendo eliminados no efluente líquido após o tratamento ácido.

Aparentemente, monômeros fenólicos incorporados na periferia da molécula, são mais susceptíveis à hidrólise ácida do que o núcleo da lignina (SARKANEN e LUDWIG, 1971). BENNER et al. (1984) verificaram que a presença de radioatividade no filtrado, poderia ter várias origens, e dentre estas, os diversos derivados da lignina.

Teores de lignina ácida foram no geral mais baixos que os valores obtidos pela técnica do permanganato de potássio, o que levou VAN SOEST e WINE (1968) a especularem que talvez resultados provenientes pelo emprego deste último método, estejam mais próximos de sua real concentração. Numa outra comparação, entre o método “Klason” e LDA, HATFIELD et al. (1994) concluíram que valores de lignina “Klason” poderiam estar produzindo dados mais confiáveis da lignina total de plantas forrageiras, devido a possível parcial solubilização da lignina no tratamento LDA.

Outra técnica gravimétrica de quantificação da lignina, é a oxidação da molécula por uma solução concentrada de permanganato de potássio (VAN SOEST e WINE, 1968). Porém, esta técnica analítica também apresenta desvantagens, pois partículas grandes não são uniformemente atingidas pelos reagentes, resultando em valores baixos para o composto em questão (GOERING e VAN SOEST, 1970). Esta técnica é amplamente utilizada pelas indústrias de papel e celulose, onde a lignina presente em pastas não-branqueadas é prontamente oxidada pelo permanganato de potássio, sendo que o consumo deste reagente durante o processo fornece uma idéia do teor de lignina ainda presente na pasta.

A lignina pode-se solubilizar em água quase que completamente após tratamento com clorito de sódio em solução diluída de ácido acético (BARTON, 1950). Este reagente pode oxidar o anel aromático até a sua completa ruptura (SARKANEN et al., 1962), podendo produzir fragmentos incolores e hidrossolúveis (DENCE et al., 1962). Baseando-se nestas reações químicas, COLLINGS et al. (1978) propuseram outro método gravimétrico de avaliação quantitativa da lignina, que quando comparado com a técnica do permanganato, produziu valores geralmente mais elevados. Entretanto, o clorito de sódio possui aproximadamente as mesmas limitações que o permanganato, pois deslignifica apenas parcialmente os tecidos

vegetais (AHLGREN et al., 1971). FORD (1978) utilizando tal método obteve redução na concentração de lignina de 52 a 87% em amostras de folhas e caules de pangola. MORRISON (1975) observou que após duas horas de deslignificação, todas as amostras tratadas ainda continham de um a dois pontos percentuais da lignina total. Embora AHLGREN et al. (1971), detectasse perda mínima de carboidratos ao empregar este procedimento, MORRISON (1975) reportou que o reagente NaClO_2 removeu a hemicelulose da parede celular a taxas crescentes à medida que o processo de deslignificação ocorria.

Dentre os métodos baseados nas propriedades ópticas dos materiais analisados, podem ser citados a espectroscopia por raios infra-vermelhos e a absorção da luz ultra-violeta. NORRIS et al. (1976) reportaram que a tecnologia da espectroscopia por raios infra-vermelhos poderia, além de realizar análises de matéria seca, proteína bruta, fibra em detergente neutro e estimar a digestibilidade da matéria seca, também efetuar análises de lignina. As grandes vantagens seriam a rapidez nas determinações e nenhuma outra manipulação das amostras, além da moagem (SHENK et al., 1979). O método requer, no entanto, 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). A correta escolha do comprimento de onda para cada tipo de material e/ou nutriente analisado, seria de fundamental importância (NORRIS et al., 1976). Outros fatores que afetam a reprodutibilidade dos resultados, incluiriam a espécie da planta, o método de preservação e a interação entre os constituintes vegetais (SHENK et al., 1979).

MORRISON (1972a), propôs um método para quantificar lignina em plantas forrageiras, baseando-se no trabalho de JOHNSON et al. (1961), que tinha sido originalmente desenvolvido para estimar lignina em amostras de madeira. Pelo isolamento de uma preparação de parede celular bruta, os compostos fenólicos solúveis que interferem com as leituras ultra-violeta, são removidos, e permanece apenas a lignina, como único composto aromático. A preparação de parede celular é então solubilizada em uma solução a 25% de brometo de acetila em ácido acético glacial, originando a lignina solúvel em brometo de acetila (LSBA), que é lida no comprimento de onda a 280 nm. Entretanto, todo método espectrofotométrico requer

o emprego de um padrão de referência, para com o qual as leituras de densidade óptica possam ser comparadas (FENGEL e WEGENER, 1989). Tanto JOHNSON et al. (1961) como MORRISON (1972b) compararam as leituras de absorbância, através de equações de regressão, com teores de lignina ácida determinados para as mesmas amostras.

Alternativamente, valores de absorbância expressos em função da concentração de matéria orgânica na solução final, poderiam ser empregados (FAHEY JR. et al., 1979; MUNTIFERING, 1982). CHESSON (1981) empregou Indulina como padrão para estimar o conteúdo total de compostos fenólicos em palhadas de cereais. JOHNSON et al. (1961) já tinham sugerido que outras preparações de lignina poderiam ser empregadas como padrões, tais como a lignina nativa de Brauns (BRAUNS, 1939), lignina enzimaticamente obtida (PEW, 1957). BRILLOVET e RIOCHET (1983) empregaram lignina “Kraft” de faia nas determinações do conteúdo de LSBA em tremço. SHARMA et al. (1986) e AL-ANI e SMITH (1988) calcularam os valores de LSBA tendo como base a absorbância ultra-violeta do guaiacol e do ácido ferúlico, respectivamente. A lignina nativa de Brauns, extraída da alfafa, foi empregada por FUKUSHIMA et al. (1991) na obtenção dos teores de lignina desta leguminosa. IYAMA e WALLIS (1990) além de escolherem como padrões preparações moídas de lignina provenientes de palhadas de trigo e de arroz, recomendaram também, o emprego de um fator numérico nos cálculos de determinação ultra-violeta da lignina, o coeficiente específico de absorção, estabelecido neste caso em $20,0 \text{ g}^{-1} \cdot \text{litro} \cdot \text{cm}^{-1}$. LOWRY et al. (1994) tentaram empregar a LDA como padrão de referência, com resultados insatisfatórios, pelo simples fato desta lignina ser insolúvel na solução de brometo de acetila. FUKUSHIMA e DEHORITY (2000) propuseram como padrão a lignina extraída da planta pelo próprio reagente brometo de acetila.

E como já mencionado anteriormente, FUKUSHIMA e HATIFIELD (2001) recomendaram o emprego de uma outra forma de lignina que é extraída da planta por uma solução ácida de dioxana. É portanto de consenso geral que nenhuma destas maneiras de relacionar leitura de densidade óptica com concentração de lignina na planta forrageira tem-se mostrado plenamente satisfatório.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Departamento de Zootecnia, da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA), da Universidade de São Paulo. O trabalho de pesquisa foi conduzido no período de maio de 1999 a dezembro de 2000.

No mês de maio realizou-se o preparo do solo com auxílio de uma grade-aradora e, posteriormente, foi efetuada a calagem a lanço em área total com a utilização de calcário dolomítico calcinado (PRNT=130%), sendo a incorporação realizada com uma gradagem. A quantidade aplicada de 0,62 t/ha teve por finalidade elevar o índice de saturação de bases para 70%. A adubação de plantio, realizada junto a semeadura, foi efetuada de acordo com as recomendações da Comissão Brasileira de Pesquisa de Aveia. A fórmula do adubo utilizada foi 04-30-16, sendo a aplicação mecanizada e regulada para 9,0 gramas por metro linear.

A semeadura foi realizada manualmente, utilizando sementes certificadas, com Valor Cultural (VC%) conhecido para determinação da densidade de semeadura (kg/ha), para garantir formação rápida e homogênea. A densidade utilizada foi de 300 sementes puras viáveis por metro quadrado.

Na adubação de cobertura, realizada 42 dias após a germinação (02/07/98), utilizou-se o adubo na fórmula 20-00-20 na quantidade de 100 g por parcela, aplicado manualmente a lanço, fornecendo-se 40 kg de N e de K₂O/ha. Cada parcela experimental, implantada com uma cultivar, apresentava 5 linhas de 5 metros de comprimento espaçadas em 0,20 metros e 0,40 metros entre parcelas. Toda área foi irrigada por aspersão e a quantidade de água variando conforme a fase de crescimento da cultura.

Oito cultivares de aveia (*Avena byzantina* L.) foram colhidos no Campo Agrostológico (FZEA-USP) e utilizados neste estudo: Centro de Treinamento Cotrijuí (CTC1, CTC2, CTC3), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS7, UFRGS10, UFRGS18), Universidade de Passo Fundo (UPF14 e UPF15).

As análises foram conduzidas nos laboratórios de Lignina e de Bromatologia (FZEA – USP).

As amostras foram colhidas em cinco estádios de maturidade, sendo o primeiro efetuado 25 dias após o corte de uniformização (31/07/98) e, com 10 dias de intervalo entre cortes. Após o 1º. corte foi realizada a adubação de cobertura, com 40 kg de N e de K₂O/ha, para a realização do 2º. corte da cultura. Logo em seguida, irrigou-se toda área para melhor aproveitamento do adubo. As plantas foram cortadas com o auxílio de uma tesoura a 10 cm do solo, e secas em estufa de ventilação forçada a 65°C durante 72 horas. O material foi dividido em três frações, a saber: 1/3 como foi colhido e, portanto, denominada “parte aérea (Pa)”, e os 2/3 restantes separados manualmente em “folha (F)” e “caule (C)”. Houve, porém, a necessidade de englobar todas as amostras do primeiro e segundo cortes, uma vez que por estarem muito jovens, não permitiram a seleção entre caule e folha. Em seguida, o material foi moído em moinho laboratorial modelo Willey munido com peneira de 1 mm e acondicionado em potes de plástico.

As fibras em detergente neutro e ácido foram determinadas de acordo com GOERING e VAN SOEST (1970); vale citar que a FDA é o passo natural de preparação de parede celular e remoção de interferentes para análises de LDA e LPer e a FDN foi feita apenas para comparação entre as paredes celulares.

Como um dos métodos analíticos para a determinação quantitativa da lignina foi espectrofotométrico, recomenda-se que o material vegetal seja uma preparação de parede celular, para eliminar a interferência de outras substâncias que absorvem no mesmo comprimento de onda da lignina, tais como aminoácidos aromáticos, flavonóides, pigmentos ou suberina (MORRISON, 1972a; SÜDEKUM et al., 1997). A metodologia utilizada para a confecção de parede celular bruta foi a descrita por IYAMA e WALLIS (1990), exceto que foi incluído uma passagem que consistiu na infusão de 25g de material em água quente (70°C durante 45 minutos e agitação

ocasional com bastão de vidro) e posterior filtração em saquinhos com tecido de pára-quedas (SAVIOLI et al., 2000), antes do tratamento com solventes que consistiu na extração em aparelho de Soxhlet com álcool etílico a 90% (cerca de 3 horas), e em seguida com clorofórmio (cerca de 2 horas) para cada amostra, até que o reagente utilizado se apresentasse incolor. Finalmente, os saquinhos com as amostras foram colocados em bandejas de alumínio e secos em estufa ventilada a 65°C durante 48 horas. Essa preparação de parede celular bruta também foi empregada para as análises pelo método LK.

As análises, em duplicata, foram feitas no Laboratório de Bromatologia (FZEA-USP). A lignina em detergente ácido foi determinada de acordo com GOERING e VAN SOEST (1970); a lignina em permanganato de potássio foi realizada segundo o método descrito por VAN SOEST e WINE (1968); a lignina Klason conforme descrito por HATFIELD et al. (1994).

Os procedimentos de determinação da lignina pelo método espectrofotométrico foram efetuados segundo a metodologia proposta por FUKUSHIMA e DEHORITY (2000), a lignina solúvel em brometo de acetila (LSBA), sendo que o padrão de referência empregado foi a lignina extraída pela solução ácida de dioxana (MONTIES, 1988). Tendo em mente que as frações folha e parte aérea possuem teores de carboidratos e proteína mais elevados, além de menor concentração de lignina, extraiu-se a lignina somente da fração caule pela solução ácida de dioxana. A equação referente à fração caule de um dado cultivar e estágio de maturidade, foi utilizada para determinação dos valores de lignina dioxana das frações folha e parte aérea do mesmo corte e cultivar, substituindo apenas os valores de leitura de absorbância referentes a cada fração.

No procedimento para a extração da lignina através do emprego da dioxana ácida, utilizou-se apenas a fração caule dos três últimos cortes. O primeiro corte, devido às plantas serem jovens, quase não apresentava a fração caule e o segundo corte não dispunha de quantidade suficiente de parede celular para a realização da análise. A técnica será sucintamente descrita a seguir: adicionar 90 mL de dioxana e 10 mL da solução 2 N de HCl, num balão de fundo redondo (250 mL) contendo 50 g

($\pm 0,1$ mg) de parede celular, conectar a um condensador e refluxar por 1 hora em atmosfera de nitrogênio. Após resfriamento, filtrar a vácuo e lavar o resíduo com 10 mL de dioxana. Neutralizar o pH da solução com 4,0 g de bicarbonato de sódio. Filtrar com membrana de nailon, porosidade 0,22 μ . Evaporar a quase totalidade da dioxana em roto-evaporador. Com auxílio de uma pipeta Pasteur, gotear a solução de dioxana em 200 mL de água, sob forte agitação, em um frasco de centrífuga de polietileno (250 mL). Centrifugar a 5.000 rpm por 30 min. Desprezar o sobrenadante. Secar por 20 minutos em estufa ventilada a 65°C. Dissolver o resíduo com 20 mL de dioxana. Da mesma maneira que o passo anterior, precipitar a lignina em 200 mL de éter etílico anidro. Centrifugar e descartar o sobrenadante. Repetir esse último passo mais duas vezes. Imediatamente após o descarte do sobrenadante, adicionar cerca de 60 mL de éter de petróleo e com o auxílio de uma espátula, fazer com que as partículas de lignina entrem em contato com o éter para ressuspender. Descartar o sobrenadante e evaporar o éter residual deixando em repouso, numa capela por ± 12 horas. Secar por 48 horas em estufa ventilada a 55°C. Transferir a lignina dioxana (LDiox) para um frasco âmbar, guardar em freezer.

Para a análise de matéria seca (105°C), seguiram-se as normas da AOAC (1990) e para o cálculo da correção dos contaminantes de proteína e carboidratos presentes nas amostras de LDiox empregou-se os métodos de Kjeldahl (AOAC, 1990) e a técnica da antrona, descrita por VILES JR. e SILVERMAN (1949), respectivamente.

Para as curvas padrão, foram feitas uma para cada lignina extraída, bem como a determinação final da lignina na amostra vegetal, foi adotado o método espectrofotométrico segundo FUKUSHIMA (1996). As curvas padrão foram confeccionadas sempre tomando por base a mesma concentração inicial de lignina (após as correções para teores de carboidrato e proteína) e alíquotas crescentes de lignina, obtendo-se as curvas de regressão linear.

As leituras de densidade óptica no comprimento de onda a 280 nm foram realizadas em um espectrofotômetro da marca Milton Roy, modelo Genesis II, pertencentes ao laboratório de lignina. A leitura a 280 nm foi inserida na equação de regressão obtida pelo traçado da curva padrão, obtendo a concentração final da lignina.

Comparou-se os dados de lignina provenientes dos quatro métodos analíticos em um esquema fatorial 8x4 (2 repetições), com o desdobramento das interações significativas de método dentro de cada cultivar.

As diferenças entre as médias dos dados foram detectadas utilizando-se o teste de Tukey, ao nível de significância de 5%, testadas pelo procedimento GLM, opção *slice*. As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do pacote estatístico SAS (STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM, 1985).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os rendimentos da parede celular bruta (PCB) foram, 54,39% para a parte aérea (Pa), aos 45 dias de idade e de 72,50% aos 65 dias de idade; na fração folha, foram de 60,39% e 77,80% aos 45 e 65 dias de idade; para a fração caule foram de 64,76% e de 70,70% para os mesmos estádios de maturidade. Valores semelhantes foram encontrados por SAVIOLI et al. (2000), cujos teores de PCB variaram de 71,2% a 76,1% para a parte aérea; de 68,3% a 73,1% para a fração folha e para a fração caule variou de 75,3% a 79,5%, nos estádios de maturidade jovem e maduro, respectivamente, em diversas plantas forrageiras.

No estágio de maturidade de 45 dias, o cultivar CTC3 apresentou teores de PCB inferiores aos demais, na parte aérea (Pa) e na fração caule (C) o mesmo cultivar apresentou teores superiores em relação aos demais como pode ser visto na Tabela 1. No estágio 45 dias de idade, para todos os cultivares, a fração caule mostrou maiores teores de PCB que a folha, e como era de esperar, o rendimento da parte aérea foi intermediário aos rendimentos de caule e folha. No estágio 65 dias de idade a fração caule foi menor em relação aos 45 dias de idade e a explicação poderia estar em erros de técnicas e no próprio manuseio das amostras. Para a parte aérea e fração folha, os resultados foram bem coerentes em relação aos 45 dias de idade, sendo a parede celular maior aos 65 dias de idade. Aparentemente houve efeito de maturidade e à medida que a forrageira amadurece, o teor de parede celular aumenta, em função do aumento da espessura da mesma (BUXTON et al., 1996).

Os rendimentos de fibra em detergente neutro (FDN) (Tabela 2) foram de 58,44% para a parte aérea, aos 45 dias de idade e aos 65 dias de idade foram de 66,88%; na fração folha foram de 54,48% e 65,44% aos 45 e 65 dias de idade; para a fração caule foram de 62,25 e 68,26% aos 45 e 65 dias de idade.

Tabela 1. Teores de parede celular bruta (PCB) de três frações para oito cultivares de aveia, em diferentes idades de corte, expressos em matéria seca (%) ¹.

CULTIVAR	IDADE DE CORTE / FRAÇÃO VEGETAL								
	45 dias			55 dias			65 dias		
	Caule - S	Folha - S	Parte aérea-S	Caule - S	Folha - S	Parte aérea-S	Caule - S	Folha - S	Parte aérea-S
CTC 1	67,94 ± 0,67	60,39 ± 0,60	62,66 ± 0,81	64,37 ± 0,37	68,73 ± 0,39	68,83 ± 0,46	67,98 ± 0,62	73,26 ± 0,37	70,03 ± 0,74
CTC 2	66,18 ± 1,20	60,64 ± 0,14	60,90 ± 0,35	68,72 ± 0,78	70,35 ± 1,48	66,92 ± 0,12	64,79 ± 0,57	71,76 ± 0,41	62,05 ± 0,07
CTC 3	69,24 ± 0,85	62,58 ± 0,60	54,39 ± 0,49	68,41 ± 0,54	67,67 ± 0,47	68,55 ± 0,64	60,50 ± 0,68	70,06 ± 0,08	63,23 ± 0,32
UFRGS 7	65,27 ± 0,78	65,28 ± 0,80	63,94 ± 0,27	58,82 ± 0,12	70,10 ± 0,14	66,92 ± 0,38	70,20 ± 0,28	77,80 ± 0,56	77,80 ± 0,57
UFRGS 10	67,83 ± 0,17	62,98 ± 0,22	64,35 ± 0,72	67,95 ± 0,37	72,34 ± 0,48	67,51 ± 0,72	62,80 ± 0,56	72,26 ± 0,65	67,59 ± 0,58
UFRGS 18	68,04 ± 0,69	62,59 ± 0,42	61,48 ± 1,08	69,18 ± 0,25	75,10 ± 0,28	67,41 ± 0,78	70,70 ± 0,42	77,64 ± 0,20	70,43 ± 0,53
UPF 14	64,76 ± 0,41	61,16 ± 0,80	58,64 ± 0,18	67,64 ± 0,91	69,18 ± 0,25	68,93 ± 0,11	70,40 ± 0,28	71,26 ± 0,42	69,77 ± 0,40
UPF 15	68,84 ± 0,74	63,87 ± 0,56	63,35 ± 0,64	70,44 ± 0,58	72,24 ± 0,34	65,47 ± 0,66	67,90 ± 0,14	77,16 ± 0,23	72,50 ± 0,35
MÉDIA	67,26	62,44	61,21	66,94	70,71	67,57	66,91	73,90	69,18
S*	1,66	1,67	3,32	3,72	2,4	1,18	3,82	3,14	5,02

¹ CTC – Centro de Treinamento Contrijuí; UFRGS – Universidade Federal do Rio Grande do Sul; UPF – Universidade de Passo Fundo; S – desvio padrão; S* - desvio padrão das médias.

Tabela 2. Teores de fibra em detergente neutro (FDN) de três frações para oito cultivares de aveia, em diferentes idades de corte, expressos em matéria seca (%)¹.

CULTIVAR	IDADE DE CORTE / FRAÇÃO VEGETAL								
	45 dias			55 dias			65 dias		
	Caule - S	Folha - S	Parte aérea-S	Caule - S	Folha - S	Parte aérea-S	Caule - S	Folha - S	Parte aérea-S
CTC 1	69,58 ± 0,46	56,19 ± 0,45	62,55 ± 0,63	70,61 ± 0,70	58,93 ± 0,45	64,81 ± 0,81	67,26 ± 0,79	65,48 ± 0,21	65,71 ± 0,78
CTC 2	71,53 ± 0,40	54,48 ± 0,57	60,80 ± 0,65	65,57 ± 0,55	61,11 ± 0,39	63,08 ± 0,46	63,92 ± 0,59	66,48 ± 0,29	62,83 ± 0,64
CTC 3	74,37 ± 0,46	56,09 ± 0,59	61,96 ± 0,41	63,98 ± 0,97	57,95 ± 0,41	63,02 ± 0,57	62,10 ± 0,12	65,44 ± 0,32	61,71 ± 0,73
UFRGS 7	62,25 ± 1,13	61,80 ± 0,23	64,49 ± 0,59	57,90 ± 0,45	65,82 ± 0,27	64,23 ± 0,82	65,00 ± 1,11	71,50 ± 0,38	66,65 ± 0,92
UFRGS 10	72,54 ± 0,75	57,40 ± 0,21	62,98 ± 0,77	61,28 ± 0,28	67,20 ± 0,32	63,76 ± 0,59	58,80 ± 0,83	67,11 ± 0,91	61,77 ± 0,64
UFRGS 18	66,54 ± 1,08	57,95 ± 0,68	58,44 ± 0,52	57,35 ± 0,16	66,61 ± 0,78	60,18 ± 0,84	60,97 ± 0,74	68,89 ± 0,57	61,75 ± 0,59
UPF 14	69,19 ± 0,64	58,19 ± 0,16	59,81 ± 0,95	67,35 ± 1,46	63,37 ± 0,35	65,48 ± 0,33	66,83 ± 0,75	67,01 ± 0,24	66,88 ± 0,79
UPF 15	67,07 ± 0,96	58,77 ± 0,13	64,22 ± 0,94	62,85 ± 1,36	66,51 ± 0,82	62,06 ± 0,43	59,80 ± 0,29	70,49 ± 0,42	63,83 ± 0,05
MÉDIA	69,13	57,61	61,91	63,36	63,44	63,33	63,09	67,80	63,89
S*	3,84	2,19	2,11	4,54	3,69	1,67	3,17	2,26	2,23

¹ CTC – Centro de Treinamento Contrijú; UFRGS – Universidade Federal do Rio Grande do Sul; UPF – Universidade de Passo Fundo; S – desvio padrão; S* - desvio padrão das médias.

Tabela 3. Teores de fibra em detergente ácido (FDA) de três frações para oito cultivares de aveia, em diferentes idades de corte, expressos em matéria seca (%) ¹.

CULTIVAR	IDADE DE CORTE / FRAÇÃO VEGETAL								
	45 dias			55 dias			65 dias		
	Caule - S	Folha - S	Parte aérea-S	Caule - S	Folha - S	Parte aérea-S	Caule - S	Folha - S	Parte aérea-S
CTC 1	38,67 ± 0,18	33,34 ± 0,20	35,86 ± 0,35	40,52 ± 0,32	35,60 ± 0,11	38,50 ± 0,88	43,66 ± 1,45	40,21 ± 0,40	39,46 ± 0,48
CTC 2	40,70 ± 0,49	32,32 ± 0,49	35,09 ± 0,22	51,19 ± 0,69	50,41 ± 0,84	50,06 ± 0,48	39,67 ± 2,07	37,48 ± 0,19	35,45 ± 0,35
CTC 3	40,31 ± 0,44	32,34 ± 0,46	36,37 ± 0,68	37,38 ± 0,35	34,37 ± 0,40	35,93 ± 0,17	37,01 ± 0,41	39,68 ± 0,14	36,24 ± 0,26
UFRGS 7	35,58 ± 0,26	37,19 ± 0,24	38,09 ± 0,62	44,84 ± 0,18	55,62 ± 0,71	52,68 ± 0,96	39,60 ± 0,50	45,75 ± 0,11	42,49 ± 1,12
UFRGS 10	41,18 ± 0,43	34,64 ± 0,28	36,31 ± 0,27	51,03 ± 0,31	56,59 ± 0,30	51,77 ± 0,46	36,80 ± 0,48	42,44 ± 0,15	38,48 ± 0,17
UFRGS 18	42,43 ± 0,74	32,55 ± 0,59	32,24 ± 0,28	47,20 ± 0,13	56,04 ± 0,13	48,77 ± 0,11	36,22 ± 0,39	40,54 ± 0,57	36,47 ± 0,44
UPF 14	38,10 ± 0,58	34,00 ± 1,41	36,61 ± 0,54	57,04 ± 0,55	52,61 ± 0,57	53,58 ± 0,18	39,80 ± 0,32	37,11 ± 0,02	39,25 ± 0,46
UPF 15	42,32 ± 0,27	32,18 ± 0,93	36,11 ± 0,47	34,27 ± 0,43	36,51 ± 0,68	35,57 ± 0,35	34,36 ± 0,17	42,65 ± 0,27	37,44 ± 0,23
MÉDIA	39,91	33,57	35,84	45,43	47,22	45,86	38,39	40,73	38,16
S*	2,33	1,71	1,68	7,71	9,93	7,80	2,88	2,85	2,27

¹ CTC – Centro de Treinamento Contrijuí; UFRGS – Universidade Federal do Rio Grande do Sul; UPF – Universidade de Passo Fundo; S – desvio padrão; S* - desvio padrão das médias.

Valores semelhantes foram encontrados por FUKUSHIMA et al (1999), que foram de 57,0% a 70,5% para vários tipos de forrageiras. Os resultados no estágio de maturidade 45 dias apresentaram dados semelhantes em todos os cultivares da fração parte aérea e da fração folha, havendo uma pequena diferença na fração caule para o cultivar CTC3 que foi superior aos demais. No estágio de maturidade 65 dias os cultivares UFRGS7 e UPF14 apresentaram dados superiores aos demais.

Os rendimentos de fibra em detergente ácido (FDA) (Tabela 3) foram de 32,24% para a parte aérea aos 45 dias de idade e 42,49% para os 65 dias; para a fração folha foram de 32,18% e de 45,75% para os 45 e 65 dias de idade, sendo que para a fração caule foram de 35,58% aos 45 dias e aos 65 dias de idade de 43,66%. Estes dados estão de acordo com os encontrados por SAVIOLI et al (2000), que foram de 25,90% a 43,7% para diversos tipos de forrageiras. No estágio de maturidade 45 dias, o cultivar UFRGS18 apresentou resultados inferiores aos demais. Na fração folha, o cultivar UFRGS7 apresentou resultados superiores aos demais e na fração caule o cultivar UFRGS7 foi inferior em relação aos outros cultivares. Nos 65 dias de idade o cultivar UFRGS7 foi também superior aos demais cultivares na parte aérea e na fração folha, sendo que na fração caule o cultivar UPF15 foi inferior aos demais. No estágio de 45 dias de idade a fração caule foi maior para todos os cultivares, sendo que aos 65 dias a fração caule foi inferior em relação a folha e parte aérea, o mesmo acontecendo com PCB e FDN.

Os rendimentos de FDN foram próximos aos de PCB, cujos teores variaram de 54,48% a 71,50% para a preparação de FDN e de 54,39% a 77,80% para a preparação da PCB, sendo superiores aos rendimentos de FDA, que variaram de 32,18% a 45,75%.

Foi observado efeito de maturidade para a PCB e também foi o mesmo reportado para a FDN e FDA. À medida que a planta amadurece, os carboidratos solúveis do citosol são alocados na forma de carboidratos estruturais na parede celular (VAN SOEST, 1994). Para as três preparações fibrosas, o caule apresentou maiores valores que o tecido foliar. HATFIELD et al. (1994) registraram que amostras de folha continham menos FDN do que amostras de caule e que com o envelhecimento da planta, há um aumento na concentração de FDN.

Para alguns cultivares, na fração caule com 65 dias foram detectados valores menores comparados aos 45 dias de idade. As explicações poderiam residir em erro laboratorial ou erros de colheitas das amostras.

De um modo geral, os teores de FDN estiveram ligeiramente acima dos dados de PCB nos 45 dias de idade o mesmo não acontecendo aos 65 dias, sendo a PCB com teores acima da FDN. A principal diferença entre os dois métodos é que para a obtenção de FDN utiliza-se uma solução de detergente neutra que solubiliza proteínas, gorduras, carboidratos solúveis, pectina e outros constituintes solúveis em água e, para a PCB, são empregados solventes orgânicos. De qualquer maneira, qualquer processo de preparação de parede celular, não se deve permitir a solubilização de lignina.

A diferença observada entre as preparações PCB/FDN e FDA, deve-se provavelmente à solubilização da hemicelulose, constituinte que não está presente na fração FDA (GOERING e VAN SOEST, 1970). Os teores de hemicelulose podem ser obtidos pela diferença entre FDN e FDA, entretanto esses valores devem ser considerados presumidos, uma vez que a FDA pode ainda apresentar resíduos de pentosanas (MORRISON, 1983).

Os diferentes métodos de isolamento da parede celular refletem possivelmente as variações qualitativas e quantitativas da lignina. Com base no rendimento das extrações de lignina extraída pelo reagente brometo de acetila, em dados obtidos por SAVIOLI et al. (2000), as preparações de PCB e FDN aparentemente mostraram-se mais eficazes do que FDA. Mesmo tendo considerado a mesma quantidade inicial de amostra, o teor de lignina na FDA foi basicamente 100% menor que as preparações PCB e FDN, indicando solubilização da lignina neste procedimento. Isso ratifica a suspeita de solubilização parcial da lignina ocorrida na FDA e, subseqüentemente, também na LDA, como poderá ser notado neste trabalho.

Os rendimentos da lignina dioxana ácida na parede celular bruta, apenas da fração caule, nos estádios de maturidade de 45, 55 e 65 dias de idade se encontram na Tabela 4.

Os rendimentos apresentaram variação dos dados (estatística não realizada) de 4,82 a 10,09% em ambos os estádios de maturidade. Estes resultados foram

ligeiramente inferiores aos obtidos por SAVIOLI e FUKUSHIMA (2000), FUKUSHIMA e DEROHITY (2000) e FUKUSHIMA et al. (2000), onde encontraram resultados de no mínimo 5,1 e máximo de 16,3% para diversos tipos de plantas forrageiras no estágio de maturidade jovem e maduro nas ligninas isoladas com brometo de acetila. Esses resultados foram semelhantes aos encontrados por FUKUSHIMA e HATFIELD (2001), de 6,31% a 9,61% em gramíneas jovens e maduras.

A LDiox tem a principal vantagem de em curto espaço de tempo, obter a fração lignina com alto rendimento e em uma forma adequada para ajudar posteriores análises químicas e biológicas. Esta lignina geralmente contém uma porcentagem muito baixa de polissacarídeos associados (MONTIES, 1988). Portanto, o procedimento tem a desvantagem da reação de condensação que ocorre dentro da molécula de lignina durante a solubilização e aumenta para uma extensão significativa com o aumento da temperatura e acidez.

Tabela 4. Rendimentos das ligninas dioxana ácida extraídas de oito cultivares de aveia da fração caule, nos estádios de maturidade de 45, 55 e 65 dias de idade, expressos em matéria seca (%).

Cultivares	Idade (dias)		
	LDiox		
	45 - S	55 - S	65 - S
CTC1	4,82 ± 0,46	6,10 ± 0,12	10,09 ± 0,08
CTC2	6,74 ± 0,0,70	6,80 ± 0,69	7,08 ± 0,21
CTC3	6,40 ± 0,27	5,08 ± 0,16	6,26 ± 0,23
UFRGS7	6,96 ± 0,06	6,48 ± 0,05	6,82 ± 1,02
UFRGS10	7,53 ± 0,17	7,24 ± 0,88	8,45 ± 0,08
UFRGS18	6,61 ± 0,38	7,05 ± 0,20	8,61 ± 0,47
UPF14	5,33 ± 1,30	7,57 ± 0,55	7,79 ± 1,04
UPF15	7,46 ± 0,03	7,55 ± 0,27	7,65 ± 0,31
Média	6,48	6,73	7,84
S*	0,96	0,84	1,21

CTC – Centro de Treinamento de Cotrijui; UFRGS – Universidade Federal do Rio Grande do Sul; UPF – Universidade de Passo Fundo; S – desvio padrão; S* - desvio padrão das médias.

A utilização da dioxana ácida para isolar a lignina foi para reduzir o nível de contaminação, particularmente carboidratos. Optou-se pela concentração da fração caule dos cultivares porque nas forragens maduras há geralmente um decréscimo na razão folha/caule e um aumento no conteúdo da parede celular incluindo maiores níveis de lignina.

Os teores de proteína (N x 6,25) (Tabela 5), foram medidos na lignina isolada pela dioxana, apenas para a fração caule e variaram nas idades de corte dos 45 para os 65 dias de idade de 1,71 a 2,59%. Houve tendência de queda no teor de proteína nas LDiox à medida que a planta forrageira avançou no estágio de maturidade (estatística não realizada).

HATFIELD et al. (1994) já haviam feito semelhante observação ao constatarem que ligninas provenientes de caules de plantas forrageiras, apresentaram menores teores de PB à medida que a planta amadurece. FUKUSHIMA e DEHORITY (2000) e FUKUSHIMA et al. (2000) também observaram o mesmo fenômeno relativo à maturidade. Ligninas de leguminosas exibem maiores teores de PB em relação às ligninas de gramíneas (HATFIELD et al., 1994). Isto pode ser reflexo da observação de que gramíneas contêm menores teores de PB na parede celular, sendo uma parte com função de proteína estrutural (DARVILL et al., 1980). Este nitrogênio pode ser resultante da presença de proteínas na parede celular, particularmente aqueles que tem papel estrutural e estão covalentemente ligados à matriz da parede, não podendo ser facilmente extraídas. WHITMORE (1982) propôs que a proteína está ligada à lignina, embora não tenha sido estabelecido nenhuma prova química. As ligninas de madeiras são tipicamente isentas de nitrogênio (VAN SOEST, 1994; FUKUSHIMA e DEHORITY, 2000).

Tabela 5. Teores de proteína bruta (PB) e de carboidrato (CHO) nas LDiox de oito cultivares de aveia da fração caule, em diferentes estádios de maturidade, expressos em matéria seca (%).

Cultivares	Idade (dias)					
	45		55		65	
	PB - S	CHO - S	PB - S	CHO - S	PB - S	CHO - S
CTC1	1,71 ± 0.06	1,24 ± 0.11	1,68 ± 0.35	0,84 ± 0.35	2,00 ± 0.12	1,25 ± 0.22
CTC2	2,21 ± 0.30	1,22 ± 0.22	2,17 ± 0.40	1,31 ± 0.23	1,28 ± 0.12	1,39 ± 0.03
CTC3	2,00 ± 0.13	1,33 ± 0.13	1,84 ± 0.18	1,11 ± 0.06	1,61 ± 0.06	1,23 ± 0.07
UFRGS7	1,75 ± 0.16	1,10 ± 0.09	1,52 ± 0.47	1,15 ± 0.12	2,59 ± 0.37	1,26 ± 0.05
UFRGS10	2,01 ± 0.03	1,37 ± 0.06	2,17 ± 0.30	1,21 ± 0.04	1,74 ± 0.01	1,44 ± 0.25
UFRGS18	2,48 ± 0.07	1,65 ± 0.30	2,20 ± 0.51	0,93 ± 0.01	1,70 ± 0.02	1,11 ± 0.29
UPF14	2,15 ± 0.07	1,08 ± 0.10	2,12 ± 0.27	1,05 ± 0.21	1,84 ± 0.12	0,77 ± 0.07
UPF15	2,09 ± 0.27	1,06 ± 0.10	1,99 ± 0.23	1,41 ± 0.39	2,21 ± 0.37	0,85 ± 0.07
Média	2,13	1,26	2,00	1,13	1,93	1,16
S*	0,19	0,01	0,27	0,01	0,41	1,09

CTC – Centro de Treinamento de Cotrijuí; UFRGS – Universidade Federal do Rio Grande do Sul; UPF – Universidade de Passo Fundo; S – desvio padrão; S* - desvio padrão das médias.

Considerando-se os teores de CHO, verifica-se que houve variação de 0,77 a 1,65% entre as diferentes idades estudadas. Estes dados apresentaram semelhança com os encontrados por SAVIOLI e FUKUSHIMA (2000), onde as concentrações de CHO foi de 1,0 a 2,2% para a parte aérea; na fração caule, de 1,0 a 2,5% e na fração folha de 0,8 a 2,4%, no estágio jovem. No estágio maduro, foi de 0,8 a 2,2% para parte aérea, de 0,6 a 2,2% para a fração caule e de 1,1 a 2,4% para a fração folha (Tabela 5). IYAMA e WALLIS (1990) declararam que obtenção de uma lignina

relativamente pura em apreciáveis quantidades, não é tarefa fácil e, possivelmente, uma das razões residiria no fato da lignina ser covalentemente ligada à fração carboidrato da parede celular, particularmente a hemicelulose (MORRISON, 1973). O presente trabalho mostrou teores baixos de CHO nas diversas LDiox, ao contrário de FUKUSHIMA e DERORITY (2000) e FUKUSHIMA et al. (2000), que registraram valores mais elevados de CHO, que variaram de 7,27 a 29% nas espécies botânicas. Diferenças desta ordem nas LDiox, podem ser devido ao tipo de solvente utilizado ou às diferentes condições analíticas ou a características inerentes às próprias plantas forrageiras.

Reportados na literatura existem diversas formas de extrair lignina dos vegetais. Deve-se ressaltar que os produtos resultantes dessas extrações podem ser diferentes das ligninas presentes nas plantas das quais se originaram (CURVELO, 1992). FENGEL e WEGENER (1989) afirmaram que uma das dificuldades encontradas na determinação espectrofotométrica seria o fato da lignina isolada poder absorver luz ultravioleta diferentemente da lignina presente na planta, induzindo a interpretações errôneas das leituras de densidade óptica.

Observando a Tabela 6 e os gráficos abaixo (citados alguns gráficos apenas como exemplos), constata-se a presença de linhas contrastantes aos 45 dias de idade nos cultivares CTC1 (Figura 5), CTC2, CTC3 e UFRGS18 (Figuras 7). A explicação mais plausível residiria no fato da técnica da extração da lignina pela dioxana ácida ser nova e talvez requerer passos adicionais na sua purificação.

Tabela 6. Valores de leitura óptica para as três frações vegetais (parte aérea, folha e caule) de oito cultivares de aveia, em diferentes idades de corte.

Cultivares	Frações Vegetais	Idades de Corte		
		45 dias	55 dias	65 dias
CTC1	Parte aérea	0.681	0.550	0.815
	Folha	0.572	0.590	0.783
	Caule	0.681	0.885	0.917
CTC2	Parte aérea	0.654	0.780	0.791
	Folha	0.576	0.619	0.690
	Caule	0.722	0.824	0.778
CTC3	Parte aérea	0.644	0.751	0.820
	Folha	0.544	0.686	0.811
	Caule	0.761	0.823	0.931
UFRGS7	Parte aérea	0.827	0.730	0.819
	Folha	0.606	0.651	0.804
	Caule	0.860	0.787	0.798
UFRGS10	Parte aérea	0.775	0.795	0.878
	Folha	0.623	0.768	0.866
	Caule	0.879	0.830	0.998
UFRGS18	Parte aérea	0.744	0.754	0.869
	Folha	0.694	0.836	0.918
	Caule	0.847	0.757	0.836
UPF14	Parte aérea	0.664	0.758	0.858
	Folha	0.633	0.712	0.778
	Caule	0.776	0.834	0.831
UPF15	Parte aérea	0.736	0.701	0.880
	Folha	0.660	0.771	0.848
	Caule	0.808	0.911	0.862

CTC – Centro de Treinamento de Cotrijui; UFRGS – Universidade Federal do Rio Grande do Sul;
UPF – Universidade de Passo Fundo

Os cultivares UFRGS7, UFRGS10 e UFRGS18, apresentaram uma queda nas leituras de densidade óptica (DO) aos 55 dias de idade (0,787, 0,830 e 0,757 nm) e elevação dos valores aos 65 dias (0,798, 0,998 e 0,836 nm). Nos cultivares UPF14 e UPF15, foi observado o fenômeno inverso, ou seja, aos 45 dias (0,834 e 0,911 nm) caracterizou-se por leituras elevadas, superiores aos outros dois cortes, a saber: 45 dias (0,776 e 0,808 nm) e 65 dias (0,831 e 0,862 nm). Com relação aos cultivares CTC, apenas a CTC3 apresentou um aumento constante nas leituras de DO em função do estágio de maturidade (0,761, 0,823 e 0,931 nm); nos dois outros cultivares, houve tendência de menor elevação dos 55 dias em relação aos 65 dias para a CTC1 (0,827 para 0,917 nm) queda nas leituras de absorbância dos 65 dias em relação aos 55 dias (CTC2: 0,778 para 0,824 nm).

Os altos valores encontrados para os 45 dias dos cultivares UFRGS7 (0,86 nm), UFRGS10 (0,879 nm) e UFRGS18 (0,847 nm), sugerem a presença de contaminantes que estariam influenciando na absorbância a 280 nm. A presença de alguma substância contaminante, que absorveria fortemente no comprimento de onda a 320-350 nm, estaria "deslocando" a curva após os 280 nm para cima. Essa observação encontra sustentação nos espectrogramas para esse cultivar, particularmente o UFRGS18, como mostra o espectrograma, onde tipicamente para os 45 dias, evidencia-se que a curva não apresenta a característica de queda após os 280 nm como se pode observar na maioria dos demais espectrogramas, mantendo-se praticamente no mesmo paralelo durante todo o restante do intervalo. Não se sabe ao certo a natureza deste contaminante. Carboidratos são contaminantes comuns na maioria das ligninas isoladas (IIYAMA e WALLIS, 1990), geralmente constituindo de 5 a 15% do material (MORRISON, 1972a; MONTANARI et al., 1992). Eles tendem a absorver fortemente na faixa de 325 nm (MORRISON, 1972b) e dessa maneira alterar o formato do espectrograma.

Os cultivares CTC também apresentaram esse fenômeno, mas aparentemente afetou em menor magnitude os valores de DO para a parede celular.

As LDiox isoladas tipicamente contém uma certa porcentagem de carboidratos. Os carboidratos, que são na sua maioria resíduos de hemicelulose se não sofrerem quaisquer alterações, não causam interferência nas leituras de absorbância.

Entretanto, altas temperaturas seja durante a extração da lignina, ou durante a construção da curva-padrão ou mesmo durante a análise do teor de lignina na parede celular, podem provocar o aparecimento de produtos de degradação da hemicelulose, particularmente as xilanas, e esses produtos de degradação interferem nas leituras de densidade óptica (HATFIELD et al., 1994) e nos espectrogramas, particularmente nos comprimentos de onda entre 310 e 320 nm, o que daria sustentação às observações do presente trabalho. Além do que, esses carboidratos são mais prevalentes em plantas jovens. Entretanto, as temperaturas utilizadas foram amenas, ao redor de 50° C, ou seja, em tese, insuficiente para causar degradação de carboidratos.

Uma outra possibilidade, seria o íon polibrometo que absorve fortemente e quando presente, interfere substancialmente no espectrograma, entretanto a sua ação é mais visível no comprimento de onda a 260 nm; além do mais na técnica analítica é preconizado o emprego da solução de hidroxilamina, cuja principal finalidade é a de anular os efeitos do íon polibrometo.

Outra possibilidade reside na presença dos ácidos hidroxicinâmicos (particularmente os ácidos ferúlico e p-coumárico) e nas gramíneas, a presença dessas substâncias é significativa; estes ácidos absorvem fortemente no comprimento de onda entre 310 e 330 nm, ou seja, compatível com o presente trabalho. Entretanto, observa-se nos espectrogramas, que as alterações são mais proeminentes nos 45 dias, sendo de bem pouca magnitude nos demais cortes, e a concentração desses ácidos aumenta com o avançar da maturidade da gramínea (JUNG et al., 1996), ou seja, seria de esperar exatamente o fenômeno oposto, se a interferência fosse devida aos ácidos hidroxicinâmicos.

A contaminação por proteína, não interfere nas absorbâncias, apesar de proteínas conterem aminoácidos aromáticos (tirosina e fenilalanina), a presença dos mesmos é muito reduzida, não afetando portanto as leituras (HIGUCHI et al, 1967).

Outro aspecto que deve ser considerado reside na parede celular, uma vez que existem razões suficientes para se questionar qual o modelo mais adequado de preparação de parede celular. Evidentemente, deve ser aquela a mais isenta possível de substâncias contaminantes que interferem nas leituras de DO.

Figura 5. Efeito das idades na densidade óptica da lignina dioxana extraída do caule da aveia (cultivar CTC1).

Figura 6. Efeito das idades na densidade óptica da lignina dioxana extraída do caule da aveia (cultivar UFRGS7).

Figura 7. Efeito das idades na densidade óptica da lignina dioxana extraída do caule da aveia (cultivar UFRGS18).

Figura 8. Efeito das idades na densidade óptica da lignina dioxana extraída do caule da aveia (cultivar UPF15).

Na Tabela 7, estão evidenciadas as equações de regressão das curvas, podendo ser verificada ampla variação nos valores de inclinação das retas.

Para cada LDiox extraída, foi traçada uma curva-padrão (Figuras de 9 a 12 – citadas como exemplos) bem como a respectiva equação de regressão e seus espectogramas que estão ilustrados nas Figuras 13 a 22 (como exemplos). Valores de

carboidrato e de proteína foram devidamente considerados. Todas as curvas foram lineares nas concentrações testadas. Tomando-se por princípio que a inclinação da reta, que é resultado direto da leitura de densidade óptica em função da concentração de um dado tipo de LDiox, fornece-nos um indicativo da qualidade da mesma, pode-se inferir que além de existirem as já reconhecidas diferenças entre ligninas de diferentes espécies botânicas, também há marcantes diferenças entre ligninas provenientes de plantas jovens ou maduras, sugerindo a ocorrência de modificações na estrutura da lignina à medida que a planta amadurece.

Tabela 7. Sumário das equações de regressão obtidas a partir das curvas padrão das ligninas dioxana da fração caule de oito cultivares de aveia, em diferentes estádios de maturidade, expressos em matéria seca (%).

Cultivar	Idade/Corte	$X = (Y - b)/a$	Desvio Padrão	Coef. Correlação
CTC 1	45	$X = (Y + 0,509)/24,71$	0,083	0,996
	55	$X = (Y + 0,248)/26,31$	0,068	0,998
	65	$X = (Y - 0,032)/14,02$	0,025	0,999
CTC 2	45	$X = (Y + 0,630)/22,60$	0,068	0,997
	55	$X = (Y + 0,061)/13,31$	0,038	0,997
	65	$X = (Y - 0,017)/14,01$	0,035	0,998
CTC 3	45	$X = (Y + 0,322)/24,75$	0,035	0,999
	55	$X = (Y - 0,009)/14,46$	0,018	0,999
	65	$X = (Y - 0,066)/14,13$	0,030	0,998
UFRGS 7	45	$X = (Y - 0,029)/17,21$	0,012	1,000
	55	$X = (Y - 0,145)/17,21$	0,027	0,999
	65	$X = (Y - 0,025)/16,01$	0,030	0,999
UFRGS 10	45	$X = (Y - 0,120)/19,17$	0,005	1,000
	55	$X = (Y - 0,049)/14,48$	0,015	1,000
	65	$X = (Y + 0,102)/13,96$	0,033	0,998
UFRGS 18	45	$X = (Y + 0,362)/25,15$	0,046	0,999
	55	$X = (Y - 0,030)/14,11$	0,014	1,000
	65	$X = (Y - 0,046)/13,67$	0,032	0,998
UPF 14	45	$X = (Y + 0,147)/14,15$	0,033	0,998
	55	$X = (Y - 0,016)/13,90$	0,029	0,998
	65	$X = (Y + 0,048)/11,27$	0,034	0,997
UPF 15	45	$X = (Y - 0,159)/17,30$	0,022	0,999
	55	$X = (Y - 0,041)/16,39$	0,035	0,998
	65	$X = (Y - 0,039)/15,13$	0,021	0,999

CTC – Centro de Treinamento Cotrijui; UFRGS – Universidade Federal do Rio Grande do Sul ;
UPF – Universidade de Passo Fundo. X - concentração de lignina (mg/mL); Y - absorbância;
b - interseção da reta; a - inclinação da reta.

Figura 9. Curvas padrão das ligninas dioxana do cultivar CTC1, em diferentes estádios de maturidade (45, 55 e 65 dias).

Figura 10. Curvas padrão das ligninas dioxana do cultivar UFRGS7, em diferentes estádios de maturidade (45, 55 e 65 dias).

Figura 11. Curvas padrão das ligninas dioxana do cultivar UFRGS18, em diferentes estádios de maturidade (45, 55 e 65 dias).

Figura 12. Curvas padrão das ligninas dioxana do cultivar UPF15, em diferentes estádios de maturidade (45, 55 e 65 dias).

Figura 13. Espectrograma da lignina dioxana extraída do caule da aveia CTC1, aos 65 dias, no intervalo de comprimento de onda de 240 a 320 nm.

Figura 14. Espectrograma da lignina dioxana extraída do caule de aveia CTC2, aos 65 dias, no intervalo de comprimento de onda de 240 a 320 nm.

Figura 15. Espectrograma da lignina dioxana extraída do caule de aveia CTC3, aos 65 dias, no intervalo de comprimento de onda de 240 a 320 nm.

Figura 16. Espectrograma da lignina dioxana extraída do caule de aveia UFRGS7, aos 65 dias, no intervalo de comprimento de onda de 240 a 320 nm.

Figura 17. Espectrograma da lignina dioxana extraída do caule de aveia UFRGS10, aos 65 dias, no intervalo de comprimento de onda de 240 a 320 nm.

Figura 18. Espectrograma da lignina dioxana extraída do caule da aveia UFRGS18, aos 65 dias, no intervalo de comprimento de onda de 240 a 320 nm.

Figura 19. Espectrograma da lignina dioxana extraída do caule da aveia UPF14, aos 45 dias, no intervalo de comprimento de onda de 240 a 320 nm.

Figura 20. Espectrograma da lignina dioxana extraída do caule da aveia UPF14, aos 55 dias, no intervalo de comprimento de onda de 240 a 320 nm.

Figura 21. Espectrograma da lignina dioxana extraída do caule da aveia UPF14, aos 65 dias, no intervalo de comprimento de onda de 240 a 320 nm.

Figura 22. Espectrograma da lignina dioxana extraída do caule da aveia UPF15, aos 65 dias, no intervalo de comprimento de onda de 240 a 320 nm.

Nas Tabelas 8 a 10 podem ser visualizados os teores de lignina obtidos através dos quatro métodos analíticos para a determinação da lignina [lignina detergente ácido (LDA); lignina permanganato de potássio (LPer); lignina Klason (LK) e lignina solúvel em brometo de acetila (LSBA)] nos oito cultivares de aveia, nas frações planta inteira, folha e caule e a razão entre os métodos para os 45, 55 e 65 dias de idade.

Dos 45 para os 65 dias de idade, as concentrações de LDA variaram, de 3,30 a 7,64% para a parte aérea, de 3,05 a 6,51% para a fração folha e para a fração caule, de 4,96 a 8,38%. Na LPer variaram de 3,05 a 12,64% na parte aérea, de 2,92 a 12,83% para folha e para caule de 2,29 a 12,25%. Os valores de LDA e LPer foram próximos aos dados encontrados na literatura. A técnica de LDA exibiu valores menores aos apresentados pelo método LPer. Estes valores foram semelhantes aos encontrados por SAVIOLI et al. (2000) e FUKUSHIMA et al. (2000), em diversas plantas forrageiras, nos estádios de maturidade jovem e maduro.

Para a LK, a concentração de lignina aos 45 e 65 dias de idade variaram de 9,20 a 15,88% para a parte aérea, de 9,41 a 18,44% para folha e de 11,43 a 15,11% para caule. Como esperado, a concentração de lignina pela metodologia da LDA foi

menor que a concentração da LK. Valores semelhantes foram encontrados por JUNG et al. (1999) e FUKUSHIMA e HATFIELD (2001) que foram em média de 8,4 a 16,6% para diversas plantas forrageiras e de 7,67 a 14,04% nas espécies forrageiras no estágio jovem e maduro. Segundo VAN SOEST (1964), a maior limitação do método de LK para amostras de forragem é a inclusão da proteína insolúvel no resíduo, resultando em alto valor de lignina.

As diferenças observadas entre os métodos LDA e LK podem ter várias origens. O procedimento analítico LK emprega o tratamento ácido em duas etapas, sendo que na primeira aplicação, a solução ácida é concentrada (72%) e fria (4°C), e a segunda fase ácida é a quente e diluída. Na metodologia LDA, a concentração do ácido é sempre mantida a 72% e à temperatura ambiente. Deste modo, pode ter efeitos drásticos sobre a estrutura da lignina, resultando em substancial solubilização de partes de molécula pelo método LDA (HATFIELD, 1999).

Especula-se que no método LDA, parte da lignina poderia ser solubilizada na solução detergente ácido (SHIMOJO e GOTO, 1984) ou então na solução concentrada de ácido sulfúrico (CRAWFORD et al., 1980; HATFIELD et al., 1994).

A hipótese de contaminantes é forte em virtude da aveia ser uma gramínea rica em polissacarídeos e proteínas (BUXTON et al., 1996). FUKUSHIMA et al. (1999), estudando quatro gramíneas, registraram maiores teores de lignina em amostras de aveia. Especula-se que a utilização de elevada quantidade de amostra de matéria seca (25 gramas) na preparação de parede celular, utilizada na LK, teria como consequência a lavagem incompleta da amostra, além do fato de que a água e solventes orgânicos são menos eficientes para remover essas substâncias.

Tabela 8. Teores de lignina em detergente ácido (LDA), lignina permanganato de potássio (LPer), lignina Klason (LK) e lignina solúvel em brometo de acetila (LSBA) para as três frações de oito cultivares de aveia, aos 45 dias de idade de corte, expressos em matéria seca (%)¹.

FRAÇÃO VEGETAL / METODOLOGIA LIGNINA												
CULTIVAR	CAULE				FOLHA				PARTE AÉREA			
	LDA - S	LPer - S	LK - S	LSBA - S	LDA - S	LPer - S	LK - S	LSBA - S	LDA - S	LPer - S	LK - S	LSBA - S
CTC 1	6,61 ^d ±1,00	9,18 ^c ±0,74	12,23 ^b ±0,84	15,51 ^a ±0,72	3,75 ^b ±0,24	3,88 ^b ±0,11	10,06 ^a ±0,07	11,00 ^a ±0,71	6,46 ^c ±0,41	4,59 ^c ±0,00	9,97 ^b ±0,14	12,58 ^a ±0,71
CTC 2	4,96 ^c ±0,23	5,36 ^c ±0,76	12,02 ^b ±0,91	16,70 ^a ±0,56	3,05 ^c ±0,22	4,67 ^c ±0,76	10,37 ^b ±0,02	13,48 ^a ±0,14	3,30 ^c ±0,24	4,51 ^c ±0,36	10,20 ^b ±0,35	14,42 ^a ±0,99
CTC 3	7,39 ^b ±1,04	2,89 ^c ±0,92	12,02 ^a ±0,21	12,74 ^a ±0,40	4,47 ^b ±0,54	5,78 ^b ±1,01	10,11 ^a ±0,64	9,12 ^a ±0,56	5,04 ^b ±0,31	6,30 ^b ±0,80	9,20 ^a ±0,14	8,85 ^a ±0,21
UFRGS 7	7,05 ^b ±0,61	2,29 ^c ±0,09	12,60 ^a ±0,14	13,23 ^a ±1,23	4,51 ^b ±0,61	2,92 ^b ±0,93	11,33 ^a ±0,21	9,12 ^a ±0,17	7,70 ^b ±0,72	7,81 ^b ±0,78	11,73 ^a ±0,35	12,35 ^a ±0,92
UFRGS 10	7,23 ^c ±0,11	10,23 ^b ±1,77	13,77 ^a ±0,28	10,96 ^b ±0,76	4,77 ^c ±0,37	4,95 ^c ±1,18	11,81 ^a ±0,07	6,89 ^b ±0,16	6,05 ^c ±0,56	9,02 ^b ±0,02	12,58 ^a ±0,63	9,16 ^b ±1,81
UFRGS 18	5,34 ^d ±0,43	8,09 ^c ±0,14	12,35 ^b ±0,49	14,02 ^a ±0,16	3,22 ^b ±0,20	4,77 ^b ±0,76	10,75 ^a ±0,35	10,95 ^a ±0,78	3,74 ^b ±0,35	5,08 ^b ±0,98	10,82 ^a ±0,21	11,27 ^a ±1,03
UPF 14	5,99 ^c ±0,76	6,22 ^c ±0,08	11,43±0,07	17,65 ^a ±0,57	3,84 ^c ±0,31	5,27 ^c ±0,76	9,41 ^b ±0,00	14,05 ^a ±0,64	4,57 ^c ±0,91	4,77 ^c ±0,69	9,80 ^b ±0,85	14,00 ^a ±0,71
UPF 15	5,00 ^c ±0,12	9,86 ^b ±0,17	12,98 ^a ±0,35	10,95 ^b ±0,57	3,53 ^c ±0,58	5,83 ^{bc} ±0,60	12,10 ^a ±0,49	7,70 ^b ±0,42	4,17 ^c ±0,18	3,05 ^c ±0,20	11,94 ^a ±0,49	8,81 ^b ±0,27
MÉDIA	6,20	6,77	12,43	13,97	3,89	4,76	10,74	10,29	5,13	5,64	10,78	11,43
S*	1,01	3,08	0,71	2,50	0,63	0,97	0,93	2,57	1,50	1,95	1,19	2,28

¹ CTC – Centro de Treinamento Cntrijuí; UFRGS – Universidade Federal do Rio Grande do Sul; UPF – Universidade de Passo Fundo; S – desvio padrão; S* - desvio padrão das médias. Médias, na linha, seguidas de letras minúsculas diferentes, para cada fração vegetal, são diferentes (P<0,05) pelo teste de Tukey.

Tabela 9. Teores de lignina em detergente ácido (LDA), lignina permanganato de potássio (LPer), lignina Klason (LK) e lignina solúvel em brometo de acetila (LSBA) para as três frações de oito cultivares de aveia, aos 55 dias de idade de corte, expressos em matéria seca (%)¹.

CULTIVAR	FRAÇÃO VEGETAL / METODOLOGIA LIGNINA											
	CAULE				FOLHA				PARTE AÉREA			
	LDA - S	LPer - S	LK - S	LSBA - S	LDA - S	LPer - S	LK - S	LSBA - S	LDA - S	LPer - S	LK - S	LSBA - S
CTC 1	10,61 ^a ±0,61	10,30 ^a ±1,01	12,94 ^a ±0,71	11,11 ^a ±1,26	4,45 ^d ±0,63	6,94 ^c ±0,02	12,54 ^a ±0,35	9,12 ^b ±1,31	8,74 ^b ±0,27	7,77 ^b ±0,22	13,08 ^a ±0,85	8,70 ^b ±0,42
CTC 2	8,49 ^c ±0,63	9,98 ^c ±0,66	13,57 ^b ±0,92	19,14 ^a ±0,96	7,90 ^b ±0,74	5,93 ^c ±1,55	13,30 ^a ±0,71	14,98 ^a ±0,74	6,85 ^d ±0,57	8,77 ^c ±1,03	13,62 ^b ±0,35	17,62 ^a ±0,54
CTC 3	8,46 ^c ±0,87	9,35 ^c ±0,71	13,10 ^b ±1,48	16,28 ^a ±0,81	4,66 ^b ±0,58	6,30 ^b ±0,49	12,45 ^a ±0,56	13,19 ^a ±1,14	6,44 ^b ±0,44	8,20 ^b ±0,65	13,95 ^a ±0,64	14,66 ^a ±0,48
UFRGS 7	8,22 ^b ±0,08	7,77 ^b ±0,46	11,94 ^a ±0,00	9,37 ^{ab} ±0,49	7,84 ^b ±0,48	7,59 ^b ±0,47	12,44 ^a ±0,78	8,58 ^b ±0,59	8,56 ^b ±0,49	7,95 ^b ±0,46	13,45 ^a ±0,00	9,47 ^b ±0,79
UFRGS 10	9,34 ^b ±0,60	11,03 ^{ab} ±1,14	13,90 ^a ±0,49	13,70 ^a ±0,42	9,06 ^b ±0,79	10,20 ^b ±0,29	15,11 ^a ±0,14	14,97 ^a ±0,54	8,56 ^b ±1,08	8,95 ^b ±0,06	14,07 ^a ±0,49	14,50 ^a ±0,71
UFRGS 18	8,83 ^c ±0,37	8,68 ^c ±0,26	12,78 ^b ±0,49	14,34 ^a ±0,96	10,02 ^b ±0,49	10,50 ^b ±0,90	16,97 ^a ±0,28	17,87 ^a ±0,18	8,18 ^b ±0,64	8,94 ^b ±0,09	13,45 ^a ±0,21	14,40 ^a ±0,59
UPF 14	15,78 ^a ±2,51	9,59 ^b ±0,59	14,76 ^a ±0,56	16,02 ^a ±1,03	6,81 ^b ±0,56	7,22 ^b ±0,51	12,97 ^a ±0,78	14,44 ^a ±0,79	9,09 ^b ±0,28	7,73 ^b ±0,42	13,62 ^a ±0,49	15,32 ^a ±1,05
UPF 15	7,33 ^b ±0,28	9,71 ^b ±0,84	14,80 ^a ±0,35	16,17 ^a ±1,22	5,79 ^d ±0,69	9,01 ^c ±0,47	15,86 ^a ±0,49	13,40 ^b ±0,84	7,47 ^b ±0,61	8,24 ^b ±1,11	12,76 ^a ±0,42	10,99 ^a ±0,79
MÉDIA	9,63	9,55	13,47	14,52	7,07	7,96	13,96	13,32	7,99	8,32	13,50	13,21
S*	2,6	0,99	0,99	3,12	2,01	1,74	1,77	3,11	0,96	0,51	0,43	3,12

¹ CTC – Centro de Treinamento Cntrijuí; UFRGS – Universidade Federal do Rio Grande do Sul; UPF – Universidade de Passo Fundo; S – desvio padrão; S* - desvio padrão das médias. Médias, na linha, seguidas de letras minúsculas diferentes, para cada fração vegetal, são diferentes (P<0,05) pelo teste de Tukey.

Tabela 10. Teores de lignina em detergente ácido (LDA), lignina permanganato de potássio (LPer), lignina Klason (LK) e lignina solúvel em brometo de acetila (LSBA) para as três frações de oito cultivares de aveia, aos 65 dias de idade de corte, expressos em matéria seca (%)¹.

FRAÇÃO VEGETAL / METODOLOGIA LIGNINA												
CULTIVAR	CAULE				FOLHA				PARTE AÉREA			
	LDA - S	LPer - S	LK - S	LSBA - S	LDA - S	LPer - S	LK - S	LSBA - S	LDA - S	LPer - S	LK - S	LSBA - S
CTC 1	8,38 ^c ±1,00	12,25 ^b ±1,18	15,09 ^b ±1,56	18,85 ^a ±0,28	4,77 ^b ±0,08	7,49 ^b ±0,18	15,28 ^a ±0,07	16,34 ^a ±1,15	6,70 ^c ±0,38	9,62 ^b ±0,36	14,99 ^a ±0,28	16,29 ^a ±1,03
CTC 2	7,34 ^b ±0,065	9,11 ^b ±0,13	13,02 ^a ±0,71	14,78 ^a ±0,31	5,84 ^c ±0,47	9,77 ^b ±0,13	14,46 ^a ±0,78	14,36 ^a ±0,93	5,57 ^d ±0,40	9,95 ^c ±0,58	12,32 ^b ±0,21	14,29 ^a ±1,00
CTC 3	6,97 ^c ±0,62	10,77 ^b ±0,13	12,01 ^{ab} ±0,07	14,86 ^a ±0,34	4,26 ^c ±0,13	8,46 ^b ±0,48	12,86 ^a ±0,21	15,39 ^a ±0,86	5,24 ^c ±0,14	9,10 ^b ±0,07	13,18 ^a ±0,92	14,06 ^a ±0,81
UFRGS 7	6,81 ^c ±0,21	11,48 ^b ±0,59	14,08 ^{ab} ±0,21	14,53 ^a ±0,66	5,93 ^c ±0,09	12,69 ^b ±0,81	17,31 ^a ±0,49	15,76 ^a ±0,55	6,56 ^c ±0,06	12,64 ^b ±1,11	14,59 ^a ±0,21	14,76 ^a ±1,36
UFRGS 10	7,60 ^c ±0,32	11,00 ^b ±0,43	13,41 ^b ±0,07	19,05 ^a ±1,13	5,54 ^d ±0,17	10,80 ^c ±0,11	15,50 ^b ±0,49	20,88 ^a ±0,17	7,64 ^c ±1,24	7,80 ^c ±0,74	15,08 ^b ±0,85	19,76 ^a ±0,34
UFRGS 18	6,76 ^b ±0,54	9,52 ^b ±0,22	15,11 ^a ±0,49	17,56 ^a ±0,99	5,91 ^c ±0,46	9,97 ^b ±0,31	18,44 ^a ±0,07	20,64 ^a ±0,54	5,91 ^d ±0,19	10,41 ^c ±0,38	15,00 ^b ±0,42	17,67 ^a ±0,47
UPF 14	7,18 ^c ±0,12	11,84 ^b ±0,40	14,09 ^b ±0,28	22,21 ^a ±0,83	4,50 ^c ±0,74	10,43 ^b ±0,87	13,08 ^b ±0,42	21,76 ^a ±0,51	6,21 ^d ±0,30	11,04 ^c ±0,31	13,12 ^b ±0,42	23,37 ^a ±0,89
UPF 15	6,49 ^c ±0,56	10,10 ^b ±0,02	13,24 ^{ab} ±0,14	15,04 ^a ±0,79	6,51 ^c ±0,58	10,38 ^b ±0,09	17,40 ^a ±0,64	17,19 ^a ±1,14	6,28 ^c ±0,49	9,83 ^b ±0,29	15,88 ^a ±0,42	16,78 ^a ±0,49
MÉDIA	7,19	10,76	13,76	17,11	5,41	10,00	15,54	17,79	6,26	10,05	14,27	17,12
S*	0,59	1,11	1,06	2,79	0,80	1,56	2,05	2,87	0,74	1,41	1,24	3,16

¹ CTC – Centro de Treinamento Cntrijuí; UFRGS – Universidade Federal do Rio Grande do Sul; UPF – Universidade de Passo Fundo; S – desvio padrão; S* - desvio padrão das médias. Médias, na linha, seguidas de letras minúsculas diferentes, para cada fração vegetal, são diferentes (P<0,05) pelo teste de Tukey.

FUKUSHIMA et al. (1991) extraíram a lignina de amostras de alfafa com etanol e obtiveram rendimentos de menos de 1% da matéria seca; o baixo rendimento foi provavelmente devido ao fato do etanol ter pequena capacidade de extração, solubilizando apenas parte da lignina. ROSSINI et al. (1989) e BALOGH et al. (1989) empregaram diversos tipos de solventes para extrair a lignina da serragem de *Pinus caribaea hondurensis*, obtendo rendimento de 2,0 a 24,4% do peso seco da madeira; estes últimos autores empregaram ácidos minerais como catalizadores na reação de extração, o que poderia introduzir modificações na estrutura da lignina. Resultados semelhantes foram registrados por FUKUSHIMA e DEHORITY (2000) e FUKUSHIMA et al. (2000), que obtiveram rendimento de LBrAc, em estágio de maturidade semelhante, variando de 5,1 a 14,39% em plantas forrageiras.

Quanto aos teores encontrados para LSBA, em média, houve variação dos 45 para os 65 dias de idade de 8,85 a 23,37% para a parte aérea, 6,89 a 21,76% na fração folha e para fração caule foi de 10,96 a 22,21%. Devido a existência de interação entre método versus cultivares versus parte vegetal, foi optado por apresentar a análise estatística dentro de linha, por cultivar, comparando-se as metodologias entre si. Valores semelhantes foram encontrados por FUKUSHIMA e HATFIELD (2001) que foram de 8,13% a 13,22% em diversas espécies, incluindo leguminosas e gramíneas em estágio de maturidade jovem e maduro. Dos quatro métodos estudados, este foi o que apresentou os maiores valores para todas as frações, nos três estádios de maturidade.

Valores de lignina determinados pelo método espectrofotométrico LSBA foram mais elevados do que os demais métodos, existem algumas possíveis razões que podem explicar as discrepâncias observadas. Por exemplo, poderiam residir ou em erro laboratorial ou em artefatos de técnica (assim, uma determinada fração vegetal, em uma dada circunstância laboratorial, pode apresentar compostos fenólicos outros que não a lignina, amino-ácidos, taninos, etc). A concentração de lignina nuclear foi superior no caule em relação à folha (MORRISON, 1980). Maiores teores de lignina na fração caule em relação à folha, nos métodos LDA e LK, foram observados por HATFIELD et al. (1994). Isto vai de encontro a frequente observação encontrada na

literatura, onde os caules exibem menores valores de digestibilidade que as folhas (VAN SOEST, 1994).

A utilização de um determinado método de extração de lignina é uma decisão importante e delicada. A escolha feita neste trabalho de se estudar diferentes cultivares dentro de uma espécie vegetal mostrou-se interessante, no entanto a variação entre os valores dos mesmos foi significativa, restringindo adequada análise estatística dos dados pela ocorrência de interação, tampouco conclusões sobre os cultivares como um todo. BUXTON e RUSSEL (1988) registraram diferenças para a composição de lignina nuclear e periférica dentro de espécies de plantas C3, e JUNG e VOGEL (1992), seguindo esta mesma linha, afirmaram que as variações para todas as medidas de lignificação parecem ser tão grandes dentro de uma espécie quanto entre diferentes espécies.

Pode-se notar uma certa uniformidade entre os quatro métodos de lignina. Para uma considerável parte das amostras, em particular a fração folha e as idade de corte 45 e 55 dias, os valores de LK e LSBA não diferiram estatisticamente entre si, e o mesmo fato ocorreu para as metodologias LPer e LDA ($P > 0,05$).

Figura 23. Comparação entre os quatro métodos analíticos para a determinação das ligninas, no estágio de maturidade (45 dias) da fração caule, expressos em matéria seca (%).

Figura 24. Comparação entre os quatro métodos analíticos para a determinação das ligninas, no estágio de maturidade (55 dias) da fração caule, expressos em matéria seca (%).

Figura 25. Comparação entre os quatro métodos analíticos para a determinação das ligninas, no estágio de maturidade (65 dias) da fração caule, expressos em matéria seca (%).

Figura 26. Comparação entre os quatro métodos analíticos para a determinação das ligninas, no estágio de maturidade (45 dias) da fração folha, expressos em matéria seca (%).

Figura 27. Comparação entre os quatro métodos analíticos para a determinação das ligninas, no estágio de maturidade (55 dias) da fração folha, expressos em matéria seca (%).

Figura 28. Comparação entre os quatro métodos analíticos para a determinação das ligninas, no estágio de maturidade (65 dias) da fração folha, expressos em matéria seca (%).

Figura 29. Comparação entre os quatro métodos analíticos para a determinação das ligninas, no estágio de maturidade (45 dias) da parte aérea, expressos em matéria seca (%).

Figura 30. Comparação entre os quatro métodos analíticos para a determinação das ligninas, no estágio de maturidade (55 dias) da parte aérea, expressos em matéria seca (%).

Figura 31. Comparação entre os quatro métodos analíticos para a determinação das ligninas, no estágio de maturidade (65 dias) da parte aérea, expressos em matéria seca (%).

Figura 32. Médias entre oito cultivares de aveia nos diversos estádios de maturidade, nos quatro métodos analíticos, para a determinação das ligninas, das três frações, expressos em matéria seca (%).

Na tabela 11 estão evidenciados os dados referentes a razão entre os métodos. A razão entre LSBA/LDA para a idade de 45 dias, variou entre 1,51 a 4,42; para a idade 55 dias, houve variação de 1,00 a 2,83 e para 65 dias de idade, de 2,01 a 4,84 (Tabela 11). Na média, os teores de LSBA foram aproximadamente o dobro em relação às concentrações de LDA. A razão LSBA/LDA de SHIMOJO e GOTO (1990) variou de 1,5 a 2,09; para IYAMA E WALLIS (1990) esta razão variou de 1,73 a 2,85; FUKUSHIMA e DEHOYTY (2000) e FUKUSHIMA et al. (2000) reportaram razão de 0,91 a 5,51. REEVES III (1988) concluiu que a melhor concordância com a metodologia da espectroscopia de raios infra-vermelho foi com a LSBA, enquanto que as comparações com a LDA e LPer, foram insatisfatórias. MUNTIFERING (1982) também mostrou que os métodos gravimétricos LDA e LPer, e o método espectrofotométrico LSBA, produziram resultados conflitantes entre si para as mesmas amostras forrageiras. As razões para explicar estas observações ainda não estão esclarecidas; entretanto, no método LDA, parte da lignina poderia ser solubilizada na solução detergente ácido (SHIMOJO e GOTO, 1984; FUKUSHIMA e DEHORITY, 2000) ou então na solução concentrada de ácido sulfúrico (CRAWFORD et al., 1980; HATFIELD et al., 1994), que em consequência, produziria os teores subestimados de lignina. Por outro lado, concentrações mais elevadas de lignina pelo método LSBA em relação à LDA poderiam ser explicadas pela hipótese de que o método espectrofotométrico quantificaria não apenas a porção interna da lignina como também a periferia da mesma, que seria removida pela ação drástica das soluções que compõe o método LDA (FAHEY JR. et al., 1979).

Teores de lignina obtidos através dos quatro métodos mostraram efeito da maturidade em quase todas as amostras, predominando a observação de que plantas maduras apresentaram teores mais elevados quando comparadas com plantas jovens.

A razão LSBA/Lper variou de 1,02 a 5,78 para a idade de 45 dias, de 1,08 a 2,53 para 55 dias e de 1,17 a 2,53 para 65 dias/corte. FUKUSHIMA e DEHORITY (2000) registraram razão LSBA/LPer variando de 1,18 a 3,16, enquanto que FUKUSHIMA et al. (2000) obtiveram valores de 1,12 a 3,39 e SAVIOLI e FUKUSHIMA (2000) de 0,8 a 2,6. Entretanto, estas constatações devem considerar que os teores de LPer

Tabela 11. Valores das razões entre quatro métodos para a determinação da lignina provenientes das frações vegetais (caule, folha e parte aérea) de oito cultivares de aveia, aos 45, 55 e 65 dias de idade de corte.

Cultivares (frações)		Idades (dias)								
		45			55			65		
		LSBA /LDA	LSBA /LPer	LSBA /LK	LSBA /LDA	LSBA /LPer	LSBA /LK	LSBA /LDA	LSBA /LPer	LSBA /LK
CTC1	Parte aérea	1,95	2,74	1,26	1,00	1,12	0,67	2,43	1,69	1,09
	Folha	2,93	2,84	1,09	2,05	1,31	0,73	3,43	2,18	1,07
	Caule	2,35	1,69	1,27	1,05	1,08	0,86	2,25	1,54	1,25
CTC2	Parte aérea	4,37	3,20	1,41	2,57	2,01	1,29	2,57	1,44	1,16
	Folha	4,42	2,89	1,30	1,90	2,53	1,13	2,46	1,47	0,99
	Caule	3,32	3,12	1,39	2,25	1,92	1,41	2,01	1,62	1,14
CTC3	Parte aérea	1,76	1,40	0,96	2,28	1,79	1,05	2,68	1,55	1,07
	Folha	2,04	1,58	0,90	2,83	2,09	1,06	3,61	1,82	1,20
	Caule	1,72	4,41	1,06	1,92	1,74	1,24	2,13	1,38	1,24
UFRGS7	Parte aérea	1,60	1,58	1,05	1,11	1,19	0,70	2,25	1,17	1,01
	Folha	2,02	3,12	0,80	1,09	1,13	0,69	2,66	1,24	0,91
	Caule	1,88	5,78	1,05	1,14	1,21	0,78	2,13	1,27	1,03
UFRGS10	Parte aérea	1,51	1,02	0,73	1,69	1,62	1,03	2,59	2,53	1,31
	Folha	1,44	1,39	0,58	1,65	1,47	0,99	3,77	1,93	1,35
	Caule	1,52	1,07	0,80	1,47	1,24	0,99	2,51	1,73	1,42
UFRGS18	Parte aérea	3,01	2,22	1,04	1,76	1,61	1,07	2,99	1,70	1,18
	Folha	3,40	2,30	1,02	1,78	1,70	1,05	3,49	2,07	1,12
	Caule	2,62	1,73	1,14	1,62	1,65	1,12	2,60	1,84	1,16
UPF14	Parte aérea	3,06	2,94	1,43	1,69	1,98	1,12	3,76	2,12	1,78
	Folha	3,66	2,67	1,49	2,12	2,00	1,11	4,84	2,09	1,66
	Caule	2,95	2,84	1,54	1,02	1,67	1,09	3,09	1,88	1,58
UPF15	Parte aérea	2,11	2,89	0,74	1,47	1,33	0,86	2,67	1,71	1,06
	Folha	2,18	1,32	0,64	2,31	1,49	0,84	2,64	1,66	0,99
	Caule	2,19	1,11	0,84	2,21	1,67	1,09	2,32	1,49	1,14
Média		2,50	2,41	1,06	1,75	1,61	1,00	2,83	1,71	1,20

CTC – Centro de Treinamento de Cotrijui; UFRGS – Universidade Federal do Rio Grande do Sul;
UPF – Universidade de Passo Fundo.

possam estar inflacionados, uma vez que tanto a celulose como a hemicelulose podem ser atacadas pela solução de permanganato, principalmente em gramíneas imaturas (VAN SOEST e WINE, 1968). BARTON II e AKIN (1977) mostraram que parte da hemicelulose e alguns tecidos do mesófilo foram removidos pela solução de permanganato.

A razão entre LSBA/LK variou de 0,58 a 1,54 para os 45 dias, de 0,67 a 1,42 para os 55 dias e de 0,91 a 1,78 para os de 65 dias de idade.

Os valores obtidos de LSBA e LK foram próximos entre si e maiores que os dos outros dois métodos, concordando com os dados de FUKUSHIMA e HATFIELD (2001). Segundo JUNG (1989), a LK caracteriza-se por extrair a lignina nuclear (*core lignin*), enquanto o método espectrofotométrico reproduz teoricamente a concentração real da lignina na planta, tanto a nuclear quanto a periférica (*non-core lignin*) (FUKUSHIMA e HATFIELD, 2001).

Para a maioria das amostras, as concentrações de lignina nos quatro métodos foram maiores na idade de 65 dias de idade em relação aos 45 dias. Segundo MORRISON (1980), JUNG e VOGEL (1992), a totalidade da lignina nuclear aumentou nas forrageiras à medida que se avançou na maturidade fisiológica, tanto para caule como para folha. HATFIELD et al. (1994) reportaram que amostras de caule mais maduros exibiram maiores teores de lignina que os mais jovens. É aceito que a lignina é o principal fator a inibir a digestibilidade, explica-se portanto as observações usualmente vistas na literatura, que plantas forrageiras maduras apresentam coeficientes de digestibilidade menores que plantas mais jovens.

5. CONCLUSÃO

Para se determinar qual método que mais fielmente reflete o real teor de lignina são necessários outros instrumentos analíticos como: digestibilidade “*in vitro*” e digestibilidade “*in vivo*” para correlacionar os dados com os métodos analíticos estudados.

Os métodos analíticos LK e LSBA aqui pesquisados, renderam maiores estimativas para a concentração de lignina em amostras de aveia, sendo que o método LDA foi o que apresentou os menores valores.

O método espectrofotométrico lignina solúvel em brometo de acetila, utilizando como padrão de referência a lignina extraída da planta forrageira com o reagente dioxana ácida, mostrou-se ser mais uma opção na escolha. O método LSBA é um método para quantificar a lignina em amostras vegetais, embora requerendo vários outros estudos, objetivando esclarecer diversos aspectos obscuros que venham ou não consolidar sua validade como técnica analítica para a quantificação do teor de lignina em produtos vegetais.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHLGREN, P.A., YEAN, W.Q., GORING, D.A.I. Chlorite delignification of sprucewood. Comparison of the molecular weight of the lignin dissolved with the size of pores in the cell wall. *TAPPI*, v.54, p. 737, 1971.
- 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, p.179, 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, p. 19-28, 1988.
- AMJED, M.; JUNG, H.G. and DONKER, J.D. Effect of alkaline hydrogen peroxide treatment on cell wall composition and digestion kinetics of sugarcane residues and wheat straw. *J. Anim. Sci.*, v.70, p. 2877-2884, 1992.
- ARMITAGE, E.R.; ASHWORTH, R.B. and FERGUSON, W.S. The determination of lignin in plant material of high protein content. *J. Sci. Chem. Ind.*, v. 67, p. 241, 1948.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS – AOAC. Official methods of analysis. 15 ed. Washington DC.: 1990. 1298p.

- BALOGH, D.T., CURVELO, A.A.S., GROOTE, R.A.M.C. Solvent effect on organosolv lignin from *Pinus caribacea hondurensis* (part I). In: BRAZILIAN SYMPOSIUM ON THE CHEMISTRY OF LIGNINS AND OTHER WOOD COMPONENTS, 1, 1989, São Carlos. *Proceedings...* São Carlos: USP, 1989, p. 313-320.
- BAKER, F. and 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, p. 3, 1947.
- BARTON, J.S. The reaction products of lignin and sodium chlorite in acid solution. *TAPPI*, v.10, p. 496, 1950.
- BARTON II, F.E. and AKIN, D.E. Digestibility of delignified forage cell walls. *J. Agric. Food Chem.*, v. 25, p. 1299, 1977.
- BENNER, R.; MACCUBBIN, A.E. and HODSON, R.E. Preparation, characterization and microbial degradation of specifically radiolabeled [^{14}C] lignocelluloses from marine and freshwater macrophytes. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 47, p. 381, 1984.
- BESLE, J.; CORNU, A. and JOUANY, J. Roles of structural phenylpropanoids in forage cell wall digestion. *J. Sci. Food Agric.*, v. 64, p. 171-190, 1994.
- BJORKMAN, A. Studies on finely divided wood. I. Extraction with neutral solvents. *Svensk. Papperstidning*, v.59, p. 477, 1956.
- BJORKMAN, A. and PERSON, B. Studies on finely divided wood. II. The properties of lignins extracted with neutral solvents from softwoods and hardwoods. *Svensk. Papperstidning*, v. 60, p. 158-169, 1957

- BRAUNS, F.E. Native lignin. I. Its isolation and methylation. *J. Am. Chem. Soc.*, v. 61, p. 2120, 1939.
- BRILLOVET, J.M. and 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, p. 861-868, 1983.
- BRUNOW, G., SIPILÄ, J. and SYRJÄNEN, K. *The structure of softwood lignin*. [on line] Disponível na Internet via WWW. URL: http://www.helsinki.fi/~orgkm_ww/lignin_structure.html. Capturado em junho 2001.
- BUNGAY, H. (1996). *An early stage in the condensation of various monomers to form lignin*. (on line). Disponível na Internet via WWW. URL: <http://www.esb.ucp.pt/bungah/sugar/lignin.htm>. Capturado em junho de 2001.
- BUXTON, D.R.; RUSSELL, J.R. and WEDIN, W.F. Structural neutral sugars in legume and grass stems in relation to digestibility. *Crop Sci.*, v. 27, p. 1279, 1987.
- BUXTON, D.R., RUSSEL, J.R. Lignin constituents and cell-wall digestibility of grass and legume stems. *Crop Sci.*, v. 28, p. 553-558, 1988.
- BUXTON, D.R., MERTENS, D.R. and FISHER, D.S. Cool-season forage grasses. *Agron. Monogr.*, v. 34, p. 229, 1996.
- CAMM, E.L. and TOWERS, G.H.N. Phenylalanine ammonia lyase. *Phytochemistry*, v.12, p. 961, 1973.

- CHAVES, C.M.; MOORE, J.E.; MOYE, H.A. and OCUMPAUGH, W.R. Separation, identification and quantification of lignin saponification products extracted from digitgrass and their relation to forage quality. *J. Anim. Sci.*, v. 54, p. 196, 1982.
- CHESSON, A. Effects of sodium hydroxide on cereal straws in relation to the enhanced degradation of structural polysaccharides by rumen microorganisms. *J. Sci. Fd. Agric.*, v. 32, p. 8745, 1981.
- COLLINGS, G.F.; YOKOYAMA, M.T. and BERGEN, W.G. Lignin as determined by oxidation with sodium chlorite and a comparison with permanganate lignin. *J. Dairy Sci.*, v. 61, p. 1156, 1978.
- CRAMPTON, E.W. and MAYNARD, L.A. The relation of cellulose and lignin content to the nutritive value of animal feeds. *J. Nutr.*, v. 15, p. 383, 1938.
- CRAWFORD, R.L.; ROBINSON, L.E. and CHEH, A.M. ^{14}C -labeled lignins as substrates for the study of lignin biodegradation and transformation. In: *LIGNIN BIODEGRADATION: MICROBIOLOGY, CHEMISTRY, AND POTENCIAL APPLICATIONS*. T.K. Kirk, T. Higuchi and H. Chang (Ed.). v. 1, 1980. p. 62.
- CURVELO, A.A.S. Organosolv lignins from *Pinus caribaea hondurensis*. In: BRAZILIAN SYMPOSIUM ON THE CHEMISTRY OF LIGNINS AND OTHER WOOD COMPONENTS, 2, *Proceedings*, p. 44-55, Campinas, SP. 1992.
- DARVILL, A., McNEIL, M., ALBERSHEIM, P. et al. The primary cell wall of flowering plants. In: Tolbert, N.E. *The biochemistry of plants (Vol. 1 – The plant cell)*. New York: Academic Press, 1980.

- DEHORITY, B.A. and JOHNSON, R.R. Effect of particle size upon the in vitro cellulose digestibility of forages by rumen bacteria. *J. Dairy Sci.*, v. 44, p. 2242, 1961.
- DENCE, C.W.; GUPTA, M.K. and SARKANEN, K.V. Studies on oxidative delignification mechanisms. II. Reactions of vanillyl alcohol with chlorine dioxide and sodium chlorite. *TAPPI*, v. 45, p. 29, 1962.
- EDWARDS, C.S. Determination of lignin and cellulose in forages by extraction with triethylene glycol. *J. Sci. Food Agric.*, v. 24, p. 381, 1973.
- ELLIS, G.H.; MATRONE, G. and 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, p. 285, 1946.
- FAHEY JR., G.C.; MCLAREN, G.A. and WILLIAMS, J.E. Lignin digestibility by lambs fed both low quality and high quality roughages. *J. Anim. Sci.*, v. 48, p. 941, 1979.
- FENGEL, D. and WEGENER, G. Lignin. In: *WOOD - CHEMISTRY, ULTRASTRUCTURE AND REACTIONS*. Walter de Gruyter & Co., 1989. p. 132-181.
- FORD, C.W. Effect of partial delignification on the in vitro digestibility of cell wall polysaccharides in *Digitaria decumbens* (*Pangola grass*). *Aust. J. Agric. Res.*, v. 29, p. 1157, 1978.
- 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, v. 3, p.318-320, 1996.

- FUKUSHIMA, R.S.; DEHORITY, B.A. and 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, p. 295, 1991.
- FUKUSHIMA, R.S. and DEHORITY, B.A. Modificação do método colorimétrico “lignina solúvel em brometo de acetila” na estimativa quantitativa da lignina. *Rev. Soc. Bras. Zootec.*, v. 24, p. 192-203, 1995.
- FUKUSHIMA, R.S. and DEHORITY, B.A. Feasibility of using lignin isolated from forages by solubilization in acetyl bromide as a standard for lignin analysis.. *J. Anim. Sci.*, , 78:3135-3143, 2000.
- FUKUSHIMA, R.S., ROSA, A.J.M., LIMA, C.G. et al. Comparação entre dois métodos analíticos para determinação da lignina de algumas gramíneas forrageiras. *Pesq. Agropec. Bras.*, v. 34, n. 6, p. 1025-1030, 1999.
- FUKUSHIMA, R.S.; GARIPPO, G.; HABITANTE, A.M.Q.B.; LACERDA, R.S. Extração da lignina e emprego da mesma em curvas de calibração para a mensuração da lignina em produtos vegetais. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 29, n. 5, p. 1302-1311, 2000.
- 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, p. 302-309, 2001.
- FUKUSHIMA, R.S. and HATFIELD, R.D. Extraction and isolation of lignin for utilization as a standard to determine lignin concentration using the acetyl bromide spectrophotometric method. *J. Agric. Food Chem.* V. 49, n. 7, p. 3133-3139, 2001.

- GIGER, S. Revue sur les methodes de dosage de la lignine utilisees en alimentation animale. *Ann. Zootech.*, v. 34, p. 85, 1985.
- GLASSER, W.G. Lignin. In: *PULP AND PAPER - CHEMISTRY AND CHEMICAL TECHNOLOGY*. Casey, J.P. (Ed.). John Wiley & Sons, Inc. 3^a ed., 1980. p. 39-111.
- GOERING, G.K. and VAN SOEST, P.J. *FORAGE FIBER ANALYSIS (APPARATUS, REAGENTS, PROCEDURES AND SOME APPLICATIONS)*. USDA Agr. Handbook. n° 379, Washington, DC. 1970.
- GORDON, A.J. A comparison of some chemical and physical properties of alkali lignins from grass and lucerne hays before and after digestion by sheep. *J. Sci. Fd. Agric.*, v. 26, p. 1551, 1975.
- HARKIN, J.M. Lignin. In: *CHEMISTRY AND BIOCHEMISTRY OF HERBAGE*. G.W. Butler and R.W. Bailey (Ed.). Vol. 1, p. 323. *Academic Press*, NY, 1973.
- HARTLEY, R.D. and JONES, E.C. Phenolic components and degradability of cell walls of grass and legume species. *Phytochemistry*, v. 16, p. 1531, 1977.
- HATFIELD, R.D.; JUNG, H.G.; RALPH, J.; BUXTON, D.R. and 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, p. 51-58, 1994.
- HATFIELD, R.D., WILSON, J.R., MERTENS, D.R. Composition of cell walls isolated from cell types of grain sorghum stems. *J. Sci. Food Agric.*, v. 79, p. 891-899, 1999.

HELM, R. *Department of Wood Science and Forest Products Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, VA 24061-6323.* (on line) Disponível na Internet via [www. URL: http://www.chem.vt.edu/chem-dept/helm/3434WOOD/info.html](http://www.chem.vt.edu/chem-dept/helm/3434WOOD/info.html). Capturado em agosto de 2001.

HIGUCHI, T. Lignin structure and morphological distribution in plant cell walls. In: *LIGNIN BIODEGRADATION: MICROBIOLOGY, CHEMISTRY AND POTENTIAL APPLICATIONS*. T.K. Kirk, T. Higuchi and H. Chang (Ed.). Vol. I, p. 2. CRC Press, Boca Raton, FL, 1980.

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

HIGUCHI, T.; ITO, Y.; SHIMADA, M. and KAWAMURA, I. Chemical properties of milled wood lignin of grasses. *Phytochemistry*, v. 6, p. 1551, 1967b.

IYAMA, K. and WALLIS, A.F.A. Determination of lignin in herbaceous plants by an improved acetyl bromide procedure. *J. Sci. Food Agric.*, v. 51, p. 145-161, 1990.

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

JOHNSON, D.B.; DEHORITY, B.A.; CONRAD, H.R. and 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, p. 250, 1962.

JUNG, H.G. and FAHEY JR, G.C. Effects of phenolic monomers on rat performance and metabolism. *J. Nutr.*, v. 113, p. 546, 1983.

- JUNG, H.G. and FAHEY JR, G.C. Influence of phenolic acids on forage structural carbohydrate digestion. *Can. J. Anim. Sci.*, v. 64 (Suppl.), p. 50, 1984.
- JUNG, H.G. and VOGEL, K.P. Influence of lignin on digestibility of forage cell wall material. *J. Anim. Sci.*, v. 62, p. 1703, 1986.
- JUNG, H.G. Forage Lignins and their effects on fiber digestibility. *Agron. J.*, 81:33-38, 1989.
- JUNG, H.G., and 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, p. 169-176, 1992.
- JUNG, H.G.; BUXTON, D.; HATFIELD, R.D.; MERTENS, D.; RALPH, J.; WEIMER, P. Improving forage fibre digestibility. *Feed Mix*, v.4, n. 6, p. 30-34, 1996.
- JUNG, H.G., VAREL, V.H., WEIMER, P.J. et al. Accuracy of klason lignin and acid detergent lignin methods as assessed by bomb calorimetric. *J. Agric. Food chem.*, v.47, p. 2005-2008, 1999.
- KERLEY, M.S.; GARLEB, K.A.; FAHEY JR., G.C.; BERGER, L.L.; MOORE, K.J.; PHILIPS, G.N.; GOULD, J.M. Effects of alkaline hydrogen peroxide treatment of cotton and wheat straw on cellulose crystallinity and on composition and site and extent of disappearance of wheat straw cell wall phenolics and monosaccharides by sheep. *J. Anim. Sci.*, v. 66, p. 3235, 1988.
- LOWRY, J.B.; CONLAN, A.C.; SCHLINK, A.C. and MCSWEENEY, C.S. Acid detergent dispersible lignin in tropical grasses. *J. Sci. Food Agric.*, v. 65, p. 41-49, 1994.

- MANZANO, R.P., FUKUSHIMA, R.S., GOMES, J.D. and GARIPPO, G. *Digestibilidade do Bagaço de Cana-de-açúcar Tratado com Reagentes Químicos e Pressão e Vapor. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA*, v. 29, n. 4, p. 1196-1204, 2000.
- MIGITA, W. and KAWAMURA, I. Chemical analysis of wood. *J. Agric. Chem. Soc. Jpn.*, v. 20, p. 348, 1944.
- MOIR, K.W. The effect of different extraction procedures on the recovery of cell walls in forage and faeces from cattle and sheep. *J. Agric. Sci. (Camb.)*, v. 78, p. 351, 1972.
- MONTANARI, S.; CURVELO, A.A.S.; GROOTE, R.A.M.C. Dioxan lignins from *Pinus caribaea hondurensis*. In: BRAZILIAN SYMPOSIUM ON THE CHEMISTRY OF LIGNINS AND OTHER WOOD COMPONENTS, 1, 1992, Campinas. *Proceedings...* p. 136-143, 1992.
- MONTIES, B. Preparation of dioxane lignin fractions by acidolysis. *Methods in Enzymology*, v. 161, p. 31-35, 1988.
- MORRISON, I.M. A semi-micro method for the determination of lignin and its use in predicting the digestibility of forage crops. *J. Sci. Fd. Agric.*, v. 23, p. 455, 1972a.
- MORRISON, I.M. Improvements in the acetyl bromide technique to determine lignin and digestibility and its application to legumes. *J. Sci. Fd. Agric.*, v. 23, p. 1463, 1972b.
- MORRISON, I.M. Isolation and analysis of lignin-carbohydrate complexes from *Lolium multiflorum*. *Phytochemistry*, v.12, p. 2979, 1973.

- MORRISON, I.M. Delignification and hemicellulose extraction of cell walls of *Lolium perenne* and *Trifolium pratense*. *Phytochemistry*, v.14, p. 505, 1975.
- MORRISON, I.M. Changes in the lignin and hemicellulose concentrations of ten varieties of temperate grasses with increasing maturity. *Grass Forage Sci.*, v. 35, p. 287-293, 1980.
- 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. Fd. Agric.*, v. 34, p. 1323, 1983.
- MUNTIFERING, R.B. Evaluation of various lignin assays for determining ruminal digestion of roughages by lambs. *J. Anim. Sci.*, v. 55, p. 432, 1982.
- NORRIS, K.H.; BARNES, R.F.; MOORE, J.E. and SHENK, J.S. Predicting forage quality by infrared reflectance spectroscopy. *J. Anim. Sci.*, v. 43, p. 889, 1976.
- PATTON, A.R and GIESEKER, L. Seasonal changes in the lignin and cellulose content of some Montana grasses. *J. Anim. Sci.*, v. 1, p. 22, 1942.
- PEPPER, J.M.; BAYLIS, P.E.T. and ADLER, E. The isolation and properties of lignins obtained by the acidolysis of spruce and aspen woods in dioxane-water medium. *Can. J. Chem.*, v. 37, p. 1241-8, 1959.
- PEW, J.C. Properties of powdered wood and isolation of lignin by cellulytic enzymes. *Tappi*, v.40, p. 553, 1957.
- 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, p. 388, 1988.

- ROSSINI, E.L.; OLIVEIRA, M.R.G.; CURVELO, A. A. S. and GROOTE, R. A. M.C. Lignins extracts by organic solvents: an extension of Brauns lignin. In: BRAZILIAN SYMPOSIUM ON THE CHEMISTRY OF LIGNINS AND OTHER WOOD COMPONENTS, 1, *Proceedings*, 305-312, São Carlos-SP, 1989.
- SARKANEN, K.V.; KAKEHI, K.; MURPHY, R.A. and WHITE, H. Studies on oxidative delignification mechanisms. I. Oxidation of vanillin with chlorine dioxide. *TAPPI*, v.45, p. 24, 1962.
- SARKANEN, K.V. and LUDWIG, C.H. *LIGNINS: OCCURRENCE, FORMATION, STRUCTURE AND REACTIONS*. Wiley Interscience, NY, 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.
- SAVIOLI, N.M.F.; FUKUSHIMA, R.S.; LIMA, C.G.; GOMIDE, C.A. Rendimento e comportamento espectrofotométrico da lignina extraída de preparações de parede celular, fibra em detergente neutro ou fibra em detergente ácido. *Rev. Bras. Zootec.*, v. 29, n. 4, p. 988-996, 2000.
- SHARMA, U.; BRILLOVET, J.M.; SCALBERT, A. and MONTIES, B. Studies on a brittle stem mutant of rice, *Oriza sativa L.*, characterization of lignin fractions, associated phenolic acids and polysaccharides from rice stem. *Agronomie*, v. 6, p. 265-271, 1986.
- SHENK, J.S.; WESTERHAUS, M.O. and HOOVER, M.R. Analysis of forages by infrared reflectance. *J. Dairy Sci.*, v. 62, p. 807, 1979.

SJÖSTRÖM, E. Lignin. In: *WOOD CHEMISTRY - FUNDAMENTALS AND APPLICATIONS*. Academic Press, Inc., 2^a ed., 1993. p. 71-89.

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, p. 838, 1984.

SHIMOJO, M. and GOTO, I. Improvement of nutritive value of tropical grasses by physical or chemical treatment. I. Effect of steam treatment on chemical composition and dry mater digestibility. *J. Japan Grassl. Sci.*, v. 36, p. 184-190, 1990.

STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM INSTITUTE INSTITUTE INC. SAS user's guide: statistics. 5 ed, Cary: SAS Institute, 1985. 956 p.

SÜDEKUM, K.-H., VOIGT, K., STANGASSINGER, M. Spectrophotometric investigations on lignin in wheat (*Triticum aestivum* L.): Influence of cell wall preparations, solvent, and standard. *J. Agric. Food. Chem.*, v. 45, p. 1220-1228, 1997.

SULLIVAN, J.T. A rapid method for the determination of acid-insoluble lignin in forages and its relation to digestibility. *J. Anim. Sci.*, v. 18, p. 1292, 1959.

THACKER, E.J. A modified lignin procedure. *J. Anim. Sci.*, v.13, p. 501, 1954.

THOMAS, B. and ARMSTRONG, D.G. A study of some methods at present used for the determination of lignin. *J. Agric. Sci.*, v. 39, p. 335, 1949.

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, 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, 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, p. 838, 1964.
- VAN SOEST, P.J. Nutritional ecology of the ruminant. *Cornell University Press, Ithaca, NY*, 2^a ed., 1994.
- VAN SOEST, P.J. and ROBERTSON, J.B. Systems of analysis for evaluating fibrous feeds. In: *STANDARDIZATION OF ANALYTICAL METHODOLOGY FOR FEEDS*. W.J. Pigden, C.C. Balch and M. Graham (Ed.), Canada, 1980. p. 128.
- VAN SOEST, P.J. and WINE, R.H. The determination of lignin and cellulose in acid-detergent fibre with permanganate. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, v. 51, p. 780, 1968.
- VILES JR., F.J.M SILVERMAN, L. Determination of starch and cellulose with anthrone. *Anal. Chem.*, v.21, p. 950, 1949.
- WADHWA, M.; SAIJPAUL, S.; MAKKAR, G.S.; ICHHPONANI, J.S. Effect of alkaline hydrogen peroxide treatment on the *in sacco* degradability of crop residues. *Ind. Journ. Anim. Sci.*, v. 63, p. 451-455, 1993.
- WHITEHEAD, D.L. and QUICKE, G.V. A comparison of six methods of estimating lignin in grass hay. *J. Sci. Food Agric.*, v. 15, p. 417, 1964.
- WHITMORE, F.W. Lignin-protein complex in cell walls of *Pinus elliotti*: amino acid constituents. *Phytochemistry*, v. 21, p. 315-318, 1982.

ZEIKUS, J.G. Fate of lignin and related aromatic substrates in anaerobic environments. In: *LIGNIN BIODEGRADATION: MICROBIOLOGY, CHEMISTRY, AND POTENTIAL APPLICATIONS*. T.K. Kirk; T. Higuchi and H. Chang (Ed.). Vol. I, p. 105. CRC Press, Boca Raton, FL. 1980.