

CAROLINA BARBOSA BACHA

**DETERMINAÇÃO DO TEOR DE LIGNINA EM AMOSTRAS DE GRAMÍNEAS AO LONGO DO
CRESCIMENTO ATRAVÉS DE TRÊS MÉTODOS ANALÍTICOS E IMPLICAÇÕES COM AS
EQUAÇÕES DE “CORNELL NET CARBOYDRATE AND PROTEIN SYSTEM”**

Pirassununga
2006

CAROLINA BARBOSA BACHA

**DETERMINAÇÃO DO TEOR DE LIGNINA EM AMOSTRAS DE GRAMÍNEAS AO LONGO DO
CRESCIMENTO ATRAVÉS DE TRÊS MÉTODOS ANALÍTICOS E IMPLICAÇÕES COM A
EQUAÇÃO DE “CORNELL NET CARBOYDRATE AND PROTEIN SYSTEM”**

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

Departamento:
Nutrição e Produção Animal

Área de concentração:
Nutrição Animal

Orientador:
Prof. Dr. Romualdo Shiguelo Fukushima

Pirassununga
2006

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.1704
FMVZ

Bacha, Carolina Barbosa

Determinação do teor de lignina em amostras de gramíneas ao longo do crescimento através de três métodos analíticos e implicações com as equações da "Cornell Net Carbohydrate and Protein System / Carolina Barbosa Bacha.- Pirassununga: C. B. Bacha, 2006.
109 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Nutrição e Produção Animal, 2006.

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

Orientador: Prof. Dr. Romualdo Shiguelo Fukushima.

1. Carboidrato. 2. Cornell. 3. Forragem. 4. Lignina em detergente ácido. 5. Lignina Klason. 6. Lignina permanganato de potássio I. Título.



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Comissão de Bioética

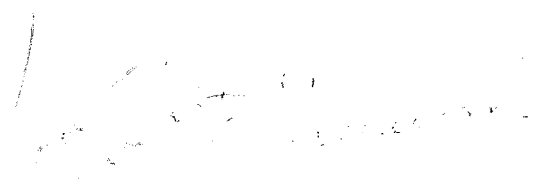
PARECER

Interessado: Carolina Barbosa Bacha

Assunto: Protocolo de experimentação adotado em experimento animal.

A Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, após analisar o projeto já executado e protocolado sob o número 871/2006, intitulado: “Implicações de métodos analíticos para lignina na determinação das frações de carboidratos de algumas plantas forrageiras tropicais”, no qual não foram utilizados animais e sim planta forrageira e preparação de parede celular, sob responsabilidade do Prof. Dr. Romualdo Shiguelo Fukushima, constatou que o mesmo foi realizado de acordo com os princípios de bioética, adotados por esta Comissão.

São Paulo, 24 de março de 2006


Prof. Dr. José Luiz Bernardino Merusse
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: BACHA, Carolina Barbosa

Título: **Determinação do teor de lignina em amostras de gramíneas ao longo do crescimento através de três métodos analíticos e implicações com as equações de “Cornell Net Carbohydrate and Protein System”**

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

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

*Aos meus pais Jussimara Bacha e Ricardo Bacha e ao meu
irmão Edmundo Bacha, eu dedico esta obra.*

Pelo carinho e pelo exemplo de família e respeito mútuo.

A Deus por me dar fé, coragem e sabedoria, para finalizar este trabalho e por me mostrar que nada na vida acontece por acaso.

Ao meu noivo André Fernando Freire pelo carinho, respeito, amor, companheirismo e paciência em todos os momentos que precisei.

A Polyana, minha amiga e minha irmã de alma pelo companheirismo e sincera amizade.

À Adriana Fuzeto, MEU MUITO OBRIGADO, pela imensa ajuda na realização deste trabalho. A você, Adriana, meu respeito e admiração.

À equipe do laboratório de lignina Ogna Fukushima e Zita, pelo apoio nos momentos de dificuldade que enfrentamos.

Ao meu amigo Felipe Borges (Fi) por toda amizade e ajuda para realização deste trabalho.

Muito obrigada de coração!

“Definitivamente nada no mundo é realização sem paixão”.

(autor desconhecido)

AGRADECIMENTOS

- ♥ Ao Prof. Dr. Romualdo Shiguelo Fukushima por ter me acolhido como orientada e pela confiança em mim depositada.
- ♥ A todos os docentes do Departamento de Nutrição e Produção Animal (VNP), em especial ao professor Aníbal Sant'Anna Moretti e ao professor Valdo Herling (FZEA) por toda amizade.
- ♥ Aos membros da FAPESP, pela concessão da bolsa de estudos e oportunidade da realização deste trabalho.
- ♥ À EMBRAPA GADO DE CORTE (CNPGC) pelas doações e condições de realizar este projeto.
- ♥ A Dra. Valéria Pacheco e ao Dr. Ademir Hugo Zimmer por todos pela amizade, paciência e ensinamentos a mim dedicados.
- ♥ Aos funcionários do VNP, em especial à Alessandra, Zequinha, Júnior, Cláudia e Maria por estarem sempre disponíveis a ajudar.
- ♥ Ao pessoal do fistulado, Gilmar e Emerson por estarem sempre prontos.
- ♥ A Cristiane e Emerson por todos os momentos de amizade e dificuldade que enfrentamos.
- ♥ A todos os colegas de mestrado do VNP, em especial ao Zé Ricardo Lobo, Felipe Borges, Raquel Helena, Abraão, Estelinha, Francine e Simone.
- ♥ Ao meu amigo (Brimo) Marcos pela amizade e paciência e toda ajuda.
- ♥ Ao Sr. Zeca, Dona. Lourdes e Silas por ter acolhido esta sua filha.
- ♥ E a todos aqueles que participaram de uma maneira ou outra, na realização deste projeto, meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

BACHA, C. B. **Determinação do teor de lignina em amostras de gramíneas ao longo do crescimento através de três métodos analíticos e implicações com as equações da “Cornell Net Carbohydrate and Protein System”**. [Grasses lignin content determination along their growth period through three analytical methods and implications with the Cornell Net Carbohydrate and Protein System equations]. 2006. 109f. Dissertação (Mestrado em Nutrição Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

Quantificou-se o teor de lignina em cinco amostras de plantas forrageiras, nas frações caule e folha, em quatro estádios de maturidade, através de três métodos analíticos: lignina detergente ácido (LDA), lignina permanganato de potássio (LPer) e lignina Klason (LK), todos de natureza gravimétrica. Os três métodos não foram concordantes entre si, sendo que para a maioria das amostras, o método LK mostrou valores mais elevados que os outros dois métodos, e o método LDA exibindo os menores valores. A fração caule exibiu teores mais elevados de lignina do que a folha; forrageiras maduras mostraram maiores concentrações de lignina do que plantas mais novas. Para quase todas as amostras, a digestibilidade *in vitro* da matéria seca foi negativamente correlacionada com os teores de lignina estimados pelos três métodos analíticos. O método LDA estimou razoavelmente bem a digestibilidade de forrageiras, seguindo-se a LPer. A LK não estimou bem a digestibilidade de gramíneas. Conclui-se que, nenhum dos três métodos foi totalmente satisfatório, sugerindo que a determinação analítica da lignina seja mais profundamente estudada. Este trabalho também quantificou as frações de carboidratos pelas equações da “Cornell Net Carbohydrate and Protein System (CNCPS)”. A utilização da preparação parede celular (PC) nas equações da CNCPS,

em substituição à fibra em detergente neutro (FDN), não proporcionou diferenças quanto aos teores de carboidratos de todas as frações. Porque foi realizada a comparação entre PC e FDN, foi descoberto que a equação da fração C, que estima os carboidratos indigeríveis da parede celular, pode ser simplificada, relacionando a fração indigerível em função do teor de lignina na matéria seca, e não em função da FDN, como é atualmente amplamente utilizado. Em outras palavras, o cálculo da fração indigerível da parede celular pode ser obtido independentemente da FDN isenta de cinzas e proteína. Como os valores da fração B₁ (amido e pectina) pelo sistema CNCPS foram menores em relação à determinação laboratorial e com base nos resultados obtidos pelo emprego da PC nas equações de Cornell, sugere-se que a fração B₂ seja destinada exclusivamente à pectina. E para os carboidratos digeríveis da parede celular, uma nova fração seja denominada, a B₃. Evidências colhidas na presente pesquisa sugerem que, pelas equações de Cornell, a pectina nunca esteve presente na fração B₁ e sim na fração A. Portanto, do conteúdo da fração A, dever-se-ia subtrair o valor da pectina. A fração C continuaria inalterada e a fração B₁ seria constituída apenas de amido.

Palavras-chave: Carboidratos. Cornell. Forragem. Lignina em detergente ácido.

Lignina Klason. Lignina permanganato de potássio.

ABSTRACT

BACHA, C. B. **Grasses lignin content determination along their growth period through three analytical methods and implications with the Cornell Net Carbohydrate and Protein System equations.** [Determinação do teor de lignina em amostras de gramíneas ao longo do crescimento através de três métodos analíticos e implicações com as equações da "Cornell Net Carbohydrate and Protein System"]. 2006. 109f. Dissertação (Mestrado em Nutrição Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

Lignin was quantified in five forage samples, in the fractions stem and leaf, at four maturity stages, through three analytical methods: acid detergent lignin (ADL), permanganate lignin (PerL) and Klason lignin (KL), all gravimetric procedures. The three techniques yielded different values for the same samples; in general, the KL method showed higher lignin concentrations than the two other methods, being the ADL which showed the lowest data. Stem fraction exhibited higher levels of lignin than leaf tissue; mature forages had higher concentrations of lignin than younger plants. For almost all the samples, lignin concentration was negatively correlated with the *in vitro* dry matter digestibility. The method ADL estimated reasonably well the digestibility of grasses, followed by PerL. The KL method was not a good predictor of digestibility of grasses. It was concluded that none of the three methods was totally satisfactory, suggesting that the analytical determination of lignin should be more deeply studied. This work also quantified the carbohydrate fractions through the Cornell Net Carbohydrate and Protein System (CNCPS). The utilization of crude cell wall instead of neutral detergent fiber in the CNCPS equations showed no differences in the estimates of all carbohydrate fractions. Because it was made a comparison between CW and NDF, it was discovered that the equation for the fraction C could be simplified where lignin expressed as a ratio of NDF, could be

described on dry matter basis and not on NDF basis as it is largely used nowadays. In another words, estimate of indigestible cell wall could be obtained independently of ash + protein-free NDF. Because estimates of B₁ fraction (starch and pectin) by means of CNCPS equations were lower than wet chemistry determinations and based on the results obtained by the substitution of NDF for PC in the Cornell equations, we suggest that B₂ fraction be allocated exclusively for pectin. And for the digestible cell wall carbohydrates a new fraction, B₃, be named. Evidences collected in the present experiment suggest that in the Cornell equations pectin was never part of B₁ fraction but present in the A fraction. Thus, from the content of fraction A, pectin must be subtracted. The fraction C would remain unaltered and the fraction B₁ would be constituted only by starch.

Key words: Acid detergent lignin. Carbohydrate. Cornell. Grasses. Klason lignin.
Potassium permanganate lignin.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Teores de lignina provenientes de três procedimentos analíticos em amostra de *Panicum maximum* cv. tanzânia em quatro estádios de maturidade. (A) Caule (B) Folha.....71
- Figura 2– Teores de lignina provenientes de três procedimentos analíticos em amostra de *Brachiaria brizantha* cv. MG5 em quatro estádios de maturidade. (A) Caule (B) Folha.....72
- Figura 3 – Teores de lignina provenientes de três procedimentos analíticos em amostra de *Brachiaria ruziziensis* em quatro estádios de maturidade. (A) Caule (B) Folha.....73
- Figura 4 – Teores de lignina provenientes de três procedimentos analíticos em amostra de *Brachiaria brizantha* cv. marandu em quatro estádios de maturidade. (A) Caule (B) Folha.....74
- Figura 5 – Teores de lignina provenientes de três procedimentos analíticos em amostra de *Brachiaria decumbens* cv. basilisk em quatro estádios de maturidade. (A) Caule (B) Folha.....75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Média \pm erro padrão da média dos teores de matéria seca (% material original) no caule e na folha das cinco amostras de forragens nos estádios de pré-florescimento, início do florescimento, total florescimento e avançada maturidade	49
Tabela 2 - Média \pm erro padrão da média dos teores de matéria mineral (%MS) no caule e na folha das cinco amostras de forragens nos estádios de pré-florescimento, início do florescimento, total florescimento e avançada maturidade	50
Tabela 3 – Média \pm erro padrão da média dos teores de proteína bruta (%MS) no caule e na folha das cinco amostras de forragens nos estádios de pré-florescimento, início do florescimento, total florescimento e avançada maturidade	51
Tabela 4 - Média \pm erro padrão da média dos teores de extrato etéreo (%MS) no caule e na folha das cinco amostras de forragens nos estádios de pré-florescimento, início do florescimento, total florescimento e avançada maturidade	52
Tabela 5 - Média \pm erro padrão da média dos teores de parede celular (%MS) no caule e na folha das cinco amostras de forragens nos estádios de pré-florescimento, início do florescimento, total florescimento e avançada maturidade	53
Tabela 6 - Média \pm erro padrão da média dos teores de fibra em detergente neutro (%MS) no caule e na folha das cinco amostras de forragens nos estádios de pré-florescimento, início do florescimento, total florescimento e avançada maturidade	54
Tabela 7- Média \pm erro padrão da média dos teores de fibra em detergente ácido (%MS) no caule e na folha das cinco amostras de forragens nos estádios de pré-florescimento, início do florescimento, total florescimento e avançada maturidade	54
Tabela 8- Média \pm erro padrão da média dos teores calculados de pectina (%MS) no caule e na folha das cinco amostras de forragens nos estádios de pré-florescimento, início do florescimento, total florescimento e avançada maturidade	56
Tabela 9 - Média \pm erro padrão da média dos teores de hemicelulose (%MS) no caule e na folha das cinco amostras de forragens nos estádios de pré-florescimento, início do florescimento, total florescimento e avançada maturidade	57
Tabela 10 - Média \pm erro padrão da média dos teores de celulose (%MS) no caule e na folha das cinco amostras de forragens nos estádios de	

pré-florescimento, início do florescimento, total florescimento e avançada maturidade	58
Tabela 11 – Valores dos teores de amido (%MS) no caule e na folha das cinco amostras de forragens nos estádios de pré-florescimento, início do florescimento, total florescimento e avançada maturidade	59
Tabela 12 – Valores dos carboidratos totais (%MS) no caule e na folha das cinco amostras de forragens nos estádios de pré-florescimento, início do florescimento, total florescimento e avançada maturidade.....	60
Tabela 13 – Valores dos carboidratos não-estruturais (%MS) no caule e na folha das cinco amostras de forragens nos estádios de pré-florescimento, início do florescimento, total florescimento e avançada maturidade	62
Tabela 14– Valores dos teores de fibra em detergente neutro isenta de cinzas (%MS) no caule e na folha das cinco amostras de forragens nos estádios de pré-florescimento, início do florescimento, total florescimento e avançada maturidade.....	63
Tabela 15 – Média \pm erro padrão da média dos teores de lignina (%MS), provenientes de três métodos analíticos, no caule e na folha de cinco forragens no estágio de pré-florescimento	65
Tabela 16– Média \pm erro padrão da média dos teores de lignina (%MS), provenientes de três métodos analíticos, no caule e na folha de cinco forragens no estágio de início de florescimento	66
Tabela 17– Média \pm erro padrão da média dos teores de lignina (%MS), provenientes de três métodos analíticos, no caule e na folha de cinco forragens no estágio de total florescimento.....	67
Tabela 18 – Média \pm erro padrão da média dos teores de lignina (%MS), provenientes de três procedimentos analíticos, no caule e na folha das cinco amostras de forragens no estágio de avançada maturidade....	68
Tabela 19– Média \pm erro padrão da média dos valores de digestibilidade <i>in vitro</i> da matéria seca (%MS) no caule e na folha das cinco amostras de forragens nos estádios de pré-florescimento, início do florescimento, total florescimento e avançada maturidade	76
Tabela 20– Correlação entre os teores de lignina obtidos pelos três métodos analíticos e a digestibilidade <i>in vitro</i> da matéria seca do caule e da folha das cinco amostras de forragens nos estádios de pré-florescimento, início do florescimento, total florescimento e avançada maturidade	78
Tabela 21– Valores da fração C dos carboidratos (%CHO) segundo o Sistema Cornell (CNCPS) e segundo a presente proposta (FMVZ-USP), utilizando a lignina LDA, no caule e na folha das cinco amostras de	

forragens nos estádios de pré-florescimento, início do florescimento, total florescimento e avançada maturidade.	81
Tabela 22– Valores da fração C dos carboidratos (%CHO) segundo o Sistema Cornell (CNCPS) e segundo a presente proposta (FMVZ-USP), utilizando a lignina LPer, no caule e na folha das cinco amostras de forragens nos estádios de pré-florescimento, início do florescimento, total florescimento e avançada maturidade.	82
Tabela 23 – Valores da fração C dos carboidratos (%CHO) segundo o Sistema Cornell (CNCPS) e segundo a presente proposta (FMVZ-USP), utilizando a lignina LK, no caule e na folha das cinco amostras de forragens nos estádios de pré-florescimento, início do florescimento, total florescimento e avançada maturidade.	83
Tabela 24 – Valores da fração B ₁ dos carboidratos (%CHO) segundo o Sistema Cornell (CNCPS) e segundo a presente proposta (FMVZ-USP) no caule e na folha das cinco amostras de forragens nos estádios de pré-florescimento, início do florescimento, total florescimento e avançada maturidade	90
Tabela 25 – Valores da fração B ₂ dos carboidratos (%CHO) segundo o Sistema Cornell (CNCPS) e segundo a presente proposta (FMVZ-USP) no caule e na folha das cinco amostras de forragens nos estádios de pré-florescimento, início do florescimento, total florescimento e avançada maturidade	94
Tabela 26– Valores da fração A dos carboidratos (%CHO) segundo o Sistema Cornell (CNCPS) e segundo a presente proposta (FMVZ-USP) no caule e na folha das cinco amostras de forragens nos estádios de pré-florescimento, início do florescimento, total florescimento e avançada maturidade	96

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 REVISÃO DE LITERATURA	22
2.1 PAREDE CELULAR	22
2.2 CARBOIDRATOS	23
2.2.1 Carboidratos fibrosos	24
2.2.2 Carboidratos não-fibrosos	26
2.2.3 O sistema detergente e as equações de Cornell	28
2.3 LIGNINA	33
2.3.1 Biossíntese da lignina	34
2.3.2 Importância da lignina	35
2.3.3 Métodos analíticos para quantificar os teores de lignina	38
3 MATERIAL E MÉTODO	43
3.1 MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS	43
3.2 ANÁLISES BROMATOLÓGICAS	44
3.3 DETERMINAÇÃO DA DIGESTIBILIDADE IN VITRO	45
3.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	46
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
4.1 COMPOSIÇÃO QUÍMICA	48
4.2 TEORES DE LIGNINA	64
4.3 DIGESTIBILIDADE IN VITRO	76
4.4 CORRELAÇÃO DOS TEORES DE LIGNINA COM A DIGESTIBILIDADE IN VITRO	77
5 AS EQUAÇÕES DA CORNELL NET CARBOHYDRATE AND PROTEIN SYSTEM	79
5.1 A EQUAÇÃO DA FRAÇÃO C	80
5.2 A EQUAÇÃO DA FRAÇÃO B ₁	87
5.3 A EQUAÇÃO DA FRAÇÃO B ₂	92
5.4 A EQUAÇÃO DA FRAÇÃO A	95
6 CONCLUSÃO	100
REFERÊNCIAS	101

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A pastagem é um componente importante para a produção de carne, leite, lã, peles, entre outros produtos de origem animal, que são alguns dos mais expressivos componentes do PIB agrícola brasileiro (ZIMMER; SILVA; MAURO, 2002).

A máxima produção de leite e de carne por animais ruminantes depende da adequada utilização de nutrientes e energia proveniente da alimentação. Para que isto ocorra é de fundamental importância a máxima utilização do potencial nutritivo dos alimentos concentrados e volumosos. Quanto aos alimentos volumosos, o principal obstáculo à digestão microbiana dos carboidratos da parede celular é a lignina (FUKUSHIMA; HATFIELD, 2001).

A lignina é um polímero fenólico formado por 3 ácidos: ácido p-coumárico, ácido ferúlico e ácido sinápico, que se interligam em uma malha complexa e resistente à hidrólise ácida e alcalina e a vários complexos enzimáticos, incluindo as enzimas microbianas e as tissulares dos animais (FUKUSHIMA; HATFIELD, 2003). Este polímero exerce grande influência sobre a taxa de degradação e a degradabilidade efetiva da parede celular dos alimentos volumosos (VAN SOEST, 1994), sendo um fator determinante do conteúdo de energia digestível das plantas forrageiras.

A determinação do conteúdo de lignina pode ser útil na estimativa da digestão da fibra (AKIN, et al., 1977; JUNG; VOGEL, 1986); entretanto, qualquer estimador de digestibilidade precisa ser quimicamente determinado com aceitáveis níveis de precisão e acurácia (FAICHNEY, 1975). Os métodos da lignina em detergente ácido (LDA) preconizado por Van Soest (1963), o da lignina permanganato de potássio (LPer) de Van Soest e Wine (1968) e o tradicional método da lignina Klason (LK)

(THEANDER; WESTERLUND, 1986), todos eles de natureza gravimétrica, podem nem sempre refletir o real valor da lignina. Por exemplo, o método LDA tipicamente subestima os teores de lignina devido à parcial solubilização da mesma na solução de detergente ácido (KONDO; MIZUNO; KATO, 1987). Apesar dos métodos LDA e LK basearem-se essencialmente na hidrólise ácida (solução de ácido sulfúrico a 72%) dos componentes da parede celular, exceto a lignina, estes têm produzidos resultados conflitantes para as mesmas amostras de plantas forrageiras (HATFIELD et al., 1994). Também valores de LDA e LK podem ser erroneamente determinados em função da presença de contaminantes insolúveis, por exemplo, a cutina (FUKUSHIMA, 1989). O conteúdo de lignina determinado pelo método LPer geralmente é mais elevado do que o obtido pela LDA (TRAXLER et al., 1998). Entretanto, contrariamente ao que é imputado ao método LDA, deve-se considerar que os teores de LPer podem estar artificialmente elevados, uma vez que outros componentes da parede celular (hemicelulose e pectina) podem ser atacados pela solução de permanganato de potássio, particularmente nas gramíneas imaturas (VAN SOEST; WINE, 1968). Além disso, parte da hemicelulose e alguns tecidos do mesófilo de *Festuca* sp. foram oxidados pela solução de permanganato (BARTON II; AKIN, 1977).

Resultados conflitantes para as mesmas amostras quando são empregados os três dos mais comuns métodos para lignina (LDA, LPer e LK), fortemente sugere que algum problema analítico esteja presente em algum dos métodos (FUKUSHIMA; HATFIELD, 2004). Estes métodos, embora relativamente fáceis, nem sempre fornecem dados seguros sobre o real teor de lignina. De acordo com Fukushima e Dehority (2000) e Hatfield et al. (1994) e, os métodos analíticos atualmente em uso não se tem mostrado satisfatórios. Embora vários métodos para quantificar os teores

de lignina, tenham sido desenvolvidos, estes apresentam várias limitações (VAN SOEST, 1967; KIRK; OBST, 1988).

Desta forma, os objetivos deste trabalho foram os de determinar os teores de lignina de algumas amostras de gramíneas ao longo de seu crescimento, através de três métodos analíticos e estudar as possíveis implicações que teriam com as equações que determinam as frações de carboidratos da “Cornell Net Carbohydrate and Protein System (CNCPS)”.

Também foram estudadas as possíveis implicações que poderiam existir na substituição da fibra em detergente neutro pela parede celular nestas mesmas equações. As equações da CNCPS para as estimativas de carboidratos (frações B₂ e C) incorporam a FDN como um dos seus constituintes. Como a FDN não é parede celular na íntegra, pois não contém pectina e alguns outros oligossacarídeos, pode-se especular que a substituição da FDN por uma preparação que espelhasse com maior fidelidade a parede celular, melhora as estimativas das frações B₂ e C. Contrastando com a FDN, a preparação parede celular bruta (PC) tem a vantagem de manter praticamente íntegra a parede celular vegetal.

REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

A revisão foi escrita abordando os três métodos analíticos: Lignina em Detergente Ácida, Lignina Permanganato de Potássio e Lignina Klason, assim como as equações de Cornell.

2.1 PAREDE CELULAR

Estimar a concentração de parede celular na forragem é de grande importância devido à sua grande participação na matéria seca, que pode variar de 25 a 85% e por estar correlacionada com o consumo e a digestibilidade da forragem. Porém menos que 50% desta fração é prontamente digerida pelo animal, assim, a parede celular é um fator controlador da qualidade das forragens. (BUXTON; HORNSTEIN, 1986; PATERSON; BELYEA; BOWMAN, 1994).

Segundo Hatfield (1992), a qualidade da planta forrageira está relacionada com a deposição de parede celular, tais como o teor e composição de carboidratos estruturais. O valor nutritivo das plantas forrageiras é determinado pela sua composição química, principalmente pelos teores de proteína bruta e dos componentes da parede celular, responsáveis diretos pela digestibilidade da matéria seca (EUCLIDES, 1995; NUSSIO; MANZANA; PEDREIRA, 1998).

A parede celular é composta de polissacarídeos estruturais como a celulose e a hemicelulose (PATERSON; BELYEA; BOWMAN, 1994). O aumento na concentração de parede celular durante o desenvolvimento da planta

particularmente o caule, resulta do espessamento das paredes primária e secundária, onde a concentração de pectina decresce enquanto a de celulose, hemicelulose e lignina aumentam (JUNG; ENGELS, 2002). Nas folhas, o aumento de parede celular é de menor magnitude (NELSON; MOSER, 1994), mesmo porque estas não tem função de sustentação da planta.

A parede celular é um dos principais responsáveis pela redução na degradabilidade dos tecidos das hastes de plantas forrageiras (JUNG; ENGELS, 2002). Isto é devido à deposição de lignina na parede celular, que aumenta conforme a planta amadurece (ALBRECHT; WEDIN; BUXTON, 1987) e segue uma concentração decrescente da base até topo da planta (BUXTON; HORNSTEIN, 1986; SMITH, 1970).

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

2.2 CARBOIDRATOS

No Brasil, as pastagens constituem importante fonte de energia para os ruminantes, por isso, tornam-se necessários o estudo e a caracterização dos carboidratos, uma das mais importantes, se não a mais importante, fonte de energia. Os carboidratos são amplamente distribuídos tanto nas plantas como nos animais, e podem ser divididos em carboidratos fibrosos e carboidratos não-fibrosos. Nas plantas são produzidos por fotossíntese, como por exemplo, a celulose e a hemicelulose que funcionam na estruturação física das plantas, e o amido que tem caráter de reserva energética. Estes compreendem os grupos de compostos que encerram as substâncias orgânicas mais abundantes da biosfera; além disso, constituem a principal fonte de energia para os primeiros níveis tróficos da teia alimentar (LEHNINGER; NELSON; COX, 1993).

2.2.1 Carboidratos fibrosos

Dentre os carboidratos, aqueles que constituem a parede celular vegetal, ou carboidratos fibrosos, representam as principais fontes de energia para os herbívoros. Os principais representantes são a celulose e a hemicelulose. Os animais herbívoros são os que apresentam maior eficiência de utilização da energia potencial química contida nessas estruturas, o que confere aos ruminantes domésticos papéis de destaque na alimentação e em outros usos para a humanidade (CHURCH, 1988; HOFMANN, 1988; e VAN SOEST, 1994).

Embora os carboidratos fibrosos não sejam digeridos pelas enzimas tissulares dos animais, eles são degradados pelas enzimas microbianas presentes no rúmen e no intestino grosso. Além disso, apresentam importante papel no trato gastrointestinal dos animais por formar o “lastro” da digesta e do bolo fecal.

De forma geral, os carboidratos estruturais (ou fibrosos, dependendo do ponto de vista do pesquisador) não são materiais com características nutricionais, químicas ou físicas uniformes (VAN SOEST; ROBERTSON; LEWIS, 1991). Estes apresentam vários padrões de complexidade que muitas vezes estão associados às ligações químicas com outras moléculas, como por exemplo, a lignina. Segundo vários pesquisadores, a molécula de lignina está intimamente associada aos carboidratos estruturais da parede celular, e por isso inibe acentuadamente a digestão da fibra por formar uma barreira física às enzimas microbianas (DEHORITY; JOHNSON; CONRAD, 1962).

À medida que a planta amadurece, ocorre diminuição da relação folha/caule e a proporção dos componentes potencialmente digestíveis (carboidratos solúveis, proteína, etc.) tende a decrescer, sendo que, por outro lado, a proporção de lignina, celulose e hemicelulose e outras frações indigestíveis (cutina, sílica, etc.) se eleva, resultando em menor digestibilidade da matéria seca (EUCLIDES, 1995).

A lignocelulose pode representar mais de 90% do peso da parede celular vegetal, sendo composta pelos polímeros celulose, hemicelulose e lignina, unidos fortemente entre si por forças não covalentes e ligações covalentes. Nas paredes celulares de tecidos vasculares de plantas terrestres superiores, as fibrilas de celulose estão localizadas em uma matriz amorfa de lignina e hemicelulose. A quantidade de cada um dos polímeros varia com a espécie e a idade da planta, bem

como entre as partes de uma planta. Em média, a lignocelulose é constituída de 45% de celulose, 30% de hemicelulose e 25% de lignina (GLASER; NIKAIDO, 1995).

A natureza estrutural da molécula de celulose, constituída de unidades D-glicose unidas por ligações tipo β -1,4 altamente ordenadas, confere característica estrutural à celulose, que dependendo do grau de ordenamento das fibras (estrutura cristalina), dificulta substancialmente o processo de hidrólise deste polímero. A resistência da celulose a processos de hidrólise é muitas vezes creditada mais à estrutura cristalina do que à existência da ligação tipo β -1,4 glicosídica. Algumas regiões menos ordenadas (amorfas) são mais sensíveis à hidrólise, sendo, portanto mais susceptíveis à ação das enzimas microbianas (CARPITA; GILBEAUT, 1993).

As hemiceluloses são macromoléculas, contendo os mais diversos tipos de açúcares (hexoses, pentoses, ácido urônicos, etc.) apresentando peso molecular menor do que a celulose. De acordo com o material lignocelulósico, as hemiceluloses podem ser classificadas como: xilanas, mananas, arabinoxilanas, arabinogalactanas e arabanos. Em madeiras duras e em uma gama de resíduos agroindustriais, o componente hemicelulósico apresenta alto conteúdo em xilanas unidas por ligações β -1,4 com ramificações com outros monossacarídeos (PEREIRA JR., 1999).

2.2.2 Carboidratos não-fibrosos

Dentre os carboidratos não-fibrosos, há aqueles presentes no conteúdo celular, tais como os açúcares simples. Estes açúcares são basicamente formados

por monossacarídeos e oligossacarídeos. Exemplos de monossacarídeos são a glicose, frutose, galactose, manose, xilose, ramnose, arabinose, fucose, etc. Os oligossacarídeos são constituídos por um número limitado de monossacarídeos, tais como a sacarose, rafinose, estaquiose, β -glucanos, etc. (DIETRICH; RIBEIRO; CHU, 1988). Estes, ao contrário dos carboidratos fibrosos, são rapidamente degradados pelos microrganismos ruminais.

Segundo Moore e Hatfield (1994), o amido e a pectina são os principais polissacarídeos não-estruturais. Muito embora Van Soest, Robertson e Lewis (1991) e outros autores tenham se referido à pectina como carboidrato não-estrutural, este ponto é controverso. Considerando-se que a pectina age como um material cimentante entre as lamelas e as paredes primária e secundária da parede celular, então é inquestionável que ela tem um papel estrutural. Estes também apresentam elevada taxa de degradação, mas mais lentos de serem degradados do que os carboidratos solúveis. Pelo fato da pectina ser uma fonte de carboidrato altamente digestível, presente principalmente nas leguminosas, é que alguns autores a classificaram como carboidrato não-estrutural, podendo ser alocada juntamente com os carboidratos solúveis do conteúdo celular (VAN SOEST, ROBERTSON; LEWIS 1991). A celulose e a hemicelulose apresentam baixo potencial de degradação em comparação com a pectina, mesmo em tempo ilimitado de incubação (BUXTON; BRASCHE, 1991).

O amido é um polissacarídeo de reserva energética das plantas superiores, fornecendo de 70 a 80% das calorias consumidas pelo homem. Os depósitos permanentes do amido nas plantas ocorrem nos órgãos de reserva (grãos, tubérculos e raízes). O amido constitui-se em grânulos compactados de amilose e amilopectina (CEREDA, 1989). É formado por moléculas de glicose ligadas entre si

através de numerosas ligações α (1,4), que são lineares, e poucas ligações α (1,6), que são pontos de ramificação. A hidrólise total do amido forma moléculas de glicose, enquanto a hidrólise parcial produz moléculas de maltose (PANDEY; SOCCOL, 2000). Independente de sua origem é tradicionalmente empregado nas indústrias alimentícias, metalúrgica, de mineração, de construção, cosmética, farmacêutica, de papel e papelão, têxtil, etc. (CEREDA, 1989).

2.2.3 O sistema detergente e as equações de Cornell

Os nutrientes contidos nas plantas forrageiras são aproveitados pelos animais ruminantes e convertidos em produtos destinados ao consumo humano. Para o máximo aproveitamento destes nutrientes, as plantas forrageiras precisam ser avaliadas quanto ao seu valor nutritivo.

Até a década de 60 aplicou-se o Sistema Proximal, também denominado de Weende ou fibra bruta; entretanto, este sistema ao longo do tempo, apresentou-se insatisfatório, por não reconhecer as diversas frações de carboidratos, com características de solubilidade e degradação distintas, e também por erros associados à metodologia (VAN SOEST, 1994). Na década de 60, pesquisadores da Universidade de Cornell, liderados por Peter Van Soest, propuseram a caracterização das plantas forrageiras em porção solúvel e não solúvel em soluções de detergentes. No caso do detergente cetiltrimetil amônio brometo, o resíduo insolúvel foi denominado de fibra em detergente ácido (FDA) (VAN SOEST, 1963).

Em se tratando do detergente lauril sulfato de sódio, a porção insolúvel foi denominada de fibra em detergente neutro (FDN) (VAN SOEST, 1967).

A FDN é amplamente utilizada pelos nutricionistas de ruminantes para diversas finalidades, incluindo-se a formulação de rações e estimativas do conteúdo energético e ingestão alimentar. A fração fibra detergente neutro (FDN) tem grande efeito sobre a ingestão voluntária de alimentos fornecidos aos animais ruminantes (MERTENS, 1994). Entretanto, a conceituação de FDN como sendo representativa da parede celular, é vista com restrições por alguns pesquisadores, uma vez que a solução de detergente neutro solubiliza a pectina, colocando-a dentro da fração solúvel. Segundo os preconizadores do sistema detergente, a pectina apesar de estar localizada na parede celular, pode ser incluída na fração que compreende o conteúdo celular, em função de sua elevada digestibilidade (VAN SOEST, 1994). Análises de alimentos ricos em pectina proporcionaram teores mais elevados de FDA em relação à FDN (VAN SOEST, ROBERTSON; LEWIS, 1991). Conseqüentemente, não raro, observam-se valores negativos quando se emprega a diferença algébrica $FDN - FDA$ para a estimativa do conteúdo de hemicelulose. Atualmente, a FDA é usada apenas como um material pré-extraído para as determinações de lignina pelos métodos gravimétricos lignina detergente ácido (VAN SOEST, 1963) e lignina permanganato de potássio (VAN SOEST; WINE, 1968). Ao contrário da FDN, a preparação parede celular (PC) proposta por Fukushima e Hatfield (2001) mantém praticamente íntegra a parede celular vegetal.

Como o sistema detergente continuava a não reconhecer as diversas frações de carboidratos, com características de solubilidade e degradação distintas, foi proposto o sistema “Cornell Net Carbohydrate and Protein System” (CNCPS) que avalia as frações protéicas e de carboidratos dos alimentos utilizando equações que

estimam a digestão e a passagem dessas frações, considerando a dinâmica da fermentação ruminal (FOX et al., 1992; RUSSEL et al., 1992; SNIFFEN, O'CONNOR; VAN SOEST, 1992). Segundo Coelho da Silva e Leão (1979), o fracionamento de carboidratos e proteínas é a melhor ferramenta para maximizar a eficiência microbiana, visto que as fontes de carboidratos representam energia e esqueleto carbônico para os microrganismos, enquanto que a proteína é fonte de nitrogênio.

No nível 2 da CNCPS, os carboidratos totais (CHO) são subdivididos em carboidratos estruturais e não-estruturais, que são estimados a partir de dados da FDN, corrigidos para os teores de cinzas e proteínas (FOX et al., 1992). O conteúdo de carboidratos totais pode ser estimado pela diferença:

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

Sniffen; O'connor; Van Soest (1992) propuseram o fracionamento dos carboidratos em quatro frações, considerando-se a disponibilidade nutricional e a taxa de degradação ruminal. Estas frações, com base no teor de CHO, são: A, B₁, B₂ e C.

Fração A - é rapidamente degradada no rúmen e é composta principalmente pelos carboidratos solúveis. A equação para a fração A é:

$$\text{A (\%CHO)} = [100 - \text{amido (\%CNE)}] \times [100 - \text{B}_2 - \text{C}] / 100$$

O amido é calculado em função dos carboidratos não-estruturais (CNE) e estes são constituídos pela somatória das frações A e B₁, que são solúveis na solução de detergente neutro, podendo ser expressos pela diferença:

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

No presente experimento, o valor da fração A foi calculado simplesmente pela diferença:

$$A (\%CHO) = 100 - (B_1 + B_2 + C)$$

Fração B₁ - é composta de amido e pectina, possuindo taxa de degradação superior à taxa de passagem. Esta fração é quantificada mediante a equação:

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

Recentemente, Queiroz et al.¹ (submetido para publicação) questionaram a inclusão da pectina na fração B₁, e então, propuseram que esta fração seja composta apenas pelo amido, ou seja, pela equação:

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

Pelas evidências apresentadas por estes autores, o presente experimento adotará para a fração B₁, o valor de amido determinado quimicamente na MS, sendo posteriormente convertido na base dos carboidratos totais.

As demais frações, B₂ e C, são ligadas à parede celular vegetal. A fração B₂ é composta pelos carboidratos estruturais da parede celular, e é de disponibilidade ruminal lenta, portanto susceptível aos efeitos da taxa de passagem. Pode ser quantificada mediante a equação:

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

Esta é uma equação um tanto quanto laboriosa. Muito embora um simples programa de computador possa solucionar a supracitada equação em segundos, estamos propondo neste trabalho a seguinte equação, que a nosso julgamento, ela não só é mais simples, mas pelo fato de empregar a preparação de parede celular (PC), ela espelha a partição dos diversos carboidratos com maior fidelidade:

$$B_2 (\%CHO) = PC (\%CHO) - \text{Pectina} (\%CHO) - C$$

¹ QUEIROZ, M. A. A., FUKUSHIMA, R. S., GOMIDE, C. A., BRAGA, M. R. Substitution of neutral detergent fibre for crude cell wall preparation in the Cornell Net Carbohydrate and Protein System suggests modifications in the equations that predict carbohydrate fractions. **Animal Science** (submetido para publicação).

Fração C - representa a parede celular indisponível, incluindo-se a lignina, e é calculada como:

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

As equações B₂ e C apresentam o termo lignina expresso na base da FDN isenta de cinzas e proteína e é multiplicado por um fator de correção igual a 2,4, proveniente do estudo de Chandler; Jewell; Gossett, (1980).

Queiroz et al.¹ (submetido para publicação) propuseram uma versão simplificada da equação C, na qual o termo lignina é expresso na base da matéria seca, ao invés da FDN isenta de cinzas e proteína:

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

É uma equação menos laboriosa, e os resultados são exatamente os mesmos que os obtidos empregando-se a equação C proposta pelos pesquisadores de Cornell. A constatação é que em nenhuma das novas equações propostas emprega-se o termo FDN. O aspecto prático é que não haveria mais a necessidade de se determinar o teor de FDN e muito menos o conteúdo de cinzas e proteína na FDN; existe apenas o requerimento da determinação do teor de parede celular.

Segundo Nocek e Russel (1988), a taxa de digestão do alimento no rúmen e, particularmente, o sincronismo entre a taxa de digestão das proteínas e dos carboidratos pode ter importante efeito sobre os produtos finais da fermentação e, conseqüentemente, sobre a produção animal. As equações da CNCPS dividem o ecossistema ruminal em microrganismos que fermentam carboidratos estruturais (carboidratos da parede celular) e os microrganismos que fermentam carboidratos não estruturais (amido, pectina, açúcares, etc.). A concentração destes carboidratos afetará diretamente a produção de proteína microbiana (RUSSEL et al., 1992).

Portanto, é de crucial importância a correta avaliação das frações de carboidratos.

¹QUEIROZ, M. A. A., FUKUSHIMA, R. S., GOMIDE, C. A., BRAGA, M. R. Substitution of neutral detergent fibre for crude cell wall preparation in the Cornell Net Carbohydrate and Protein System suggests modifications in the equations that predict carbohydrate fractions. **Animal Science** (submetido para publicação).

2.3 LIGNINA

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

O papel da lignina na limitação da degradação da parede celular é agravado pela insolubilidade deste polímero em diversos solventes, resistência a diversos agentes hidrolíticos, estrutura complexa e tamanho não definido, dificultando o seu isolamento e, portanto as análises qualitativa e quantitativa. A molécula da lignina apresenta estrutura condensada, com ligação covalente carbono-carbono e ligação do tipo éter, explicando porque este polímero é extremamente resistente à ação hidrolítica de ácidos e álcalis. Esta resistência tem também retardado o desenvolvimento de técnicas laboratoriais para quantificar este composto (VAN SOEST, 1967).

Depois da celulose, a lignina é o polímero orgânico mais abundante no mundo vegetal. Esta se encontra em estreita associação com os carboidratos da parede celular, formando um revestimento protetor da estrutura celulose-hemicelulose da célula e durante o crescimento da planta, aparentemente protege esta camada dos ataques bacterianos (NUNES, 1998).

O estudo da concentração de lignina é muito importante, porém Jung e Deetz (1993) citaram que a composição química poderia interferir e limitar a digestibilidade dos carboidratos da parede celular. Entretanto, os exatos mecanismos desta inibição

não estão totalmente elucidados. Por exemplo, as gramíneas apresentam menores concentrações de lignina que as leguminosas, e, no entanto a lignina de gramínea inibe mais acentuadamente a digestão (MOWAT; KWAIN; WINCH, 1969). Outro exemplo reside na constatação que forrageiras jovens, contendo baixas concentrações de lignina, um pequeno acréscimo na concentração de lignina acarreta em significativo efeito negativo na digestibilidade, enquanto que nas forrageiras maduras, que possuem elevados teores de lignina, com subsequente aumento na concentração de lignina, mostram pequenos decréscimos na digestibilidade (JUNG; VOGEL, 1986).

2.3.1 Biossíntese da lignina

A lignina é biossintetizada nas plantas vasculares em um complexo encadeado de reações, começando por CO_2 e H_2O , originando o ácido shikímico e prosseguindo via aminoácido aromático, a L-fenilalanina (SARKANEN; LUDWIG, 1971). A via do ácido shikímico é uma rota sintética que exige boro para alguns passos na síntese de fenol e, de acordo com Lewis (1980) a deficiência de boro nas plantas tem sido incriminada como causador de uma lignificação ineficiente.

A fenilalanina amônia-liase, que é uma enzima regulatória do metabolismo fenólico nas células vegetais, converte a fenilalanina no ácido cinâmico, um precursor do ácido p-coumárico (CAMM; TOWERS, 1973). As gramíneas são as únicas espécies vegetais que conseguem converter a L-tirosina, outro aminoácido aromático, para o ácido p-coumárico, numa reação catalisada pela enzima tirosina

amônia-liase; portanto, as gramíneas podem utilizar qualquer dos dois aminoácidos para confeccionar lignina (HIGUCHI; ITO; KAWAMURA, 1967).

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: os ácidos p-coumárico, ferúlico e sinápico. Uma polimerização enzimática destas unidades fenilpropanóides é o passo final da biossíntese da lignina pelas plantas, sendo que a relativa porcentagem de cada monômero fenólico dentro da molécula é dependente da origem filogenética do vegetal (SARKANEN; LUDWIG, 1971).

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

2.3.2 Importância da lignina

A parede celular das leguminosas contém aproximadamente duas vezes mais lignina do que a parede celular das gramíneas, mas ela é fermentada mais rapidamente do que gramíneas no mesmo estágio de crescimento. Embora gramíneas apresentem menores concentrações de lignina do que as leguminosas, a lignina de gramíneas é mais inibitória da digestão do que a lignina de leguminosa Jung (1989).

Supõe-se que a diferença seja resultante do maior teor de hemicelulose nas gramíneas, ou porque as respectivas ligninas sejam diferentes em suas

constituições de ácidos fenólicos (VAN SOEST, 1994). Ainda, deve-se considerar o arranjo espacial da lignina na parede celular, uma vez que a lignina de leguminosas tende a apresentar-se mais condensada (GORDON, 1975)

Outra possibilidade reside no método de determinação quantitativa da lignina; se as metodologias atualmente empregadas fornecem resultados contraditórios para uma mesma amostra, pode-se questionar a validade de certas afirmações baseadas em concentração de lignina, que foram feitas no passado.

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

Se, por outro lado, as concentrações de lignina foram corretamente determinadas, então se pode dizer que a associação exponencial entre teor de lignina e a digestibilidade da parede celular insinua que a lignina em parede celular imatura (com baixo teor de lignina) protege mais os carboidratos do que são protegidos na parede celular madura altamente lignificada (JUNG; VOGEL, 1986).

Usualmente constata-se forte correlação negativa entre estágio de maturidade e digestibilidade da matéria seca para a maioria das plantas forrageiras (VAN SOEST, 1994). À medida que as forrageiras amadurecem, aumenta o teor de parede celular em função do engrossamento da parede celular e ao decréscimo de relação folha: caule (BUXTON; HORNSTEIN, 1996), bem como maiores concentrações de

lignina na fração caule em relação à folha (HATFIELD et al., 1994). Corrobora com essa constatação, a observação de que a parede celular da fração caule apresentou valor de digestibilidade *in vitro* inferior à fração folha (FUKUSHIMA; SAVIOLI, 2001), se bem que é necessário levar-se em conta a observação de que a lignina presente no caule é possivelmente diferente daquela presente na folha (SAVIOLI; FUKUSHIMA, 2000). Não apenas a concentração de lignina aumenta com a maturidade, mas também existem indícios de que ocorrem modificações estruturais na molécula da lignina (FUKUSHIMA; DEHORITY, 2000). Assim a lignificação da parede celular tem uma correlação direta com decréscimo na digestibilidade dos polissacarídeos da parede celular. Deduz-se daí, a importância de se quantificar este polímero.

A distribuição e também a proporção destes monômeros obedece às características filogenéticas de cada um dos vegetais estudados. Por exemplo, madeiras duras possuem núcleos coniferífico e sinapílico na lignina em diferentes proporções, enquanto que as gramíneas possuem além destes núcleos, também unidades de p-coumarílicas. As ligninas das madeiras moles, como por exemplo, o pinheiro, apresenta praticamente 100% de sua composição apenas no núcleo coniferífico (FUKUSHIMA; HATFIELD, 2004).

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

2.3.3 Métodos analíticos para quantificar os teores de lignina

A determinação analítica da lignina pode ser realizada por dois métodos: gravimétrico e não gravimétrico. O método gravimétrico pode ser representado pelo procedimento lignina detergente ácido (LDA) preconizada por (VAN SOEST, 1963), pelo método lignina permanganato de potássio (LPer) descrito por (VAN SOEST; WINE, 1968) e o método Klason (LK) (THEANDER; WESTERLUND, 1986), porém estes métodos de natureza gravimétrica nem sempre refletem o real valor da lignina (FUKUSHIMA; HATFIELD, 2004).

Por exemplo, o método LDA tipicamente subestima os teores de lignina devido à parcial solubilização da mesma na solução de detergente ácido (KONDO; MIZUNO; KATO, 1987) ou então na solução de ácido sulfúrico 72% (HATFIELD et al., 1994; SHIMOJO; GOTO, 1984). No método LDA a perda de lignina, particularmente em gramíneas pode chegar até 50% (LOWRY et al., 1994). Apesar dos métodos LDA e Klason basearem-se essencialmente na hidrólise ácida dos componentes da parede celular, exceto a lignina, estes têm produzido resultados conflitantes para as mesmas amostras de plantas forrageiras (HATFIELD et al., 1994). Também valores de LDA e Klason podem ser erroneamente determinados em função da presença de contaminantes insolúveis, por exemplo, a cutina (FUKUSHIMA, 1989).

Van Soest (1963) empregou a solução de detergente ácido para obter uma preparação lignocelulósica isenta de proteína, a fibra em detergente ácido (FDA), objetivando tratá-la com ácido sulfúrico 72%, ao qual o autor denominou de lignina

detergente ácido. Van Soest objetivou procurar uma preparação isenta de proteína, uma vez que uma das principais críticas ao método KL, é a contaminação protéica no resíduo de lignina (WHITEHEAD; QUICKE, 1964). O método KL, largamente empregado para mensurar lignina em madeiras, usa a preparação parede celular bruta como substrato ao tratamento com ácido sulfúrico 72%. Entretanto, a parede celular de madeiras, e conseqüentemente a lignina, é livre de proteínas; porém a parede celular de plantas forrageiras, em especial leguminosas, apresenta altos teores de proteína, o que representa sérios obstáculos ao método LK (VAN SOEST, 1994). O tratamento da amostra com enzimas proteolíticas ajudaria a remover este material proteináceo, entretanto, o processo não é completamente eficiente (ARMITAGE; ASHWORTH; FERGUSON, 1948; SULLIVAN, 1959). Uma outra maneira para contornar esta interferência, seria a mensuração do conteúdo protéico e realização das devidas correções (THOMAS; ARMSTRONG, 1949).

A técnica da lignina permanganato caracteriza-se pela oxidação da molécula de lignina por uma solução concentrada de permanganato de potássio (VAN SOEST; WINE, 1968). O conteúdo de lignina determinado pelo método LPer geralmente é mais elevado do que o obtido pela LDA (TRAXLER et al., 1998). Entretanto, contrariamente ao que é imputado ao método LDA, deve-se considerar que os teores de LPer podem estar artificialmente elevados, uma vez que outros componentes da parede celular (hemicelulose e pectina) podem ser atacados pela solução de permanganato de potássio, particularmente nas gramíneas imaturas (VAN SOEST; WINE, 1968). Além disso, parte da hemicelulose e alguns tecidos do mesófilo de *Festuca sp.* foram oxidados pela solução de permanganato (BARTON II; AKIN, 1977). Partículas alimentares grandes não são uniformemente atingidas pelos reagentes, resultando em valores mais baixos para o composto em questão

(GOERING; VAN SOEST, 1970). Ainda assim, esta técnica é amplamente utilizada pelas indústrias de papel e celulose, onde a lignina presente em pastas não-branqueadas é oxidada pelo permanganato de potássio, sendo que o consumo deste reagente durante o processo fornece uma idéia do teor de lignina ainda presente na pasta celulósica.

A questão que se apresenta é qual seria o método analítico de escolha para quantificar o teor de lignina em produtos vegetais?

Não é uma pergunta com fácil resposta; para tentar responder, pelo menos em parte a esta questão, outros procedimentos analíticos são necessários. Por exemplo, pode-se lançar mão da análise quantitativa dos ácidos/aldeídos fenólicos individuais após a oxidação alcalina pelo nitrobenzeno (BILLA; TOLLIER; MONTIES, 1996; LAM; IYAMA; STONE, 1990), entretanto, este procedimento resulta em apenas parte dos monômeros que fazem parte da estrutura da lignina, exigindo correções matemáticas para estimar o total de fenóis que compõem a lignina (IYAMA; WALLIS, 1990). Fukushima e Hatfield (2001) quando oxidaram a lignina dioxana com nitrobenzeno, também não obtiveram a totalidade da lignina medida através da somatória dos seus constituintes individuais. Outro procedimento é a clivagem da lignina com brometo de acetila, mas também não hidrolisa a lignina na totalidade dos seus blocos constitutivos (LU; RALPH, 1997; LU; RALPH, 1998). A ressonância magnética nuclear é um instrumento analítico dos mais valiosos, fornecendo informações detalhadas e específicas sobre os componentes moleculares da lignina, e possíveis substâncias contaminantes (FUKUSHIMA; HATFIELD, 2003; RALPH et al., 1994;); entretanto, a técnica da ressonância é de caráter qualitativo ficando desta maneira limitado o seu emprego quando se deseja avaliação quantitativa do teor de lignina em produtos vegetais.

Possivelmente as melhores ferramentas coadjuvantes para auxiliar na determinação de um método analítico adequado, sejam os ensaios de digestibilidade (*in vivo*, *in vitro* ou *in situ*) através da correlação estatística (regressão) entre as variáveis teor de lignina medida pelos métodos analíticos e o valor obtido após fermentação por 96 h do produto vegetal com fluido ruminal. Neste projeto, a digestibilidade foi a *in vitro*, devido ao elevado número de amostras, ser de fácil execução e expressar com grande fidelidade os fenômenos observados nos experimentos de digestibilidade *in vivo* (REINHART; SUNVOLD, 1996). Como é do conhecimento geral, a lignina é obstáculo à degradação enzimática dos carboidratos estruturais da parede celular e essa relação é essencialmente linear e negativa (MERTENS, 1987). O grau de correlação existente entre a digestibilidade e o parâmetro sendo medido é muitas vezes empregado para avaliar procedimentos analíticos; se bem que o grau de correlação seja muitas vezes um critério insatisfatório, este índice reflete a praticidade de se obter a estimativa mais acurada do valor nutritivo a partir de dados da composição bromatológica (VAN SOEST; ROBERTSON, 1980). Entretanto, o grau de correlação para ser uma medida de valor, exige que a determinação química de um dado nutriente seja pelo menos satisfatória (FONNESBECK, 1976). A correlação tem sido empregada objetivando obter subsídios que possam dar sustentação a um método analítico mais adequado para a estimativa quantitativa da concentração de lignina (FUKUSHIMA; DEHORITY, 2000; FUKUSHIMA; SAVIOLI, 2001).

MATERIAL E MÉTODO

3 MATERIAL E MÉTODO

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

3.1 MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS

Foram ensaiadas cinco espécies vegetais, sendo três oriundas do Campo Agrostológico da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, e duas plantadas no Campo Agrostológico da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (sementes doadas pela Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS). O plantio das sementes foi realizado no mês de novembro de 2003, de acordo com as orientações específicas para cada espécie. O corte de nivelamento das espécies vegetais de ambos os campos agrostológicos foi realizado no dia 18 de janeiro de 2004. Após o nivelamento de 5 cm acima do solo, cada canteiro recebeu uma adubação de cobertura utilizando a formulação 20-05-20 (NPK) na quantidade de 300 g por canteiro, cada qual com 9 m².

As espécies forrageiras utilizadas foram: *Brachiaria decumbens* cv. basilisk, *Brachiaria ruziziensis*, *Brachiaria brizantha* cv. MG5, *Brachiaria brizantha* cv. Marandú e *Panicum maximum* cv. Tanzânia. As plantas foram colhidas em quatro estádios, contados em dias após o corte de uniformização, sendo: pré-florescimento

(entre 60 e 65 dias), início de florescimento (entre 75 e 90 dias), florescimento total (entre 87 e 107 dias) e estágio avançado de maturidade (entre 139 e 151 dias).

3.2 ANÁLISES BROMATOLÓGICAS

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

O material verde foi colhido e pesado; deste, foi retirada uma amostra para a determinação do teor de matéria seca, em estufa a 105°C. O restante foi desidratado em estufa de circulação forçada de ar, regulada a 65°C. Após secagem, até peso constante, as plantas foram divididas em “folha”(incluindo-se a bainha) e “caule” (flores e sementes não foram inclusas), moídas em moinho laboratorial Wiley munido de peneira 0,5 mm e posteriormente, acondicionadas em potes de vidro até o momento das análises e ensaios de digestibilidade.

Nestas amostras foram feitas as seguintes análises: matéria mineral (MM), proteína bruta (PB), extrato etéreo (EE), amido, pectina, fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente neutro livre de cinzas (FDNc), fibra em detergente ácido (FDA), lignina em detergente ácido (LDA), parede celular (PC) e parede celular livre de cinzas (PCc). As determinações de FDN, FDA e LDA foram realizadas segundo Van Soest, Robertson e Lewis (1991). A determinação da lignina permanganato de potássio (LPer), foi realizada de acordo com Van Soest e Wine (1968), e a determinação de lignina Klason foi realizada de acordo com Kirk e Obst (1988).

A PC foi determinada segundo o protocolo experimental proposto por Fukushima e Hatfield (2001). As análises de amido seguiram o procedimento descrito por Pereira e Rossi Júnior (1994), com prévia extração dos carboidratos solúveis (HENDRIX, 1993). A pectina foi determinada pela diferença PC – FDN, com as devidas precauções descritas por Queiroz et al. (submetido para publicação). As análises de PB foram realizadas pelo método micro-Kjeldahl (AOAC, 1990).

A hemicelulose (Hem) foi presuntivamente calculada pela diferença FDN - FDA. Os valores de Hem obtidos desta maneira devem ser encarados com ressalva, uma vez que a pectina interfere neste cálculo. O conteúdo de carboidratos totais (CHO) foi estimado pela diferença: $CHO (\%MS) = 100 - [PB (\%MS) + EE (\%MS) + MM (\%MS)]$ (SNIFFEN; O'CONNOR; VAN SOST, 1992).

As determinações das frações de carboidratos foram realizadas de duas maneiras: pelas equações propostas por Sniffen, O'connor e Van Sost (1992), que vêm a caracterizar uma das secções da “Cornell Net Carbohydrate and Protein System (CNCPS)” e pelas nossas equações, ao qual denominamos de equações da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP).

3.3 DETERMINAÇÃO DA DIGESTIBILIDADE IN VITRO

Possivelmente uma das melhores ferramentas coadjuvantes para auxiliar na caracterização de um método analítico adequado, seja a correlação estatística entre o ensaio de digestibilidade (*in vivo*, *in vitro* ou *in situ*) e o teor de lignina medido por

um determinado método analítico. Neste ensaio as amostras vegetais foram incubadas em solução mineral e líquido ruminal por 96 h; a seguir, as amostras foram digeridas em solução de pepsina por 48 h (TILLEY; TERRY, 1963). Na solução mineral foi empregada a técnica de aceleração de obtenção da anaerobiose do meio de cultura, pelo emprego de uma lâmpada incandescente de 100 Watts, preconizada por Fukushima, Weimer e Kunz (2002).

3.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados de lignina provenientes dos três métodos analíticos foram comparados utilizando-se o teste de Tukey, ao nível de significância de 5%, após análise de variância. Os dados foram testados pelo procedimento GLM, opção *slice*. Devido à existência de interação entre método analítico *versus* material vegetal *versus* parte vegetal, optou-se comparar as metodologias entre si, principal objetivo deste trabalho. Os teores de lignina foram correlacionados com os valores de digestibilidade. As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do pacote estatístico SAS (1985).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 COMPOSIÇÃO QUÍMICA

Como seria de se esperar, o teor de matéria seca (MS) das forrageiras aumentou à medida que se avançou no estágio de maturidade (Tabela 1). São várias as citações na literatura que confirmam esta observação (VAN SOEST, 1994). Este aumento do teor de MS deve-se particularmente ao incremento dos componentes estruturais da parede celular, o que é feito à custa dos carboidratos solúveis (CHURCH; POND, 1977). Nos dois últimos estágios de maturidade, o caule apresentou maior teor de MS em relação ao tecido foliar. Este é um fenômeno esperado, uma vez que o caule é estrutura de sustentação da planta, com importante função na fase reprodutiva da planta. A parede celular é composta de polissacarídeos estruturais como a celulose e a hemicelulose (PATERSON; BELYEA; BOWMAN, 1994), além da lignina e pectina. O aumento na concentração de parede celular durante o desenvolvimento da planta particularmente o caule, resulta do espessamento das paredes primária e secundária, onde a concentração de pectina decresce enquanto a de celulose, hemicelulose e lignina aumentam (JUNG; ENGELS, 2002). Nas folhas, o aumento de parede celular é de menor magnitude (NELSON; MOSER, 1994), mesmo porque estas não tem função de sustentação.

A parede celular altamente lignificada é responsável pela redução na degradabilidade das hastes de plantas forrageiras (JUNG; ENGELS, 2002). Isto é devido à deposição de lignina, que aumenta conforme a planta amadurece

(ALBRECHT; WEDIN; BUXTON, 1987) e segue uma concentração decrescente da base até topo da planta (BUXTON; HORNSTEIN, 1986; SMITH, 1970).

Tabela 1- Média \pm erro padrão da média dos teores de matéria seca (% material original) no caule e na folha das cinco amostras de forragens nos estádios de pré-florescimento, início do florescimento, total florescimento e avançada maturidade

Amostra	Pré	Início	Total	Avançada
<i>Panicum maximum</i> cv. tanzânia (caule)	19,21 \pm 0,15	20,10 \pm 0,25	27,85 \pm 0,64	34,11 \pm 1,08
<i>Panicum maximum</i> cv. tanzânia (folha)	20,12 \pm 1,11	21,70 \pm 0,44	25,32 \pm 0,56	32,24 \pm 1,19
<i>Brachiaria brizantha</i> cv. MG5 (caule)	19,10 \pm 0,16	20,06 \pm 0,32	24,19 \pm 0,08	31,44 \pm 1,28
<i>Brachiaria brizantha</i> cv. MG5 (folha)	21,16 \pm 0,51	20,00 \pm 0,48	23,14 \pm 0,13	29,18 \pm 0,76
<i>Brachiaria ruziziensis</i> (caule)	16,23 \pm 0,25	18,56 \pm 0,97	23,52 \pm 0,15	30,22 \pm 0,59
<i>Brachiaria ruziziensis</i> (folha)	17,35 \pm 0,28	19,10 \pm 0,22	21,16 \pm 0,66	28,19 \pm 0,61
<i>Brachiaria brizantha</i> cv. marandu (caule)	18,28 \pm 0,87	19,16 \pm 0,73	25,64 \pm 0,98	31,00 \pm 1,07
<i>Brachiaria brizantha</i> cv. marandu (folha)	19,70 \pm 0,09	20,12 \pm 0,66	23,18 \pm 0,13	29,17 \pm 0,19
<i>Brachiaria decumbens</i> cv. basilisk (caule)	17,14 \pm 0,43	18,22 \pm 1,29	23,15 \pm 1,17	30,00 \pm 0,87
<i>Brachiaria decumbens</i> cv. basilisk (folha)	18,17 \pm 0,32	19,62 \pm 0,09	22,10 \pm 0,23	29,88 \pm 0,83

O teor de matéria mineral foi mais elevado para as folhas (Tabela 2). Esta constatação pode ser explicada, em virtude da maioria das reações químicas acontecerem nas folhas, particularmente as reações de fotossíntese, e estas necessitarem de maiores concentrações de minerais. Aparentemente, não houve influência do estágio de maturidade na concentração de matéria mineral.

Tabela 2 - Média \pm erro padrão da média dos teores de matéria mineral (%MS) no caule e na folha das cinco amostras de forragens nos estádios de pré-florescimento, início do florescimento, total florescimento e avançada maturidade

Amostra	Pré	Início	Total	Avançada
<i>Panicum maximum</i> cv. tanzânia (caule)	4,64 \pm 0,05	4,23 \pm 0,03	4,56 \pm 0,02	4,22 \pm 0,02
<i>Panicum maximum</i> cv. tanzânia (folha)	3,32 \pm 0,04	7,67 \pm 0,10	8,77 \pm 0,06	7,99 \pm 0,08
<i>Brachiaria brizantha</i> cv. MG5 (caule)	4,97 \pm 0,04	2,78 \pm 0,04	2,33 \pm 0,04	2,58 \pm 0,04
<i>Brachiaria brizantha</i> cv. MG5 (folha)	7,57 \pm 0,11	6,70 \pm 0,03	6,85 \pm 0,05	5,71 \pm 0,12
<i>Brachiaria ruziziensis</i> (caule)	2,56 \pm 0,02	2,18 \pm 0,05	2,29 \pm 0,07	3,63 \pm 0,20
<i>Brachiaria ruziziensis</i> (folha)	6,88 \pm 0,05	5,76 \pm 0,08	5,75 \pm 0,13	8,06 \pm 0,27
<i>Brachiaria brizantha</i> cv. marandu (caule)	4,82 \pm 0,04	3,05 \pm 0,01	3,67 \pm 0,06	3,23 \pm 0,56
<i>Brachiaria brizantha</i> cv. marandu (folha)	7,57 \pm 0,10	6,08 \pm 0,03	6,56 \pm 0,03	7,03 \pm 0,10
<i>Brachiaria decumbens</i> cv. basilisk (caule)	7,23 \pm 0,02	7,53 \pm 0,22	4,93 \pm 0,05	3,35 \pm 1,13
<i>Brachiaria decumbens</i> cv. basilisk (folha)	7,81 \pm 0,05	8,65 \pm 0,33	7,50 \pm 0,01	7,43 \pm 0,11

Para a maioria das amostras, a concentração de PB diminuiu à medida que a planta envelheceu (Tabela 3). Esta constatação é do conhecimento geral, sendo reportado em livros-texto (CHURCH; POND, 1977). Por serem tecidos metabolicamente mais ativos, também as folhas apresentaram teores mais elevados de PB. No aspecto da produtividade animal, este fato tem conotação nutricional importante, uma vez que as folhas são preferencialmente ingeridas pelos animais herbívoros.

Tabela 3 – Média \pm erro padrão da média dos teores de proteína bruta (%MS) no caule e na folha das cinco amostras de forragens nos estádios de pré-florescimento, início do florescimento, total florescimento e avançada maturidade

Amostra	Pré	Início	Total	Avançada
<i>Panicum maximum</i> cv. tanzânia (caule)	5,64 \pm 0,10	5,81 \pm 0,10	2,91 \pm 0,06	2,29 \pm 0,00
<i>Panicum maximum</i> cv. tanzânia (folha)	11,18 \pm 0,24	9,68 \pm 0,00	7,22 \pm 0,08	5,72 \pm 0,08
<i>Brachiaria brizantha</i> cv. MG5 (caule)	4,58 \pm 0,09	3,25 \pm 0,06	2,11 \pm 0,00	1,86 \pm 0,09
<i>Brachiaria brizantha</i> cv. MG5 (folha)	8,71 \pm 0,04	8,18 \pm 0,07	7,13 \pm 0,05	5,28 \pm 0,00
<i>Brachiaria ruziziensis</i> (caule)	3,08 \pm 0,12	2,73 \pm 0,09	4,67 \pm 0,08	3,08 \pm 0,12
<i>Brachiaria ruziziensis</i> (folha)	7,75 \pm 0,06	6,25 \pm 0,09	9,50 \pm 0,00	9,77 \pm 0,09
<i>Brachiaria brizantha</i> cv. marandu (caule)	5,81 \pm 0,10	3,08 \pm 0,12	3,08 \pm 0,12	3,25 \pm 0,06
<i>Brachiaria brizantha</i> cv. marandu (folha)	10,12 \pm 0,09	8,01 \pm 0,10	7,31 \pm 0,04	6,16 \pm 0,12
<i>Brachiaria decumbens</i> cv. basilisk (caule)	5,19 \pm 0,10	3,24 \pm 0,06	3,96 \pm 0,08	2,73 \pm 0,06
<i>Brachiaria decumbens</i> cv. basilisk (folha)	11,35 \pm 0,14	7,13 \pm 0,06	8,10 \pm 0,00	6,69 \pm 0,08

Relativo ao conteúdo de EE, as amostras de gramíneas apresentaram relativamente baixos teores (Tabela 4) e sem definida tendência em função ao estágio de maturidade. Entretanto, da mesma maneira que observado para os nutrientes que precederam a este, as folhas apresentaram concentrações mais elevadas de EE. Provavelmente, a explicação mais plausível reside no fato das folhas serem tecidos metabolicamente mais ativos, com mais reações químicas se realizando, particularmente as reações fotossintéticas. A clorofila é um pigmento lipossolúvel, portanto, sendo quantificado na fração EE.

Tabela 4 - Média \pm erro padrão da média dos teores de extrato etéreo (%MS) no caule e na folha das cinco amostras de forragens nos estádios de pré-florescimento, início do florescimento, total florescimento e avançada maturidade

Amostra	Pré	Início	Total	Avançada
<i>Panicum maximum</i> cv. tanzânia (caule)	0,32 \pm 0,05	0,43 \pm 0,11	0,41 \pm 0,02	0,34 \pm 0,14
<i>Panicum maximum</i> cv. tanzânia (folha)	1,07 \pm 0,04	0,94 \pm 0,10	1,02 \pm 0,10	0,67 \pm 0,08
<i>Brachiaria brizantha</i> cv. MG5 (caule)	0,47 \pm 0,14	0,39 \pm 0,04	0,28 \pm 0,04	0,46 \pm 0,12
<i>Brachiaria brizantha</i> cv. MG5 (folha)	1,24 \pm 0,11	0,25 \pm 0,03	0,97 \pm 0,25	0,87 \pm 0,12
<i>Brachiaria ruziziensis</i> (caule)	0,24 \pm 0,12	0,25 \pm 0,05	0,38 \pm 0,07	0,38 \pm 0,15
<i>Brachiaria ruziziensis</i> (folha)	1,27 \pm 0,09	1,98 \pm 0,22	1,17 \pm 0,12	0,85 \pm 0,27
<i>Brachiaria brizantha</i> cv. marandu (caule)	0,43 \pm 0,12	0,39 \pm 0,12	0,36 \pm 0,16	0,33 \pm 0,20
<i>Brachiaria brizantha</i> cv. marandu (folha)	1,11 \pm 0,10	1,11 \pm 0,12	0,69 \pm 0,09	0,94 \pm 0,10
<i>Brachiaria decumbens</i> cv. basilisk (caule)	0,59 \pm 0,12	0,29 \pm 0,12	0,32 \pm 0,12	0,29 \pm 0,92
<i>Brachiaria decumbens</i> cv. basilisk (folha)	1,40 \pm 0,15	1,37 \pm 0,13	0,95 \pm 0,22	0,78 \pm 0,11

A parede celular (PC) representa cerca de 80% da MS. Portanto, nada mais lógico que os valores de PC seguissem as mesmas tendências que a concentração de MS, ou seja, à medida que a planta avançou no estágio de maturidade, houve incremento no valor de PC (Tabela 5). Também houve clara tendência de maiores rendimentos de PC nas plantas maduras em relação às jovens, nas frações caule e folha (SAVIOLI; FUKUSHIMA, 2000). No presente experimento, os valores de PC foram ao redor de 66 a 98%, que no geral foram mais elevados do que os valores obtidos por Savioli e Fukushima (2000), que observaram teores de 68 a 79% no caule e folha de diversas gramíneas, em dois estádios de maturidade.

Tabela 5 - Média \pm erro padrão da média dos teores de parede celular (%MS) no caule e na folha das cinco amostras de forragens nos estádios de pré-florescimento, início do florescimento, total florescimento e avançada maturidade

Amostra	Pré	Início	Total	Avançada
<i>Panicum maximum</i> cv. tanzânia (caule)	85,20 \pm 0,85	86,22 \pm 0,10	86,17 \pm 0,45	88,57 \pm 0,16
<i>Panicum maximum</i> cv. tanzânia (folha)	75,39 \pm 0,12	77,32 \pm 0,12	86,07 \pm 0,15	87,83 \pm 0,18
<i>Brachiaria brizantha</i> cv. MG5 (caule)	77,50 \pm 0,05	78,08 \pm 0,07	86,72 \pm 0,88	87,99 \pm 0,19
<i>Brachiaria brizantha</i> cv. MG5 (folha)	66,24 \pm 0,18	67,58 \pm 0,10	75,82 \pm 0,14	77,35 \pm 0,26
<i>Brachiaria ruziziensis</i> (caule)	85,55 \pm 0,09	88,22 \pm 0,10	89,01 \pm 0,23	90,32 \pm 0,22
<i>Brachiaria ruziziensis</i> (folha)	66,12 \pm 0,05	67,96 \pm 0,20	75,63 \pm 0,22	82,35 \pm 0,11
<i>Brachiaria brizantha</i> cv. marandu (caule)	85,97 \pm 0,09	88,33 \pm 0,28	89,68 \pm 0,36	90,02 \pm 0,44
<i>Brachiaria brizantha</i> cv. marandu (folha)	75,60 \pm 0,14	77,85 \pm 0,20	85,39 \pm 0,22	98,19 \pm 0,25
<i>Brachiaria decumbens</i> cv. basilisk (caule)	86,22 \pm 0,03	87,59 \pm 0,33	88,26 \pm 0,14	88,34 \pm 0,87
<i>Brachiaria decumbens</i> cv. basilisk (folha)	76,58 \pm 0,02	78,28 \pm 0,21	82,34 \pm 0,47	85,75 \pm 0,63

Similarmente, os caules exibiram teores maiores de PC. Savioli e Fukushima (2000) também reportaram que a fração caule mostrou rendimentos de PC de maior monta que a folha. O rendimento da PC foi superior aos valores apresentados pela fibra em detergente ácido e a fibra em detergente neutro.

Os teores de FDN variaram de 58,9 a 80,6% (Tabela 6), que correspondem bem com as observações de Malafaia, Valadares Filho e Vieira (1998) e Ribeiro, Pereira e Valadares Filho (2001). Note-se, entretanto, o registro de valores mais baixos de FDN no presente experimento, mas eles se devem à fração folha. Os supracitados autores analisaram gramíneas intactas, ou seja, englobando caule e folha. Para todas as plantas, a FDN mostrou valores mais elevados do que a FDA (Tabelas 6 e 7).

Tabela 6 - Média \pm erro padrão da média dos teores de fibra em detergente neutro (%MS) no caule e na folha das cinco amostras de forragens nos estádios de pré-florescimento, início do florescimento, total florescimento e avançada maturidade

Amostra	Pré	Início	Total	Avançada
<i>Panicum maximum</i> cv. tanzânia (caule)	77,39 \pm 0,54	78,73 \pm 0,17	77,76 \pm 0,40	77,85 \pm 0,61
<i>Panicum maximum</i> cv. tanzânia (folha)	67,81 \pm 0,08	69,51 \pm 0,09	71,21 \pm 0,14	71,57 \pm 0,35
<i>Brachiaria brizantha</i> cv. MG5 (caule)	76,85 \pm 0,31	76,93 \pm 0,07	77,42 \pm 0,13	79,45 \pm 0,22
<i>Brachiaria brizantha</i> cv. MG5 (folha)	65,44 \pm 0,45	67,85 \pm 0,09	68,58 \pm 0,10	68,52 \pm 0,26
<i>Brachiaria ruziziensis</i> (caule)	73,62 \pm 0,93	76,24 \pm 0,19	76,71 \pm 0,21	77,41 \pm 0,11
<i>Brachiaria ruziziensis</i> (folha)	59,97 \pm 0,81	60,43 \pm 0,20	62,94 \pm 1,70	63,79 \pm 0,44
<i>Brachiaria brizantha</i> cv. marandu (caule)	73,05 \pm 0,23	74,82 \pm 0,28	76,69 \pm 0,26	79,33 \pm 0,92
<i>Brachiaria brizantha</i> cv. marandu (folha)	62,66 \pm 0,13	65,00 \pm 0,33	66,56 \pm 0,28	68,19 \pm 0,18
<i>Brachiaria decumbens</i> cv. basilisk (caule)	77,46 \pm 0,70	79,61 \pm 0,17	79,14 \pm 0,17	80,64 \pm 0,19
<i>Brachiaria decumbens</i> cv. basilisk (folha)	58,90 \pm 1,18	63,96 \pm 0,23	65,03 \pm 0,22	65,73 \pm 0,30

Tabela 7- Média \pm erro padrão da média dos teores de fibra em detergente ácido (%MS) no caule e na folha das cinco amostras de forragens nos estádios de pré-florescimento, início do florescimento, total florescimento e avançada maturidade

Amostra	Pré	Início	Total	Avançada
<i>Panicum maximum</i> cv. tanzânia (caule)	52,03 \pm 0,15	53,18 \pm 0,15	54,91 \pm 0,25	56,38 \pm 0,64
<i>Panicum maximum</i> cv. tanzânia (folha)	37,67 \pm 1,08	38,94 \pm 0,71	39,31 \pm 0,15	42,76 \pm 0,18
<i>Brachiaria brizantha</i> cv. MG5 (caule)	50,78 \pm 1,43	52,30 \pm 0,08	53,74 \pm 0,31	54,37 \pm 0,39
<i>Brachiaria brizantha</i> cv. MG5 (folha)	36,56 \pm 0,17	37,53 \pm 1,02	39,32 \pm 0,13	47,66 \pm 0,20
<i>Brachiaria ruziziensis</i> (caule)	48,24 \pm 0,24	49,93 \pm 0,23	50,49 \pm 0,25	51,36 \pm 0,40
<i>Brachiaria ruziziensis</i> (folha)	30,99 \pm 0,32	32,23 \pm 0,17	32,31 \pm 1,11	33,19 \pm 0,19
<i>Brachiaria brizantha</i> cv. marandu (caule)	44,55 \pm 0,16	47,96 \pm 0,56	49,41 \pm 0,16	51,52 \pm 1,19
<i>Brachiaria brizantha</i> cv. marandu (folha)	32,05 \pm 2,68	35,32 \pm 1,28	35,78 \pm 1,39	39,94 \pm 0,12
<i>Brachiaria decumbens</i> cv. basilisk (caule)	49,25 \pm 0,48	50,12 \pm 1,42	51,33 \pm 0,52	51,87 \pm 0,22
<i>Brachiaria decumbens</i> cv. basilisk (folha)	31,58 \pm 0,08	32,23 \pm 0,08	35,11 \pm 0,21	38,37 \pm 0,83

Hatfield et al. (1994) registraram que amostras de folha continham menos fibra em detergente neutro (FDN) do que o caule e que o efeito da maturidade foi o de aumentar a concentração de FDN. Estas duas observações também foram constatadas no presente experimento. Já se sabe de longa data, que um dos efeitos da maturidade é o promover o engrossamento da matriz da parede celular, e conseqüentemente, o aumento de todos os componentes fibrosos da parede celular, como a PC, FDN, FDA, celulose, hemicelulose, etc.

Os valores de FDA do presente experimento variaram de aproximadamente 31 a 56% (Tabela 7). Valores também bem próximos aos reportados anteriormente (MALAFAIA; VALADARES FILHO; VIEIRA, 1998; RIBEIRO; PEREIRA; VALADARES FILHO, 2001).

Considerando que a preparação PC preserva a quase totalidade dos componentes da parede celular, enquanto que para a obtenção da FDN, a solução de detergente neutro remove as substâncias pécticas, oligossacarídeos (por exemplo, os β -glucanos) e ácidos orgânicos, é fácil assimilar a razão dos menores valores registrados para a FDN. Esta diferença foi variável entre as amostras estudadas, em torno de zero para a *Brachiaria brizantha* cv. MG5, tanto folha como caule, nos dois primeiros estádios. Mas, esta diferença chegou a 20 unidades percentuais na folha deste mesmo capim, no cultivar marandu, no último estágio de maturidade. Neste experimento, seguindo a recomendações e precauções contida em Queiroz et al. (submetido para publicação), estaremos estimando a pectina pela diferença $PC - FDN =$ "pectina inflacionada". Inflacionada, porque esta diferença comporta, além da pectina, alguns outros carboidratos de cadeia curta (oligossacarídeos), ácidos orgânicos, bem como parte da proteína e cinzas contidas

na matriz da parede celular. Os valores relativos à “pectina inflacionada” estão contidos na tabela 8.

Houve uma tendência do conteúdo de pectina elevar-se à medida que a gramínea envelheceu. Mas a influência da parte anatômica vegetal não pode ser claramente visualizada. É importante ressaltar que, dependendo do tecido vegetal sendo considerado, variações na concentração de ácidos orgânicos vão interferir nesta estimativa de pectina. Quando o conhecimento da concentração de pectina for importante, aconselha-se que ela seja determinada quimicamente.

Tabela 8- Média \pm erro padrão da média dos teores calculados de pectina (%MS) no caule e na folha das cinco amostras de forragens nos estádios de pré-florescimento, início do florescimento, total florescimento e avançada maturidade

Amostra	Pré	Início	Total	Avançada
<i>Panicum maximum</i> cv. tanzânia (caule)	7,81 \pm 0,33	7,49 \pm 0,17	8,41 \pm 0,40	10,72 \pm 0,41
<i>Panicum maximum</i> cv. tanzânia (folha)	7,58 \pm 0,10	7,81 \pm 0,11	14,86 \pm 0,14	16,26 \pm 0,25
<i>Brachiaria brizantha</i> cv. MG5 (caule)	0,05 \pm 0,18	1,15 \pm 0,10	9,30 \pm 0,73	8,54 \pm 0,22
<i>Brachiaria brizantha</i> cv. MG5 (folha)	0,80 \pm 0,33	0,0 \pm 0,00	7,24 \pm 0,12	8,83 \pm 0,26
<i>Brachiaria ruziziensis</i> (caule)	11,93 \pm 0,47	11,98 \pm 0,15	12,30 \pm 0,21	12,91 \pm 0,16
<i>Brachiaria ruziziensis</i> (folha)	6,15 \pm 0,23	7,53 \pm 0,20	12,69 \pm 0,96	18,56 \pm 0,34
<i>Brachiaria brizantha</i> cv. marandu (caule)	12,92 \pm 0,22	13,51 \pm 0,28	12,99 \pm 0,28	10,69 \pm 0,72
<i>Brachiaria brizantha</i> cv. marandu (folha)	12,94 \pm 0,13	12,85 \pm 0,21	18,83 \pm 0,24	30,0 \pm 0,17
<i>Brachiaria decumbens</i> cv. basilisk (caule)	8,76 \pm 0,52	7,98 \pm 0,22	9,12 \pm 0,17	7,70 \pm 0,16
<i>Brachiaria decumbens</i> cv. basilisk (folha)	17,68 \pm 0,96	14,32 \pm 0,19	17,31 \pm 0,32	20,02 \pm 0,32

A diferença observada entre o FDN e o FDA deve-se provavelmente à solubilização da hemicelulose, constituinte este que não está presente na fração

FDA, mas sim na FDN (GOERING; VAN SOEST, 1970). Portanto, os teores de hemicelulose podem ser obtidos pela diferença entre FDN e FDA (Tabela 9). Entretanto esses valores devem ser considerados presuntivos, uma vez que a FDA pode ainda apresentar resíduos de pentosanas (MORRISON, 1983). Por outro lado, deve-se atentar ao fato de que a FDN não apresenta pectina, enquanto que esta fração é presente na FDA (QUEIROZ et al.¹, submetido para publicação). Em outras palavras, para plantas ricas em pectina, a diferença FDN – FDA poderá não refletir o conteúdo de hemicelulose com fidelidade.

Tabela 9 - Média \pm erro padrão da média dos teores de hemicelulose (%MS) no caule e na folha das cinco amostras de forragens nos estádios de pré-florescimento, início do florescimento, total florescimento e avançada maturidade

Amostra	Pré	Início	Total	Avançada
<i>Panicum maximum</i> cv. tanzânia (caule)	25,36 \pm 0,34	25,55 \pm 0,16	22,85 \pm 0,32	21,47 \pm 0,33
<i>Panicum maximum</i> cv. tanzânia (folha)	30,14 \pm 0,58	30,57 \pm 0,40	31,90 \pm 0,16	28,81 \pm 0,27
<i>Brachiaria brizantha</i> cv. MG5 (caule)	26,07 \pm 0,87	24,63 \pm 0,08	23,68 \pm 0,23	25,08 \pm 0,35
<i>Brachiaria brizantha</i> cv. MG5 (folha)	28,88 \pm 0,31	30,32 \pm 0,55	29,26 \pm 0,13	20,86 \pm 0,43
<i>Brachiaria ruziziensis</i> (caule)	25,38 \pm 0,59	26,31 \pm 0,21	26,22 \pm 0,33	26,05 \pm 0,26
<i>Brachiaria ruziziensis</i> (folha)	28,98 \pm 0,57	28,20 \pm 0,18	30,63 \pm 0,91	30,60 \pm 0,32
<i>Brachiaria brizantha</i> cv. marandu (caule)	28,50 \pm 0,20	26,86 \pm 0,50	27,28 \pm 0,21	27,81 \pm 1,10
<i>Brachiaria brizantha</i> cv. marandu (folha)	30,61 \pm 1,41	29,68 \pm 0,81	30,78 \pm 0,84	28,25 \pm 0,16
<i>Brachiaria decumbens</i> cv. basilisk (caule)	28,21 \pm 0,59	29,49 \pm 0,80	27,81 \pm 0,34	28,77 \pm 0,21
<i>Brachiaria decumbens</i> cv. basilisk (folha)	27,32 \pm 0,63	31,73 \pm 0,16	29,92 \pm 0,22	27,35 \pm 0,63

Aparentemente não houve influência do estágio de maturidade nem da parte vegetal na concentração de hemicelulose. De acordo com Van Soest (1963), outra importante diferença existente entre FDN e FDA reside na preservação das frações

¹QUEIROZ, M. A. A., FUKUSHIMA, R. S., GOMIDE, C. A., BRAGA, M. R. Substitution of neutral detergent fibre for crude cell wall preparation in the Cornell Net Carbohydrate and Protein System suggests modifications in the equations that predict carbohydrate fractions. **Animal Science** (submetido para publicação).

protéicas na primeira; a solução de detergente ácido objetiva dissolver a proteína contida na parede celular com o detergente brometo cetil trimetilamônio. Uma desvantagem do método da lignina Klason é a mensuração da proteína como sendo lignina, problema particularmente sério para as leguminosas, que são mais ricas em proteína do que as gramíneas (HATFIELD et al., 1994). A intenção de Van Soest foi a de produzir um substrato, a FDA, mais adequado para a determinação quantitativa do teor de lignina, via hidrólise ácida com solução concentrada de ácido sulfúrico.

Os teores médios de celulose estão contidos na tabela 10. Como esperado, o conteúdo de celulose seguiu o padrão observado para a parede celular ou FDN. A celulose é o constituinte mais elevado na matriz da parede celular.

Tabela 10 - Média \pm erro padrão da média dos teores de celulose (%MS) no caule e na folha das cinco amostras de forragens nos estádios de pré-florescimento, início do florescimento, total florescimento e avançada maturidade

Amostra	Pré	Início	Total	Avançada
<i>Panicum maximum</i> cv. tanzânia (caule)	40,77 \pm 0,29	40,71 \pm 0,40	42,08 \pm 0,19	43,08 \pm 0,22
<i>Panicum maximum</i> cv. tanzânia (folha)	29,60 \pm 0,70	30,34 \pm 0,32	31,26 \pm 0,12	32,28 \pm 0,13
<i>Brachiaria brizantha</i> cv. MG5 (caule)	39,38 \pm 0,05	41,20 \pm 0,25	41,97 \pm 0,43	42,35 \pm 0,21
<i>Brachiaria brizantha</i> cv. MG5 (folha)	26,87 \pm 0,07	28,04 \pm 0,08	29,43 \pm 0,11	30,15 \pm 0,11
<i>Brachiaria ruziziensis</i> (caule)	37,95 \pm 0,15	38,26 \pm 0,18	38,65 \pm 0,11	38,91 \pm 1,18
<i>Brachiaria ruziziensis</i> (folha)	24,27 \pm 0,19	24,95 \pm 0,27	25,90 \pm 0,22	26,34 \pm 0,98
<i>Brachiaria brizantha</i> cv. marandu (caule)	34,20 \pm 0,12	35,23 \pm 0,50	37,84 \pm 0,33	41,84 \pm 0,16
<i>Brachiaria brizantha</i> cv. marandu (folha)	24,55 \pm 0,42	28,22 \pm 0,23	27,54 \pm 0,22	33,38 \pm 0,16
<i>Brachiaria decumbens</i> cv. basilisk (caule)	40,39 \pm 0,21	40,92 \pm 0,51	41,79 \pm 0,34	42,05 \pm 0,07
<i>Brachiaria decumbens</i> cv. basilisk (folha)	26,23 \pm 0,05	26,24 \pm 0,15	26,32 \pm 0,29	26,73 \pm 0,14

Este trabalho também determinou quimicamente a concentração de amido (Tabela 11). Muito embora o amido seja um constituinte minoritário na maioria das gramíneas tropicais, ele foi avaliado aqui em função das equações de Cornell que estimam as frações de carboidratos, particularmente as frações A e B₁.

Tabela 11 – Valores dos teores de amido (%MS) no caule e na folha das cinco amostras de forragens nos estádios de pré-florescimento, início do florescimento, total florescimento e avançada maturidade

Amostra	Pré	Início	Total	Avançada
<i>Panicum maximum</i> cv. tanzânia (caule)	0,03	0,00	0,00	0,00
<i>Panicum maximum</i> cv. tanzânia (folha)	0,00	0,10	0,05	0,05
<i>Brachiaria brizantha</i> cv. MG5 (caule)	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>Brachiaria brizantha</i> cv. MG5 (folha)	0,00	0,03	0,00	0,26
<i>Brachiaria ruziziensis</i> (caule)	0,10	0,08	0,00	0,08
<i>Brachiaria ruziziensis</i> (folha)	0,08	0,24	0,42	0,57
<i>Brachiaria brizantha</i> cv. marandu (caule)	0,00	0,00	0,13	0,00
<i>Brachiaria brizantha</i> cv. marandu (folha)	0,10	0,08	0,05	0,08
<i>Brachiaria decumbens</i> cv. basilisk (caule)	0,00	0,08	0,00	0,00
<i>Brachiaria decumbens</i> cv. basilisk (folha)	0,00	0,16	0,05	0,00

Várias amostras não exibiram teores de amido. Naquelas que mostraram alguma concentração, pode se observar substancial variabilidade. Entretanto, devido a peculiar maneira com que as concentrações de amido foram obtidas, não nos foi possível fazer uma estimativa do grau de variabilidade. Como esta situação é provavelmente decorrente da baixa concentração deste carboidrato na planta, e aliando-se ao fato de que muito provavelmente não teria qualquer impacto no valor

biológico da planta, pode-se admitir esta omissão. Ribeiro, Pereira e Valadares Filho, (2001) reportaram teores de amido em feno de capim tifton 85, com idades entre 28 e 56 dias, ligeiramente superiores aos reportados aqui, variando de 1,5 a 1,7% na MS.

Como no cálculo das frações de carboidratos pelas equações de Cornell é necessário o conhecimento da quantidade total de carboidratos (CHO) e dos carboidratos não-estruturais (CNE), nas tabelas 12 e 13 estão mostradas estes valores, respectivamente.

Tabela 12 – Valores dos carboidratos totais (%MS) no caule e na folha das cinco amostras de forragens nos estádios de pré-florescimento, início do florescimento, total florescimento e avançada maturidade

Amostra	Pré	Início	Total	Avançada
<i>Panicum maximum</i> cv. tanzânia (caule)	89,41	89,53	92,13	93,15
<i>Panicum maximum</i> cv. tanzânia (folha)	84,44	81,71	82,99	85,62
<i>Brachiaria brizantha</i> cv. MG5 (caule)	90,07	93,57	95,28	95,11
<i>Brachiaria brizantha</i> cv. MG5 (folha)	82,49	84,02	85,05	88,14
<i>Brachiaria ruziziensis</i> (caule)	94,12	94,84	92,68	92,96
<i>Brachiaria ruziziensis</i> (folha)	84,11	86,89	83,58	81,32
<i>Brachiaria brizantha</i> cv. marandu (caule)	88,94	93,49	92,89	93,18
<i>Brachiaria brizantha</i> cv. marandu (folha)	81,20	84,90	85,45	85,87
<i>Brachiaria decumbens</i> cv. basilisk (caule)	86,99	88,92	90,80	93,64
<i>Brachiaria decumbens</i> cv. basilisk (folha)	79,44	82,85	83,45	85,10

Os CHO representam a totalidade dos carboidratos, ou seja, a somatória dos carboidratos fibrosos e dos não-fibrosos. Nesta tabela e nas tabelas de carboidratos

não-estruturais e fibra em detergente neutro isenta de cinzas, não foram calculados os respectivos erros padrões da média, pois foram dados provenientes de outros dados, que apareceram em tabelas anteriores. No presente experimento, a concentração de CHO variou em torno de 80 a 95%, valores ligeiramente mais elevados que os descritos por Malafaia, Valadares Filho e Vieira, (1998) e Ribeiro, Pereira e Valadares Filho, (2001), que reportaram para algumas plantas forrageiras, valores variando de 74 a 85%.

Como já descrito anteriormente, os CHO são determinados segundo a seguinte fórmula, que aparece no trabalho de Sniffen, O'Connor e Van Soest, (1992):

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

Outra razão para o cálculo do CHO, é que este elemento é peça fundamental nas equações de Cornell, uma vez que as frações de carboidratos são descritos em termos de carboidratos totais.

Os valores dos carboidratos não-estruturais (CNE) aparecem na Tabela 13. As equações A e B₁ de Cornell expressam o conteúdo de amido em função de CNE. Já na nossa proposta, para o cálculo das frações A e B₁, não há a necessidade de se determinar o CNE, uma vez que o amido é expresso na MS.

A fórmula do cálculo do CNE é:

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

Em outras palavras, o CNE engloba os açúcares, amido, pectina e oligossacarídeos. Vale novamente ressaltar que alguns pesquisadores são de opinião contrária a este termo, preferindo denominar esta fração de carboidratos não-fibrosos.

Tabela 13 – Valores dos carboidratos não-estruturais (%MS) no caule e na folha das cinco amostras de forragens nos estádios de pré-florescimento, início do florescimento, total florescimento e avançada maturidade

Amostra	Pré	Início	Total	Avançada
<i>Panicum maximum</i> cv. tanzânia (caule)	12,02	11,13	15,15	16,22
<i>Panicum maximum</i> cv. tanzânia (folha)	17,76	13,54	13,96	16,73
<i>Brachiaria brizantha</i> cv. MG5 (caule)	10,62	16,81	18,16	16,04
<i>Brachiaria brizantha</i> cv. MG5 (folha)	16,57	16,59	17,64	21,26
<i>Brachiaria ruziziensis</i> (caule)	20,64	19,75	16,45	16,19
<i>Brachiaria ruziziensis</i> (folha)	24,46	26,46	21,96	19,26
<i>Brachiaria brizantha</i> cv. marandu (caule)	16,15	18,67	16,49	14,23
<i>Brachiaria brizantha</i> cv. marandu (folha)	19,17	20,67	19,86	19,05
<i>Brachiaria decumbens</i> cv. basilisk (caule)	9,80	9,60	12,10	13,62
<i>Brachiaria decumbens</i> cv. basilisk (folha)	21,45	19,91	19,47	20,80

Os valores de CNE variaram de 9,6 a 26,5% (Tabela 13), valores estes ligeiramente superiores aos descritos por Malafaia, Valadares Filho e Vieira, (1998) e Ribeiro, Pereira e Valadares Filho, (2001). A principal razão para explicar esta diferença provavelmente se deva à espécie e à idade da planta forrageira em questão. Um outro aspecto que deve ser observado é quanto à terminologia. Muito embora a presente pesquisa tenha usado o termo carboidrato não-estrutural para definir os açúcares, amido e pectina, o termo mais adequado seria carboidrato não-fibroso. Certamente os açúcares e o amido não têm função estrutural, mas sim energética; entretanto, a pectina funciona como uma substância cimentante entre as lamelas e os carboidratos celulose e hemicelulose da parede celular. Em outras

palavras, é indiscutível que a pectina é carboidrato estrutural, não só pertencendo à parede celular, mas auxiliando na sua própria estruturação.

Da mesma maneira que anteriormente justificado para outros compostos, optamos também por incluir uma tabela mostrando os valores de FDN isenta de cinzas (FDNc) (Tabela 14).

Idealmente, para aderir estritamente às equações de Cornell, dever-se-ia também determinar o teor de PB na FDN, para se obter a FDN isenta de cinzas e proteína. Entretanto, por dificuldades laboratoriais e também por que a concentração de PB na FDN é pequena, optou-se por empregar apenas a FDNc naquelas equações.

Tabela 14– Valores dos teores de fibra em detergente neutro isenta de cinzas (%MS) no caule e na folha das cinco amostras de forragens nos estádios de pré-florescimento, início do florescimento, total florescimento e avançada maturidade

Amostra	Pré	Início	Total	Avançada
<i>Panicum maximum</i> cv. tanzânia (caule)	77,39	78,4	76,98	76,93
<i>Panicum maximum</i> cv. tanzânia (folha)	66,68	68,17	69,03	68,89
<i>Brachiaria brizantha</i> cv. MG5 (caule)	79,45	76,76	77,12	79,07
<i>Brachiaria brizantha</i> cv. MG5 (folha)	65,92	67,43	67,41	66,88
<i>Brachiaria ruziziensis</i> (caule)	73,48	75,09	76,23	76,77
<i>Brachiaria ruziziensis</i> (folha)	59,65	60,43	61,62	62,06
<i>Brachiaria brizantha</i> cv. marandu (caule)	72,79	74,82	76,4	78,95
<i>Brachiaria brizantha</i> cv. marandu (folha)	62,03	64,23	65,59	66,82
<i>Brachiaria decumbens</i> cv. basilisk (caule)	77,19	79,32	78,7	80,02
<i>Brachiaria decumbens</i> cv. basilisk (folha)	57,99	62,94	63,98	64,3

Uma outra grande vantagem, a nosso ver, das equações que estão sendo propostas aqui, é que estas ao empregarem PC, são independentes da FDN. Não há a necessidade de se determinar FDN e muito menos os conteúdos de cinzas e proteína na FDN. Vale ressaltar que às vezes a determinação de FDN é extremamente laboriosa, principalmente se amostra contiver teores relativamente altos de amido. Este problema foi contornado com o emprego de uma amilase bacteriana termo-resistente, que é adicionada à solução de detergente neutro durante a extração (VAN SOEST; ROBERTSON; LEWIS, 1991). Também deixa de ter sentido a questão da presença de proteína na parede celular, que era tentativamente removida com o uso de sulfito de sódio (GOERING; VAN SOEST, 1970).

Aliás, a FDN teria sentido de ser conduzido apenas com a finalidade de se estimar a concentração aproximada de β -glucanos e outros oligossacarídeos da parede celular que são removidos da matriz da parede celular pela solução de detergente neutro, mas não pelo procedimento parede celular proposto por Fukushima e Hatfield (2001), que emprega essencialmente água quente e solventes neutros. O teor de pectina deve ser determinado quimicamente.

4.2 TEORES DE LIGNINA

Regra geral, todos os métodos utilizados para determinação dos teores de lignina nas amostras de forragens, em diferentes estádios de maturidade, apresentaram diferenças significativas ($P < 0,05$) entre si. As tabelas 15, 16, 17 e 18

contêm os dados de lignina de acordo com os diferentes métodos para as gramíneas nos estádios de pré-florescimento, início do florescimento, total florescimento e avançado estágio de maturidade, respectivamente.

O método da lignina detergente ácido (LDA) apresentou os menores teores de lignina para todas as amostras nos quatro estádios de maturidade analisados, tal fato vem corroborar com os resultados encontrados por Fuzeto (2003) e Fukushima e Hatfield (2004). Por exemplo, o método LDA tipicamente subestima os teores de lignina devido à parcial solubilização da mesma na solução de detergente ácido (KONDO, MIZUNO E KATO, 1987).

Tabela 15 – Média \pm erro padrão da média dos teores de lignina (%MS), provenientes de três métodos analíticos, no caule e na folha de cinco forragens no estágio de pré-florescimento

Amostra	LDA¹	LPer	LK
<i>Panicum maximum</i> cv. tanzânia (caule)	5,71 \pm 0,07 ^a	11,91 \pm 0,23 ^b	13,13 \pm 0,28 ^c
<i>Panicum maximum</i> cv. tanzânia (folha)	4,21 \pm 0,10 ^a	6,69 \pm 0,32 ^b	8,22 \pm 0,44 ^c
<i>Brachiaria brizantha</i> cv. MG5 (caule)	5,59 \pm 0,27 ^a	10,85 \pm 0,08 ^b	12,22 \pm 0,31 ^c
<i>Brachiaria brizantha</i> cv. MG5 (folha)	3,42 \pm 0,16 ^a	5,57 \pm 0,32 ^b	9,24 \pm 0,38 ^c
<i>Brachiaria ruziziensis</i> (caule)	6,45 \pm 0,15 ^a	12,53 \pm 0,33 ^b	13,75 \pm 0,63 ^c
<i>Brachiaria ruziziensis</i> (folha)	3,19 \pm 0,31 ^a	5,81 \pm 0,21 ^b	7,20 \pm 0,82 ^c
<i>Brachiaria brizantha</i> cv. marandu (caule)	4,68 \pm 0,18 ^a	9,76 \pm 0,38 ^b	11,92 \pm 0,29 ^c
<i>Brachiaria brizantha</i> cv. marandu (folha)	3,89 \pm 0,38 ^a	6,15 \pm 0,04 ^b	8,74 \pm 0,09 ^c
<i>Brachiaria decumbens</i> cv. basilisk (caule)	4,76 \pm 0,08 ^a	7,71 \pm 0,19 ^b	9,10 \pm 0,18 ^c
<i>Brachiaria decumbens</i> cv. basilisk (folha)	2,67 \pm 0,04 ^a	4,15 \pm 0,25 ^b	6,43 \pm 0,44 ^c

¹ LDA – lignina detergente ácido; LPer – lignina permanganato de potássio; LK – lignina Klason.

Ou então na solução de ácido sulfúrico 72% (HATFIELD et al., 1994; SHIMOJO; GOTO, 1984). No método LDA a perda de lignina, particularmente em gramíneas jovens pode chegar até 50% (LOWRY et al., 1994). Apesar dos métodos LDA e Klason basearem-se essencialmente na hidrólise ácida dos componentes da parede celular, exceto a lignina, estes têm produzido resultados conflitantes para as mesmas amostras de plantas forrageiras (HATFIELD et al., 1994). Também valores de LDA e Klason podem ser erroneamente determinados em função da presença de contaminantes insolúveis, por exemplo, a cutina (FUKUSHIMA, 1989).

Tabela 16– Média \pm erro padrão da média dos teores de lignina (%MS), provenientes de três métodos analíticos, no caule e na folha de cinco forragens no estágio de início de florescimento

Amostra	LDA¹	LPer	LK
<i>Panicum maximum</i> cv. tanzânia (caule)	7,77 \pm 0,13 ^a	13,19 \pm 0,16 ^b	15,55 \pm 0,12 ^c
<i>Panicum maximum</i> cv. tanzânia (folha)	4,68 \pm 0,01 ^a	6,69 \pm 0,32 ^b	9,02 \pm 0,44 ^c
<i>Brachiaria brizantha</i> cv. MG5 (caule)	7,40 \pm 0,47 ^a	13,12 \pm 0,35 ^b	14,10 \pm 0,23 ^c
<i>Brachiaria brizantha</i> cv. MG5 (folha)	3,95 \pm 0,04 ^a	6,55 \pm 0,13 ^b	10,12 \pm 0,14 ^c
<i>Brachiaria ruziziensis</i> (caule)	6,97 \pm 0,06 ^a	12,64 \pm 0,23 ^b	14,36 \pm 0,12 ^c
<i>Brachiaria ruziziensis</i> (folha)	3,42 \pm 0,31 ^a	6,22 \pm 0,29 ^b	8,40 \pm 0,95 ^c
<i>Brachiaria brizantha</i> cv. marandu (caule)	5,44 \pm 0,08 ^a	9,24 \pm 0,09 ^b	13,80 \pm 0,84 ^c
<i>Brachiaria brizantha</i> cv. marandu (folha)	3,17 \pm 0,06 ^a	6,82 \pm 0,04 ^b	9,21 \pm 0,92 ^c
<i>Brachiaria decumbens</i> cv. basilisk (caule)	6,99 \pm 0,18 ^a	10,40 \pm 0,14 ^b	11,95 \pm 0,92 ^c
<i>Brachiaria decumbens</i> cv. basilisk (folha)	2,87 \pm 0,17 ^a	4,85 \pm 0,21 ^b	7,45 \pm 0,64 ^c

¹ LDA – lignina detergente ácido; LPer – lignina permanganato de potássio; LK – lignina Klason.

Van Soest (1963) empregou a solução de detergente ácido para obter uma preparação lignocelulósica isenta de proteína, a fibra em detergente ácido (FDA), objetivando tratá-la com ácido sulfúrico 72%, ao qual o autor denominou de lignina detergente ácido. Van Soest procurou por uma preparação isenta de proteína, uma vez que uma das principais críticas ao método KL, é a contaminação protéica no resíduo de lignina (WHITEHEAD; QUICKE, 1964). O método KL, largamente empregado para mensurar lignina em madeiras, usa a preparação parede celular bruta como substrato ao tratamento com ácido sulfúrico 72%. Entretanto, a parede celular de madeiras, e conseqüentemente a lignina, é livre de proteínas.

Tabela 17– Média \pm erro padrão da média dos teores de lignina (%MS), provenientes de três métodos analíticos, no caule e na folha de cinco forragens no estágio de total florescimento

Amostra	LDA¹	LPer	LK
<i>Panicum maximum</i> cv. tanzânia (caule)	10,26 \pm 0,22 ^a	13,45 \pm 0,25 ^b	17,34 \pm 0,12 ^c
<i>Panicum maximum</i> cv. tanzânia (folha)	5,08 \pm 0,29 ^a	7,12 \pm 0,18 ^b	10,12 \pm 0,10 ^c
<i>Brachiaria brizantha</i> cv. MG5 (caule)	8,42 \pm 0,17 ^a	13,68 \pm 0,28 ^b	16,97 \pm 0,43 ^c
<i>Brachiaria brizantha</i> cv. MG5 (folha)	5,19 \pm 0,05 ^a	8,79 \pm 0,27 ^b	12,14 \pm 0,10 ^c
<i>Brachiaria ruziziensis</i> (caule)	7,87 \pm 0,06 ^a	13,97 \pm 0,33 ^b	16,96 \pm 0,14 ^c
<i>Brachiaria ruziziensis</i> (folha)	4,00 \pm 0,31 ^a	6,35 \pm 0,36 ^b	10,23 \pm 0,77 ^c
<i>Brachiaria brizantha</i> cv. marandu (caule)	5,78 \pm 0,06 ^a	11,45 \pm 0,22 ^b	14,71 \pm 0,88 ^c
<i>Brachiaria brizantha</i> cv. marandu (folha)	3,97 \pm 0,32 ^a	7,90 \pm 0,34 ^b	10,70 \pm 0,92 ^c
<i>Brachiaria decumbens</i> cv. basilisk (caule)	7,50 \pm 0,38 ^a	12,86 \pm 0,08 ^b	13,03 \pm 0,71 ^c
<i>Brachiaria decumbens</i> cv. basilisk (folha)	4,80 \pm 0,31 ^a	5,88 \pm 0,44 ^b	8,18 \pm 0,42 ^c

¹ LDA – lignina detergente ácido; LPer – lignina permanganato de potássio; LK – lignina Klason.

Porém, não é o caso da parede celular de plantas forrageiras, em especial leguminosas, apresenta altos teores de proteína, o que representa sérios obstáculos ao método LK (VAN SOEST, 1994). O tratamento da amostra com enzimas proteolíticas ajudaria a remover este material proteináceo, entretanto, o processo não é completamente eficiente (ARMITAGE et al., 1948; SULLIVAN, 1959). Uma outra maneira para contornar esta interferência, seria a mensuração do conteúdo protéico e realização das devidas correções (THOMAS; ARMSTRONG, 1949).

Tabela 18 – Média \pm erro padrão da média dos teores de lignina (%MS), provenientes de três procedimentos analíticos, no caule e na folha das cinco amostras de forragens no estágio de avançada maturidade

Amostra	LDA¹	LPer	LK
<i>Panicum maximum</i> cv. tanzânia (caule)	10,52 \pm 0,36 ^a	16,81 \pm 0,14 ^b	19,62 \pm 0,36 ^c
<i>Panicum maximum</i> cv. tanzânia (folha)	5,45 \pm 0,48 ^a	11,29 \pm 0,30 ^b	12,93 \pm 0,35 ^c
<i>Brachiaria brizantha</i> cv. MG5 (caule)	8,89 \pm 0,10 ^a	14,28 \pm 0,09 ^b	18,36 \pm 0,43 ^c
<i>Brachiaria brizantha</i> cv. MG5 (folha)	5,49 \pm 0,34 ^a	10,01 \pm 0,19 ^b	14,46 \pm 0,44 ^c
<i>Brachiaria ruziziensis</i> (caule)	9,43 \pm 0,35 ^a	14,15 \pm 0,48 ^b	19,30 \pm 0,08 ^c
<i>Brachiaria ruziziensis</i> (folha)	5,98 \pm 0,19 ^a	6,86 \pm 0,21 ^b	12,88 \pm 0,19 ^c
<i>Brachiaria brizantha</i> cv. marandu (caule)	9,18 \pm 0,25 ^a	13,82 \pm 0,28 ^b	16,86 \pm 0,82 ^c
<i>Brachiaria brizantha</i> cv. marandu (folha)	4,64 \pm 0,22 ^a	8,69 \pm 0,06 ^b	11,84 \pm 0,77 ^c
<i>Brachiaria decumbens</i> cv. basilisk (caule)	9,29 \pm 0,32 ^a	16,13 \pm 0,51 ^b	15,84 \pm 0,66 ^c
<i>Brachiaria decumbens</i> cv. basilisk (folha)	5,61 \pm 0,39 ^a	8,24 \pm 0,36 ^b	9,78 \pm 0,92 ^c

¹ LDA – lignina detergente ácido; LPer – lignina permanganato de potássio; LK – lignina Klason.

A técnica da lignina permanganato caracteriza-se pela oxidação da molécula de lignina por uma solução concentrada de permanganato de potássio (VAN

SOEST; WINE, 1968). O conteúdo de lignina determinado pelo método LPer geralmente é mais elevado do que o obtido pela LDA (TRAXLER et al., 1998). Neste experimento também foi observado este mesmo acontecimento. Entretanto, contrariamente ao que é imputado ao método LDA, deve-se considerar que os teores de LPer podem estar artificialmente elevados, uma vez que outros componentes da parede celular (hemicelulose e pectina) podem ser atacados pela solução de permanganato de potássio, particularmente nas gramíneas imaturas (VAN SOEST; WINE, 1968). Além disso, parte da hemicelulose e alguns tecidos do mesófilo de *Festuca sp.* foram oxidados pela solução de permanganato (BARTON II; AKIN, 1977). Partículas alimentares grandes não são uniformemente atingidas pelos reagentes, resultando em valores mais baixos para o composto em questão (GOERING; VAN SOEST, 1970). Compostos fenólicos residuais (como os taninos, flavonóides) podem ser atacados pelo permanganato (VAN SOEST; WINE, 1968).

Ainda assim, esta técnica é amplamente utilizada pelas indústrias de papel e celulose, onde a lignina presente em pastas não-branqueadas é oxidada pelo permanganato de potássio, sendo que o consumo deste reagente durante o processo fornece uma idéia do teor de lignina ainda presente na pasta celulósica.

Os maiores valores de lignina foram apresentados pelo método de lignina Klason (Tabelas 15, 16, 17 e 18). Este fato também foi observado por Hatfield et al. (1994), onde os teores de lignina observados em LK foram cerca de 2 a 3 vezes maiores que os de LDA, para as mesmas amostras de forragens.

Como já anteriormente mencionado, a principal limitação do método LK para forragens é a inclusão de proteínas no resíduo insolúvel, resultando em altos valores de lignina (LAI; SARKANEM, 1971; VAN SOEST, 1967). De acordo com Hatfield et

al. (1994), o teor de nitrogênio nos resíduos de LK foi sempre maior do que nos de LDA.

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

De acordo com a literatura vigente, a concentração de lignina aumenta à medida que as plantas forrageiras amadurecem, bem como o teor de lignina é maior no caule do que na folha. Tal observação pode ser constatada graficamente neste trabalho (Figuras 1, 2, 3, 4 e 5). Fukushima e Savioli (2001) também encontraram maiores teores de lignina no caule em relação à folha, quando empregaram três técnicas de quantificação da lignina. Note-se que, independentemente do método empregado para quantificar os teores de lignina nas amostras, os teores deste polímero aumentaram à medida que se avançou o estágio de maturidade das espécies forrageiras.

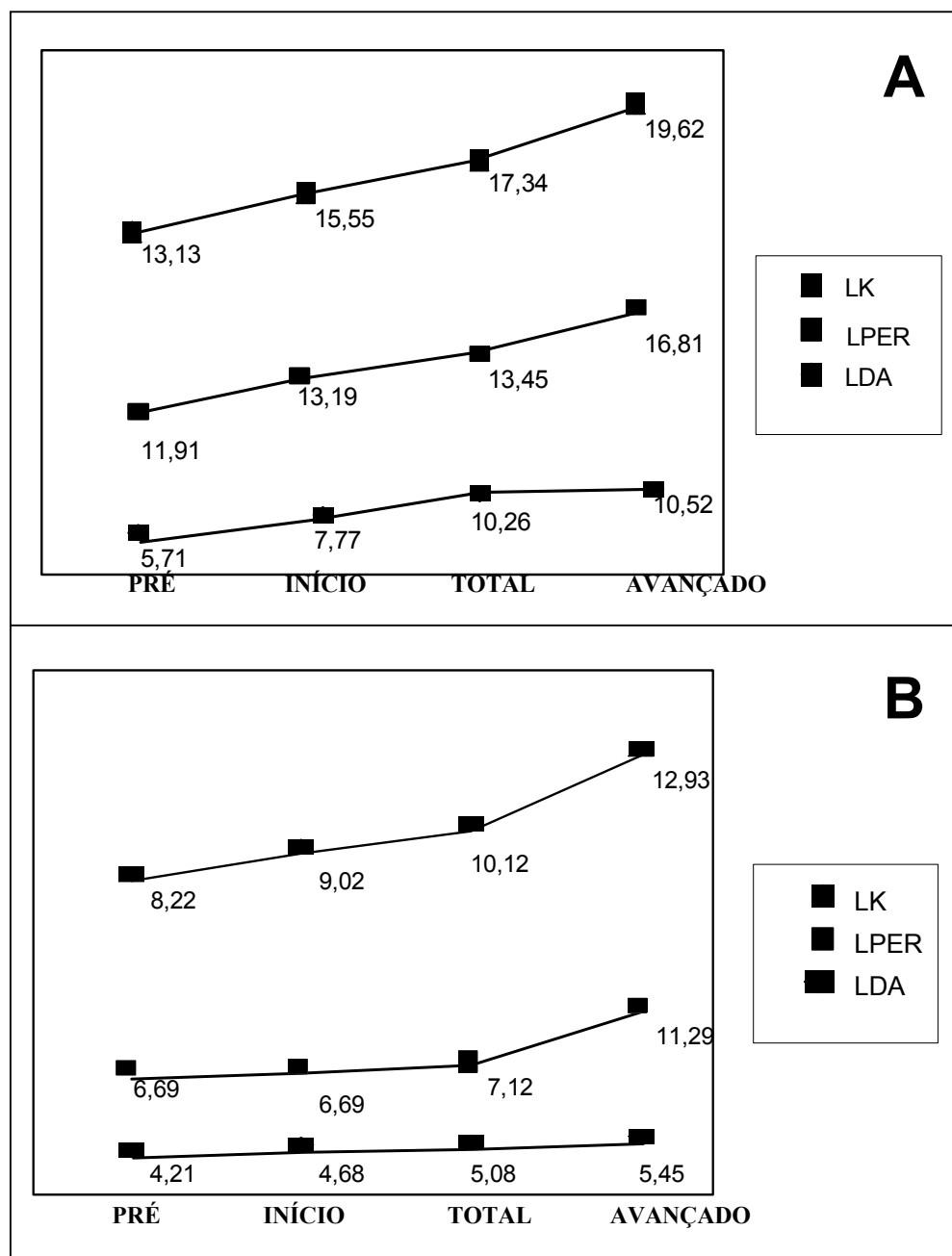


Figura 1 – Teores de lignina provenientes de três procedimentos analíticos em amostra de *Panicum maximum* cv. tanzânia em quatro estádios de maturidade. (A) Caule (B) Folha

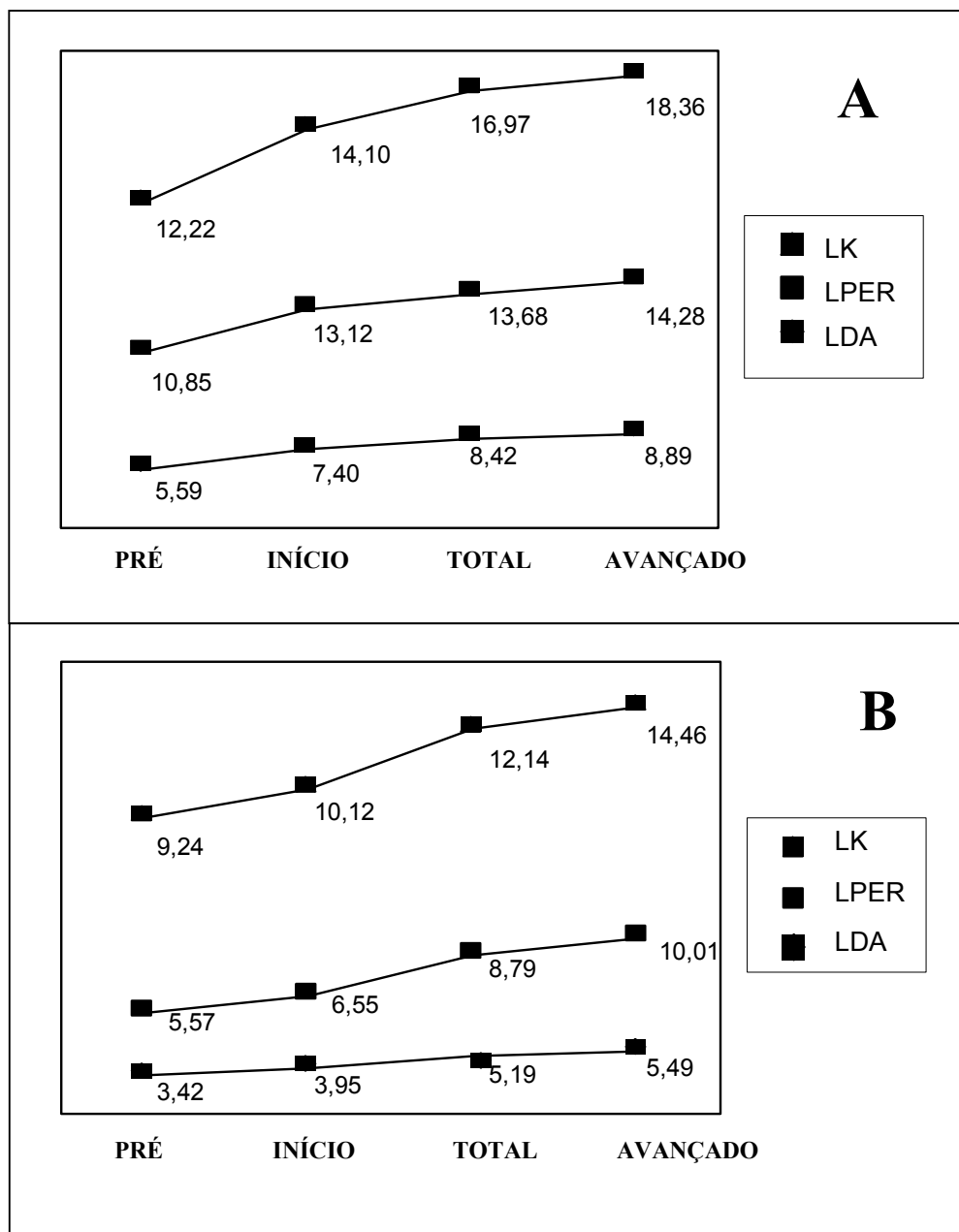


Figura 2– Teores de lignina provenientes de três procedimentos analíticos em amostra de *Brachiaria brizantha* cv. MG5 em quatro estádios de maturidade. (A) Caule (B) Folha

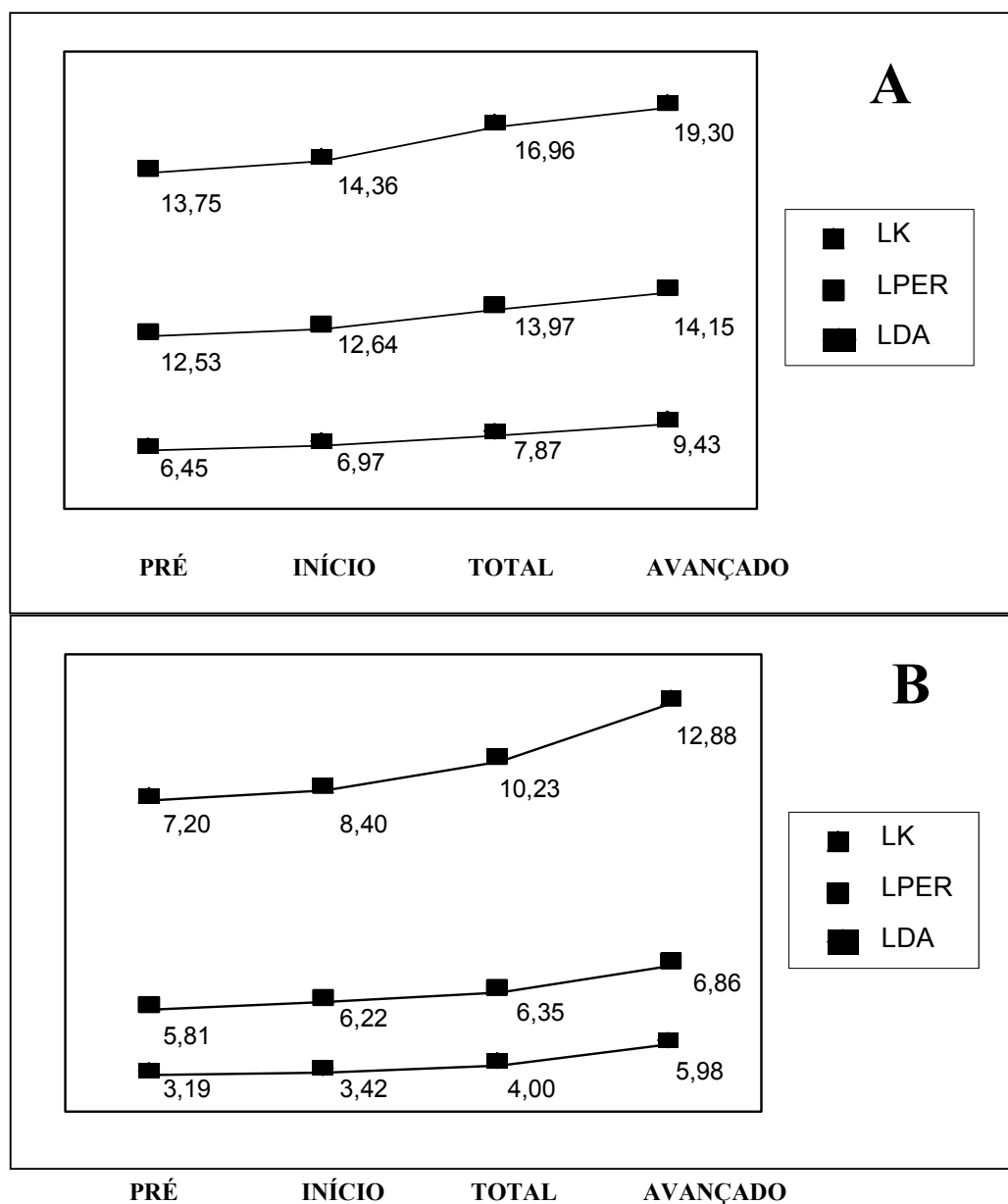


Figura 3 – Teores de lignina provenientes de três procedimentos analíticos em amostra de *Brachiaria ruziziensis* em quatro estádios de maturidade. (A) Caule (B) Folha

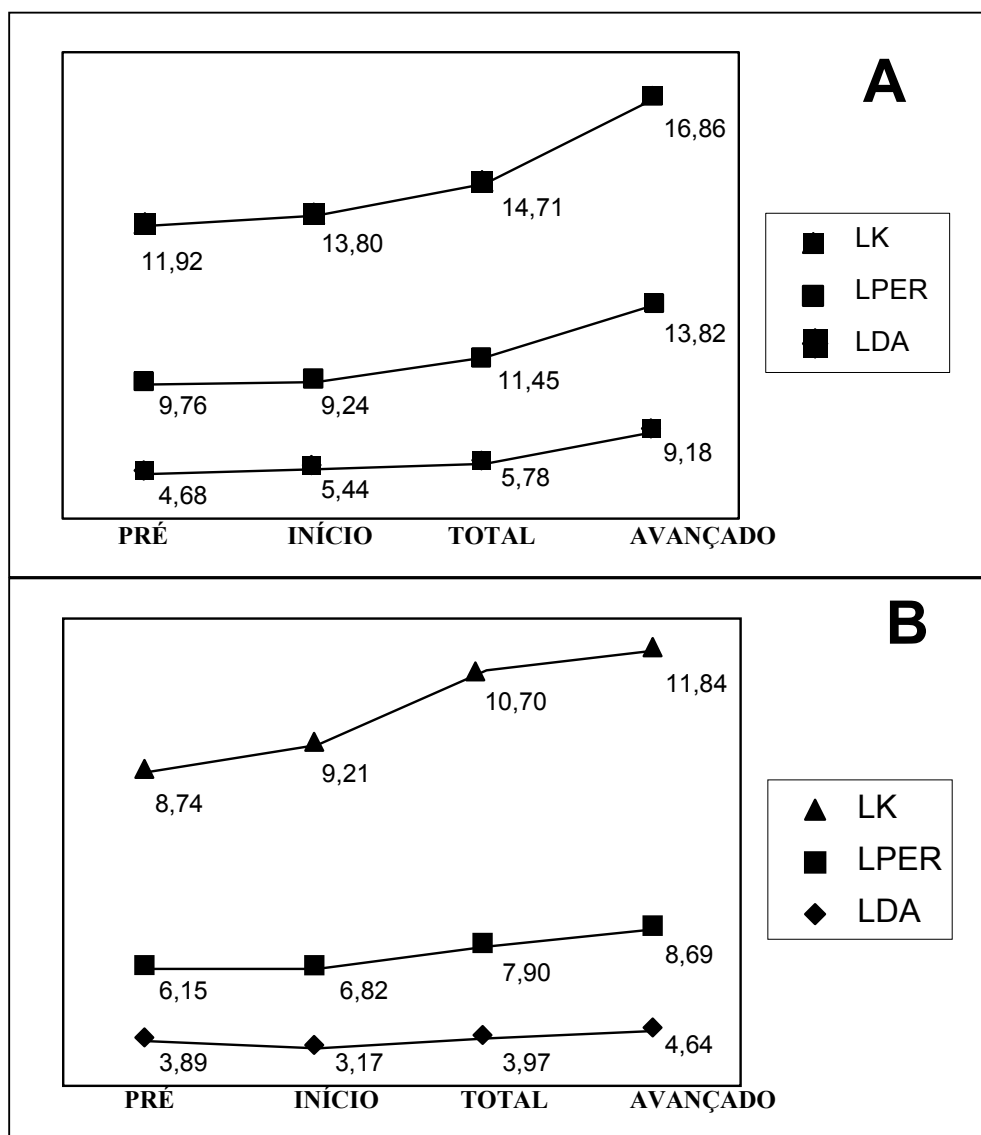


Figura 4 – Teores de lignina provenientes de três procedimentos analíticos em amostra de *Brachiaria brizantha* cv. marandu em quatro estádios de maturidade. (A) Caule (B) Folha

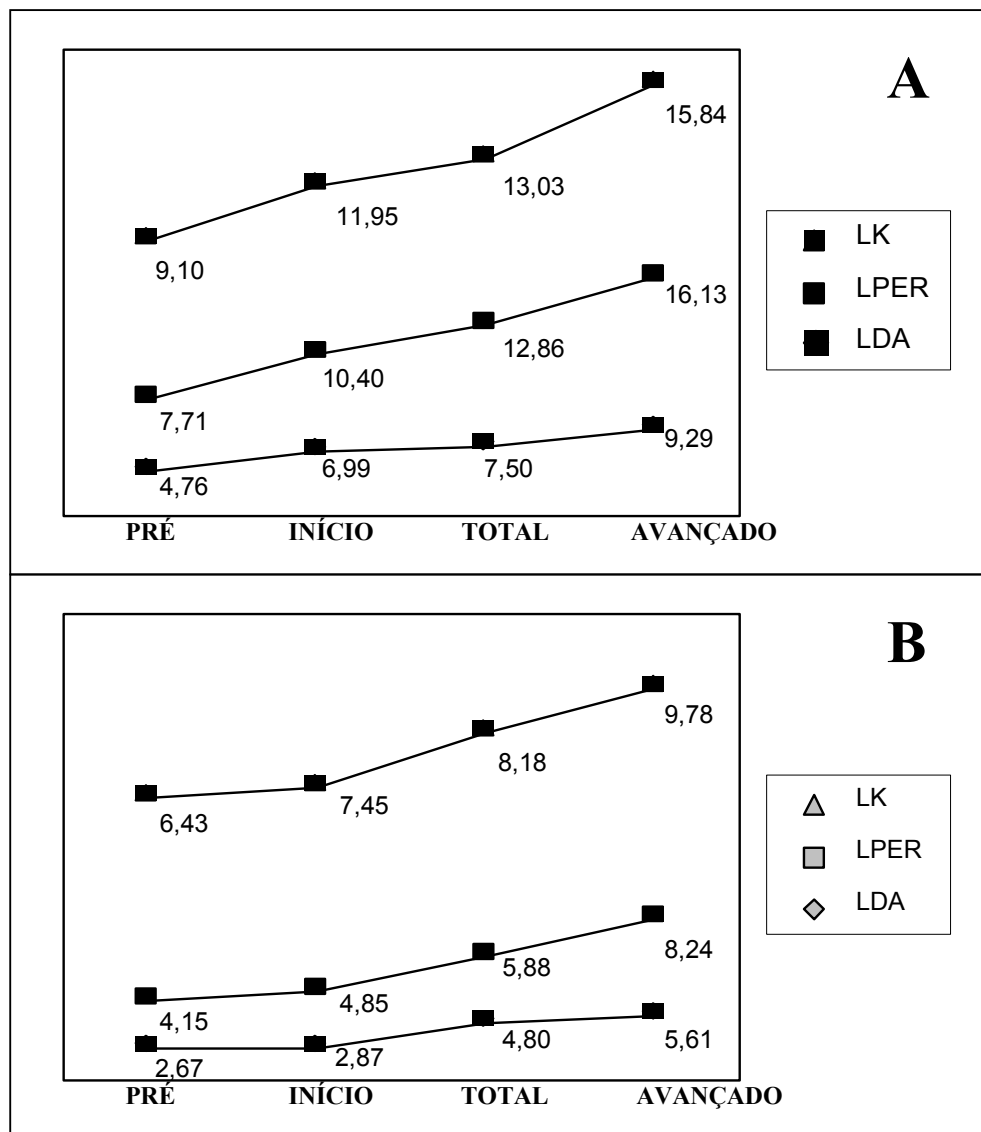


Figura 5 – Teores de lignina provenientes de três procedimentos analíticos em amostra de *Brachiaria decumbens* cv. basilisk em quatro estádios de maturidade. (A) Caule (B) Folha

4.3 DIGESTIBILIDADE IN VITRO

Quanto à inferência de um valor nutritivo para as forrageiras testadas, a digestibilidade *in vitro* do tecido foliar foi superior à do caule (Tabela 19). Fukushima e Savioli (2001) também encontraram valores de digestibilidade superiores para a folha em relação ao caule. De acordo com Buxton, Mertens e Fisher, (1996), à medida que as forragens amadurecem, a concentração de parede celular aumenta em função do espessamento das paredes. Como este fenômeno ocorre com maior intensidade no caule, e a parede celular é associada intrinsecamente com o teor de lignina, nada mais lógico que os caules exibam valores de digestibilidade menores que as folhas.

Tabela 19– Média \pm erro padrão da média dos valores de digestibilidade *in vitro* da matéria seca (%MS) no caule e na folha das cinco amostras de forragens nos estádios de pré-florescimento, início do florescimento, total florescimento e avançada maturidade

Amostra	Pré	Início	Total	Avançada
<i>Panicum maximum</i> cv. tanzânia (caule)	44,13 \pm 0,22	33,65 \pm 0,53	31,76 \pm 0,64	29,77 \pm 0,25
<i>Panicum maximum</i> cv. tanzânia (folha)	66,16 \pm 0,55	45,47 \pm 0,41	39,09 \pm 0,18	37,70 \pm 0,55
<i>Brachiaria brizantha</i> cv. MG5 (caule)	47,88 \pm 0,24	35,74 \pm 0,54	32,44 \pm 0,61	27,11 \pm 0,26
<i>Brachiaria brizantha</i> cv. MG5 (folha)	58,12 \pm 0,33	41,99 \pm 0,55	41,85 \pm 0,19	40,77 \pm 0,57
<i>Brachiaria ruziziensis</i> (caule)	45,33 \pm 0,12	41,42 \pm 0,74	39,40 \pm 0,65	35,53 \pm 0,33
<i>Brachiaria ruziziensis</i> (folha)	62,15 \pm 0,48	59,10 \pm 0,19	54,74 \pm 0,23	53,45 \pm 0,36
<i>Brachiaria brizantha</i> cv. marandu (caule)	44,30 \pm 0,26	40,33 \pm 0,20	38,77 \pm 0,29	33,29 \pm 0,73
<i>Brachiaria brizantha</i> cv. marandu (folha)	67,33 \pm 0,77	49,83 \pm 0,51	44,63 \pm 0,83	43,10 \pm 0,36
<i>Brachiaria decumbens</i> cv. basilisk (caule)	47,46 \pm 0,86	40,13 \pm 0,28	37,58 \pm 0,36	30,65 \pm 0,29
<i>Brachiaria decumbens</i> cv. basilisk (folha)	69,26 \pm 0,25	58,47 \pm 0,38	49,66 \pm 0,64	47,01 \pm 0,76

Como salientado acima, é sobejamente conhecido que tal fato está relacionado com as concentrações de lignina nas diferentes frações da planta. Mas, Savioli e Fukushima (2000) ressaltaram que é necessário também levar-se em conta que a lignina presente no caule é possivelmente diferente daquela presente na folha, ou seja, a composição fenólica pode ter influência na digestibilidade.

4.4 CORRELAÇÃO DOS TEORES DE LIGNINA COM A DIGESTIBILIDADE IN VITRO

Para quase todas as amostras, os teores de lignina mensurados pelas técnicas de LDA e LPER foram negativamente correlacionados com a digestibilidade *in vitro* (Tabela 20).

À exceção da LK, as forrageiras mostraram de razoáveis a elevadas correlações, em alguns casos, altamente significativas ($P < 0,05$). Como a concentração de lignina é praticamente linearmente associada à digestibilidade, pode se inferir através da correlação que, neste experimento, a acurácia do método LDA seja melhor que a dos dois outros métodos, ficando em segundo lugar a LPer.

A LK não estimou bem a digestibilidade em gramíneas, possivelmente devido à interferência das proteínas e erros associados às técnicas laboratoriais. Embora os métodos LDA e LPer tenham razoavelmente estimado a digestibilidade em forrageiras, nenhum dos três métodos analíticos foi totalmente satisfatório. Portanto, mais estudos são necessários para a estimativa do teor de lignina em amostras vegetais, de forma a originar resultados mais conclusivos.

Tabela 20— Correlação entre os teores de lignina obtidos pelos três métodos analíticos e a digestibilidade *in vitro* da matéria seca do caule e da folha das cinco amostras de forragens nos estádios de pré-florescimento, início do florescimento, total florescimento e avançada maturidade

Amostra	Pré			Início			Total			Avançada		
	LDA ¹	LPer	LK	LDA	LPer	LK	LDA	LPer	LK	LDA	LPer	LK
<i>Panicum maximum</i> cv. tanzânia (caule)	-0,852 0,001	-0,589 0,001	0,465 0,101	-0,826 0,009	-0,752 0,001	-0,321 0,009	-0,633 0,001	-0,566 0,001	-0,281 0,001	-0,832 0,009	-0,523 0,001	-0,223 0,010
<i>Panicum maximum</i> cv. tanzânia (folha)	-0,874 0,001	-0,436 0,001	0,568 0,001	-0,628 0,369	-0,486 0,001	0,281 0,102	-0,555 0,008	-0,436 0,001	-0,122 0,001	-0,992 0,001	-0,662 0,005	-0,256 0,000
<i>Brachiaria brizantha</i> cv. MG5 (caule)	-0,789 0,001	-0,527 0,001	0,693 0,112	-0,496 0,001	-0,436 0,001	0,745 0,001	-0,436 0,001	-0,566 0,000	-0,233 0,002	0,693 0,000	-0,697 0,000	-0,825 0,002
<i>Brachiaria brizantha</i> cv. MG5 (folha)	-0,677 0,001	-0,436 0,001	0,223 0,256	-0,699 0,006	-0,554 0,001	-0,282 0,002	-0,486 0,201	-0,256 0,001	-0,123 0,001	-0,783 0,005	-0,685 0,000	-0,458 0,001
<i>Brachiaria ruziziensis</i> (caule)	-0,683 0,002	-0,589 0,006	0,364 0,005	-0,125 0,223	-0,258 0,001	0,364 0,004	-0,783 0,213	-0,589 0,006	0,693 0,09	-0,698 0,092	0,522 0,128	-0,885 0,005
<i>Brachiaria ruziziensis</i> (folha)	-0,470 0,001	-0,358 0,101	0,522 0,122	-0,555 0,001	-0,436 0,022	0,221 0,023	-0,521 0,000	-0,432 0,003	0,547 0,156	-0,289 0,001	-0,435 0,001	-0,788 0,000
<i>Brachiaria brizantha</i> cv. marandu (caule)	-0,572 0,006	-0,432 0,003	0,156 0,236	-0,662 0,005	-0,523 0,001	0,576 0,320	-0,223 0,000	-0,433 0,000	-0,225 0,001	-0,436 0,005	-0,259 0,001	-0,436 0,001
<i>Brachiaria brizantha</i> cv. marandu (folha)	-0,631 0,001	-0,259 0,001	0,542 0,322	-0,783 0,223	-0,528 0,001	0,663 0,001	-0,558 0,326	-0,438 0,000	0,369 0,002	-0,282 0,002	0,542 0,322	-0,336 0,246
<i>Brachiaria decumbens</i> cv. basilisk (caule)	-0,832 0,001	-0,435 0,012	0,308 0,069	-0,523 0,002	-0,433 0,001	0,328 0,002	-0,785 0,000	-0,436 0,006	-0,587 0,223	-0,661 0,001	-0,492 0,000	-0,783 0,353
<i>Brachiaria decumbens</i> cv. basilisk (folha)	-0,462 0,009	-0,326 0,005	0,223 0,010	-0,431 0,001	-0,326 0,001	-0,128 0,201	-0,225 0,000	-0,556 0,032	0,452 0,001	-0,436 0,000	-0,281 0,009	-0,221 0,020

¹ LDA = lignina detergente ácido; LPer = lignina permanganato de potássio; LK = lignina Klason.

² r* = Índice de Correlação de Pearson; P = nível de significância.

Determinação do real valor de lignina pode ser útil para estimar a extensão da digestão da fibra (AKIN et al., 1977); e a exatidão química com que esses nutrientes são determinados, que quanto maior, melhor será o grau de correlação com a medida de valor nutritivo sendo investigada (FONNESBECK, 1976). O grau de correlação existente entre a digestibilidade e o parâmetro sendo medido é muitas vezes empregado para avaliar procedimentos analíticos; se bem que o grau de correlação seja muitas vezes um critério insatisfatório, este índice reflete a praticidade de se obter a estimativa mais acurada do valor nutritivo a partir de dados da composição bromatológica (VAN SOEST; ROBERTSON, 1980).

De forma geral, a ausência de acurácia nos métodos utilizados para a determinação dos teores de lignina está refletida nos resultados encontrados neste trabalho. Esta observação reforça para a necessidade de novas metodologias com maior poder de acurácia na determinação dos teores desta molécula nos variados grupos vegetais.

5 AS EQUAÇÕES DA CORNELL NET CARBOHYDRATE AND PROTEIN SYSTEM

Como o sistema detergente continuava a não reconhecer as diversas frações de carboidratos, com características de solubilidade e degradação distintas, foi proposto o sistema “Cornell Net Carbohydrate and Protein System” (CNCPS) que avalia as frações protéicas e de carboidratos dos alimentos utilizando equações que estimam a digestão e a passagem dessas frações, considerando a dinâmica da fermentação ruminal (FOX et al., 1992; RUSSEL et al., 1992; SNIFFEN; O’CONNOR; VAN SOEST, 1992).

Como já anteriormente mencionado, Sniffen, O'Connor e Van Soest (1992) propuseram o fracionamento dos carboidratos em quatro frações, considerando-se a disponibilidade nutricional e a taxa de degradação ruminal. Estas frações, com base no teor de CHO, são: A, B₁, B₂ e C. Para facilitar a discussão destas frações e as conseqüências da substituição da FDN pela PC, este trabalho inverterá a ordem destas frações, começando a tecer comentários sobre a fração C.

5.1 A EQUAÇÃO DA FRAÇÃO C

A fração C é a fração carboidrato indigerível da CNCPS, que é descrita como lignina expressa em termos de FDN \times 2,4. Como a presente pesquisa explorou três métodos analíticos para a lignina e todos eles exibindo resultados diferentes para a mesma amostra, nada mais lógico que três diferentes equações para a fração C pudessem ser obtidas. Os resultados da fração C usando os dados de LDA, LPer e LK, estão mostrados nas tabelas 21, 22 e 23, respectivamente.

A fração C contém lignina e o resíduo de carboidrato não digerido. Segue, portanto, o mesmo comportamento demonstrado para as ligninas, quanto à fração vegetal e o estágio de maturidade. Obviamente fornece ao cientista uma avaliação da qualidade do alimento sendo fornecido. O que não é coerente são três informações conflitantes sobre um mesmo alimento. Esta questão só será solucionada quando for obtido um método que determine o teor de lignina com acurácia e precisão. Como as equações de Cornell são baseadas em um teor de lignina, e aderindo à proposta da CNCPS, os valores empregados nas demais equações, foram os da lignina ácida, ou seja, a LDA.

Tabela 21– Valores da fração C dos carboidratos (%CHO) segundo o Sistema Cornell (CNCPS) e segundo a presente proposta (FMVZ-USP), utilizando a lignina LDA, no caule e na folha das cinco amostras de forragens nos estádios de pré-florescimento, início do florescimento, total florescimento e avançada maturidade¹.

Amostra	Pré			Início			Total			Avançada		
	CNCPS	FMVZ USP		CNCPS	FMVZ USP		CNCPS	FMVZ USP		CNCPS	FMVZ USP	
<i>Panicum maximum</i> cv. tanzânia (caule)	15,33	15,32		20,83	20,83		26,73	26,72		27,10	27,10	
<i>Panicum maximum</i> cv. tanzânia (folha)	11,97	11,96		13,75	13,75		14,79	14,65		15,28	15,27	
<i>Brachiaria brizantha</i> cv. MG5 (caule)	14,90	14,89		18,98	18,98		21,21	21,21		22,43	22,43	
<i>Brachiaria brizantha</i> cv. MG5 (folha)	9,95	9,95		11,28	11,28		14,65	14,64		14,95	14,95	
<i>Brachiaria ruziziensis</i> (caule)	16,45	16,45		17,64	17,64		20,38	20,37		24,35	24,34	
<i>Brachiaria ruziziensis</i> (folha)	9,10	9,10		9,44	9,44		11,49	11,49		17,65	17,65	
<i>Brachiaria brizantha</i> cv. marandu (caule)	12,63	12,63		13,96	13,96		14,93	14,93		23,64	23,64	
<i>Brachiaria brizantha</i> cv. marandu (folha)	11,50	11,48		8,97	8,97		11,15	11,15		12,97	12,97	
<i>Brachiaria decumbens</i> cv. basilisk (caule)	13,13	13,13		18,87	18,87		19,82	19,82		23,81	23,81	
<i>Brachiaria decumbens</i> cv. basilisk (folha)	8,07	8,07		8,31	8,31		13,80	13,80		15,82	15,82	

¹ CHO – Carboidratos totais; CNCPS – Cornell Net Carbohydrate and Protein System; FMVZ-USP – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

Tabela 22– Valores da fração C dos carboidratos (%CHO) segundo o Sistema Cornell (CNCPS) e segundo a presente proposta (FMVZ-USP), utilizando a lignina LPer, no caule e na folha das cinco amostras de forragens nos estádios de pré-florescimento, início do florescimento, total florescimento e avançada maturidade¹.

Amostra	Pré			Início			Total			Avançada		
	CNCPS	FMVZ USP		CNCPS	FMVZ USP		CNCPS	FMVZ USP		CNCPS	FMVZ USP	
<i>Panicum maximum</i> cv. tanzânia (caule)	31,97	31,97		35,36	35,36		35,04	35,04		43,31	43,31	
<i>Panicum maximum</i> cv. tanzânia (folha)	19,01	19,01		19,65	19,65		20,59	20,59		31,65	31,65	
<i>Brachiaria brizantha</i> cv. MG5 (caule)	28,81	28,91		33,65	33,65		34,46	34,46		36,03	36,04	
<i>Brachiaria brizantha</i> cv. MG5 (folha)	16,21	16,20		18,70	18,71		24,80	24,80		27,26	27,26	
<i>Brachiaria ruziziensis</i> (caule)	31,95	31,95		31,99	31,99		36,18	36,17		36,53	36,53	
<i>Brachiaria ruziziensis</i> (folha)	16,58	16,58		17,18	17,18		18,23	18,23		20,25	20,24	
<i>Brachiaria brizantha</i> cv. marandu (caule)	26,34	26,32		23,72	23,72		29,58	29,58		35,60	35,60	
<i>Brachiaria brizantha</i> cv. marandu (folha)	18,17	18,18		19,30	19,30		22,19	22,19		24,29	24,29	
<i>Brachiaria decumbens</i> cv. basilisk (caule)	21,27	21,27		28,07	28,07		33,99	33,99		41,34	41,34	
<i>Brachiaria decumbens</i> cv. basilisk (folha)	12,54	12,54		14,05	14,04		16,91	16,91		23,24	23,24	

¹ CHO – Carboidratos totais; CNCPS – Cornell Net Carbohydrate and Protein System; FMVZ-USP – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

Tabela 23 – Valores da fração C dos carboidratos (%CHO) segundo o Sistema Cornell (CNCPS) e segundo a presente proposta (FMVZ-USP), utilizando a lignina LK, no caule e na folha das cinco amostras de forragens nos estádios de pré-florescimento, início do florescimento, total florescimento e avançada maturidade¹.

Amostra	Pré			Início			Total			Avançada		
	CNCPS	FMVZ USP		CNCPS	FMVZ USP		CNCPS	FMVZ USP		CNCPS	FMVZ USP	
<i>Panicum maximum</i> cv. tanzânia (caule)	35,24	35,24		41,68	41,68		45,17	45,17		50,55	50,55	
<i>Panicum maximum</i> cv. tanzânia (folha)	23,36	23,36		26,49	26,49		29,27	29,27		36,24	36,24	
<i>Brachiaria brizantha</i> cv. MG5 (caule)	32,57	32,56		36,17	36,16		42,74	42,74		46,33	46,33	
<i>Brachiaria brizantha</i> cv. MG5 (folha)	26,88	26,88		28,91	28,91		34,26	34,26		39,37	39,37	
<i>Brachiaria ruziziensis</i> (caule)	35,06	35,06		36,33	36,34		43,92	43,92		49,83	49,83	
<i>Brachiaria ruziziensis</i> (folha)	20,54	20,54		23,20	23,20		29,38	29,38		38,01	38,01	
<i>Brachiaria brizantha</i> cv. marandu (caule)	32,17	32,16		35,43	35,43		38,00	38,01		43,41	43,42	
<i>Brachiaria brizantha</i> cv. marandu (folha)	25,83	25,83		26,06	26,06		30,05	30,05		33,09	33,09	
<i>Brachiaria decumbens</i> cv. basilisk (caule)	25,11	25,10		32,25	32,25		34,44	34,44		40,60	40,60	
<i>Brachiaria decumbens</i> cv. basilisk (folha)	19,43	19,42		21,58	21,58		23,53	23,53		27,58	27,58	

¹ CHO – Carboidratos totais; CNCPS – Cornell Net Carbohydrate and Protein System; FMVZ-USP – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

Observando as três tabelas, com destaque para a Tabela 21, que utiliza a LDA, a lignina referência, conforme preconizado pelos pesquisadores de Cornell, pode se verificar uma coluna para a CNCPS e outra para a FMVZ-USP (Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo), para cada estágio de desenvolvimento da planta. Os dados numéricos, que são referentes aos valores da fração C, de cada planta, e em cada estágio de maturidade, foram absolutamente idênticos (sequer cogitar-se-ia a necessidade de uma análise estatística!).

A utilização da PC nas equações da CNCPS, em substituição à FDN, **não** proporcionou diferenças quanto aos teores de carboidratos da fração C. Esta constatação foi extremamente intrigante, uma vez que os dados de PC (Tabela 5) e os dados de FDN (Tabela 6) são completamente diferentes. Os demais termos da equação não foram alterados.

A equação da fração C, segundo a CNCPS, é:

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

A solução ao enigma, muito simples, diga-se de passagem, é que o 1º termo fibroso (FDN) se cancelava com o 2º termo FDN da lignina durante a resolução da equação. Em outras palavras, não importava se era FDN ou PC que estava sendo usado: o resultado era absolutamente o mesmo, porque a porção fibrosa se cancelava! Entretanto, chamamos a atenção para o fato de que esta descoberta só foi possível porque foram testados dois elementos com valores distintos. Não fosse isto, não teria sido possível tal constatação. Objetivamente, trata-se de um grave desacerto cometido pelos pesquisadores de Cornell, baseado em um flagrante erro de álgebra.

Se então o termo fibroso se cancela durante a resolução da equação, então ele é prescindível. Executando esta manobra, é que o presente trabalho oferece uma alternativa ao cálculo da fração C, que está sendo denominada aqui de FMVZ-USP. Esta equação é:

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

É uma equação substancialmente mais simples e mais direta, que permite fácil visualização da fração indigerível da parede celular em função do teor de lignina na matéria seca. Em outras palavras, a fração indigerível pode ser obtida independentemente da FDN, não exigindo tampouco a prévia determinação do conteúdo de cinzas e proteína na FDN.

Muito embora a fração C seja independente da FDN, como cabalmente demonstrado acima, no passado, não era tão corrente este pensamento. De longa data é reconhecido que a lignina exerce a sua ação deletéria sobre os carboidratos da parede celular e não sobre o conteúdo celular (VAN SOEST, 1994); portanto, relacionar digestibilidade da FDN com conteúdo de lignina em função da matéria seca, deve ser evitado (VAN SOEST, 1967). Por outro lado, Traxler et al. (1998) observaram que coeficientes de correlação relacionando indigestibilidade da MS ou FDN com o conteúdo de lignina em função da matéria seca foram melhores do que quando o conteúdo de lignina era expresso em função da FDN; entretanto, estes autores creditaram esta observação ao efeito da maturidade, uma vez que o teor de FDN aumenta enquanto que a concentração de PB e o conteúdo celular declinam com o avançar da maturidade.

É coerente que a ação deletéria da lignina seja apenas sobre os carboidratos estruturais da parede celular. Há vários experimentos clássicos que indicaram que o mecanismo de ação da lignina é o de agir como uma barreira física, impedindo o

acesso das enzimas microbianas aos carboidratos da parede celular (DEHORITY; JOHNSON, 1961; DEHORITY; JOHNSON; CONRAD, 1962).

Um outro ângulo desta observação interessante para futuro estudo, é a equação proposta por Conrad, Weiss e Odwongo, (1984) e Weiss (1998) para estimar o conteúdo de FDNcp digestível, que possui a razão $(\text{Lignina} / \text{FDNcp})^{0,667}$, e que por sua vez integra a equação para a determinação dos nutrientes digestíveis totais (NRC, 2001). Se a razão $(\text{Lignina} / \text{FDNcp})^{0,667}$ pode ser diretamente calculada em termos de MS, é uma questão instigante e talvez deva ser mais profundamente estudada. Rocha Júnior, Valadares Filho e Borges, (2003) observaram que, talvez, a relação lignina / FDNcp não esteja sendo tão precisa para estimar a FDN digestível devido à variabilidade da matriz fibrosa entre as plantas forrageiras tropicais.

Por outro lado, como já destacado anteriormente, merece mais estudos a própria técnica analítica de determinação da concentração de lignina; um método que forneça valores questionáveis de lignina vai, evidentemente, distorcer todas estas estimativas de FDN indigerível. Os métodos gravimétricos de quantificação de lignina atualmente em uso padecem de acurácia (FUKUSHIMA; DEHORITY, 2000; FUKUSHIMA; HATFIELD, 2001). Resultados sobre uma técnica analítica alternativa aos métodos gravimétricos foram recentemente reportados e se mostraram promissores (FUKUSHIMA; HATFIELD, 2004; HATFIELD; FUKUSHIMA, 2005).

Um outro ponto de discórdia entre os pesquisadores reside no fator de correção originalmente sugerido por Chandler, Jewell e Gossett, (1980), que foi baseado no resíduo indigerível de FDN após a fermentação de vários substratos por 90 ou 120 dias. Não há unanimidade neste valor de 2,4 e já foram sugeridos outros fatores de correção (FERNANDES; QUEIROZ; PEREIRA, 2003; MALAFAIA; VALADARES FILHO; VIEIRA, 1998; TRAXLER et al., 1998). Se houver um problema

analítico referente à determinação quantitativa da lignina, obviamente o fator numérico também estará comprometido. Face a estes problemas, alternativamente à estimação do conteúdo energético dos alimentos através da composição química, a fração C pode ser obtida através da FDN indigerível após 96 horas (FERNANDES; QUEIROZ; PEREIRA, 2003; PEREIRA; QUEIROZ; PAULINO, 2000) ou 144 horas (CABRAL; VALADARES FILHO; DETMANN, 2004; AZEVÊDO; PEREIRA; QUEIROZ, 2003) de incubação *in vitro* com líquido ruminal e tampão adequado. Embora esta metodologia tente reproduzir com maior fidelidade o real conteúdo de parede celular não digerível, ela é mais laboriosa. Entretanto, poderá ser empregada para verificar a eficácia da equação C. Equações baseadas em composição química para estimar valor nutritivo foram introduzidas com a justificativa de serem mais práticas e rápidas.

5.2 A EQUAÇÃO DA FRAÇÃO B₁

A equação para a fração B₁ da CNCPS é:

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

Nas equações das frações A e B₁, o amido é calculado em função dos carboidratos não-estruturais (CNE). Os CNE são constituídos pela somatória das frações A e B₁, que são solúveis na solução de detergente neutro, podendo ser expressos pela diferença:

$$CNE (\%MS) = 100 - (PB + FDN_{cp} + EE + MM)$$

De acordo com e Fox, Tedeschi e Tylutki, (2004) e Sniffen, O'connor e Van Soest, (1992) a fração B₁ é composta por amido e pectina, o que não tem lógica, uma vez que a estimativa do conteúdo de pectina (Tabela 8) foi substancialmente maior que os valores da fração B₁ (Tabela 24).

É provável que a fração B₁ não esteja adequadamente estimando as frações de carboidratos nela pertencentes, ou que os métodos analíticos para as determinações de pectina e amido não estejam refletindo os reais teores. Malafaia, Valadares Filho e Vieira, (1998) já haviam sinalizado algo a respeito ao proporem a somatória das frações A + B₁, baseados na praticidade do cálculo de rações para ruminantes e no aspecto analítico, uma vez que as metodologias de determinação do amido não resultam em valores verossímeis e não apresentam boa repetibilidade em função da natureza heterogênea dos tecidos vegetais. Outros autores também optaram por calcular as frações A e B₁ conjuntamente, através do cálculo dos carboidratos não fibrosos, que pode ser obtido pela subtração da FDN_{cp} dos CHO (CABRAL et al., 2003; FERNANDES; QUEIROZ; PEREIRA, 2003; GONÇALVES; SANTOS; JOBIM, 2003; PEREIRA; QUEIROZ; PAULINO, 2000).

Queiroz et al. (submetido para publicação) sugeriram que a fração B₁ represente apenas o teor de amido, determinado quimicamente, com base nos carboidratos totais. Portanto, este experimento reitera esta proposta ao considerar que a fração B₁ seja calculada da seguinte forma:

$$B_1 (\%CHO) = 100 \times \text{amido} (\%MS) / \text{CHO} (\%MS)$$

Estes resultados, na tabela 24, estão encabeçados pela chamada FMVZ-USP, ou seja, a nossa proposta. Os dados nas colunas encabeçadas pelo título CNCPS, foram calculados pela fórmula convencional de Cornell. Pode-se observar que os valores foram praticamente idênticos, o que reforça a nossa hipótese de que a fração B_1 é constituída apenas por amido. Por outro lado, esta forma de calcular B_1 é mais simples e mais rápida do que pela proposta da CNCPS.

Tabela 24 – Valores da fração B₁ dos carboidratos (%CHO) segundo o Sistema Cornell (CNCPS) e segundo a presente proposta (FMVZ-USP) no caule e na folha das cinco amostras de forragens nos estádios de pré-florescimento, início do florescimento, total florescimento e avançada maturidade¹

Amostra	Pré			Início			Total			Avançada		
	CNCPS	FMVZ USP		CNCPS	FMVZ USP		CNCPS	FMVZ USP		CNCPS	FMVZ USP	
<i>Panicum maximum</i> cv. tanzânia (caule)	0,03	0,03		0,0	0,0		0,03	0,0		0,03	0,0	
<i>Panicum maximum</i> cv. tanzânia (folha)	0,0	0,0		0,0	0,12		0,0	0,06		0,0	0,06	
<i>Brachiaria brizantha</i> cv. MG5 (caule)	0,0	0,0		0,0	0,0		0,0	0,0		0,0	0,0	
<i>Brachiaria brizantha</i> cv. MG5 (folha)	0,0	0,0		0,0	0,03		0,0	0,0		0,0	0,29	
<i>Brachiaria ruziziensis</i> (caule)	0,12	0,11		0,11	0,08		0,10	0,0		0,11	0,09	
<i>Brachiaria ruziziensis</i> (folha)	0,11	0,09		0,10	0,28		0,10	0,50		0,11	0,70	
<i>Brachiaria brizantha</i> cv. marandu (caule)	0,0	0,0		0,0	0,0		0,0	0,14		0,0	0,0	
<i>Brachiaria brizantha</i> cv. marandu (folha)	0,29	0,12		0,27	0,09		0,25	0,06		0,27	0,09	
<i>Brachiaria decumbens</i> cv. basilisk (caule)	0,0	0,0		0,0	0,09		0,0	0,0		0,0	0,0	
<i>Brachiaria decumbens</i> cv. basilisk (folha)	0,0	0,0		0,0	0,19		0,0	0,06		0,0	0,0	

¹ CHO – Carboidratos totais; CNCPS – Cornell Net Carbohydrate and Protein System; FMVZ-USP – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

Entretanto, resta uma questão: se a fração B_1 , que era considerada como sendo a somatória de amido e pectina, e agora tendo somente amido, onde estará a pectina? Os teores de FDN foram menores do que as preparações de PC (Tabelas 6 e 5, respectivamente). Como já anteriormente mencionado, a solução de detergente neutro quente dissolve a pectina (VAN SOEST; ROBERTSON; LEWIS, 1991). Esta solução possui dentre os reagentes utilizados, um quelante de cálcio, o ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) que promove a solubilização da pectina. A preparação de parede celular bruta proposta por Fukushima e Hatfield (2001), preserva a maior parte das substâncias pécnicas da parede celular. Portanto, a diferença algébrica PC – FDN fornece, em princípio, uma estimativa do teor de pectina (Tabela 8). Neste caso, a pectina estaria inclusa na fração A e não na fração B_1 . Queiroz et al. (submetido para publicação) já haviam constatado esta ocorrência.

A utilização de PC nas equações da CNCPS em substituição à FDN, não proporcionou diferenças quanto aos teores de carboidratos das frações B_1 , o que faz pleno sentido, pois sendo esta fração constituída apenas de amido, ela é totalmente independente de FDN ou PC.

5.3 A EQUAÇÃO DA FRAÇÃO B₂

Por outro lado, quando se utiliza a lógica da PC, a pectina não estaria incluída na fração A. O que faz sentido, uma vez que foi demonstrado acima que quando se utiliza a preparação PC, a pectina não entraria mais no grupo dos CNE e sim continuaria a ser um dos componentes da matriz da parede celular. E neste caso, deveria integrar a fração B₂, a fração dos carboidratos lentamente digeríveis no rúmen. Entretanto, caracterizar a pectina dentro de uma fração de “carboidratos rapidamente degradáveis”, ao lado de açúcares e ácidos orgânicos, que é a fração A, não parece adequado. Similarmente, a localização da pectina dentro da fração B₂, dos carboidratos lentamente digeríveis no rúmen, não tem lógica. O mais indicado seria a alocação da pectina, determinada quimicamente, para uma fração exclusiva para ela, que poderia ser a mesma fração B₂. E para os carboidratos estruturais da parede celular digeríveis, uma nova fração seria denominada, a fração B₃, que seria constituída da PC, exceto a pectina, e subtraindo-se dela a fração C. Esta fração poderia ser escrita da seguinte maneira:

$$B_3 (\%CHO) = PC (\%CHO) - \text{pectina} (\%CHO) - \text{fração C}$$

Esta nova fração seria comparável à fração B₂ da CNCPS, que é a seguinte:

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

Não resta a menor dúvida de que a nossa proposta, novamente, é substancialmente mais simples do que a equação de Cornell. A Tabela 25 registra os valores da fração B₂ (ou B₃, se adotar-se a presente proposta). Aqui também é feita a comparação entre CNCPS e FMVZ-USP, empregando-se as duas equações acima citadas. Os valores tão muito próximos, que se poderia perfeitamente dispensar uma comparação estatística. Ou então, realizar a comparação estatística com a finalidade de confirmar a veracidade dos nossos achados.

Tabela 25 – Valores da fração B₂ dos carboidratos (%CHO) segundo o Sistema Cornell (CNCPS) e segundo a presente proposta (FMVZ-USP) no caule e na folha das cinco amostras de forragens nos estádios de pré-florescimento, início do florescimento, total florescimento e avançada maturidade¹

Amostra	Pré			Início			Total			Avançada		
	CNCPS	FMVZ USP		CNCPS	FMVZ USP		CNCPS	FMVZ USP		CNCPS	FMVZ USP	
<i>Panicum maximum</i> cv. tanzânia (caule)	71,16	71,24		66,67	67,11		56,79	57,68		55,46	56,47	
<i>Panicum maximum</i> cv. tanzânia (folha)	66,87	68,34		69,56	71,32		68,30	67,44		65,11	65,74	
<i>Brachiaria brizantha</i> cv. MG5 (caule)	71,09	70,44		63,02	63,24		59,71	60,05		60,68	61,10	
<i>Brachiaria brizantha</i> cv. MG5 (folha)	69,86	69,38		68,88	69,15		64,52	66,00		60,87	62,79	
<i>Brachiaria ruziziensis</i> (caule)	61,59	61,77		61,51	62,75		61,82	62,39		58,20	58,93	
<i>Brachiaria ruziziensis</i> (folha)	61,72	62,20		60,03	60,10		62,12	63,82		58,55	59,53	
<i>Brachiaria brizantha</i> cv. marandu (caule)	69,15	69,50		66,04	66,07		67,28	67,63		61,05	61,50	
<i>Brachiaria brizantha</i> cv. marandu (folha)	64,77	65,68		66,59	67,91		65,52	66,74		64,77	63,74	
<i>Brachiaria decumbens</i> cv. basilisk (caule)	75,54	75,91		70,30	70,66		66,81	67,34		61,62	62,31	
<i>Brachiaria decumbens</i> cv. basilisk (folha)	64,79	66,08		67,57	68,89		62,77	64,13		59,66	60,66	

¹ CHO – Carboidratos totais; CNCPS – Cornell Net Carbohydrate and Protein System; FMVZ-USP – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

Como já mencionado anteriormente, um simples programa de computador pode perfeitamente resolver a complexa equação de Cornell em centésimos de segundos, tornando-se dispensável uma equação mais simplificada. Entretanto, as sérias questões pertinentes à solubilização de componentes da parede celular (pectina e β -glucanos), que fazem da FDN uma entidade sem claras definições dos seus constituintes; dificuldades na filtração que impõe a necessidade de utilizar uma enzima, a α -amilase; uso de sulfito de sódio para eliminar parcialmente a proteína da matriz da parede celular; etc. que não estão presentes na preparação da parede celular de Fukushima e Hatfield (2001), colocam em xeque o emprego da FDN para esta finalidade. Além do mais, parece-nos mais coerente o emprego de PC nestas equações, uma vez que a partição das frações de carboidratos seguiria uma definição mais clara dos diversos constituintes da parede celular vegetal.

5.4 A EQUAÇÃO DA FRAÇÃO A

Esta equação, que representa os açúcares, ácidos orgânicos, etc. é representada pela equação de Cornell como:

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

O presente trabalho também apresenta uma outra proposta para a equação A, que seria simplesmente descrita como:

$$A (\%CHO) = 100 - B_1 - B_2 - C$$

A tabela 26 atesta a exeqüibilidade desta nossa proposta ao compará-la com a equação A de Cornell.

Tabela 26– Valores da fração A dos carboidratos (%CHO) segundo o Sistema Cornell (CNCPS) e segundo a presente proposta (FMVZ-USP) no caule e na folha das cinco amostras de forragens nos estádios de pré-florescimento, início do florescimento, total florescimento e avançada maturidade¹

Amostra	Pré			Início			Total			Avançada		
	CNCPS	FMVZ USP		CNCPS	FMVZ USP		CNCPS	FMVZ USP		CNCPS	FMVZ USP	
<i>Panicum maximum</i> cv. tanzânia (caule)	13,48	13,41		12,50	12,06		16,48	15,60		17,44	16,43	
<i>Panicum maximum</i> cv. tanzânia (folha)	21,16	19,70		16,57	14,81		16,85	17,85		19,55	18,93	
<i>Brachiaria brizantha</i> cv. MG5 (caule)	14,01	14,67		18,00	17,78		19,08	18,74		16,89	16,47	
<i>Brachiaria brizantha</i> cv. MG5 (folha)	20,19	20,67		19,80	19,54		20,83	19,36		23,88	21,97	
<i>Brachiaria ruziziensis</i> (caule)	21,85	21,67		20,77	19,53		17,80	17,24		17,36	16,64	
<i>Brachiaria ruziziensis</i> (folha)	29,08	28,61		30,25	30,18		25,89	24,19		23,09	22,12	
<i>Brachiaria brizantha</i> cv. marandu (caule)	18,22	17,87		20,00	19,97		17,65	17,30		15,31	14,86	
<i>Brachiaria brizantha</i> cv. marandu (folha)	23,61	22,72		24,34	23,03		23,27	22,05		22,17	23,20	
<i>Brachiaria decumbens</i> cv. basilisk (caule)	11,33	10,96		10,74	10,38		13,37	12,84		14,57	13,88	
<i>Brachiaria decumbens</i> cv. basilisk (folha)	27,14	25,85		23,93	22,61		23,37	22,01		24,52	23,52	

¹ CHO – Carboidratos totais; CNCPS – Cornell Net Carbohydrate and Protein System; FMVZ-USP – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

Também não sentimos a necessidade de uma análise comparativa, a não ser talvez para atestar a eficácia da nossa sugestão. Se for utilizada a FDN nas equações da CNCPS, a pectina deve ser subtraída do conteúdo da fração A. Caso se empregue a PC, esta subtração não será necessária. Entretanto, a pectina deve ser determinada quimicamente. A fração B₁ seria constituída exclusivamente de amido.

Recentemente, na Reunião Anual da “American Society of Animal Science, American Dairy Science Association e Canadian Society of Animal Science”, pesquisadores da Cornell University apresentaram um resumo no qual propuseram um esquema expandido das frações de carboidratos (LANZAS; TEDESCHI; FOX, 2005). Este novo esquema expande substancialmente a fração A e subdivide a fração B, que seria composto pelas seguintes frações: A₁ = ácidos acético, propiônico e butírico; A₂ = ácido láctico; A₃ = ácidos orgânicos; A₄ = açúcares; B₁ = amido; B₂ = fibra solúvel; B₃ = FDN disponível e fração C = FDN não disponível. Objetivando verificar a consistência do esquema proposto, uma análise Monte Carlo comparou os dois esquemas (tradicional *versus* expandido) usando dados de acervo proveniente de diversos alimentos usados para gado leiteiro; os autores concluíram que devido à robustez do novo esquema, este fará parte da nova versão do Sistema Cornell (CNCPS v.6). Instigante que alguns achados da presente pesquisa foram coincidentes com os reportados no resumo de Lanzas, Tedesch e Fox (2005). Deve-se enfatizar que os dois trabalhos foram conduzidos independentemente, sem conhecimento prévio dos resultados ou parte dos resultados; além do que, a metodologia de trabalho foi diferente nas duas pesquisas: os pesquisadores de Cornell basearam-se em dados de

acervo para compor a proposta das frações de carboidratos expandidas e a presente pesquisa baseou-se em dados laboratoriais ao comparar a substituição da FDN pela PC nas equações de carboidratos da CNCPS.

CONCLUSÃO

6 CONCLUSÃO

Os dados apresentados, nas condições com que este trabalho foi realizado, não oferecem respostas conclusivas quanto a um definitivo método de escolha para se quantificar o teor de lignina em plantas forrageiras. Podemos inferir que os valores obtidos para os teores de lignina nos três métodos analíticos empregados darão margem a discussões sobre a questão:

Qual o melhor método analítico empregado para se determinar o real teor de lignina presente em uma amostra vegetal?

A nosso ver, poderá ser de significativa importância o achado de que as equações da “Cornell Net Carbohydrate and Protein System” que estimam as frações de carboidratos, podem ser calculadas sem o emprego de FDN e com a preparação PC no seu lugar. O fato de colocar a pectina dentro de uma fração específica para ela, melhora a partição das frações de carboidratos, conferindo a ela uma posição de destaque, que não poderia ser compartilhada junto com a fração A ou com a fração B₂. Definitivamente, a pectina não pertence à fração B₁, como fora proposta pelo grupo de Cornell. Sugerimos a criação de uma nova fração, a B₃, que seria constituída pela PC, exceto a pectina, e subtraindo-se dela a fração C.

Além do que, a vantagem que é a simplificação da equação que estima a fração indigerível dos carboidratos (fração C), é indiscutível.

REFERÊNCIAS

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

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

AOAC. - ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods Of analysis**. 13. ed Washington, D.C.: Association Of Official Analytical Chemists, 1980. 1015 p.

ARMITAGE, E. R.; ASHWORTH, R. B.; FERGUSON, W. S. The determination of lignin in plant material of high protein content. **Journal of Science Chemistry Industry**, v. 67, p. 241, 1948.

AZEVEDO, J. A. G.; PEREIRA, J. C.; QUEIROZ, A. C. Composição químico-bromatológica, fracionamento de carboidratos e cinética da degradação *in vitro* da fibra de três variedades de cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 32, p. 1443-1453, 2003.

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

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

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

BUXTON, D. R.; MERTENS, D. R.; FISHER, D. S. Cool-season forage grasses. **Agronomy Monography**, v. 1, n. 34, p. 229, 1996.

CABRAL, L. S.; FERNANDES, A. M.; QUEIROZ, A. C.; PEREIRA, J. C.; LANA, R. P.; BARBOSA, M. H. P.; FONSECALLI, D. M.; DETMANN, E.; PEREIRA, E. S.; VITTORI, A. Fracionamento e cinética da degradação *in vitro* dos carboidratos constituintes da cana-de-açúcar com diferentes ciclos de produção em três idades de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 32, p. 262- 269, 2003, suplementum 1.

CABRAL, L. S.; VALADARES FILHO, S. C.; DETMANN, E. Taxas de digestão das frações protéicas e de carboidratos para as silagens de milho e de capim-elefante, o feno de capim-Tifton-85 e o farelo de soja. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 33, p. 1573-1580, 2004.

CAMM, E. L.; TOWERS, G. H. N. Review article: phenylalanine ammonia lyase. **Phytochemistry**, v. 12, p. 961-73, 1973.

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

CEREDA, M. P. Alternativas de uso industrial para fécula de mandioca. **Revista Brasileira de Mandioca**, v. 8, n. 1, p. 63-71, 1989.

CHANDLER, J. A.; JEWELL, W. J.; GOSSETT, J. M. Predicting methane fermentation biodegradability. In: JEWELL, W. J. **Biotechnology and bioengineering symposium**, 10. ed. New York: John Wiley & Sons, 1980. p. 93-107.

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

CHURCH, D. C.; POND, W. G. **Bases científicas para la nutrición y alimentación de los animales domesticos**. Zaragoza, Spain: Editorial Acribia, 1977. 462 p.

COELHO DA SILVA, J. F.; LEÃO, M. I. **Fundamentos de nutrição dos ruminantes**. Piracicaba: Livrocetes, 1979. p. 380.

CONRAD, H. R.; WEISS, W. P.; ODWONGO, W. O. Estimating net energy lactation from components of cell solubles and cell walls. **Journal of Dairy Science**, v. 67, n. 2, p. 427-436, 1984.

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

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

DIETRICH, S. M. C.; RIBEIRO, R. C. L. F.; CHU, E. P. O açúcar das plantas. **Revista Ciência Hoje**, v. 7, n. 39, p. 42-48, 1988.

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

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

FERNANDES, A. M.; QUEIROZ, A. C.; PEREIRA, J. C. Fracionamento e cinética da degradação *in vitro* dos carboidratos constituintes da cana-de-açúcar com diferentes ciclos de produção em três idades de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 32, p. 1778-1785, 2003, Suplemento 1.

FONNESBECK, P. V. Estimating nutritive value from chemical analyses. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM FEED COMPOSITION, ANIMAL NUTRIENT REQUIREMENTS, AND COMPUTERIZATION OF DIETS, 1., 1976, Logan. **Proceedings...** p. 219-227.

FOX, D. G.; SNIFFEN, C. J.; O'CONNOR, J. D.; RUSSEL, J. B.; VAN SOEST, P. J. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: III. Cattle requirements and diet adequacy. **Journal of Animal Science**, v. 70, p. 3578-3596, 1992.

FOX, D. G.; TEDESCHI, L. O.; TYLUTKI, T. P. The Cornell Net carbohydrate and protein system model for evaluating herd nutrition and nutrient excretion. **Animal Feed Science and Technology**, v. 112, p. 29-78, 2004.

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

FUKUSHIMA, R. S.; DEHORITY, B. A. Feasibility of using lignin isolated from forages by solubilization in acetyl bromide as a standard for lignin analysis. **Journal of Animal Science**, v. 78, n 2, p. 3135-3143, 2000.

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

FUKUSHIMA, R. S.; HATFIELD, R. D. Composição fenólica de ligninas dioxano determinadas pela reação oxidativa com o nitrobenzeno. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, n 3, p. 373-378, 2003.

FUKUSHIMA, R. S.; HATFIELD, R. D. Extraction and isolation of lignin for utilization as a standard to determine lignin concentration using the acetil bromide spectrophotometric method. **Journal of Agriculture. Food Chemistry**, v. 49, n 7, p. 3133-3139, 2001.

FUKUSHIMA, R. S.; SAVIOLI, N. M. F. Correlação entre digestibilidade *in vitro* da parede celular e três métodos analíticos para a avaliação quantitativa da lignina. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 2, n 2, p. 302-309, 2001.

FUKUSHIMA, R. S.; WEIMER, P. J.; KUNZ, D. Photocatalytic interaction of N-oxide resazurin with cystein optimizes preparation of anaerobic medium solutions. **Anaerobe**, v. 8, p. 29-34, 2002.

FUZETO A. P. **Determinação do teor de lignina em amostras vegetais através de três métodos analíticos e correlação com digestibilidade *in vitro***. 2003. 70 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

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

GOERING, H.K.; VAN SOEST, P.J. Forage fiber analysis (Apparatus, reagent, procedures and some applications). **Agriculture Handbook**, 379, ARS, USDA, Washington, DC. 1970.

GONÇALVES, G. D.; SANTOS, G. T.; JOBIM, C. C. Determinação do consumo, digestibilidade e frações protéicas e de carboidratos do feno de Tifton 85 em diferentes idades de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 32, p. 804-813, 2003.

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. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 26, p.1551-1557, 1975.

HATFIELD, R. D. Carbohydrate composition of alfafa cell walls Isolated from stem sections differing in maturity. **Journal Agriculture Food Chemistry**, v. 40, p. 424-430. 1992.

HATFIELD, R. D. The acetyl bromide assay to determine lignin concentrations in plants. **Journal of Agriculture Food Chemistry**, v. 47, p. 628-632, 2001.

HATFIELD, R. D.; FUKUSHIMA, R. S. Can lignin be accurately measured? **Crop Science**, v. 45, p. 832-838, 2005.

HATFIELD, R. D.; JUNG, H. G.; RALPH, J.; BUXTON, D. R.; WEIMER, P. J. A comparison of the insoluble residues produced by the klason lignin and acid detergent lignin procedures. **Journal of. Agriculture Food Chemistry**, v. 65, n 1, p. 51-58, 1994.

HENDRIX, D. L. Rapid extraction and analysis of nonstructural carbohydrate in plant tissues. **Crop Science**, v. 33, p. 1306-1311, 1993.

- HIGUCHI, T. Lignin structure and morphological distribution in plant cell walls. In: KIRK, T. K.; HIGUCHI, T.; CHANG, H. (Ed.). **Lignin biodegradation: microbiology, chemistry and potential applications**. Boca Raton: CRC Press, FL, 1980. v. I, p. 2.
- HIGUCHI, T.; ITO, Y.; KAWAMURA, I. P-Hydroxyphenylpropane component of grass lignin and role of tyrosine-ammonia lyase in its formation. **Phytochemistry**, v. 6, n. 1, p. 875, 1967.
- HOFMANN, R. R. Anatomy of the gastrointestinal tract. In: CHURCH, D. C. (Ed.). **The ruminant animal: digestive physiology and nutrition**. Englewood Cliffs: Prentice Hall. 1988. p. 14-43.
- IYAMA, K.; WALLIS, A. F.A. Determination of lignin in herbaceous plants by an improved acetyl bromide procedure. **Journal of Science Food Agriculture**, v. 51, p. 145-161, 1990.
- JUNG, H. G. Forage lignins and their effects on fiber digestibility. **Journal Agriculture Food Chemistry**, v. 59, p.169-176, 1989.
- JUNG, H. G.; DEETZ, D. A. Cell wall lignification and degradability. In: JUNG, H. G.; HATIFIELD, D. R **Forage cell wall structure and digestibility**. Madison: America Society of Agronomy, Society of America Science, 1993. p. 315-46.
- JUNG, H. G.; ENGELS, F. M. Alfafa stem tissues cell wall deposition, composition, and degradability. **Crop Science**, v. 62, p. 524-534, 2002.
- JUNG, H. G.; FAHEY JR., G. C. Effects of phenolic monomers on rat performance and metabolism. **Journal of Nutrition**, v. 113, p. 546, 1983.
- JUNG, H. G.; VOGEL, K. P. Influence of lignin on digestibility of forage cell wall material. **Journal of Animal Science**, v. 62, p. 1703, 1986.
- KIRK, T. K.; OBST, J. R. Lignin determination. In: WILLIS, A.; KELLOGGS, S. T. (Ed.). **Methods in enzymology**. San Diego, CA: Academic Press, v. 161, 1988. p. 87-101.
- KONDO, T.; MIZUNO, K.; KATO, T. Some characteristics of forage plant lignin. **Japanese Agriculture Research Quarter**, v. 21, n. 1, p. 47-52, 1987.
- LAI, Y. Z.; SARKANEN, K. V. Delignification by peracetic acid. II Comparative study on softwood and hardwood lignins. **Tappi**, v. 51, n. 10, p. 449-453, 1971.
- LAM, T. B. T.; IYAMA, K.; STONE, B. A. Lignin in wheat internodes. Part 2: Alkaline nitrobenzene oxidation by wheat straw lignin and its fractions. **Journal of Science Food Agriculture**, v. 51, p. 493-506, 1990.

LANZAS, C.; TEDESCHI, L. O.; FOX, D. G. Impact of the level of aggregation of feed carbohydrate (CHO) fractions on predictions of the Cornell Net Carbohydrate and Protein System (CNCPS). **Journal of Animal Science**, v. 83, p. 392, 2005. Supplement 1.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Principles of biochemistry cell**. New York: Worth Publishers, 1993. 937 p.

LEWIS, D. H. Boron Lignification and the origin of vascular plants - a unified hypothesis. **New Phytologist**, v. 84, p. 209-229, 1980.

LOWRY, J. B.; CONLAN, A. C.; SCHLINK, A. C.; MCSWEENEY, C. S. Acid detergent dispersible lignin in tropical grasses. **Journal of Science Food Agriculture**, v. 65, n. 6, p. 41-49, 1994.

LU, F.; RALPH, J. Derivatization followed by reductive cleavage (DFRC method), a new method for lignin analysis: protocol for analysis of DFRC monomers. **Journal of Agriculture Food Chemistry**, v. 45, p. 2590-2592, 1997.

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

MALAFAIA, P. A. M.; VALADARES FILHO, S. C.; VIEIRA, R. A. M. Determinação das frações que constituem os carboidratos totais e cinética ruminal da fibra em detergente neutro de alguns alimentos para ruminantes. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 27, p. 790-796, 1998.

MERTENS, D. R. Predicting intake and digestibility using mathematical models of ruminal function. **Journal of Animal Science**, v. 64, n. 8, p. 1584-1558, 1987.

MERTENS, D. R. Regulation of forage intake. In: FAHEY JR., D. C. **Forage quality, evaluation and utilization**. Madison: American Society of Agronomy, 1994. p. 450-492.

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

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. **Journal of Agriculture Food Chemistry**, v. 34, n. 1, p. 1323, 1983.

MOWAT, D. N.; KWAIN, M. L.; WINCH, J. E. Lignification and in vitro cell wall digestibility of plants parts. **Canadian Journal of Plant Science**, v. 49, n. 4, p. 499-504, 1969.

NELSON, C. J.; MOSER, L. E. Plant factors affecting forage quality. In: FAHEY JR., G.C. (Ed.). **Forage quality, evaluation and utilization**. Madison: American Society of Agronomy, 1994. p.115-154.

NOCEK, J. E.; RUSSEL, J. B. Protein and energy as an integrated system: relationship of ruminal protein and carbohydrate availability to microbial synthesis and milk production. **Journal of Dairy Science**, v. 71, p. 2070-2107, 1988.

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

NUNES, I. J. **Nutrição animal básica**. 2. ed. Belo Horizonte: Manole, 1998. p. 51-72.

NUSSIO, L. G.; MANZANO, R. P.; PEDREIRA, C. G. S. Valor alimentício em plantas do gênero *Cynodon*. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO DA PASTAGEM, 15., 1998, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: FEALQ, 1998. p. 203-242.

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

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

PEREIRA, E. S.; QUEIROZ, A. C.; PAULINO, M. F. Determinação das frações protéicas e de carboidratos e taxas de degradação *in vitro* da cana-de-açúcar, da cama de frango e do farelo de algodão. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 29, p. 1887-1893, 2000.

PEREIRA, J. R. A. composição botânica e valor nutritivo da dieta de bovinos em pastos tropicais. In: SIMPÓSIO SOBRE NUTRIÇÃO DE BOVINOS, 7., 1999, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: FEALQ, 1999. 467 p.

PEREIRA, J. R. A.; ROSSI JR., P. **Manual prático de avaliação nutricional de alimentos**. Piracicaba: FEALQ, 1994. 34 p.

QUEIROZ, M. A. A.; FUKUSHIMA, R. S.; GOMIDE, C. A.; BRAGA, M. R. Substitution of neutral detergent fibre for crude cell wall preparation in the Cornell Net Carbohydrate and Protein System suggests modifications in the equations that predict carbohydrate fractions. **Animal Science** (submetido).

RALPH, J.; HATFIELD, R. D.; QUIDEAU, S.; HELM, R. F.; GRABBER, J. H.; JUNG, H. G. Pathway of *p*-coumaric acid incorporation into maize lignin as revealed by NMR. **Journal of American Chemistry Society**, v. 116, p. 9448-9456, 1994.

- REINHART, G. A.; SUNVOLD, G. D. Proceedings of the 1996 Iams International Nutrition Symposium. In vitro fermentation as a predictor of fiber utilization. In: CAREY, D. P.; NORTON, S. A.; BOLSER, S. M. **Recent advances in canine and feline nutritional research**. Wilmington: Orange Frazer Press, 1996. p. 15-24.
- RIBEIRO, K. G.; PEREIRA, O. G.; VALADARES FILHO, S. C. Caracterização da frações que constituem as proteínas e os carboidratos e respectivas de digestão do feno de capim Tifton 85 de diferentes idades de rebrota. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 30, p. 589-595, 2001.
- ROCHA JR., V. R.; VALADARES FILHO, S. C.; BORGES, A. M. Estimativa do valor energético dos alimentos e validação das equações propostas pelo NRC (2001). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 32, n. 2, p. 480-490, 2003.
- RUSSEL, J. B.; O'CONNOR, J. D.; FOX, D. G.; VAN SOEST, P. J.; SNIFFEN, C. J. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: I. Ruminal fermentation. **Journal of Animal Science**, v. 70, p. 3551-3561, 1992.
- SARKANEN, K. V.; LUDWIG, C. H. **Lignins**: occurrence, formation, structure and reactions. New York: Wiley Interscience, 1971.233, p.
- SAS. STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM. **SAS user's guide**: statistics. Versão 5 Cary: SAS, 1985.
- 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. **Revista Brasileira Zootecnia**, v. 29, n. 6, p. 1320-1332, 2000.
- SHARMA, H. S. S. Compositional analysis of neutral detergent, acid detergent, lignin and humus fractions of mushroom compost. **Thermochemica Acta**, v. 285, n 2, p. 211-220, 1996.
- SHIMOJO, M.; GOTO, I. A study on the relation between disappearance of dry matter and acetyl bromide lignin of tropical grass. **Japanese Journal of Zoology**, v. 55, p. 838, 1984.
- SMITH T. A. The quantitative estimation of putrescine by gas chromatography. **Analytical Biochemistry**, v. 33, p. 10-15, 1970.
- SNIFFEN, C. J.; O'CONNOR, J. D.; VAN SOEST, P. J. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: II. Carbohydrate and protein availability. **Journal of Animal Science**, v. 70, n.12, p. 3562-3577, 1992.
- THEANDER, O.; WESTERLUND, E. A. Studies on dietary fibre. 3. Improved procedures for analysis on dietary fibre. **Journal of Agriculture Food Chemistry**, v. 34, n 2, p. 330-336, 1986.
- THOMAS, B.; ARMSTRONG, D. G. The determination of lignin. **Journal of Agriculture Science**, v. 39, p. 335, 1949.

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

TRAXLER, M. J.; FOX, D. G.; VAN SOEST, P. J.; PELL, A. N.; LASCANO, C. E.; LANNA, D. P. D.; MOORE, J. E.; LANA, R. P.; VÉLEZ, M.; FLORES, A. Predicting forage indigestible NDF from lignin concentration. **Journal of Animal Science**, v. 76, p. 1469-1480, 1998.

VAN SOEST, P. J. Development of comprehensive system of feed analyses and application to forages. **Journal of Animal Science**, v. 26, p. 119-131, 1967.

VAN SOEST, P. J. **Nutritional ecology of the ruminant**. 2. ed. Ithaca, NY: Cornell University Press, 1994. p. 657.

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

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

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

VAN SOEST, P. J.; WINE, R. H. The determination of lignin and cellulose in acid-detergent fibre with permanganate. **Journal of Association Official Analise Chemistry**, v. 51, n. 4, p. 780, 1968.

WEISS, W. P. Estimating the available energy content of feeds for dairy cattle. In: Symposium: energy availability. **Journal of Dairy Science**, v. 81, p. 830-839, 1998.

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

ZIMMER, A. H.; SILVA, M. P.; MAURO, R. Sustentabilidade e impactos ambientais da produção animal em pastagens. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO DE PASTAGEN, 2002, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: FEALQ, 2002. v. 19, p. 31-58.