

DAIANY IRIS GOMES

AVALIAÇÃO DO TEOR DE LIGNINA EM FORRAGENS TROPICAIS POR
DIFERENTES MÉTODOS ANALÍTICOS E SUA ASSOCIAÇÃO COM A
DEGRADAÇÃO DA FIBRA INSOLÚVEL

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa, como
parte das exigências do Programa de
Pós-Graduação em Zootecnia, para
obtenção do título de *Magister
Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2010

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

G633a
2010

Gomes, Daiany Iris, 1985-

Avaliação do teor de lignina em forragens tropicais por diferentes métodos analíticos e sua associação com a degradação da fibra insolúvel / Daiany Iris Gomes. – Viçosa, MG, 2010.

x, 39f. : il. ; 29cm.

Orientador: Edenio Detmann.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 35-39.

1. Fibras na nutrição animal. 2. Lignina. 3. Rúmen - Fermentação. 4. Bovino - Alimentação e rações. 5. Plantas forrageiras. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 636.2084

DAIANY IRIS GOMES

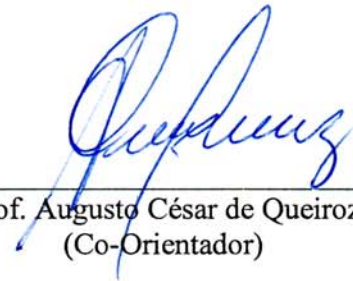
**AVALIAÇÃO DO TEOR DE LIGNINA EM FORRAGENS TROPICAIS POR
DIFERENTES MÉTODOS ANALÍTICOS E SUA ASSOCIAÇÃO COM A
DEGRADAÇÃO DA FIBRA INSOLÚVEL**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa, como
parte das exigências do Programa de
Pós-Graduação em Zootecnia, para
obtenção do título de *Magister
Scientiae*.

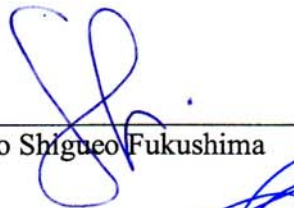
APROVADA: 23 de fevereiro de 2010




Prof. Sebastião de Campos Valadares Filho
(Co-Orientador)



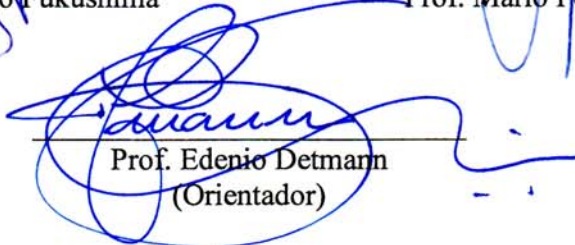
Prof. Augusto César de Queiroz
(Co-Orientador)



Prof. Romualdo Shigueo Fukushima



Prof. Mário Fonseca Paulino



Prof. Edenio Detmann
(Orientador)

A Deus, minha fortaleza...

Ao meu pai, **José Antônio Gomes**, exemplo de homem simples, honesto, trabalhador, sinônimo de luta e vitória.

À minha mãe, **Aida de Almeida Gomes**, exemplo de garra e determinação que nos momentos difíceis sempre teve uma palavra de consolo.

Aos meus queridos irmãos, **Kácia e Rodrigo**, os quais com atitudes diferentes, sempre demonstraram suas torcidas por mim.

Ao homem trabalhador e dedicado, **Lazir Ribeiro**, que compartilha momentos de alegria, tristeza e vitórias ao meu lado.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

À Deus e Nossa Senhora pela vida e saúde.

À Universidade Federal de Viçosa, e ao Departamento de Zootecnia, por tornar possível a realização deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudos.

À Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG - Programa Pesquisador Mineiro) e ao CNPq, pelo apoio financeiro para realização deste trabalho.

Ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Ciência Animal (INCT-Ciência Animal), pelo apoio financeiro durante a realização do trabalho.

Ao Professor Edenio Detmann, pela orientação, conselhos e generosidade em transmitir conhecimento, dedicação. Admirado por sua inteligência e responsabilidade.

Ao Professor Augusto Cezar de Queiroz, pela atenção e preocupação com o desenvolvimento do trabalho.

Ao Professor Romualdo Shigueo Fukushima, pelos ensinamentos, atenção, acolhida e por ceder generosamente as instalações do Laboratório de Lignina.

Aos Professores Mário Fonseca Paulino, Sebastião C. Valadares Filho, pelos os ensinamentos e apoio.

A toda minha família meu porto seguro, cumplicidade, incentivo, compreensão e confiança.

Aos amigos, Kaliandra e Rennan, mesmo distantes transmitem palavras de força e coragem, sempre torcendo e incentivando toda a caminhada acadêmica. São minha segunda família em Parauapebas. Obrigada.

À amiga, Livia Barros, pelas horas de estudo, por dividir momentos de alegrias e dificuldades, pela confiança, palavra de força.

Aos amigos, Evaristo e Thaysa, pelos momentos de descontrações, conversas serias, conselhos, e por serem irmãos do coração.

À Natália, Carolina, Anelisa (Isa) e Márcia (República), por todos os momentos de convivência, são minha família em Viçosa. Obrigada, por chorarem comigo nos momentos difíceis e comemorarem as alegrias. Vocês excepcionalmente especiais.

Ao Carlindo, Hellen, e Rosana pelos momentos de descontração, conversas, estudo e amizade “Os cafés”.

Aos amigos, Raphael, Darley, Sandra, Enio e José Cláudio pela torcida e momentos de descontração.

À Isabela, Isis, Claudinha, Viviane e Janderson, por sempre estarem dispostos a esclarecer as dúvidas.

À Majorrie e Tiago pela contribuição e auxílio na execução do trabalho.

Ao Willian, Erick e Polliana, pelo trabalho realizado, sempre com muita dedicação, bom humor e atenção.

À Vanessa Cristian, pelo trabalho, dedicação, contribuição significativa para o desenvolvimento deste trabalho.

À Natália e Filipe, por contribuírem com o trabalho nos momentos que precisei de ajuda.

Aos funcionários do Laboratório, especialmente, Monteiro, Wellington e Fernando por contribuírem imensamente com o desenvolvimento do trabalho.

Aos colegas da pós, Andréa, Rafael, Fabiana Lana, Gustavo, Gilson, Mateus, João Paulo, Mozart, Macio, Ivanna e Tadeu pelos momentos de descontração.

À Celeste, Fernanda e Edson pela atenção e dedicação.

À todos os funcionários do Departamento de Zootecnia, que sempre tiveram atenção em ajudar.

À Estela e Pacheco pelo acolhimento, simpatia e atenção, durante os dias em Pirassununga.

A todos que contribuíram para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

DAIANY IRIS GOMES, filha de José Antônio Gomes e Aida de Almeida Gomes nasceu em Unai, Minas Gerais, em 29 de novembro de 1985.

Em março de 2004, ingressou na Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA), no curso de Zootecnia, graduando-se em julho de 2008.

Em agosto de 2008 iniciou o curso de mestrado em Zootecnia pela Universidade Federal de Viçosa (UFV), concentrando seus estudos na área de Nutrição de Ruminantes, submetendo-se à defesa de dissertação em 23 de fevereiro de 2010.

CONTEÚDO

RESUMO.....	VII
ABSTRACT	IX
INTRODUÇÃO	1
MATERIAL E MÉTODOS	5
RESULTADOS.....	12
DISCUSSÃO	25
CONCLUSÕES.....	35
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35

RESUMO

GOMES, Daiany Iris, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2010. **Avaliação do teor de lignina em forragens tropicais por diferentes métodos analíticos e sua associação com a degradação da fibra insolúvel.** Orientador: Edenio Detmann. Co-orientadores: Augusto César de Queiroz e Sebastião de Campos Valadares Filho.

Objetivou-se avaliar os teores de lignina em forragens tropicais pelos métodos lignina em ácido sulfúrico (LAS), lignina em permanganato de potássio (LPER), lignina Klason (LK) e lignina solúvel em brometo de acetila obtida a partir da parede celular (LBApf) e do resíduo em detergente ácido (LBAfda) e sua associação com parâmetros da degradação da fibra em detergente neutro (FDN). Foram avaliadas amostras de dez gramíneas: capim elefante (*Pennisetum purpureum*), capim braquiária (*Brachiaria decumbens*), grama castela (*Panicum repens*), quicúio da amazônia (*Brachiaria humidicola*), capim andropogon (*Andropogon gayanus*), capim aruana (*Panicum maximum* cv. Aruana), capim mombaça (*Panicum maximum* cv. Mombaça), capim xaraés (*Brachiaria brizantha* cv. Xaraés), capim tifton-85 (*Cynodon* sp.) e capim-massai (*Panicum maximum* cv. Massai); e dez leguminosas: amendoim forrageiro (*Arachis pintoi*), alfafa (*Medicago sativa*), leucena (*Leucaena leucocephala*), galactia (*Galactia striata*), lab lab (*Dolichos lablab*), centrosema (*Centrosema pubescens*), soja perene (*Glycine wegthii*), gliricidia (*Gliricidia sepium*), estilosantes (*Stylosantes guianensis*) e guandu (*Cajanus cajan*). Todas as amostras foram obtidas por corte rente ao solo no mês de dezembro de 2008. As plantas apresentavam aproximadamente 45 dias de rebrotação. Os teores de lignina obtidos pelos métodos gravimétricos foram estimados também na forma corrigida para compostos nitrogenados, sendo referenciados como LASp, LPERp e LKp. Foram estimados por intermédio de ensaio *in vitro* os teores da fração indegradável da FDN (FDNi), a taxa de degradação da fração potencialmente degradável da FDN (kd) e a latência discreta para degradação da FDN (LAG). A correção para compostos nitrogenados implicou reduções significativas ($P < 0,05$) nos teores de LAS, LK e LPER. Evidenciaram-se diferenças mais proeminentes entre valores corrigidos e brutos (não corrigidos) para LK. Os teores de proteína associados à LK foram considerados similares ($P > 0,05$) aos teores de proteína insolúvel em detergente neutro. Verificou-se interação ($P < 0,05$) entre método analítico e grupo de forrageiras para os teores de lignina. Considerando-se a unidade g/kg MS, diferenças entre gramíneas e leguminosas foram obtidas ($P < 0,05$) com os métodos

LASp e LPERp, que indicaram maiores valores para leguminosas, e LBAPc, o qual, por sua vez, indicou maior estimativa para gramíneas. Considerando-se somente gramíneas, maior estimativa ($P < 0,05$) foi conferida pelo método LKp, seguido de LPERp e LBAPc, que não diferiram ($P > 0,05$), LASp e LBAfda. Para leguminosas, as maiores estimativas ($P < 0,05$) foram conferidas por LKp, seguidas por LPERp, LASp e LBAPc e LBAfda, sendo estes últimos similares ($P > 0,05$). As estimativas dos teores de lignina obtidas pelos métodos LASp e LPERp apresentaram comportamento similar, associando-se significativamente ($P < 0,05$) com os teores de FDNi e com kd e LAG. Contudo, para ambos os métodos, não se detectou comportamento diferenciado para gramíneas e leguminosas quanto ao intercepto ou coeficiente de inclinação da função ajustada ($P > 0,05$). Correlações mais fortes foram observadas entre LPERp e os parâmetros de degradação da FDN em relação àquelas obtidas com o método LASp. Os teores de LKp se associaram ($P < 0,05$) com todos os parâmetros de degradação da FDN. No entanto, diferente dos métodos LASp e LPERp, verificou-se diferenciação entre gramíneas e leguminosas quanto ao intercepto da função ajustada ($P < 0,05$), observando-se valores superiores de FDNi e LAG e inferiores de kd para as leguminosas. Os mais fortes coeficientes de correlação entre todos os métodos avaliados foram obtidos com LPERp e LKp. Os teores de lignina estimados pelo método LBAPc não apresentaram relação ($P > 0,05$) funcional com nenhum dos parâmetros da dinâmica de degradação da FDN. Para todos estes, apenas percebeu-se a diferença média entre grupos de forrageiras. Verificou-se relação ($P < 0,05$) entre os teores de lignina estimados pelo método LBAfda e os teores de FDNi, observando-se, contudo, nenhuma diferenciação entre gramíneas e leguminosas ($P > 0,05$). Contudo, o coeficiente de correlação foi menos forte em comparação àqueles verificados para os métodos LASp, LKp e LPERp. Não foram verificadas relações funcionais ($P > 0,05$) entre as estimativas obtidas pelo método LBAPc e os parâmetros de degradação da FDN, detectando-se somente a diferença média entre grupos de forrageiras. A partir dos resultados obtidos conclui-se que os métodos gravimétricos LAS, LPER e LK produzem resíduos contaminados por compostos nitrogenados. A correção para estes contaminantes é sugerida, notadamente para LK, para que os teores de lignina sejam expressos com maior exatidão. Associações entre lignina e os parâmetros de degradação ruminal da FDN são mais bem estabelecidas utilizando-se as estimativas produzidas pelos métodos LKp e LPERp.

ABSTRACT

GOMES, Daiany Iris, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February of 2010.

Evaluation of lignin contents in tropical forages using different analytical methods and their correlation with degradation of insoluble fiber. Adviser: Edenio Detmann.

Co-advisers: Augusto César de Queiroz and Sebastião de Campos Valadares Filho.

The objective of this work was to evaluate the lignin contents in tropical forage using the methods of acid sulfuric lignin (ASL), potassium permanganate lignin (PL), Klason lignin (KL) and acetyl bromide soluble lignin obtained from cell wall (ABL_{cw}) and from acid detergent residue (ABL_{ad}) and their association with parameters of neutral detergent fiber (NDF) degradation. It were evaluated ten grass samples: elephant grass (*Pennisetum purpureum*), signal grass (*Brachiaria decumbens*), torpedo grass (*Panicum repens*), Korovinia grass (*Brachiaria humidicula*), gamba grass (*Andropogon gayanus*), aruana grass (*Panicum maximum* cv. Aruana), mombaça grass (*Panicum maximum* cv. Mombaça), xaraés grass (*Brachiaria brizantha* cv. Xaraés), tifton-85 (*Cynodon* sp.), and massai grass (*Panicum maximum* cv. Massai); and ten legume samples: perennial peanut (*Arachis pintoi*), alfafa (*Medicago sativa*), leucaena (*Leucaena leucocephala*), galactia (*Galactia striata*), lablab bean (*Dolichos lablab*), butterfly pea (*Centrosema pubescens*), glycine (*Glycine wightii*), gliricidia (*Gliricidia sepium*), Brazilian lucerne (*Stylosantes guianensis*) and guandu (*Cajanus cajan*). All samples were taken through a cutting near to ground in December of 2008. The plants were 45-days regrowth. The lignin contents obtained by gravimetric methods were also estimated corrected for nitrogenous compounds. In this case, they were assigned as ASL_p, PL_p, and KL_p. The indigestible NDF (iNDF), the fractional degradation rate of potentially degradable NDF (kd), and the discrete lag of NDF degradation were obtained by an *in vitro* assay. The correction for nitrogenous compounds decreased ($P < 0.05$) the contents of ASL, KL and PL. The differences between corrected and crude values were more prominent for KL. The protein contents of KL were found similar ($P > 0.05$) to neutral detergent insoluble protein. There was interaction effect ($P < 0.05$) between analytical method and forage group on lignin contents. Considering the contents as g/kg DM, differences between grasses and legumes were pointed out ($P < 0.05$) by ASL_p and PL_p, being the higher values associated with legumes, and by ABL_{cw}, which caused higher values in grasses. For grasses, highest lignin contents ($P < 0.05$) were obtained with KL_p, which was followed by PL_p and ABL_{cw}, that did not differ each other ($P > 0.05$), ASL_p, and ABL_{ad}. For legumes, highest

contents ($P < 0.05$) were obtained with KLp, followed by Lp, ASLp, ABLcw, and ABLad. These last two were not different ($P > 0.05$). The lignin estimates obtained by ASLp and PLp shown similar association pattern ($P < 0.05$) with iNDF, kd, and LAG. There was no difference in both methods for grasses and legumes regarding intercept and slope of adjusted regression ($P > 0.05$). Stronger correlations were observed between PLp and degradation parameters of NDF compared to ASLp. The KLp estimates did associate with all degradation parameters ($P < 0.05$). However, there were differences between grasses and legumes regarding intercept of adjusted regression ($P < 0.05$). Legumes presented higher iNDF and LAG, and lower kd. The strongest correlation coefficients were obtained using Lp and KLp estimates. The ABLcw contents did not presented functional relationships with NDF degradation parameters ($P > 0.05$), where only the average differences between forage groups were detected. It was verified relationship ($P < 0.05$) between ABLad contents and iNDF. However, no difference between grasses and legumes was pointed out by adjusted regression ($P > 0.05$). Nevertheless, the correlation coefficient was weaker compared to ones obtained using ASLp, KLp, and PLp. There were no functional relationships between ABLcw and degradation parameter of NDF ($P > 0.05$). In this case, it was only detected the average difference between forage groups. It was concluded that gravimetric methods ASL, PL and KL produce residues that contain significant contaminant nitrogenous compounds. More accurate estimates of lignin content could be obtained when correction for residual nitrogen is done. This is particularly necessary for KL. Associations between lignin and degradation parameters of NDF are better recognized when KLp and PLp methods are employed.

INTRODUÇÃO

A quantificação do valor nutricional dos alimentos para ruminantes envolve estudos que avaliam, principalmente, a fração fibrosa das forragens, a qual tem importância fundamental, pois fornece quantidade significativa de energia a baixo custo. Esta, por apresentar variabilidade naturalmente superior aos demais componentes químicos, deve ocupar posição central na avaliação energética (Detmann et al., 2004; 2008a).

A melhor medida do valor nutritivo dos alimentos é a produtividade animal, a qual é resultante da ingestão, digestão e eficiência de utilização de nutrientes absorvidos (Smith et al., 1972). Contudo, alguns alimentos apresentam maior proporção de parede celular lignificada, o que muitas vezes está associado à menor digestão das forragens (Jung & Deetz, 1993). Neste sentido, torna-se importante do ponto de vista nutricional o entendimento dos mecanismos que ditam os limites da degradação dos substratos fibrosos pelos microrganismos ruminais.

Vários fatores são apontados na tentativa de esclarecer a utilização das forragens pelo animal, no intuito de se otimizar o desempenho dos ruminantes nos trópicos. Os aspectos associados à constituição da parede celular são apontados como os responsáveis pelo menor consumo de forragem e desempenho animal nos trópicos (Paulino et al., 2008). Dos componentes da parede celular, a lignina, polímero de subunidades aromáticas derivadas do ácido shiquímico, é o componente mais reconhecido por limitar a digestão dos polissacarídeos fibrosos no rúmen (Van Soest, 1994). No entanto, na planta, a lignina exerce papel de matriz ao redor dos componentes polissacarídeos da parede celular, promovendo rigidez e resistência física, bem como tornando a parede hidrofóbica e impermeável (Jung & Allen, 1995).

Neste contexto, os carboidratos fibrosos das plantas forrageiras nem sempre são acessados pelos microrganismos ruminais devido à presença de compostos fenólicos, como a lignina, que formam barreira física para a ação dos sistemas enzimáticos microbianos (Dehority, 1993). Assim, o grau de lignificação em torno da celulose é mais relacionado com a redução da digestibilidade do que a concentração total de lignina da planta (Dehority & Johnson, 1961).

A digestão da parede celular requer população microbiana ativa com capacidade de utilizá-la. Desta maneira, a forma como o substrato é trabalhado depende da ação dos sistemas enzimáticos durante o tempo no qual a interação enzima:substrato ocorre, ou seja,

da efetividade do processo de degradação ou digestão (Detmann et al., 2008a). Portanto, os componentes da parede celular que impedem a colonização e utilização da fração fibrosa dos alimentos devem ser estudados criteriosamente para serem entendidos não apenas como estruturas químicas absolutas, mas também no tocante à sua influência sobre o processo dinâmico de degradação ruminal.

Em grande parte das avaliações nutricionais tem-se ignorado a complexidade dos mecanismos biológicos de digestão, pois o teor de lignina tem sido correlacionado com a digestibilidade pontual da forragem (Van Soest, 1963; Smith et al., 1972; Jung & Vogel, 1986; Jung & Varel, 1988; Savioli & Fukushima, 2000; Fukushima & Hatifield, 2004) Entretanto, o processo de utilização do substrato no trato gastrintestinal do ruminante abrange vários fatores mais complexos. Neste sentido, alguns fatores como taxa e extensão da degradação e densidade e estrutura da parede celular são limitações básicas que determinam o quanto e como ocorrerá a digestão da matriz orgânica da parede celular (Van Soest, 1993). Portanto, torna-se importante do ponto de vista biológico a forma com que são estabelecidas as associações entre as variáveis de limitação (teor de lignina) e as variáveis relacionadas à efetividade e ao potencial de ação microbiana sobre o substrato (fibra insolúvel).

O grau de interação ou imposição de indigestibilidade da lignina sobre a parede celular depende primariamente da interação química entre os compostos fenólicos e glicosídicos. Esta interação seria amplamente afetada pela razão entre precursores guaiacil:siringil no estabelecimento da cadeia polifenólica do complexo lignina (Jung & Deetz, 1993). Neste contexto, as ligações cruzadas observadas nas moléculas derivadas de guaiacil (não observadas em siringil) incrementariam o efeito deletério da lignina sobre a degradabilidade dos componentes fibrosos (Van Soest, 1994), dificultando o isolamento de qualquer destes compostos através de métodos que visem à quantificação do teor de lignina com base em formulas químicas de isolamento (Detmann et al., 2004). Dessa maneira, os estudos devem estar direcionados em relacionar todos os componentes químicos que interagem de forma integrada com os fenômenos biológicos.

Afirmar qual método deve ser usado para quantificar o teor de lignina em amostras de forragens não parece ser bem claro em termos de fornecer medida acurada do total de lignina encontrado nas amostras. Os métodos atualmente utilizados podem fornecer resultados contraditórios para uma mesma amostra, tornando questionável a validade de certas afirmações baseadas em concentrações de lignina que foram feitas no passado e ainda hoje são realizadas (Bacha, 2006). No entanto, de um ponto de vista nutricional e

funcional, os métodos para quantificação de lignina devem ser vistos como “meio” para se verificar a porção do alimento que corresponde aos efeitos deletérios sobre a digestão dos carboidratos fibrosos, e não com “fins”, ou valores químicos absolutos. A nutrição animal deve seguir caminhos que elucidem a complexidade dos efeitos biológicos causados por componentes químicos, como a lignina.

Nenhuma medida da qualidade da forragem pode estar totalmente incorreta, mas a utilidade dos dados resultantes de esforços dirigidos para a melhoria da qualidade da forragem é limitada pela forma como o material é caracterizado (Jung & Allen, 1995).

Existem diferentes métodos empregados na avaliação de lignina, porém nenhum atende plenamente à expectativa nutricional, relacionando teor de lignina, bem como seus efeitos, e o processo digestivo do animal. Há divergências significativas nos resultados obtidos em laboratórios para todos os métodos aplicados.

O método de lignina insolúvel em ácido sulfúrico com extração prévia com detergente ácido (LAS), adotado com padrão por alguns sistemas nutricionais (e.g. NRC, 2001), tipicamente subestima os teores de lignina devido à solubilização parcial da mesma na solução de detergente ácido (Van Soest, 1994). No método LAS a perda de lignina, particularmente em gramíneas pode chegar a 50% (Lowry et al., 1994). Apesar dos métodos LAS e de 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). Os métodos gravimétricos são restritos por não ter uma preparação pura de lignina em relação à qual podem ser padronizados (Fukushima & Dehority, 2000).

A lignina também é suscetível à oxidação, a qual aumenta com a presença de duplas ligações insaturadas e, por apresentar natureza fenólica, é facilmente oxidada por uma quinona. As duplas ligações remanescentes são oxidadas e clivadas (Van Soest, 1994). Neste sentido, a oxidação por permanganato de potássio constitui método para avaliação gravimétrica do teor de lignina (Van Soest & Robertson, 1985).

A diferença entre métodos remete ao risco de remover os carboidratos que não fazem parte da lignina, em especial a hemicelulose residual e contaminação de pectina no resíduo em detergente ácido, passo intermediário do processo analítico o qual seria responsável pela redução dos contaminantes na avaliação gravimétrica de lignina (Van Soest & Robertson, 1985). A razão dos teores de lignina obtidos por oxidação por

permanganato e por hidrólise em ácido (LAS) é de aproximadamente 1,2:1 (Van Soest & Wine, 1968).

Outros possíveis métodos para mensurar o conteúdo de lignina são baseados na absorvância de luz ultravioleta. O procedimento é realizado através da extração da lignina por álcali, a qual é mensurada por intermédio da absorvância em solução. Entretanto, esses métodos apresentam desvantagens, sendo que a principal dificuldade é a densidade óptica, pois há limitação na conversão dos valores de absorvância em números absolutos do teor de lignina devido à ausência de padrão referência (Fukushima & Hatfield, 2004). No entanto, alguns autores têm sugerido a lignina solúvel em brometo de acetila na avaliação do valor nutritivo de forragens (Fukushima & Dehority, 2001).

Os métodos espectrofotométricos, como a lignina solúvel em brometo de acetila, parecem ter menos interferências causadas pelos componentes não-lignina (Van Soest, 1994). O brometo de acetila em anidrido acético pode dissolver melhor a matéria orgânica da parede celular. Assim, os fenólicos acetilados poderão, então, ser estudados na solução. Entretanto, o fato de que o espectro de absorção da luz ultravioleta é diferenciado à medida que a forragem amadurece, e de que estas diferenças também existem entre as frações da planta, sugere diferenças na composição fenólica, caracterizando, portanto, a possível existência de diferentes ligninas em uma mesma forrageira (Savioli & Fukushima, 2000).

O método espectrofotométrico da lignina solúvel em brometo de acetila, utilizando como padrão de referência a lignina extraída da planta forrageira, mostra-se eficaz e com potencial para quantificar a lignina em forragens, embora ainda se exijam estudos para elucidar diversos aspectos ainda obscuros (Savioli & Fukushima, 2000). Contudo, uma possível solução para reduzir o labor durante a quantificação do teor de lignina em brometo de acetila seria obter curva padrão universal para qualquer amostra, para evitar o passo da extração da lignina em brometo de acetila e a construção da curva padrão todas as vezes que for executar o método no laboratório. Neste contexto, Fukushima & Kerley (s.d.) produziram equação de regressão a partir da curva padrão construída a partir de diferentes materiais, a qual foi estabelecida descontando cinzas, proteínas, água, e carboidratos. Desta forma, a lignina em brometo de acetila tornar-se-ia de fácil aplicabilidade.

Todos os métodos praticados para avaliação do teor de lignina baseados no isolamento dos componentes químicos apresentam limitações no tocante aos processos analíticos, de forma que os somatórios das partes são sempre contraditórios em uma mesma amostra. Portanto, a afirmação sobre qual método representa melhor quantidade de

lignina da amostra de forragem e qual estabelece melhor a associação com os fenômenos biológicos do processo de degradação ruminal permanece ainda indefinida.

Portanto, objetivou-se avaliar o teor de lignina em forragens por diferentes métodos (lignina em ácido sulfúrico, lignina em permanganato de potássio, lignina Klason e lignina em brometo de acetila) e sua associação com parâmetros da degradação da fibra em detergente neutro em gramíneas e leguminosas de clima tropical.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado nas dependências do Laboratório de Nutrição Animal do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, e no Laboratório de Lignina da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, Pirassununga-SP.

As amostras de forragem foram obtidas no Setor de Forragicultura do Departamento de Zootecnia da UFV, no qual as forrageiras eram cultivadas em canteiros de 2 x 4 m. Foram avaliadas (Tabela 1) dez gramíneas: capim elefante (*Pennisetum purpureum*), capim braquiária (*Brachiaria decumbens*), grama castela (*Panicum repens*), quicuío da amazônia (*Brachiaria humidicula*), capim andropogon (*Andropogon gayanus*), capim aruana (*Panicum maximum* cv. Aruana), capim mombaça (*Panicum maximum* cv. Mombaça), capim xaraés (*Brachiaria brizantha* cv. Xaraés), capim tifton-85 (*Cynodon* sp.) e capim massai (*Panicum maximum* cv. Massai); e dez leguminosas: amendoim forrageiro (*Arachis pintoi*), alfafa (*Medicago sativa*), leucena (*Leucaena leucocephala*), galactia (*Galactia striata*), lab lab (*Dolichos lablab*), centrosema (*Centrosema pubescens*), soja perene (*Glycine wightii*), glirícia (*Gliricidia sepium*), estilosantes (*Stylosantes guianensis*) e guandu (*Cajanus cajan*). Todas as amostras foram obtidas por corte rente ao solo no mês de dezembro de 2008. As plantas apresentavam aproximadamente 45 dias de rebrotação.

As amostras foram secas em estufa com ventilação forçada (60°C) e processadas em moinho de facas (1 mm).

Inicialmente, foram quantificados os teores de matéria seca (MS), fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA), segundo sugestões de Silva & Queiroz (2002), Mertens (2002) e Van Soest & Robertson (1985), respectivamente. Os

teores de FDN foram corrigidos para cinzas e proteína (FDN_{cp}), segundo os procedimentos descritos por Mertens (2002) e Licitra et al. (1996), respectivamente (Tabela 1).

Tabela 1 – Composição química das gramíneas e leguminosas

	MS	MO	PB	EE	FDN _{cp}	CNF
Gramíneas						
<i>P. purpureum</i>	20,02	88,66	11,37	2,13	65,80	9,36
<i>B. decumbens</i>	30,58	92,06	7,85	3,69	71,03	9,49
<i>P. repens</i>	31,07	95,15	9,73	2,54	71,48	11,40
<i>B. humidicola</i>	29,02	93,09	7,02	2,31	72,30	11,45
<i>A. gayanus</i>	29,05	94,04	8,79	2,32	73,67	9,25
<i>P. maximum</i> cv Aruana	34,75	94,21	7,80	2,51	73,65	10,25
<i>P. maximum</i> cv Mombaça	29,46	90,56	10,39	1,28	69,04	9,88
<i>B. brizantha</i> cv Xaraés	27,21	93,31	8,68	2,38	71,98	10,27
<i>Cynodon</i> sp	31,25	94,65	10,74	2,40	69,23	12,28
<i>P. maximum</i> cv Massai	32,10	93,29	7,26	2,15	79,95	3,90
Leguminosas						
<i>Arachis pintoi</i>	19,87	91,88	17,61	1,88	40,36	32,04
<i>Medicago</i> <i>sativa</i>	25,69	91,67	21,96	4,85	39,87	24,97
<i>Leucena</i> <i>leucocephala</i>	34,25	93,42	22,08	3,97	40,89	26,48
<i>Galactia striata</i>	33,29	92,48	19,87	2,69	40,71	29,21
<i>Dolichos</i> <i>lablab</i>	19,58	91,43	16,87	2,98	44,36	27,22
<i>Centrozema</i> <i>pubescens</i>	26,27	93,26	15,69	2,08	68,09	7,40
<i>Glicine wightii</i>	24,32	90,49	17,82	3,65	51,23	17,78
<i>Gliricidia</i> <i>sepium</i>	17,62	93,47	19,68	1,55	59,80	12,44
<i>Stylosantes</i> <i>guianensis</i>	30,42	94,24	12,75	2,70	54,69	24,10
<i>Cajanus cajan</i>	29,38	94,92	16,98	2,90	69,25	5,79

Os teores de lignina nas forragens foram quantificados por cinco métodos distintos: método da solubilização da celulose por ácido sulfúrico, após extração com detergente ácido (LAS); método da oxidação por permanganato de potássio, após extração com detergente ácido (LPER); método de Klason (LK); método da lignina solúvel em brometo de acetila, após extração com detergente ácido (LBA_{fda}); e método da lignina solúvel em brometo de acetila, a partir do resíduo de parede celular (LBA_{pc}).

Para quantificação do teor de LAS, foi pesado em potes de polietileno (120 mL) aproximadamente 1 g de amostra seca ao ar, adicionando-se 100 mL de detergente ácido (Van Soest & Robertson, 1985). Depois de vedados, os frascos foram autoclavados (105°C/1 hora), de forma a se extraírem todos os componentes solúveis em detergente ácido (técnica de micro-extração; Pell & Schofield, 1993). O resíduo insolúvel em detergente ácido foi retido por filtração sob vácuo em cadinhos filtrantes (porosidade grossa), lavado seqüencialmente com água quente e acetona e submetido à secagem em estufa (105°C/16 horas).

Posteriormente, os cadinhos filtrantes contendo os resíduos foram acondicionados em potes de polietileno, adicionando-se aproximadamente 30 mL de ácido sulfúrico (72% p/p) para umedecimento e homogeneização do conteúdo com auxílio de bastão de vidro. Este procedimento foi realizado com objetivo de quebrar todos os grumos e permitir que o ácido entrasse em contato com todas as partículas da amostra até adquirir forma de pasta. Em seqüência, adicionou-se ácido sulfúrico (72% p/p) até atingir-se metade da altura do cadinho, procedendo-se à homogeneização após 30 minutos (Van Soest & Robertson, 1985).

Após três horas os cadinhos foram submetidos à filtração sob vácuo e lavagem com água quente até a completa retirada do ácido. O material foi seco em estufa (105°C/16 horas), obtendo-se a massa do resíduo composto por lignina e contaminantes minerais (sílica). A seguir, os cadinhos foram transferidos para mufla (500°C) onde permaneceram por três horas. A massa de lignina foi calculada pela perda de peso após a incineração.

Para quantificação do teor de compostos nitrogenados associados à lignina, alíquotas dos resíduos obtidos após o tratamento com ácido sulfúrico foram avaliadas segundo o método de Kjeldhal (Silva & Queiroz, 2002).

O teor de LK foi baseado na hidrólise ácida da fração insolúvel em água (Theander & Westerlund, 1986). Neste método, o material não foi submetido previamente à extração com detergente ácido. Aproximadamente 250 mg de amostra foram acondicionados em potes de polietileno com capacidade de 120 mL. Adicionou-se 3 mL de ácido sulfúrico (72% p/p; 12 M) sobre a amostra, a qual foi homogeneizada com auxílio de bastão de vidro, para que os grumos fossem quebrados formando uma pasta. Em seguida, os potes foram transferidos para “banho-maria”, onde permaneceram por 1 hora a 30°C, procedendo-se à homogeneização a cada 30 minutos. Em seguida adicionou-se aos potes 80 mL de água destilada. Os potes foram então vedados e autoclavados (1 hora/105°C).

Após o passo da autoclave, com o conteúdo ainda morno, o material insolúvel foi transferido quantitativamente sob vácuo para cadinhos filtrantes, procedendo-se à lavagem com água quente e secagem (105°C/16 horas). Em seguida, os cadinhos foram levados para mufla (500°C) durante três horas. A lignina foi obtida pela diferença de peso entre os resíduos insolúvel em ácido sulfúrico e após incineração.

Para quantificação do teor de compostos nitrogenados associados à lignina, alíquotas dos resíduos obtidos após o tratamento com ácido sulfúrico foram avaliadas segundo o método de Kjeldhal (Silva & Queiroz, 2002).

Para avaliação da LPER obteve-se inicialmente o resíduo insolúvel em detergente ácido de forma similar ao descrito para a avaliação da LAS. Em seqüência, os cadinhos filtrantes com o resíduo foram colocados em bandeja de polietileno com uma camada de água destilada de 2 a 3 cm. Foram adicionados 30 mL de solução saturada de KMnO_4 e solução-tampão (2:1; Van Soest & Wine, 1968), respectivamente. Atenção especial foi conferida para que o nível da solução nos cadinhos filtrantes permanecesse em cerca de 50% da altura dos cadinhos, cobrindo toda a amostra. O conteúdo foi constantemente homogeneizado com bastões de vidro. Após 2 horas o precipitado foi isolado por filtração sob vácuo.

Os cadinhos filtrantes com os resíduos foram transferidos para uma bandeja limpa, com lâmina de água similar à descrita anteriormente. Foram adicionados 30 mL da solução de desmineralização (Van Soest & Wine, 1968). Após 30 minutos a solução foi filtrada sob vácuo, procedeu-se à lavagem do resíduo com solução de etanol (80% v/v) e acetona. Os cadinhos com o resíduo foram levados para estufa (105°C/16 horas). A massa de lignina foi dada pela diferença entre a massa de resíduo insolúvel em detergente ácido e a massa do resíduo após o tratamento acima descrito.

Posteriormente, alíquotas dos resíduos obtidos após o tratamento com as soluções de permanganato e desmineralizadora foram avaliadas segundo o método de Kjeldhal (Silva & Queiroz, 2002). O teor de compostos nitrogenados associados à lignina foi obtido pela diferença entre os compostos nitrogenados insolúveis em detergente ácido (Licitra et al., 1996) e os compostos nitrogenados do resíduo obtido.

Para o isolamento da parede celular para avaliação de LBAPc, alíquotas de aproximadamente 10 g foram acondicionadas em sacos de tecido-não tecido (TNT; 100 g/m²; 15 x 10 cm) previamente pesados. Os sacos foram acondicionados em extrator tipo Soxhlet provido de manta aquecedora. A amostra foi submetida à extração seqüencial com água, etanol, clorofórmio:metanol (2:1) e acetona, aproximadamente 250 mL de cada

solução foi gasta até a completa retirada dos pigmentos verdes, deixando o conteúdo residual da amostra incolor. Após a drenagem da maior porção da água da amostra, realizou-se a extração com etanol (96%) usando o mesmo equipamento. A extração completou-se quando o líquido residual estava incolor. Em seguida procedeu-se às extrações com clorofórmio:metanol (2:1) e acetona, definindo-se o ponto final de maneira similar às extrações anteriores. O material foi transferido para estufa com ventilação forçada (60°C) por 72 horas.

A preparação do material para quantificação da LBAfda foi realizada de forma similar ao descrito para a avaliação da LAS.

Os resíduos obtidos para avaliação dos teores de LBAPc e LBAfda foram analisados segundo recomendações de Fukushima & Kerley (s.d.).

Foram pesados 100 mg de parede celular ou FDA em tubo de vidro de centrifuga com tampa de teflon. Adicionaram-se 10 mL da solução de brometo de acetila 25% v/v em ácido acético, homogeneizando-se lentamente. Em seguida realizou-se a digestão dos resíduos em “banho-maria” (50°C/2 horas). A cada 30 minutos o conteúdo foi homogeneizado. Em conjunto à bateria de tubos efetuou-se o branco. Depois dos tubos resfriarem, o material foi centrifugado a 2000 x g por 15 minutos. Em seguida alíquota de 0,5 mL das soluções, contendo cerca de 5 mg dos resíduos, foi pipetado em tubo de ensaio contendo 6,5 mL de ácido acético glacial e 2 mL de NaOH (0,3 M). O material foi homogeneizado. Adicionou-se 1,0 mL de solução de cloridrato de hidroxilamina (0,5 M), procedendo-se a nova homogeneização.

A leitura da solução foi realizada em comprimento de onda de 280 nm. As absorvâncias foram convertidas em concentração segundo equação sugerida por Fukushima & Kerley (s.d.):

$$L = \frac{A - 0,0009}{23,077} \quad (1);$$

em que: L = concentração de lignina (mg/mL); e A = absorvância.

Os teores de LBAfda e LBAPc foram considerados isentos de contaminação por proteínas (Morrison, 1972a), não havendo, portanto, correção.

Para os procedimentos de avaliação *in vitro* da dinâmica de degradação da FDN, alíquotas de forragem (350 mg de MS) foram acondicionadas em frascos de vidro tipo “penicilina” com 50 mL de volume total. Posteriormente, foram adicionados 28 mL de solução tampão (McDougall, 1949), com pH previamente ajustado para 6,8 por intermédio de aspersão com CO₂.

Os frascos foram mantidos em sala climatizada (39°C) para prévia hidratação das amostras. Durante o processo de hidratação, foi coletado líquido ruminal proveniente de um bovino doador, fistulado no rúmen, mantido nas proximidades da sala de incubação. O animal foi alimentado *ad libitum* com dieta mista (80% de volumoso) e teve acesso irrestrito a água e mistura mineral completa (6% de fósforo).

O líquido foi coletado na região de interface líquido:sólido do ambiente ruminal, filtrado por uma camada tripla de gaze, acondicionado em recipiente térmico e imediatamente transportado à sala de incubação. Foram adicionados 7 mL de inóculo ruminal por frasco, procedendo-se imediatamente à saturação do ambiente de incubação com CO₂ e à vedação dos frascos. Os frascos foram mantidos a 39°C, sob agitação orbital (40 rpm). A retirada dos gases oriundos da fermentação foi realizada a cada três horas com o auxílio de agulhas.

Foram avaliados os tempos de 0, 3, 6, 9, 12, 24, 36, 48, 72 e 96 horas de incubação. O procedimento de incubação foi repetido quatro vezes, perfazendo-se o total de quatro avaliações por tempo de incubação para cada forrageira. Ao final de cada tempo de incubação, os frascos foram retirados da sala climatizada, sendo o conteúdo filtrado sob vácuo em cadinhos filtrantes (porosidade grossa).

Os cadinhos foram então acondicionados em frascos de polietileno (120 mL), aos quais se adicionaram 50 mL de detergente neutro (Mertens, 2002). Após serem vedados, os frascos foram autoclavados (105°C/1 hora), de forma a se extraírem todos os componentes solúveis em detergente neutro (técnica de micro-extração; Pell & Schofield, 1993). Após este tratamento, procedeu-se novamente à filtração sob vácuo e lavagem seqüencial do resíduo com água quente e acetona. A FDN residual foi obtida após secagem do material em estufa não ventilada (105°C/16 horas).

Os resíduos de FDN nos diferentes tempos, para cada forrageira, foram submetidos, por intermédio do algoritmo de Gauss-Newton, implementado no PROC NLIN do SAS, ao ajustamento do modelo logístico não-linear descrito por Van Milgen et al. (1991):

$$Rt = FDNpd \times (1 + \lambda \times t) \times \exp(-\lambda \times t) + FDNi \quad (2);$$

em que: Rt = resíduo não-degradado de FDN no tempo “t” (%); FDNpd = fração potencialmente degradável da FDN (%); FDNi = fração indegradável da FDN (%); λ = taxa fracional conjunta de latência e degradação da FDNpd (h⁻¹); e t = tempo (h).

Em virtude de o parâmetro λ representar conjuntamente as taxas de latência e degradação, estimou-se a taxa fracional de degradação a partir de λ utilizando-se as propriedades da distribuição gama-2 (Ellis et al., 1994):

$$kd = 0,59635 \times \lambda \quad (3);$$

em que: kd = taxa fracional de degradação da FDNpd (h^{-1}).

As estimativas de latência discreta foram obtidas segundo derivações de Vieira et al. (1997):

$$L = \frac{R(0) - R(t_i)}{R'(t_i)} + t_i \quad (4);$$

em que: L = latência discreta (h); R(0) = resíduo de FDN não degradado em t = 0 (%); R(t_i) = resíduo não-degradado de FDN obtido no ponto de inflexão da curva de degradação (%); R'(t_i) = derivada da curva ajustada de degradação para o ponto de inflexão (máxima taxa de degradação do substrato) (h^{-1}); t_i = tempo equivalente ao ponto de inflexão da curva de degradação (h).

Os valores de t_i foram obtidos segundo descrições de Van Milgen et al. (1991):

$$t_i = \frac{1}{\lambda} \quad (5).$$

A comparação entre os valores de lignina brutos e corrigidos para compostos nitrogenados foram realizados de forma independente para LAS, LPER e LK por intermédio do ajustamento de equação de regressão linear simples dos valores corrigidos (variável independente) sobre os valores brutos (variável independente), sendo a avaliação estatística conduzida sob as seguintes hipóteses (Mayer et al., 1994):

$$H_0 : \beta_0 = 0 \text{ e } \beta_1 = 1 \quad X \quad H_a : \text{não}H_0 \quad (6).$$

Para o caso de não-rejeição da hipótese de nulidade, concluiu-se pela similaridade entre valores brutos e corrigidos.

A comparação direta quanto aos teores de lignina obtida pelos diferentes métodos nos diferentes grupos de espécies (gramíneas ou leguminosas) foi conduzida segundo delineamento inteiramente casualizado, em esquema de parcelas subdivididas, segundo o modelo:

$$Y_{ijk} = \mu + G_i + S_{(i)j} + M_k + GM_{ik} + \varepsilon_{ijk} \quad (7);$$

em que: μ = constante geral; G_i = efeito relativo ao grupo de espécies i (efeito fixo); S_{(i)j} = efeito da espécie j aninhado ao grupo i (efeito aleatório); M_k = efeito do método de análise

k (efeito fixo); GM_{ik} = interação entre o grupo de espécies i e o método de análise k (efeito fixo); e ε_{ijk} = erro aleatório, não-observável, pressuposto NID (0; σ^2).

As relações entre os teores de lignina obtidos pelos diferentes métodos e as características de degradação da FDN (taxa de degradação, latência discreta e teor de FDNi) foram avaliadas por regressão linear, utilizando-se variável “dummy” (Draper & Smith, 1966), segundo o modelo básico:

$$Y_{ij} = \beta_0 + \beta_1 \times D + \beta_2 \times L_{ij} + \beta_3 \times (D \times L_{ij}) + e_{ij} \quad (8);$$

em que: Y_{ij} = variável dependente observada na espécie j do grupo i; L_{ij} = teor de lignina (g/kg FDN); D = variável “dummy” correspondente ao grupo de espécies, sendo D = 0 para gramíneas e D = 1 para leguminosas; e e_{ij} = erro aleatório, não observável, pressuposto NID (0; σ^2).

A escolha do melhor modelo para descrição das relações foi realizada por intermédio da técnica de *backward regression*, segundo descrições de Draper & Smith (1966).

Todos os procedimentos estatísticos foram realizados por intermédio do programa SAS (PROC MIXED e PROC NLIN), adotando-se 0,05 como nível crítico de probabilidade para o erro tipo I.

RESULTADOS

A correção para compostos nitrogenados reduziu, em média, em 1,3; 12,8 e 3,3% os teores de LAS, LK e LPER, respectivamente, em gramíneas. No tocante a leguminosas, observaram-se reduções de 2,8; 22,7 e 6,8%, na ordem descrita anteriormente (Tabela 2). Este comportamento indica que a contaminação por compostos nitrogenados sobre os teores de lignina avaliados gravimetricamente foi superior em leguminosas em comparação a gramíneas.

Considerando-se ambas as unidades de expressão dos teores de lignina (g/kg MS e g/kg FDN), a correção para compostos nitrogenados implicou reduções ($P < 0,05$) nos teores de LAS, LK e LPER (Tabela 3). Contudo, a inspeção dos pares ordenados permitiu evidenciar diferenças mais proeminentes entre valores corrigidos e brutos (não corrigidos) para LK (Figura 2), corroborando as estatísticas descritivas (Tabela 2).

Tabela 2 – Estatísticas descritivas para as variáveis avaliadas

Variável ¹	Gramíneas		Leguminosas	
	Média	Erro-Padrão	Média	Erro-Padrão
	g/kg de matéria seca			
FDNcp	568,5	13,4	412,4	19,7
LAS	63,4	3,5	92,3	6,8
LASp	62,6	3,4	89,7	5,9
LK	154,2	6,6	171,3	17,8
LKp	134,3	5,9	132,4	14,9
LPER	83,9	2,2	116,8	5,2
LPERp	81,1	2,1	108,9	5,5
LBAPc	79,7	5,3	53,1	15,8
LBAfda	46,9	3,5	41,6	2,1
	g/kg de FDN			
LAS	111,5	5,8	224,1	13,7
LASp	110,3	5,6	217,7	11,9
LK	271,8	12,3	413,8	38,7
LKp	236,8	11,1	319,3	32,2
LPER	147,8	3,5	286,1	12,0
LPERp	142,8	3,4	266,6	12,7
LBAPc	141,4	10,8	131,8	7,9
LBAfda	82,8	6,3	101,3	3,1
	Parâmetros da dinâmica de degradação			
FDNpd	630,7	15,4	489,6	26,8
FDNi	369,3	15,4	510,4	26,8
LAG	3,43	0,15	4,71	0,38
kd	0,0498	0,0022	0,0376	0,0028

¹FDNcp = fibra em detergente neutro corrigida de cinzas e proteína; LAS = lignina em ácido sulfúrico; LASp = lignina em ácido sulfúrico corrigida para proteína; LK = lignina Klason, LKp = lignina Klason corrigida para proteína; LPER = lignina em permanganato; LPERp = lignina em permanganato corrigida para proteína; LBAPc = lignina em brometo de acetila a partir da parede celular; LBAfda = lignina em brometo de acetila a partir do resíduo insolúvel em detergente ácido; FDNpd = fração potencialmente degradável da FDN (g/kg de FDN); FDNi = fração indegradável da FDN (g/kg FDN); LAG = latência discreta (h); kd = taxa fracional de degradação da FDNpd (h⁻¹).

Os teores de proteína associados à LK foram considerados similares (P>0,05) aos teores de proteína insolúvel em detergente neutro (PIDN) (Figura 2).

Em virtude da redução (P<0,05) dos teores de LAS, LK e LPER em função das correções, os demais resultados e discussão foram baseados considerando-se somente os valores corrigidos, os quais passam a serem referenciados como LASp, LKp e LPERp. Esta decisão se baseia no fato de os compostos nitrogenados da parede celular não exercerem efeitos refratários à degradação sobre os carboidratos fibrosos e permitir-se comparação mais verossímeis com os teores de LBAfda e LBAPc, os quais são considerados corrigidos quanto contaminação protéica.

Tabela 3 - Estimativas de parâmetros da regressão linear entre os teores de lignina brutos (X) e corridos para proteína (Y) de acordo com diferentes métodos gravimétricos

Método ¹	Estimativas de Parâmetros				
	Intercepto	Coef. de Inclinação	r ²	S _{xy}	Valor-P ²
	g/kg de MS				
LAS	4,8238	0,9163	0,9941	1,61	<0,0001
LK	5,4141	0,7859	0,9010	11,34	<0,0001
LPER	3,5644	0,9109	0,9772	2,98	<0,0001
	g/kg de FDN				
LAS	6,7810	0,9370	0,9960	4,06	<0,0001
LK	31,3182	0,7196	0,9345	22,44	<0,0001
LPER	6,5452	0,9135	0,9920	6,42	<0,0001

¹ LAS = lignina em ácido sulfúrico; LK = lignina Klason; LPER = lignina em permanganato. ² Nível descritivo de probabilidade para o erro tipo I associado a H₀: $\beta_0 = 0$ e $\beta_1 = 1$ (Equação 6).

Verificou-se efeito de interação (P<0,05) do método analítico e grupo de forrageira para os teores de lignina (Tabela 4). Considerando-se a unidade g/kg MS, diferenças entre gramíneas e leguminosas foram obtidas (P<0,05) com os métodos LASp e LPERp, que indicaram maiores valores para leguminosas, e LBApc, o qual, por sua vez, indicou maior estimativa para gramíneas. Considerando-se somente gramíneas, maior estimativa (P<0,05) foi conferida pelo método LKp, seguido de LPERp e LBApc, que não diferiram (P>0,05), LASp e LBAfda. Para leguminosas, as maiores estimativas (P<0,05) foram conferidas por LKp, seguidas por LPERp, LASp e LBApc e LBAfda, sendo estes últimos similares (P>0,05) (Tabela 4).

Quando considerados os teores de lignina como fração da FDN (g/kg FDN), diferenças entre grupos de forrageiras foram apontadas (P<0,05) pelos métodos LASp, LKp e LPERp, sendo as estimativas superiores para leguminosas. Não foram observadas diferenças (P>0,05) entre grupos com os métodos LBAfda e LBApc. Considerando-se somente as gramíneas, maiores estimativas (P<0,05) foram obtidas com o método LKp, as quais foram seguidas por LPERp e LASp, que não diferiram (P>0,05), e LBApc e LBAfda, também similares entre si (P>0,05). Para leguminosas, o comportamento foi similar ao anteriormente descrito considerando-se a unidade g/kg MS (Tabela 4).

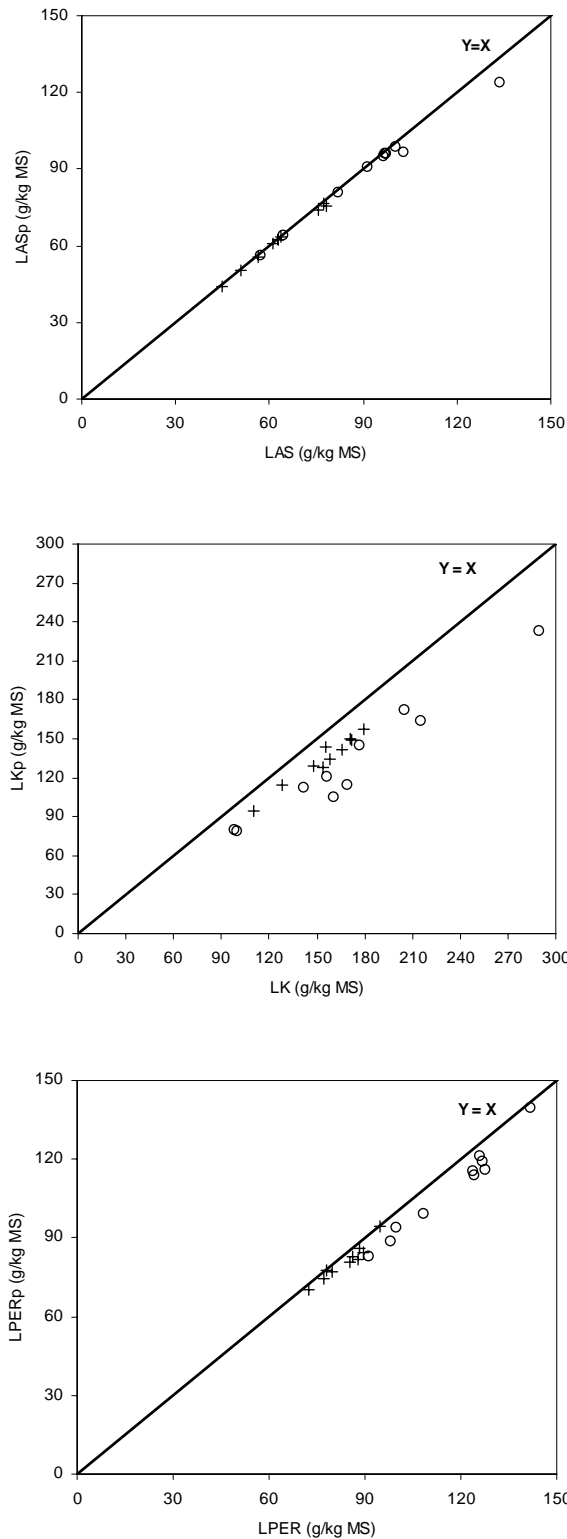


Figura 1 - Relação entre os teores de lignina brutos e isentos de proteína (p) obtidos pelos métodos do ácido sulfúrico (LAS), de Klason (LK) e do permanganato (LPER) (+ = gramíneas; o = leguminosas).

Apesar das diferenças entre métodos (Tabela 3), verificou-se que os métodos LASp, LKp e LPERp correlacionaram-se mutuamente ($P < 0,05$), observando-se estimativas

de coeficientes de correlação moderadas a fortes (Tabela 4). Por outro lado, os métodos espectrofométricos LBA_{fda} e LBA_{pc} não se correlacionaram ($P > 0,05$) entre si ou com os métodos gravimétricos (Tabela 4).

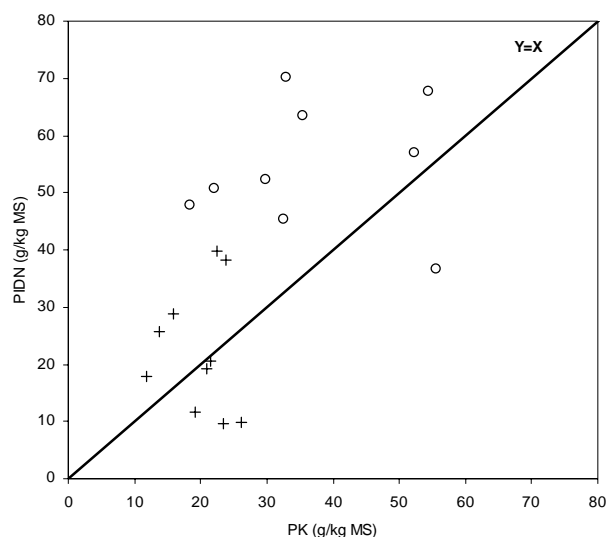


Figura 2 - Relação entre os teores de proteína insolúvel em detergente neutro (PIDN) e proteína residual da lignina Klason (PK) [$\hat{Y} = 13,2208 + 0,8663X$; $r^2 = 0,3337$; $s_{xy} = 16,60$; Valor-P: 0,0665 (ver Equação 6)] (+ = gramíneas; o = leguminosas).

Considerando-se que os efeitos inibitórios da lignina sobre a degradação são observados somente sobre a fração fibrosa, as associações com os parâmetros da degradação da FDN foram interpretadas considerando-se somente a unidade g/kg FDN. De forma similar ao anteriormente descrito, os teores de lignina obtidos pelos métodos gravimétricos foram considerados nas formas corrigidas para a contaminação por compostos nitrogenados.

As estimativas dos teores de lignina obtidas pelos métodos LASp e LPERp apresentaram comportamento similar, associando-se ($P < 0,05$) com os teores de FDN_i e com kd e LAG (Tabela 6; Figuras 3 e 4). Contudo, para ambos os métodos, não se detectou comportamento diferenciado para gramíneas e leguminosas quanto ao intercepto ou coeficiente de inclinação da função ajustada ($P > 0,05$). Correlações mais fortes foram observadas entre LPERp e os parâmetros de degradação da FDN em relação àquelas obtidas com o método LASp (Tabela 6).

Tabela 4 - Desdobramento do efeito de interação entre método analítico e grupo forrageiro para os teores médios de lignina

Forrageira	Método ¹					EPM
	LASp	LKp	LPERp	LBAPc	LBAfda	
			g/kg MS ²			
Gramínea	62,6Bc	134,3Aa	81,1Bb	79,7Ab	46,9Ad	6,24
Leguminosa	89,7Ac	132,4Aa	108,9Ab	53,1Bd	41,6Ad	
			g/kg FDN ²			
Gramínea	110,3Bc	236,8Ba	142,8Bb	141,4Ab	82,8Ac	13,18
Leguminosa	217,7Ac	319,3Aa	266,6Ab	131,8Ad	101,3Ad	

¹ LASp = lignina em ácido sulfúrico corrigida de proteína; LKp = lignina Klason corrigida de proteína; LPERp = lignina em permanganato corrigida de proteína; LBAPc = lignina em brometo de acetila a partir da parede celular; LBAfda = lignina em brometo de acetila a partir do resíduo insolúvel em detergente ácido. ² Médias na linha, seguidas por letras minúsculas diferentes, ou na coluna, seguidas por letras maiúsculas diferentes, são diferentes pelo teste DMS de Fisher (P<0,05).

Os teores de LKp se associaram (P<0,05) com todos os parâmetros de degradação da FDN (Tabela 6). No entanto, diferente dos métodos LASp e LPERp, verificou-se diferenciação entre gramíneas e leguminosas quanto ao intercepto da função ajustada (P<0,05), observando-se valores superiores de FDNi e LAG e inferiores de kd para as leguminosas, independentemente do nível de lignina (Figura 5). A inclusão de um parâmetro adicional, a partir do qual se consideraram peculiaridades relativas ao grupo de forrageiras conferiu a LKp os mais fortes coeficientes de correlação entre todos os métodos avaliados (Tabela 6). Contudo, ao ajustar-se os coeficientes de correlação para o número de parâmetros no modelo, verificou-se que serem estas similares às obtidas com o método LPERp.

Tabela 5 - Correlações parciais entre os teores de lignina (g/kg FDN) obtidos por diferentes métodos analíticos

Método	Método ^{1 2 3}			
	LASp	LKp	LPERp	LBAPc
LKp	0,7397 0,0003	---		
LPERp	0,5954 0,0072	0,6545 0,0024	---	
LBAPc	-0,0046 0,9850	0,0743 0,7625	0,3760 0,1126	---
LBAfda	0,2034 0,4036	0,1044 0,6705	0,1550 0,5263	-0,0103 0,9667

¹ LASp = lignina em ácido sulfúrico corrigida de proteína; LKp = lignina Klason corrigida de proteína; LPERp = lignina em permanganato corrigida de proteína; LBAPc = lignina em brometo de acetila a partir da parede celular; LBAfda = lignina em brometo de acetila a partir do resíduo insolúvel em detergente ácido. ² Os valores de correlação foram ajustados para o efeito de grupo forrageiro. ³ Os valores sub-escritos correspondem ao nível descritivo de probabilidade para o erro tipo I associado a H₀: ρ = 0.

Os teores de lignina estimados pelo método LBAPc não apresentaram relação ($P>0,05$) funcional com nenhum dos parâmetros da dinâmica de degradação da FDN. Para todos estes, apenas percebeu-se a diferença média entre grupos de forrageiras (Figura 6).

Tabela 6 - Estimativas de parâmetros da regressão entre os teores de fibra em detergente neutro indigestível (FDNi), taxa fracional de degradação da fibra em detergente neutro potencialmente degradável (kd) e latência discreta e os teores de lignina (g/kg de FDN) estimados por diferentes métodos analíticos

Item ²	Método ¹				
	LASp	LKp	LPERp	LBAPc	LBAfda
	FDNi (g/kg FDN)				
β_0	242,3	255,9	187,7	369,3	179,8
β_1	---	111,3	---	141,1	---
β_2	1,2292	0,4790	1,2817	---	2,8263
β_3	---	---	---	---	---
Valor-P	0,0001	<0,0001	0,0004	0,0002	0,0208
r	0,7698	0,8534	0,8237	---	0,5209
r^3	0,7541	0,8333	0,8121	---	0,4779
s_{xy}	67,20	58,68	71,56	69,29	87,27
	kd (h^{-1})				
β_0	0,0590	0,0605	0,0637	0,0499	0,0499
β_1	---	-0,0067	---	-0,0106	-0,0106
β_2	-0,000087	-0,000045	-0,000095	---	---
β_3	---	---	---	---	---
Valor-P	0,0046	0,0030	0,0010	0,0056	0,0056
r	-0,6200	-0,7179	-0,6934	---	---
r^3	-0,5901	-0,6744	-0,6710	---	---
s_{xy}	0,0072	0,0066	0,0066	0,0073	0,0073
	LAG (h)				
β_0	2,60	2,45	2,16	3,43	3,43
β_1	---	0,63	---	0,98	0,98
β_2	0,0080	0,0041	0,0088	---	---
β_3	---	---	---	---	---
Valor-P	0,0038	0,0019	0,0007	0,0040	0,0040
r	0,6301	0,7372	0,7077	---	---
r^3	0,6013	0,6974	0,6867	---	---
s_{xy}	0,64	0,58	0,58	0,64	0,64

¹ LASp = lignina em ácido sulfúrico corrigida de proteína; LKp = lignina Klason corrigida de proteína; LPERp = lignina em permanganato corrigida de proteína; LBAPc = lignina em brometo de acetila a partir da parede celular; LBAfda = lignina em brometo de acetila a partir do resíduo insolúvel em detergente ácido. ² Para detalhes sobre os parâmetros, consultar a Equação 8. ³ Correlações ajustadas para o número de parâmetros no modelo (Draper & Smith, 1966).

Verificou-se associação ($P<0,05$) entre os teores de lignina estimados pelo método LBAfda e os teores de FDNi, não se observando, contudo, diferenciação entre gramíneas e leguminosas ($P>0,05$). No entanto, o coeficiente de correlação foi menos forte em comparação àqueles verificados para os métodos LASp, LKp e LPERp (Tabela 6). Em

adição, de forma similar ao método LBAPc, não foram verificadas relações funcionais ($P > 0,05$) entre lignina e os parâmetros kd e LAG (Tabela 6), nos quais somente se detectou a diferença média entre grupos de forrageiras (Figura 7).

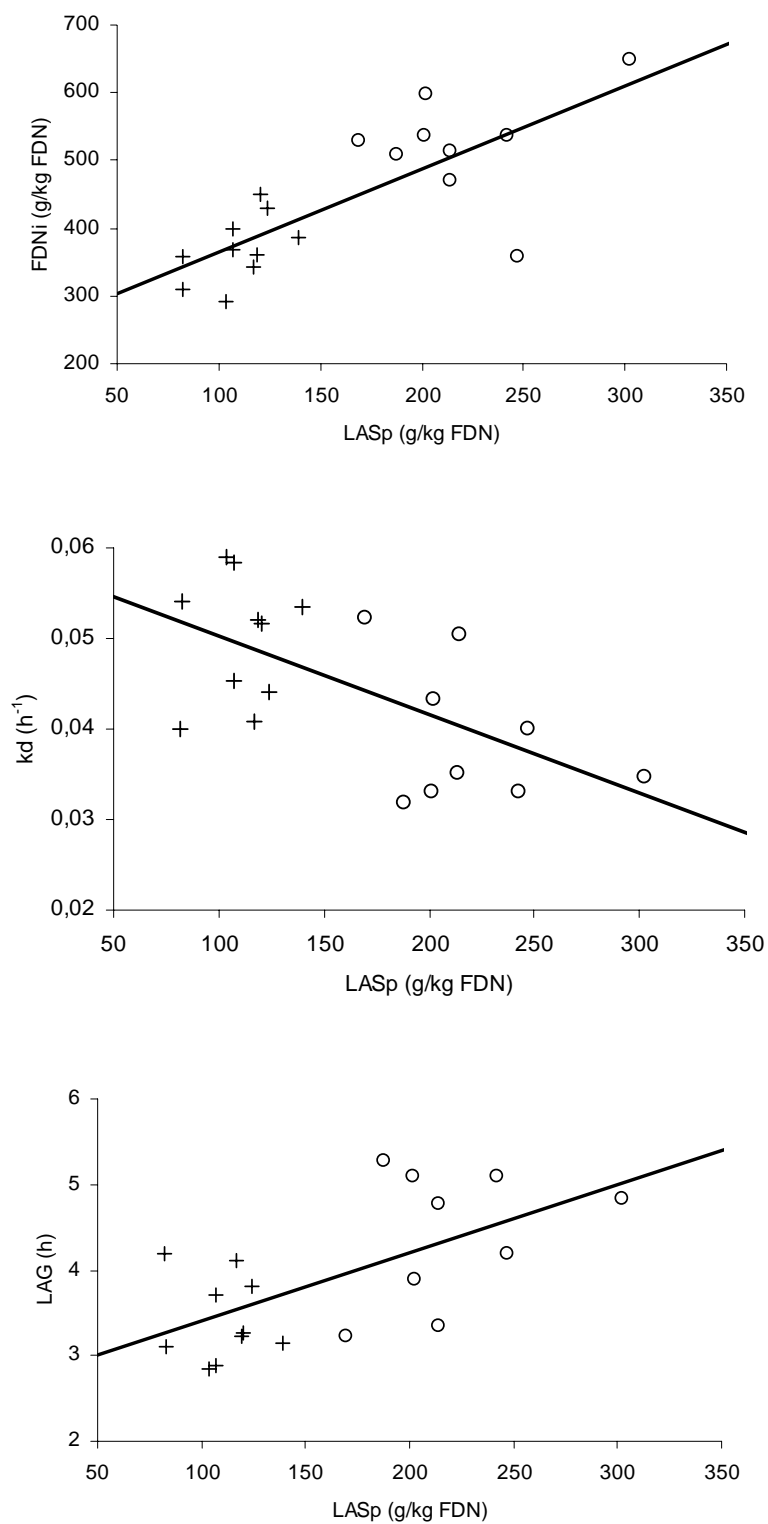


Figura 3 - Relação entre os teores de lignina em ácido sulfúrico corrigida de proteína (LASp) e teor de fibra em detergente neutro indigestível (FDNi), taxa fracional de degradação da fibra em detergente neutro potencialmente degradável (kd) e latência discreta (LAG) (+ = gramíneas; o = leguminosas).

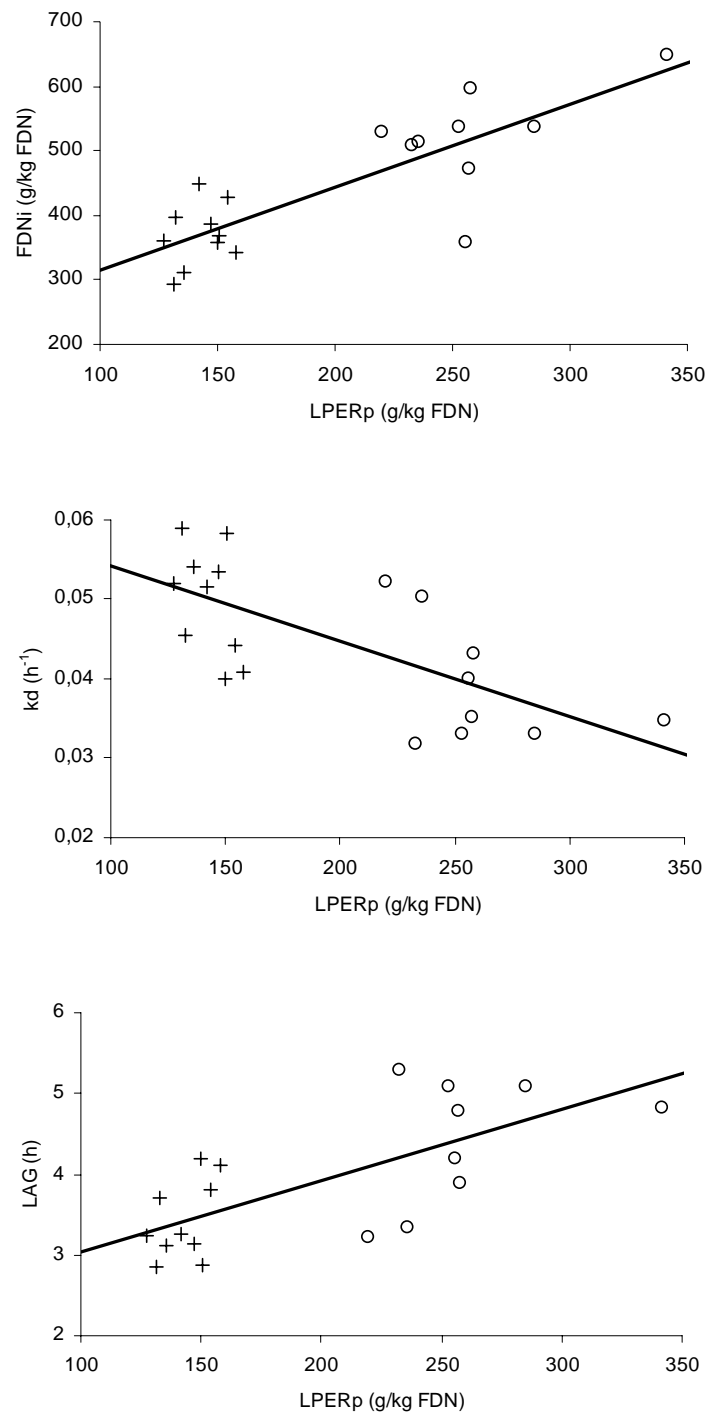


Figura 4 - Relação entre os teores de lignina em permanganato de potássio corrigida de proteína (LAsp) e teor de fibra em detergente neutro indigestível (FDNi), taxa fracional de degradação da fibra em detergente neutro potencialmente degradável (kd) e latência discreta (LAG) (+ = gramíneas; o = leguminosas).

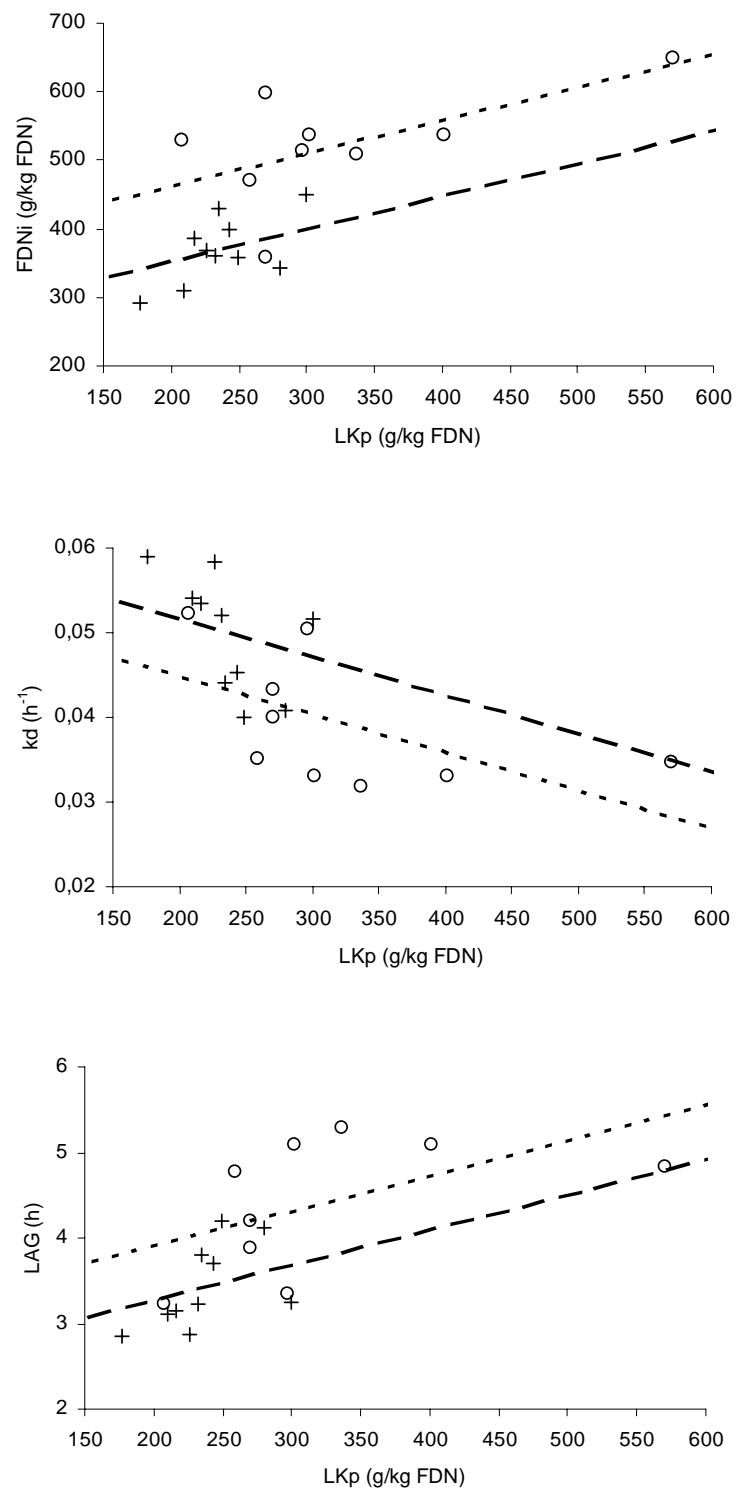


Figura 5 - Relação entre os teores de lignina Klason corrigida de proteína (LKp) e teor de fibra em detergente neutro indigestível (FDNi), taxa fracional de degradação da fibra em detergente neutro potencialmente degradável (kd) e latência discreta (LAG) (+ = gramíneas; o = leguminosas).

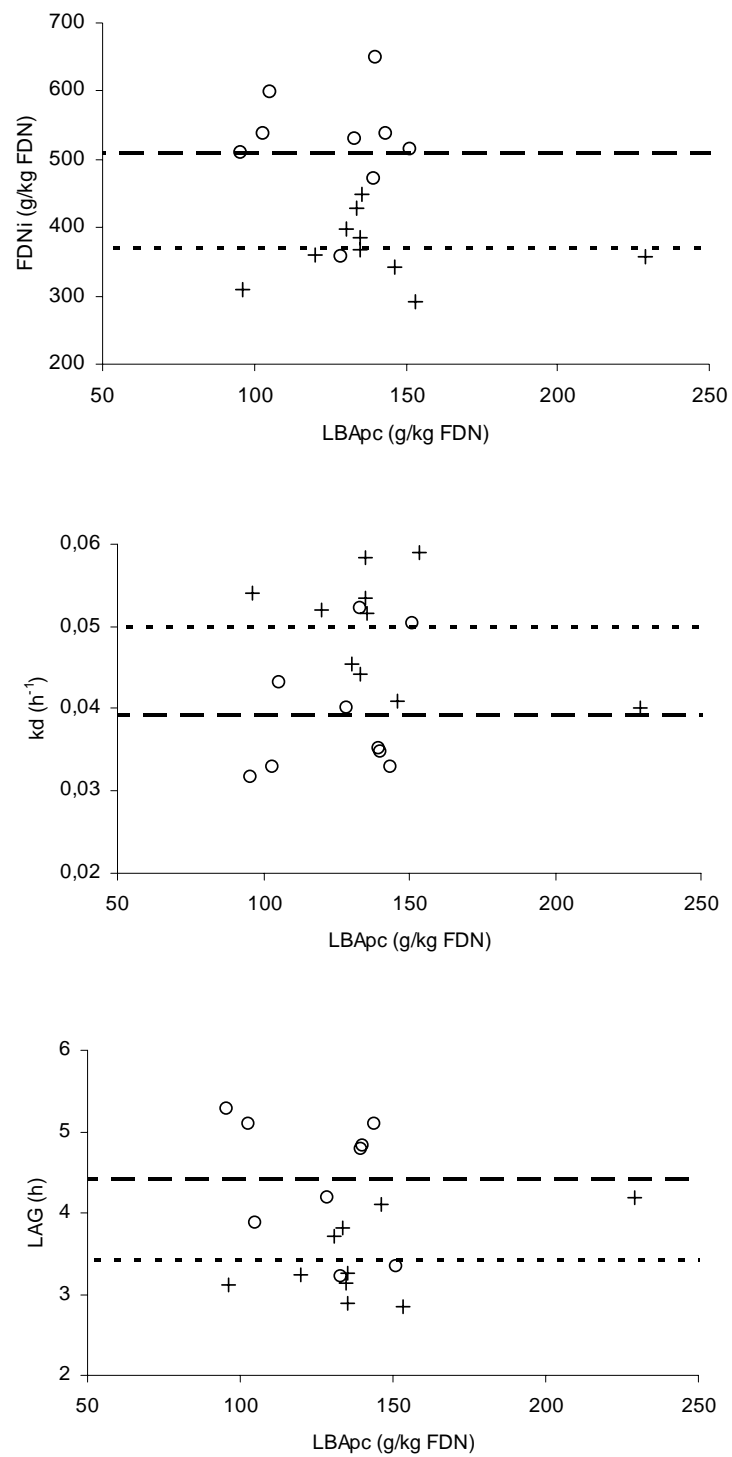


Figura 6 - Relação entre os teores de lignina em brometo de acetila com base na parede celular (LBApc) e teor de fibra em detergente neutro indigestível (FDNi), taxa fracional de degradação da fibra em detergente neutro potencialmente degradável (kd) e latência discreta (LAG) (+ = gramíneas; o = leguminosas).

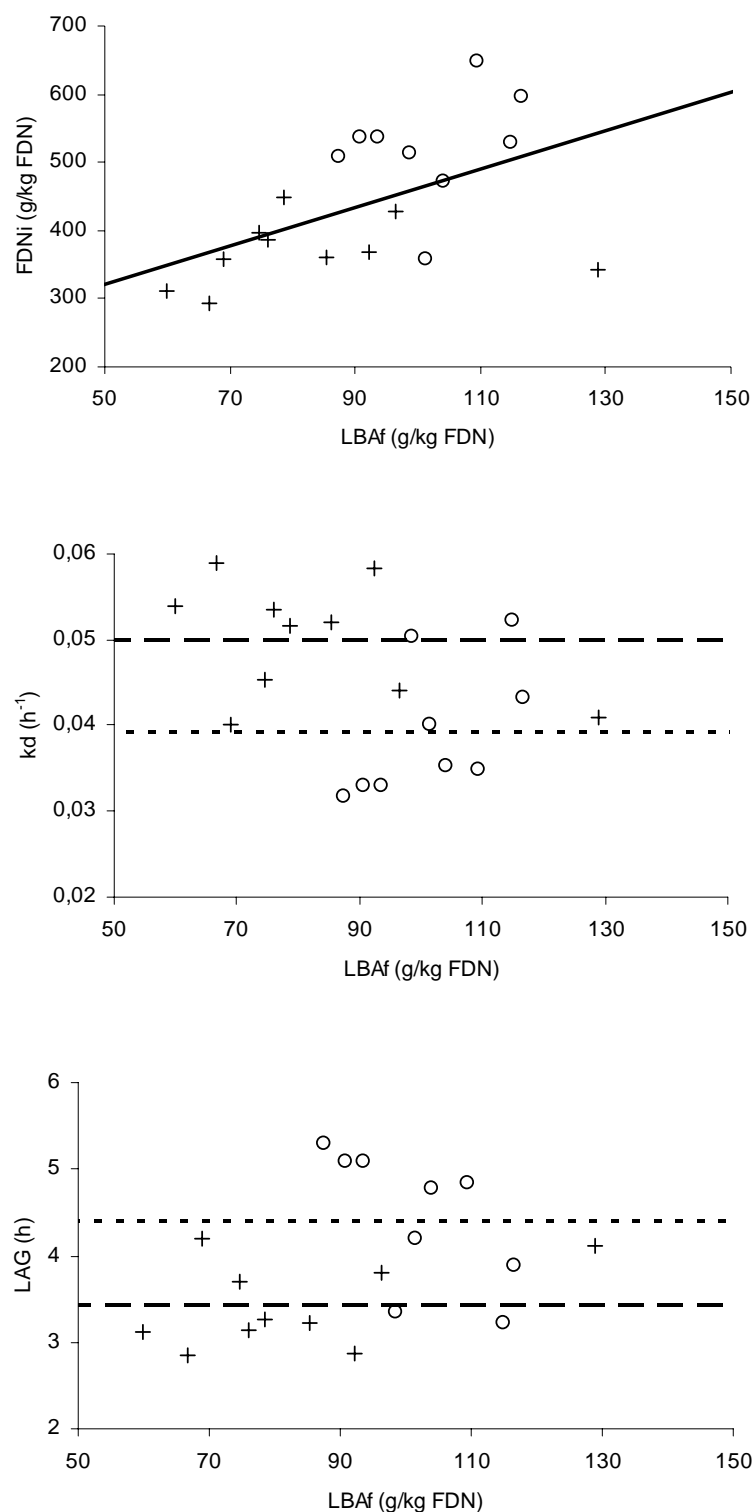


Figura 7 - Relação entre os teores de lignina em brometo de acetila a partir do resíduo insolúvel em detergente ácido (LBAfda) e teor de fibra em detergente neutro indigestível (FDNi), taxa fracional de degradação da fibra em detergente neutro potencialmente degradável (k_d) e latência discreta (LAG) (+ = gramíneas; o = leguminosas).

DISCUSSÃO

No presente trabalho ficou evidenciado que a contaminação protéica afetou significativamente o teor de lignina quando avaliado por todos os métodos gravimétricos (Tabelas 2 e 3). Verificou-se, contudo, que esta contaminação se mostrou mais evidente para LK em comparação a LAS e LPER (Figura 1).

A correção protéica em LK reduziu, em média, em 1,99 e 3,89 pontos percentuais (19,9 e 38,9 g/kg MS) os teores de lignina (Tabela 2). Estes resultados corroboram aqueles obtidos por Chang et al. (2008), que obtiveram reduções de 2,5 a 3,2 pontos percentuais com a correção protéica nos teores de LK em *Arabidopsis*.

Entre os métodos gravimétricos empregados para avaliação de lignina, LK apresenta maior contaminação protéica (Fukushima & Hatfield, 2001). Este aspecto consiste em um dos principais vieses das estimativas obtidas por este método. A LK foi inicialmente desenvolvida para avaliação do teor de lignina em madeira. Neste tipo de material não se observam problemas por contaminação protéica, devido à sua pequena contribuição (Whitehead & Quicke, 1964; Theander & Westerlund, 1986). Entretanto, a utilização de LK sem nenhuma adaptação para se quantificar o teor de lignina em forragens torna-se complicada devido à presença significativa de compostos nitrogenados no resíduo insolúvel, os quais são erroneamente quantificados como lignina (Van Soest, 1994).

Os compostos nitrogenados associados ao resíduo de lignina apresentam quatro fontes potenciais: nitrogênio que se encontra naturalmente associado à parede celular; nitrogênio ligado a artefatos de Maillard; nitrogênio ligado a taninos; e queratinas de origem animal (Van Soest, 1994). Este último caso não se aplica aos presentes resultados.

Presume-se que leguminosas apresentem mais contaminação por proteína do que gramíneas (Fukushima & Hatfield, 2001), como verificado neste estudo (Tabela 2). Embora leguminosas apresentem teores naturalmente superiores de proteína em relação às gramíneas, o nível de proteína bruta (PB) de uma amostra não se correlaciona com a intensidade de contaminação protéica nos resíduos de lignina (Hatfield et al., 1994), o que é reforçado pelo comportamento homogêneo dos pares ordenados de ambos os grupos de forrageiras quando considerada sua contaminação (Figura 1). Contudo, como apresentado anteriormente, a contaminação protéica de LK promoveu redução média de 3,89 pontos percentuais nos teores de lignina, comparados a 1,99 pontos percentuais em gramíneas (Tabela 2). Ao menos parte desta maior contaminação em leguminosas pode estar

associada ao maior teor de taninos, o que propiciaria a formação de complexos insolúveis com os componentes protéicos das forragens (Van Soest, 1994; Poppi & McLennan, 1995).

A análise do teor de lignina é laboriosa, consome tempo e pode produzir resíduos constituídos parcialmente por artefatos que superestimam o teor de lignina (Van Soest, 1963). Parte da contaminação protéica associada à lignina pode ser atribuída à formação de artefatos pela reação de Maillard. Contudo, a formação destes ocorre principalmente em temperaturas de secagem iguais ou superiores a 65°C, o que não foi utilizado neste estudo (60°C). Por outro lado, a utilização de temperaturas adequadas, associadas ao uso de estufas com ventilação, reduzem a formação destes artefatos por acelerarem a retirada de umidade do material, a qual é necessária para ocorrências das reações não enzimáticas (Van Soest, 1994).

De outra forma, o uso de temperaturas elevadas durante o processo de extração poderia estar associado à formação de artefatos que contém nitrogênio. Contudo, a reação de Maillard é desfavorecida em meios ácidos (Eskin et al., 1971), não havendo evidências de formação de artefatos insolúveis entre componentes protéicos do conteúdo celular e produtos da hidrólise dos carboidratos da parede celular (Hatfield et al., 1994).

Desta forma, a despeito da possibilidade de formação de complexos com taninos em leguminosas, a maior parte da contaminação protéica associada à LK parece estar associada à retenção no resíduo insolúvel de compostos nitrogenados naturalmente presentes na parede celular.

A parede celular contém proteínas que possuem papel estrutural na matriz, as quais podem apresentar ligações cruzadas com a lignina (Whitmore, 1982). Contudo, não está claro se os compostos nitrogenados presentes no resíduo insolúvel da LK representam proteína intacta, fragmentos de proteína, proteína modificada ou ácidos nucleicos (Hatfield et al., 1994). No entanto, independentemente da origem dos compostos nitrogenados, o principal problema no fracionamento químico do tecido fibroso da planta consiste na separação eficiente entre proteína e lignina (Van Soest, 1963).

O teor de proteína insolúvel em detergente neutro (PIDN) tem sido sugerido como aproximação química ao teor de proteína associada à parede celular em forragens tropicais (Detmann et al., 2008b). Neste estudo, verificou-se que a contaminação protéica associada à LK foi similar ao teor de PIDN encontrado nas forragens (Figura 2). Isto parece indicar que as extrações realizadas no método LK não são capazes de retirar a fração protéica associada à parede celular do material, ficando esta retida gravimetricamente como LK.

A principal diferença analítica entre os métodos LK e LAS consiste na seqüência com que a concentração do ácido sulfúrico e a temperatura de extração são utilizadas, o que causa efeitos diferentes na hidrólise dos polissacarídeos (Hatfield et al., 1994). Contudo, há de se ressaltar que em LK não se utiliza detergente catiônico (brometo de cetil trimel amônio; CTAB) como adjuvante na retirada de materiais a serem solubilizados, o qual proporciona a limpeza do material que será submetido à hidrólise ácida. Assim, o detergente ácido (solução de H₂SO₄ 1N e CTAB 20 g/L) é responsável pela obtenção de resíduo aproximadamente livre da interferência protéica (Van Soest & Robertson, 1985), promovendo solubilização de grande parte da proteína associada à parede celular (Van Soest, 1994). Assim, a LK apresenta valores mais elevados de contaminação protéica em comparação a LAS, uma vez que, o material não passa por tratamento com detergente catiônico, responsável por retirar parte da contaminação protéica.

Devido à utilização da extração prévia com detergente ácido, LPER apresentou contaminação protéica também inferior a LK, sendo, contudo, levemente superior à contaminação observada em LAS (Figura 1). Isto parece ser justificado pelo fato de que algumas proteínas não removidas pelo detergente ácido podem reagir com o permanganato e serem quantificadas como lignina (Van Soest & Wine, 1968).

Segundo Van Soest (1994), mesmo conduzindo-se as análises de lignina cuidadosamente, a contaminação ainda existirá, independentemente do método gravimétrico utilizado, o que corrobora os resultados aqui obtidos (Tabela 3). Desta forma, para correta expressão das concentrações de lignina obtidas pelos métodos gravimétricos, deve-se levar em consideração a correção para contaminação protéica (Henriques et al., 2007), principalmente na utilização de LK.

Neste contexto, a comparação direta entre métodos foi realizada relevando-se a correção para contaminação protéica nos resíduos mensurados gravimetricamente, evitando-se confundimento, uma vez que há diferenças entre estes na intensidade de contaminação (Figura 1) e os resultados obtidos espectrofotometricamente são considerados isentos deste tipo de contaminante (Fukushima & Kerley, s.d.).

O teor de lignina em amostras de forragens varia de acordo com o método de isolamento químico da molécula polifenólica. As propriedades físicas da lignina são geralmente alteradas por ácidos fortes, os quais promovem polimerização e condensação adicional e pode converter parte do material originalmente solúvel em produtos insolúveis (Van Soest, 1994).

A diferença entre os métodos quanto ao teor de lignina mensurado na mesma amostra deve-se, possivelmente, à forma de atuação dos reagentes. Isto implica que diferentes procedimentos analíticos propiciam estimativas diferentes do conteúdo de lignina (Fukushima & Dehority, 2000).

Os métodos para análise de lignina podem ser divididos em três categorias principais: os gravimétricos que removem os constituintes da parede celular exceto a lignina, como LAS e LK; os gravimétricos que oxidam a lignina da matriz da parede celular, como LPER; e os métodos de solubilização com quantificação espectrofotométrica, como LBAfda e LBAPc.

Contudo, a despeito das peculiaridades químicas de cada método, diferenças nos resultados podem ser obtidas em função dos passos preparatórios da amostra. A utilização de detergente ácido, embora tenha por principal função a redução de contaminação protéica (Van Soest, 1994), em geral, subestima o valor de lignina das forragens, principalmente em gramíneas (Lowry et al., 1994) devido à solubilização parcial de componentes fenólicos (Lowry et al., 1994; Fukushima & Hatfield, 2001; Fukushima et al., 2009). Estes aspectos suportam, em geral, os menores valores de lignina verificados para LASp e LPERp em comparação a LKp, e para LBAfda em comparação a LBAPc (Tabela 4).

Apesar de serem ambos gravimétricos e precedidos de extração com detergente ácido, verificou-se maiores estimativas de lignina para LPERp em comparação a LASp (Tabela 4). Segundo Van Soest & Wine (1968), a relação LPER:LAS é de aproximadamente 1,2:1. Considerando-se os valores expressos na Tabela 4, obtêm-se as razões 1,30:1 e 1,21:1, considerando-se a unidade g/kg MS; e 1,30:1 e 1,23:1, considerando-se a unidade g/kg FDN; para gramíneas e leguminosas, respectivamente; relações próximas àquela descrita por Vans Soest & Wine (1968).

A avaliação da lignina em permanganato de potássio pode ser afetada por alguns componentes da amostra como, por exemplo, fenóis e outras substâncias insaturadas, como taninos e pigmentos, que não são completamente removidos durante a extração com detergente ácido. Estas substâncias reagiriam com a solução de permanganato e seriam contabilizadas como lignina, principalmente em gramíneas imaturas (Van Soest & Wine, 1968), ampliando o valor total de lignina da amostra. Isto justificaria, ao menos em parte, as maiores estimativas de LPERp em relação a LASp (Tabela 4).

Geralmente considera-se que a principal limitação para a utilização do método LK seja a contaminação protéica, a qual gera viés positivo sobre as estimativas (Van Soest &

Robertson, 1985; Kondo et al., 1987). Entretanto, uma vez havendo correção protéica no presente estudo, os valores mais elevados da LKp não podem ser atribuídos aos compostos nitrogenados contaminantes.

Apesar do método LK ter sido desenvolvido com fins de extrair lignina em madeira (Van Soest, 1994), este pode ser utilizado para quantificar a lignina de alimentos usados na nutrição de ruminantes. Contudo, mesmo após modificações, nas quais se incluiu o aquecimento indireto (Theander & Westerlund, 1986), o método continua sendo aplicado sobre a amostra integral. Desta forma, especula-se que o ácido sulfúrico pode solubilizar parte da hemicelulose contida na parede celular, a qual precipita com a diluição do ácido com água, sendo quantificado como lignina (Van Soest, 1967). Compostos como o ácido D-galacturônico, ácido D-glucurônico e D-xilose, podem ser convertidos em compostos aromáticos em meios aquosos aquecidos e levemente acidificados (Popoff & Theander, 1976), similares à segunda etapa do método LK.

No entanto, em recente trabalho, verificou-se que a contaminação por carboidratos na lignina obtida pelo método LK poderia ser considerada pequena a ponto de não contribuir com porção significativa do resíduo (Hatfield et al., 1994). Por outro lado, Hatfield et al. (1994) verificaram que a relação siringil:guaiacil dos resíduos de lignina obtidos pelos métodos LAS e LK foram similares. Desta forma, parece não haver contaminação significativa com compostos fenólicos formados a partir de carboidratos, os quais poderiam alterar a relação siringil:guaiacil.

Assim, a diferença entre LKp e LASp, e por conseguinte, entre LKp e LPERp, residiria sobre a solubilização de parte da lignina pelo detergente ácido (Hatfield et al., 1994; Lowry et al., 1994). Neste caso, a dissolução da matriz de hemicelulose pelo detergente ácido deixaria parte da lignina sem o suporte dado pela hemicelulose, permitindo sua solubilização (Lowry et al., 1994). Neste sentido, há evidências que a LKp fornece melhores estimativas do teor total de lignina em amostras de forragens do que a LASp, especialmente em gramíneas (Kondo et al., 1987; Hatfield et al., 1994; Jung et al. 1997).

As estimativas do teor de lignina pelo método LBAfda foram menores que as obtidas pelo LBAPc em gramíneas, mas não em leguminosas (Tabela 4). Esta diferença se deve, possivelmente, devido à solubilização de parte da lignina pelo detergente ácido durante a obtenção da LBAfda, similar ao discutido anteriormente. Esta solubilização pode acarretar menor densidade óptica, comprometendo a leitura da solução da LBAfda, sendo

observada de forma mais proeminente em gramíneas (Fukushima & Dehority, 2000), o que corrobora os resultados deste estudo (Tabela 2).

A lignina em brometo de acetila baseia-se na leitura a 280 nm após solubilização em solução de brometo de acetila a 25% em ácido acético, procedimento espectrofotométrico desenvolvido, em princípio, para quantificar o teor de lignina em pequenas amostras de madeira (Johnson et al., 1961). Este método foi modificado para ser utilizado com amostras de forragens, as quais apresentam quantidade considerável de proteína que interfere significativamente no teor de lignina mensurado (Morrison, 1972a; 1972b). Fukushima et al. (2009) verificaram, contudo, que o efluente da solução de detergente ácido resultante do preparo da FDA de diversas gramíneas apresentava picos de absorvância semelhantes aos da lignina retida no resíduo insolúvel em detergente ácido. Neste sentido, a avaliação do teor de lignina em brometo de acetila tendo como base que a parede celular forneceria estimativas mais verossímeis do teor de lignina de forragens (Iiyama & Wallis, 1990; Fukushima & Dehority, 2000; Fukushima & Hatfield, 2001; Fukushima & Savioli, 2001; Fukushima & Hatfield, 2004; Chang et al., 2008).

A extração da parede celular, com lavagem seqüencial com água, etanol, clorofórmio, e acetona, utilizando o método de Soxhlet, busca representar a quantidade de polissacarídeos da parede vegetal de forma verossímil (Fukushima & Hatfield, 2004). Assim, a preparação da parede celular caracteriza-se por valores mais elevados quando comparados a outros métodos de isolamento de componentes da parede celular, como FDA e FDN. Porém, os componentes não-lignina e outros compostos fenólicos, como os taninos, se não removidos durante o passo da preparação da parede celular, podem ser dissolvidos na solução de brometo de acetila, levando a interferências durante a leitura da amostra (Morrison, 1972a).

Entretanto, a falta de padrão para calibração do espectrofotômetro consiste no principal fator de limitação para utilização rotineira do método (Savioli et al., 2000). Desta maneira, em recente trabalho utilizou-se à extração da lignina com o reagente brometo de acetila e conseguinte correção quanto ao teor de carboidratos, cinzas, água e proteína para construção de curva padrão universal, tentando-se reduzir o procedimento analítico para apenas digestão da amostra e leitura espectrofotométrica (Fukushima & Kerley, s.d.), sendo utilizada neste trabalho.

Os teores de lignina obtidos para gramíneas pelo método LBAPc foram maiores que os obtidos pelo método LASp (Tabela 4). Este resultado pode ser suportado devido à solubilização parcial da lignina durante a extração com detergente ácido para obtenção de

LASp, corroborando os resultados de outros autores (Fukushima & Dehority, 2000; Fukushima & Savioli, 2001; Fukushima & Hatfield, 2004).

Para leguminosas, contudo, os teores de lignina obtidos com os métodos LBAfda e LBApc foram similares, ao passo que LBApc produziu estimativas inferiores a LASp, comportamento diferenciado em relação ao observado para gramíneas (Tabela 4) e que contraria os pressupostos para as diferenças entre métodos apresentados anteriormente.

De forma geral, os teores de lignina obtidos pelo método LBApc mostram-se superiores aos obtidos com os métodos LASp (Fukushima & Dehority, 2000). Contudo, alguns resultados diferentes destes podem ser observados na literatura (Fukushima & Savioli, 2001).

Uma das dificuldades da quantificação de lignina em brometo de acetila reside sobre a obtenção de padrão espectrofotométrico satisfatório de lignina (Savioli et al., 2000; Hatfield & Fukushima, 2005). De forma geral, as avaliações de lignina em brometo de acetila foram mais intensamente conduzidas em amostras de gramíneas em comparação a leguminosas. O conjunto de amostras utilizado por Fukushima & Kerley (s.d.) para construção de curva padrão universal apresentava somente três leguminosas em um domínio formado por amostras oriundas de 14 espécies, incluindo, além das leguminosas, gramíneas e arbóreas, e três ligninas comerciais. Considerando-se que a composição química da lignina de gramíneas e leguminosas é diferente (Van Soest, 1994), as aparentes distorções obtidas neste trabalho podem indicar que a eficiência de predição da curva padrão universal (Equação 1), embora aparentemente alta para gramíneas, pode ser baixa para leguminosas.

Segundo Detmann (s.d.), o simples conhecimento do teor de FDN de um alimento não é capaz de gerar informações sobre o potencial da fibra insolúvel em ser aproveitada no trato gastrintestinal dos animais ruminantes. Em outras palavras, dois alimentos podem apresentar teores de FDN similares, mas potenciais de aproveitamento distintos. Isto torna as inferências baseadas somente em teores limitadas do ponto de vista nutricional, exigindo-se conhecimento acerca da dinâmica de degradação das diferentes fontes de FDN no ecossistema ruminal, permitindo-se a ampliação do conhecimento sobre digestibilidade e sobre o potencial de implementação de efeitos restritivos físicos sobre o consumo voluntário.

Neste estudo, três parâmetros da dinâmica de degradação da FDN foram investigados. A fração indegradável da FDN (FDNi) permite o entendimento da potencialidade de aproveitamento da FDN, sendo o complemento natural da fração

potencialmente degradável (FDN_{pd}). Desta forma, o teor de FDN_i de uma forragem expressa de forma inversamente proporcional a capacidade de fornecimento energético do alimento a partir de sua porção fibrosa insolúvel (Detmann et al., 2008a). A taxa fracional de degradação (kd) expressa a velocidade com a qual o substrato (FDN_{pd}) é degradado pelos sistemas enzimáticos microbianos, apresentando íntima associação com a efetividade da extração energética a partir da FDN e com a capacidade de repleção ruminal da fibra insolúvel (Detmann, s.d.). Por sua vez, a latência discreta (LAG) permite estimar a ocorrência dos eventos preparatórios às atividades de degradação, os quais englobam aspectos físicos (e.g. hidratação) e microbiológicos (e.g. fixação microbiana, síntese de enzimas, etc) (Detmann et al., 2009).

Contudo, as disponibilidades de infra-estrutura e tempo constituem fatores limitantes para a obtenção de dados relativos à dinâmica de degradação da FDN em toda e qualquer situação. Isto demanda, em vias práticas, a obtenção de elemento capaz de gerar informação que permita discriminar com rapidez e relativa precisão fontes diferentes de FDN no tocante à sua capacidade de aproveitamento por um animal ruminante.

Por ser indigestível e agir na redução da fração fibrosa potencialmente degradável (Traxler et al., 1998), a lignina é geralmente aceita como a entidade primária responsável pela limitação da degradação dos componentes fibrosos das forragens (Smith et al., 1972; Van Soest, 1994). A estimativa laboratorial de sua concentração é rápida e demanda menor infra-estrutura em comparação à realização de estudos *in situ* ou *in vitro* da dinâmica de degradação da FDN. No entanto, à semelhança do anteriormente discutido, havendo diferentes métodos analíticos, que podem mensurar componentes químicos diferentes, torna-se necessária a identificação, entre estes, daquele que melhor expressa poder de discriminação no tocante aos aspectos da degradação ruminal da FDN. Segundo Lowry et al. (1994), deve-se considerar mais importante na avaliação de alimentos para ruminantes os aspectos da fermentação no rúmen para definir a fração da parede celular deletéria aos microrganismos, em vez de se definirem frações químicas exatas.

De forma geral, LASp e LPERp foram similares em termos de relação com os parâmetros da degradação da FDN (Tabela 6), apresentando resultados biologicamente coerentes, considerando-se associações positivas entre o teor de lignina e o teor de FDN_i e a LAG, e negativas entre lignina e kd (Tabela 6; Figuras 3 e 4). Contudo, mesmo estando relacionados entre si (Tabela 6), correlações mais fortes foram verificadas com o método LPERp em comparação a LASp. Estes resultados agregam àqueles obtidos por Traxler et

al. (1998) e Clipes (2007), que observaram maior acurácia na predição da FDNi a partir de LPER em comparação a LAS em gramíneas e leguminosas.

Como discutido anteriormente, a ação do ácido sulfúrico em LAS reside sobre a oxidação dos componentes celulósicos da parede celular vegetal após prévia extração com detergente ácido (Van Soest & Robertson, 1985), mantendo os componentes fenólicos como resíduo; enquanto que, a ação do permanganato de potássio se baseia na solubilização dos compostos fenólicos da parede celular vegetal, também após tratamento prévio com detergente ácido, produzindo resíduo no qual se concentram os compostos celulósicos.

Embora, em uma visão simples de conceito, os métodos possam parecer perfeitamente complementares, problemas residem sobre a definição exata do limite de ação de cada um dos reagentes (Van Soest, 1994), fazendo com que as estimativas dos teores de lignina obtidas por ambos os métodos não sejam similares, com verificado neste estudo (Tabela 6). A maior diferença entre a ação do ácido sulfúrico e do permanganato de potássio parece ser percebida nas regiões limites entre os compostos celulósicos e fenólicos, região esta na qual se espera que haja maior ação inibitória da lignina sobre a degradação microbiana no ambiente ruminal (Traxler et al., 1998; Clipes, 2007).

Desta forma, especula-se que a ação diferenciada dos reagentes supracitados possa levar a diferenciações qualitativas associadas às estimativas gravimétricas dos teores de lignina dos alimentos. Ou seja, a ação inibitória associada aos compostos fenólicos retidos como lignina, e suas particularidades de extração nas regiões limítrofes com os carboidratos da parede celular, poderiam apresentar diferentes associações com a fração indegradável da FDN (Clipes, 2007), o que atribuiria melhor associação com os teores de LPERp em comparação a LASp (Tabela 6).

As diferenças entre gramíneas e leguminosas apontadas por LASp e LPERp são atribuídas somente à concentração de lignina nas amostras, uma vez que nenhum parâmetro específico para diferenciação entre estes foi significativo (Tabela 6).

Por outro lado, as associações entre os parâmetros da degradação da FDN e os teores de LKp contemplaram, além das diferenças de concentração entre amostras, parâmetro relativo à diferenciação do intercepto entre funções para gramíneas e leguminosas (Tabela 6; Figura 5). Esta discriminação adicional em relação a LASp parece estar associada à perda da fração de lignina solúvel em detergente ácido, como discutido anteriormente. Neste contexto, a inclusão de parâmetro adicional na função conferiu à LKp correlações mais fortes em relação a LASp, mesmo considerando-se o ajustamento para o

número de parâmetros do modelo (Tabela 6). Estes resultados contrariam os obtidos por Jung et al. (1997), que verificaram correlações similares entre a digestibilidade *in vitro* e *in vivo* da FDN e LK e LAS.

Considerando-se os coeficientes de correlação ajustados para o número de parâmetros no modelo, as estimativas de conteúdo de lignina obtidas pelos métodos LPERp e LKp foram igualmente efetivas em se associar aos parâmetros da degradação da FDN (Tabela 6). Estes métodos apresentaram teores de lignina superiores aos obtidos por LASp (Tabela 6). Neste contexto, especula-se esta fração superior dos métodos LKp e LPERp possa conter componentes que exercem papel significativo sobre a degradação da fibra insolúvel, os quais não seriam quantificados em LASp, o que poderia justificar as correlações mais fracas observadas com este método (Tabela 6).

De forma geral, excetuando-se a relação entre LBAfda e FDN_i, não foram observadas associações funcionais significativas entre os teores de lignina obtidos pelos métodos espectrofotométricos e os parâmetros da degradação da FDN (Tabela 6; Figuras 6 e 7), o que é reforçado pela falta de correlação entre estes e as estimativas fornecidas pelos métodos gravimétricos (Tabela 6).

Investigações recentes sobre a avaliação da lignina solúvel em brometo de acetila têm atentado à possibilidade de se obter estimativas mais verossímeis do teor de lignina em alimentos, com minimização das interferências por outros compostos, utilizando como base, principalmente, a parede celular em detrimento ao resíduo insolúvel em detergente ácido (Fukushima & Dehority, 2000; Fukushima & Hatfield, 2004; Fukushima et al., 2009).

Em alguns trabalhos tem se observado que as correlações entre os teores de LBApc e digestibilidade *in vitro* da MS ou de componentes da parede celular são mais fortes do que aquelas obtidas com LAS ou LPER (Fukushima & Dehority, 2000; Fukushima & Hatfield, 2004). Contudo, nestes trabalhos, os padrões espectrofométricos foram obtidos de forma independente para cada material avaliado, diferente da curva padrão universal proposta por Fukushima & Kerley (s.d.) e adotada neste trabalho.

Segundo Fukushima & Dehority (2000), a lignina extraída de uma forragem não poderia ser utilizada como padrão para a análise de diferentes espécies ou de forragens em diferentes estádios de maturidade. Equações de regressão de base empírica, como aquela proposta por Fukushima & Kerley (s.d.) são população-dependentes. Estes modelos são baseados exclusivamente nas informações experimentais e não necessariamente sobre alguma teoria ou fundamento biológico. Assim, mesmo com bom ajustamento aos dados, o

modelo deve ser considerado específico para as condições nas quais os dados foram obtidos. Neste caso, a amplitude de sua habilidade para predição será limitada (Forbes & France, 1993).

Desta forma, considerando-se informações prévias (Fukushima & Dehority, 2000; Fukushima & Hatfield, 2004), a ausência de associação entre os teores de LBA_{fda} e LBA_{pc} pode estar associada à ineficiência de predição da curva padrão sugerida por Fukushima & Kerley (s.d.).

CONCLUSÕES

Os métodos gravimétricos de lignina insolúvel em detergente ácido, lignina em permanganato de potássio e lignina Klason produzem resíduos contaminados por proteínas. A correção para estes contaminantes é sugerida, notadamente para a lignina Klason, para que os teores de lignina sejam expressos com maior exatidão. Leguminosas produzem contaminação protéica mais proeminente em relação a gramíneas

Associações entre lignina e os parâmetros de degradação ruminal da fibra em detergente neutro são mais bem estabelecidas utilizando-se as estimativas produzidas pelos métodos lignina Klason e lignina em permanganato de potássio.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BACHA, C.B. **Determinação do teor de lignina em amostras de gramíneas ao longo do crescimento através de três métodos analíticos e implicações com as equações de “Cornell Net Carbohydrate and Protein System”**. 2006. 109f. Dissertação (Mestrado em Nutrição e Produção Animal) – Universidade de São Paulo/Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Pirassununga, 2006.
- CHANG, X.F.; CHANDRA, R.; BERLETH, T.; BEATSON, R.P. Rapid, microscale, acetyl bromide-based method for high-throughput determination of lignin content in *Arabidopsis thaliana*. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.56, p.6825-6834, 2008.
- CLIPES, R.C. **Avaliação de parâmetros para estimação do potencial de degradação ruminal de compostos fibrosos e nitrogenados em gramíneas tropicais**. 2007. 69f. Tese (Doutorado em Produção Animal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes, 2007.
- 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, p.2242-2249, 1961.

- DEHORITY, B.A. Microbial ecology of cell wall fermentation. In: JUNG, H.G.; BUXTON, D.R.; HATIFIELD, R.D.; RALPH, J. (Eds.) **Forage cell wall structure and digestibility**. Madison: America Society of Agronomy, 1993. p.425-453.
- DETMANN, E.; ZERVOUDAKIS, J.T.; CABRAL, L.S.; ROCHA JUNIOR, V.R.; VALADARES FILHO, S.C.; QUEIROZ, A.C.; PONCIANO, N.J.; FERNANDES, A.M. Validação de equações preditivas da fração indigestível da fibra em detergente neutro em gramíneas tropicais. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.33, p.1866-1875, 2004.
- DETMANN, E.; PAULINO, M.F.; VALADARES FILHO, S.C. Avaliação de alimentos ou de dietas? Uma abordagem conceitual. In: SIMPÓSIO DE PRODUÇÃO DE GADO DE CORTE, 6, 2008, Viçosa. **Anais...** Viçosa: DZO-UFV, 2008a. p. 21-51.
- DETMANN, E.; MAGALHÃES, K.A.; VALADARES FILHO, S.C.; PAULINO, M.F.; HENRIQUES, L.T.; PINA, D.S. Desenvolvimento de um sub-modelo bi-compartimental para estimação da fração digestível da proteína bruta em bovinos a partir da composição química dos alimentos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.37, p.2215-2221, 2008b.
- DETMANN, E.; PAULINO, M.F.; MANTOVANI, H.C.; VALADARES FILHO, S.C.; SAMPAIO, C.B.; SOUZA, M.A.; LAZZARINI, I.; DETMANN, K.S.C. Parameterization of ruminal fibre degradation in low-quality tropical forage using Michaelis-Menten kinetics. **Livestock Science**, v.126, p.136-146, 2009.
- DETMANN, E. Fibra na nutrição de novilhas leiteiras. In: PEREIRA, E.S.; PIMENTEL, P.S.; QUEIROZ, A.C. (Eds.) **Nutrição e produção de novilhas leiteiras**. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará, s.d. (no prelo).
- DRAPER, N.; SMITH, H. **Applied regression analysis**. New York: John Willey & Sons, 1966. 407p.
- FORBES, J.M.; FRANCE, J. Introduction. In: FORBES, J.M.; FRANCE, J. (Eds.) **Quantitative aspects of ruminant digestion and metabolism**. Wallingford: CAB International, 1993. p.1-12.
- ELLIS, W.C.; MATIS, J.H.; HILL, T.M.; MURPHY, M.R. Methodology for estimating digestion and passage kinetics of forages. In: FAHEY JR., G.C. (Ed.) **Forage quality, evaluation, and utilization**. Madison: American Society of Agronomy, 1994. p.682-756.
- ESKIN, N.A.M.; HENDERSON, H.M.; TOWNSEND, R.J. **Biochemistry of foods**. New York: Academic Press, 1971. 240p.
- FUKUSHIMA, R.S.; DEHORITY, B.A. Feasibility of using lignin isolated from forages by solubilization in acetyl bromide as a standard for lignin analyses. **Journal of Animal Science**, v.78, p.3135-3143, 2000.
- FUKUSHIMA, R.S.; HATIFIELD, R.D. Extraction and isolation of lignin for utilization as a standard to determine lignin concentration using the acetyl bromide spectrophotometric method. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.49, p.3133-3139, 2001.
- FUKUSHIMA, R.S.; HATIFIELD, R.D. Comparison of the acetyl bromide spectrophotometric method with other analytical lignin methods for determining lignin concentration in forage samples. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.52, p.3713-3720, 2004.

- FUKUSHIMA, R.S.; KERLEY, M.S. Use of lignin extracted from different plant sources as standards in the spectrophotometric acetyl bromide lignin method. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, s.d. (no prelo).
- FUKUSHIMA, R.S.; SAVIOLI, N.M.F. Correlação entre digestibilidade *in vitro* da parede celular e três métodos analíticos para avaliação quantitativa de lignina. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.30, p.302-309, 2001.
- FUKUSHIMA, R.S.; KERLEY, M.S.; PORTER, J.H.; KALLENBACH, R. Emprego do método lignina brometo de acetila para quantificar o teor de lignina em gramíneas. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 46, 2009, Maringá. **Anais...** Maringá: Sociedade Brasileira de Zootecnia, [2009]. (CD-ROM)
- HATFIELD, R.; FUKUSHIMA, R.S. Can lignin be accurately measured? **Corp Science**, v.45, p.832-839, 2005.
- HATFIELD, R.D.; JUNG, H.G.; RALPH, J.; BUXTON, D.R.; WEIMER, P.J. Comparison of the insoluble residues produced by the Klason lignin and acid detergent lignin procedures. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.65, p.51-58, 1994.
- HENRIQUES, L.T.; DETMANN, E.; QUEIROZ, A.C.; VALADARES FILHO, S.C.; LEÃO, M.I.; PAULINO, M.F. Frações dos compostos nitrogenados associados à parede celular em forragens tropicais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.59, p.258-263, 2007.
- IYAMA, K.; WALLIS, A.F. Determination of lignin in herbaceous plants by an improved acetyl bromide procedure. **Journal of Science and Food Agriculture**, v.51, p.145-161, 1990.
- JOHNSON, D.B.; MOORE, W.E.; ZANK, L.C. The spectrophotometric determination of lignin in small wood samples. **Tappi**, v.44, p.793-798, 1961.
- JUNG, H.G.; ALLEN, M.S. Characteristics of plant cell walls affecting intake and digestibility forages by ruminants. **Journal of Animal Science**, v.73, p.2774-2790, 1995.
- JUNG, H.G.; DEETZ, D.A. Cell wall lignification and degradability. In: JUNG, H.G.; BUXTON, D.R.; HATFIELD, R.D.; RALPH, J. (Ed.) **Forage cell wall structure and digestibility**. Madison: American Society of Agronomy, 1993. p.315-46.
- JUNG, H.G.; VAREL, V. H. Influence of forage type ruminal bacterial populations and subsequent *in vitro* fiber digestion. **Journal of Dairy Science**, v.71, p.1526-1535, 1988.
- JUNG, H.G.; VOGEL, K.P. Influence of lignin on digestibility of forage cell wall material. **Journal of Animal Science**, v.62, p.1703-1712, 1986.
- JUNG, H.G.; MERTENS, D.R.; PAYNE, A.J. Correlation of acid detergent lignin and Klason lignin with digestibility of forage dry matter and neutral detergent fiber. **Journal of Dairy Science**, v.80, p.1622-1628, 1997.
- KONDO, T.; MIZUNO, K.; KATO, T. Some characteristics of forage plant lignin. **Japanese Agriculture Research Quarter**, v.21, p.47-52, 1987.
- LICITRA, G.; HERNANDES, T.M.; VAN SOEST, P.J. Standardization of procedures for nitrogen fractionation of ruminant feeds. **Animal Feed Science and Technology**, v.57, p.347-358, 1996.

- LOWRY, J.B.; CONLAN, A.C.; SHLINK, A.C.; McSWEENEY, C.S. Acid detergent dispersible lignin in tropical grasses. **Journal of Science and Food Agriculture**, v.65, p.41-49, 1994.
- MAYER, D.G.; STUART, M.A.; SWAIN, A.J. Regression of realworld data on model output: an appropriate overall test of validity. **Agricultural Systems**, v.45, p.93-104, 1994.
- McDOUGALL, E.I. Studies on ruminal saliva. 1. The composition and output of sheep's saliva. **Biochemistry Journal**, v.43, p.99-109, 1949.
- MERTENS, D.R. Gravimetric determination of amylase-treated neutral detergent fibre in feeds with refluxing beakers or crucibles: collaborative study. **Journal of AOAC International**, v.85, p.1217-1240, 2002.
- MORRISON, I.M. Improvements in the acetyl bromide technique to determine lignin and digestibility and its application to legumes. **Journal of Science and Food Agriculture**, v.23, p.1463-1469, 1972a.
- MORRISON, I.M. A semi-micro method for the determination of lignin and its use in predicting the digestibility of forage crops. **Journal of Science and Food Agriculture**, v.23, p.455-463, 1972b.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. **Nutrient requirements of dairy cattle**. 7.ed. Washington, D.C.: Academic Press, 2001. 381p.
- PAULINO, M.F.; DETMANN, E.; VALENTE, E.E.L.; BARROS, L.V. Nutrição de bovinos em pastejo. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO ESTRATÉGICO DA PASTAGEM, 4, 2008, Viçosa, **Anais...** Viçosa: DZO-UFV, 2008. p.131-169.
- PELL, A.N.; SCHOFIELD, P. Computerized monitoring of gas production to measure forage digestion *in vitro*. **Journal of Dairy Science**, v.76, p.1063-1073, 1993.
- POPOFF, T.; THEANDER, O. Formation of aromatic compounds from carbohydrates. IV. Chromones from reaction of hexuronic acids in slightly acid, aqueous solution. **Acta Chemica Scandinavica**, v.30, p.705-710, 1976.
- POPPI, D.P.; McLENNAN, S.R. Protein and energy utilization by ruminants at pasture. **Journal of Animal Science**, v.73, p.278-290, 1995.
- SAVIOLI, N.M.; 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 de Zootecnia**, v.29, p.1969-1981, 2000.
- SAVIOLI, N.M.; FUKUSHIMA, R.S.; LIMA, C.G.; GOMIDE, C.A. Rendimento e comportamento espectrofotométrico da lignina extraída de preparações de parede celular, fibra em detergente neutro ou fibra em detergente ácido. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.29, p.988-996, 2000.
- SILVA, D.J.; QUEIROZ, A.C. **Análise de alimentos**. Métodos químicos e biológicos. 3.ed. Viçosa: Editora UFV, 2002. 235p.
- SMITH, L.W.; GOERING, H.K.; GORDON, C.H. Relationships of forage compositions with rates of cell wall digestion and indigestibility of cell walls. **Journal of Dairy Science**, v.55, p.1140-1147, 1972.
- THEANDER, O., WESTERLUND, E.A. Studies on dietary fiber. 3. Improved procedures for analysis of dietary fiber. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**. v.34, p.330-336. 1986

- 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 MILGEN, J.; MURPHY, L.L.; BERGER, L.L. A compartmental model to analyze ruminal digestion. **Journal of Dairy Science**, v.74, p.2515-2529, 1991.
- Van SOEST, P.J. Symposium on nutrition and forage and pastures: new chemical procedures for evaluating forages. **Journal of Animal Science**, v.22, p.838-845, 1963.
- Van SOEST, P.J. Development of comprehensive system of feed analyses and application to forages. **Journal of Animal Science**, v.26, p.119-128, 1967.
- Van SOEST, P.J. Cell wall matrix interactions and degradation – session synopsis. In: JUNG, H.G.; BUXTON, D.R.; HATIFIELD, R.D.; RALPH, J. (Eds.) **Forage cell wall structure and digestibility**. Madison: America Society of Agronomy, 1993. p.377-395.
- Van SOEST, P.J. **Nutritional ecology of the ruminant**. 2.ed. Ithaca: Cornell University Press, 1994. 476p.
- Van SOEST, P.J.; ROBERTSON, J.B. **Analysis of forages and fibrous foods**. Ithaca: Cornell University, 1985. 202p.
- Van SOEST, P.J.; WINE, R.H. The determination of lignin and cellulose in acid-detergent fibre with permanganate. **Journal of Association Official Analytical Chemistry**, v.51, p.780-785, 1968.
- VIEIRA, R.A.M.; PEREIRA, J.C.; MALAFAIA, P.A.M.; QUEIROZ, A.C. The influence of elephantgrass (*Pennisetum purpurem* Schum. Mineiro variety) growth on the nutrient kinetics in the rumen. **Animal Feed Science and Technology**, v.66, p.197-210, 1997.
- WHITEHEAD, D.L.; QUICKE, G.V. A comparison of six methods of estimating lignin in grass hay. **Journal of Science Food and Agriculture**, v.15, p. 417-422, 1964.
- WHITMORE, F.W. Lignin-protein complex in cell walls of *Pinus elliottii*: amino acid constituents. **Phytochemistry**, v.21, p.315-318, 1982.