

## **Fundamentos e Avaliação Comparativa de Métodos para Análise de Lignina em Forragens** (Foundations and Comparative Evaluation of Methods for Analysis of Lignin in Forages)

**Márcia Cristina Araújo Santana<sup>1</sup>, Jucilene Cavali<sup>2</sup>** <sup>1</sup> Doutoranda em Zootecnia, Unesp, Jaboticabal - SP - Brasil. [mcaspoz@hotmail.com](mailto:mcaspoz@hotmail.com) <sup>2</sup> Doutoranda em Zootecnia, UFV, Viçosa - MG-Brasil. [jcavalv@uol.com.br](mailto:jcavalv@uol.com.br)

### **Resumo**

A lignina é dos componentes da parede celular que ainda não possui caracterização concisa sobre sua formação. Porém de grande relevância, pois sua concentração nos alimentos, principalmente de ruminantes, exerce negativamente uma grande influencia sobre a digestibilidade da dieta. Devido a inibição da digestibilidade de constituintes da parede celular de plantas forrageiras sua determinação, tem sido útil, na estimativa da digestão da fibra e por conseguinte no estabelecimento do valor nutritivo destas. Assim esta revisão tem o intuito de rever alguns dos principais fundamentos e discorrer sobre os principais métodos para determinação da lignina em alimentos para animais.

**Palavras-Chave:** Fibra, Lignina, Métodos

### **Abstract**

The lignin is one of the components of the cellular wall that it still doesn't possess concise characterization about his formation. However of great relevance, because his concentration in the foods, mainly of ruminant, exercises a big one negatively influences on the digestibility of the diet. Due to inhibition of the representatives of the cellular wall of forage plants digestibility his determination, it has been useful, in the estimate of the digestion of the fiber and consequently in the establishment of the nutritional value of these. Thus, this revision has the intention of to review some of the main foundations and to discourse on the main methods for determination of the lignin in animals foods.

**Key Words:** Fiber, Lignin, Method

### **INTRODUÇÃO**

A lignina é dos componentes da parede celular que ainda não possui caracterização concisa sobre sua formação. Porém de grande relevância, pois sua concentração nos alimentos, principalmente de ruminantes, exerce negativamente uma grande influencia sobre a digestibilidade da dieta. Devido a inibição da digestibilidade de constituintes da parede celular de plantas forrageiras sua determinação, tem sido útil, na estimativa da digestão da fibra e por conseguinte no estabelecimento do valor nutritivo destas. Assim esta revisão tem o intuito de rever alguns dos principais fundamentos e discorrer sobre os principais métodos para determinação da lignina em alimentos para animais.

### **Revisão de Literatura**

Araújo Santana, Márcia Cristina; Cavali, Jucilene..Fundamentos e Avaliação Comparativa de Métodos para Análise de Lignina em Forragens. *Revista Electrónica de Veterinaria REDVET*®, ISSN 1695-7504, Vol. VII, nº 11, Noviembre/2006, [Veterinaria.org](http://www.veterinaria.org)® - [Comunidad Virtual Veterinaria.org](http://www.veterinaria.org)® - Veterinaria Organización S.L.® España. Mensual. Disponible en <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet> y más específicamente en <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n111106.html>

A estrutura microscópica da maioria das células vegetais é formada por uma parede celular rígida composta basicamente de celulose, disposta em forma de fibra, associada com outros polissacarídeos, principalmente hemiceluloses e compostos pécnicos (que formam uma matriz onde estão embebidas as fibras de celulose - Figura 1), lignina e minerais. Esta parede é fina e elástica nas células vegetais mais jovens (parede primária). Nas células adultas esta parede sofre um espessamento, que pode formar, internamente à parede primária, uma parede secundária, composta de lignina, hemicelulose e suberina Figura 1.

Muitas outras substâncias, orgânicas e inorgânicas, ocorrem na parede celular em quantidades variáveis, dependendo do tipo de célula. Entre as orgânicas destacam-se as de natureza protéica e as de natureza lipídica com cutina, suberina e ceras, porém é com a lignina que adquire maior rigidez.

Antes do processo de lignificação, as células vegetais apresentam expansão da parede celular primária, seguida de novas deposições de celulose, hemicelulose, pectina e proteínas estruturais. O início da síntese de lignina se dá com o transporte de monolignóis do citoplasma para a parede celular.

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

Os álcoois p-cumaril, coniferil e sinapil, conhecidos como monolignóis, são as moléculas que vão originar a lignina. O ácido shiquímico vai originar os aminoácidos aromáticos fenilalanina e tirosina que são os precursores dos álcoois Figura 2. Segundo Higuchi, 1985 (citado por Iiyama et al., 1993) a tirosina é o precursor primário da lignina nas gramíneas, mas não para outras plantas.

Estudiosos classificam as ligninas em três grupos sendo: ligninas de gimnospermas, formadas pela desidrogenação dos álcoois coniferil e sinapil; e ligninas de gramíneas, formadas pela desidrogenação dos álcoois coniferil, sinapil e cumaril (Glasser et. al 1980).

Em muitas espécies de plantas a fenilalanina é o precursor preferencial para a síntese de monolignanos, entretanto, monocotiledôneas utilizam tanto fenilalanina como tirosina, indiscriminadamente. Portanto as gramíneas podem utilizar qualquer dos dois aminoácidos pra confeccionar lignina.

A lignificação é um processo bioquímico que abrange a biossíntese de monolignóis, seu transporte e a polimerização na parede celular. De um modo geral a complexidade estrutural das ligninas depende das ligações formadas entre as unidades constitucionais (C6C3) durante o processo de polimerização (Micic et al., 2002). Para formar os precursores terminais (ésteres de ácidos fenilpropanóides), sucessivas oxidações e metilações são descritas (Choinowski et l.,1999).

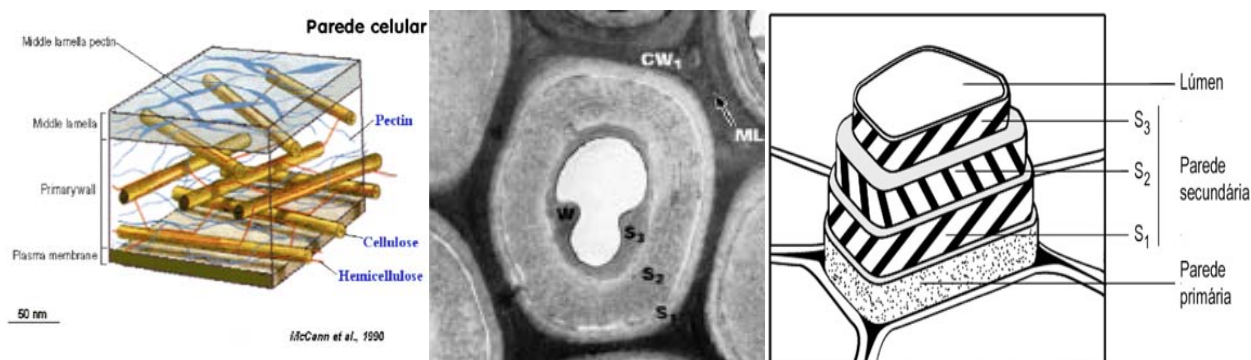


Figura 1. Estrutura da parede celular vegetal

A lignina é sintetizada, inicialmente, em locais definidos da parede celular e da lamela média. A partir destes locais específicos a lignina se propaga em polímeros que se estendem através da parede celular. Estudos demonstram que o início da deposição de lignina esta espacialmente e temporalmente associado com outros eventos da parede, em particular, a síntese e deposição de polissacarídeos, e também com a secreção de proteínas específicas pelo complexo de Golgi. Segundo o modelo de síntese de lignina, assume-se que o crescimento da cadeia do polímero é conduzido por uma matriz protéica que direciona e controla os tipos de ligações e configurações.

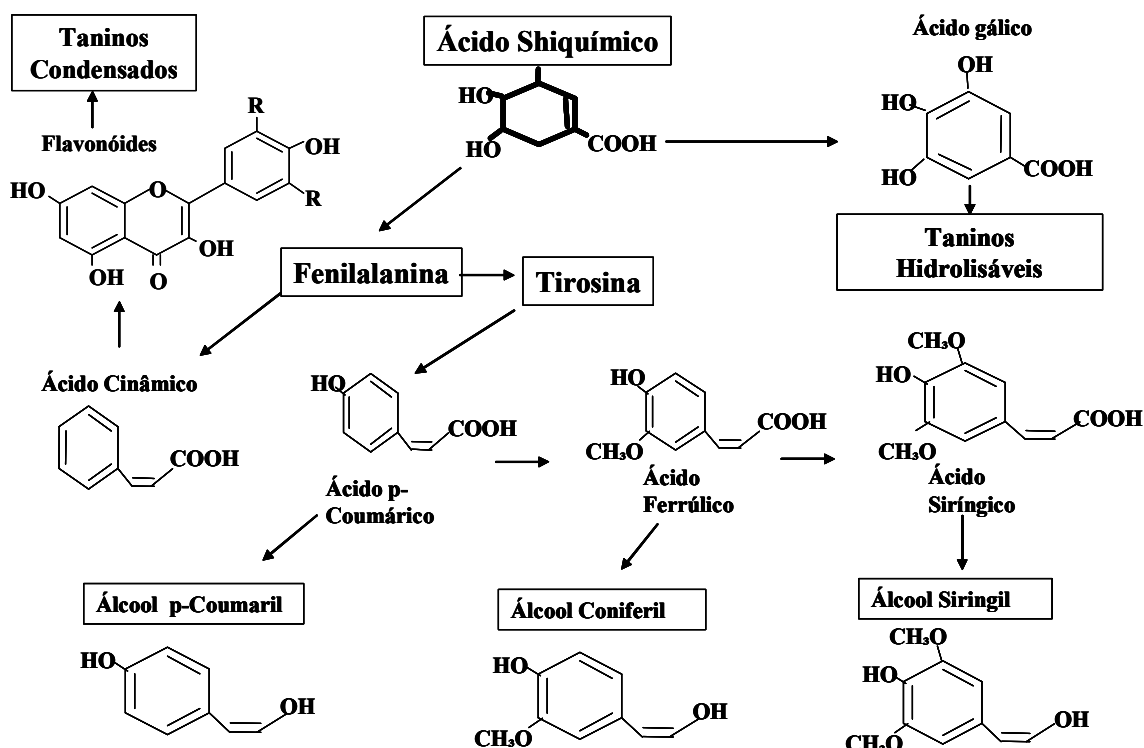


Figura 2- Esquema da formação dos monolignóis, precursores da lignina

Ainda que a parede celular dos tecidos corresponda de 35 a 80%, de acordo com Wilson & Mertens (1995) a espessura da parede, os tipos de ligações que formam os polissacarídeos e a deposição de lignina dentro da parede celular são fatores que podem reduzir a disponibilidade de sua energia para os ruminantes.

Associada aos carboidratos estruturais, celulose e hemicelulose durante o processo de formação da parede celular (Norton, 1982) sendo o componente que reconhecidamente mais limita a digestão dos polissacarídeos da parede celular no rúmen (Jung & Deetz, 1993). Está presente nas partes lenhosas dos vegetais, sabugos, cascas e folhas e corresponde a 5 a 10% do peso seco das forragens, podendo atingir até 50% na madeira de lei. As coníferas de um modo geral apresentam um teor de lignina de 26 a 34%.

O termo "core" e "non-core" têm sido usados por alguns autores para diferentes tipos de lignina em forrageiras (Gordon, 1975; Jung & Deetz, 1993). A lignina "core" refere-se ao polímero de fenilpropanóides depositado na parede celular pela polimerização dos álcoois precursores coniferil, sinapil e p-coumaril. Este tipo, determinado rotineiramente nas análises laboratoriais com uso de ácido sulfúrico 72%, é extremamente condensado e também conhecido como lignina Klason ou lignina em detergente ácido (Van Soest, 1994). A lignina

“non-core” representa os ácidos fenólicos p-cumárico e ferrúlicos (e seus dímeros) depositados na parede celular durante sua formação. Esses ácidos podem estar ligados à lignina “core”, aos polissacarídeos ou a ambos simultaneamente (Jung, 1989) e correspondem aos fenólicos extraídos. Com a maturação da planta, reduz-se a concentração dos ésteres dos ácidos fenólicos livres devido sua polimerização, assim, a concentração de lignina verdadeira aumenta (Van Soest, 1994).

Hartley (1972) mostrou correlações negativas entre as concentrações dos ácidos fenólicos (“non-core”) presentes na parede celular das forrageiras com a digestibilidade destas, sendo o ácido p-cumárico o mais representativo dessa indigestibilidade. A lignificação da parede celular limita a digestão através de três mecanismos: o efeito tóxico aos microrganismos fibrolíticos; limitação da ação das enzimas fibrolíticas criada pela hidrofobicidade resultante da deposição dos polímeros de lignina com a maturidade da planta e, impedimento físico causado pela ligação polissacarídeo-lignina o que limitaria o acesso das enzimas.

Como o peso molecular deste complexo é elevado, sua taxa de difusão pode ser até 14 vezes mais lenta que a dos monômeros fenólicos isolados (Wilson & Mertens, 1995). O que pode causar toxicidade (concentração acima de 1 mM) aos microrganismos ruminais (Paciullo, 2002). A extensão dessa inibição parece pouco significativa (Jung & Deetz, 1993), já que as bactérias possuem mecanismos de desintoxicação dos ácidos p-cumárico e ferrúlico.

Após a diferenciação e a maturação dos tecidos, a lignina do tipo guaiacil, por ser formada pelo álcool coniferil, o qual propicia mais ligações e ramificações, tornaria a lignina mais ramificada e condensada, resultando em aumento da relação lignina/polissacarídeos na parede primária e lamela média, refletindo em maior efeito negativo na digestão dos tecidos. A lignina do tipo siringil, formada pelo álcool sinapil, torna o polímero de lignina mais linear e menos condensada, portanto, com menor ligação com os polissacarídeos (Jung & Deetz, 1993). Essas características fazem com que a presença da lignina comprometa menos sua digestão.

De acordo com Akin et al. (1973), pode-se relacionar o potencial de digestibilidade de uma planta com os diferentes tecidos vegetais ou com tecidos específicos. Assim, maiores quantidades de tecidos vasculares lignificados e esclerenquimáticos proporcionam menores taxas de digestibilidade (Rodella, 1982). Com o envelhecimento das plantas ocorre espessamento e lignificação das paredes celulares, principalmente na região dos feixes vasculares.

Os tecidos vegetais apresentam potencial de digestão diferenciados, do que decorre a proporção de tecidos e o valor nutritivo de gramíneas forrageiras (Brito et al., 1999). Em termos gerais, as células do mesófilo e as do floema de parede celular delgada são rapidamente digeridas (Akin et al., 1973), as células da epiderme e da bainha parenquimática dos feixes, de digestão lenta e parcial de tecidos como esclerênquima e xilema, que apresentam parede celular espessa e lignificada, são muito pouco digeridos (Akin, 1989).

A baixa digestão de alguns tecidos pode advir, principalmente, do arranjo adensado de suas células e da elevada espessura das paredes celulares que, geralmente, apresentam-se lignificadas.

## **MÉTODOS DE DETERMINAÇÃO DO TEOR DE LIGNINA E ALGUMAS COMPARAÇÕES ENTRE ESTES MÉTODOS.**

As análises laboratoriais de plantas forrageiras são necessárias para estimar a qualidade nutritiva e, conseqüentemente, prever a extensão da degradação biológica (Van Soest & Robertson, 1980). No entanto, qualquer método utilizado para determinar concentrações químicas deve condizer a níveis aceitáveis de precisão e acurácia. Embora o conhecimento da

exata concentração de lignina seja um valioso instrumento na estimativa do valor nutritivo das plantas forrageiras, as determinações químicas são trabalhosas e produzem resultados não muito precisos (Van Soest, 1964).

Como a fibra, a lignina não é facilmente definida por características químicas específicas. É geralmente definida como o resíduo obtido a partir da fibra em detergente ácido (celulose, lignina, cutina, minerais, sílica e NIDA), Figura 3.

Giger (1985) em uma revisão sobre as diversas classificou as diversas análises químicas da lignina em duas principais categorias: métodos gravimétricos e métodos não gravimétricos. O primeiro grupo inclui o método da lignina insolúvel em solução a 72% de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – também conhecida por lignina ácida ou lignina “Klason” (LK)(Ellis et al, 1946 e Van Soest, 1963); oxidação da lignina pelo clorito de sódio (Collings al, 1978); oxidação pelo permanganato de potássio (Lper) (Van Soest & Wine, 1968); e solubilização da macromolécula em solução ácida de trietilenoglicol (Edwards, 1973), Figura 3. Os métodos não gravimétricos incluem aqueles por espectroscopia dos raios infra-vermelhos (Norris et al, 1976) e os baseados nas propriedades ópticas da lignina, tais como a técnica da lignina solúvel em brometo de acetila (Morrison, 1972).

O método da lignina insolúvel em H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 72% foi inicialmente dividido em LK e lignina em detergente ácido (LDA). A diferença entre as duas determinações está na LDA ser previamente tratada com solução em detergente ácido, resultando na fibra em detergente ácido (lignocelulose) que é composta de lignina, celulose e sílica (cinza insolúvel). Ambos os métodos apresentam limitações, porém, acredita-se serem estas menos expressivas quando a lignina é determinada pelo método LDA. Atualmente, o método da determinação de lignina em H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 72% é definido somente pelo método em LDA, a qual é também chamada de lignina Klason, (Figura 3).

A LK é o resíduo orgânico insolúvel remanescente depois da hidrólise por H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> em duas fases, que é comumente usada para determinar os componentes de açúcar neutro dos polissacarídeos da parede celular. LK bruta em alimentos pode incluir uma variedade de componentes não lignificados: isto é, polímeros de aldeído fenol, taninos, polímeros Maillard de danos por calor, cutina (não fenólico) e resistente à hidrólise por H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 72% (Goering & Van Soest, 1970). Amostras podem estar contaminadas por compostos de Maillard (Jhonson et al, 1962). São caracterizados pela indigestibilidade e infermentabilidade. Os complexos tanino-proteína podem estar também presentes na preparação final da lignina, contaminando-a (Whitehead & Quicke, 1964). O tratamento das amostras com enzimas proteolíticas ajudariam a remover este material proteínico, entretanto, o processo não é completamente eficiente (Sullivan, 1959). No entanto, como certas enzimas requerem pH alcalino para poderem operar eficazmente, existe a probabilidade de que certa parcela da lignina verdadeira possa ser perdida no decorrer da análise (Van Soest, 1964). A aplicação destes métodos não adaptados para forragens e alimentos sofreu sérias limitações por causa da proteína, a qual é desprezível em madeira, causando sérias interferências. A remoção da proteína é essencial porque se a mesma não for removida, será mensurada como lignina. A LK vem sendo muito criticada devido às impurezas, o que impede a recuperação de fenóis e a alteração de lignofenóis necessitando do alto uso de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

No método da LDA, Van Soest (1963), na tentativa de solucionar problemas por contaminação com proteína, empregou solução de detergente em pH ácido, para obter preparações de parede celular antes do tratamento com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, porém, também neste caso, o nitrogênio não foi completamente removido. Uma maneira para contornar esta interferência, seria a mensuração do conteúdo protéico e realização das devidas correções (Thomas & Armstrong, 1949).

Talvez o mais sério percalço no procedimento da lignina ácida, seja o de que considerável fração da lignina é solúvel em solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Migita & Kawamura, 1944). Estes autores Araújo Santana, Márcia Cristina; Cavali, Jucilene. *Fundamentos e Avaliação Comparativa de Métodos para Análise de Lignina em Forragens*. Revista Electrónica de Veterinaria REDVET®, ISSN 1695-7504, Vol. VII, nº 11, Noviembre/2006, [Veterinaria.org](http://www.veterinaria.org)® - [Comunidad Virtual Veterinaria.org](http://www.veterinaria.org)® - Veterinaria Organización S.L.® España. Mensual. Disponible en <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet> y más específicamente en <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n111106.html>

reportaram que de 5 a 60% da lignina presente em várias amostras de madeira, foi solúvel na solução ácida. Trabalhando com lignina radiativamente marcada, Crawford et al (1980), observaram altos teores de fenóis marcados sendo eliminados no efluente líquido após o tratamento ácido. Aparentemente, os monômeros fenólicos incorporados na periferia da molécula são mais susceptíveis à hidrólise ácida do que o núcleo da lignina (Sarkanen & Ludwig, 1971).

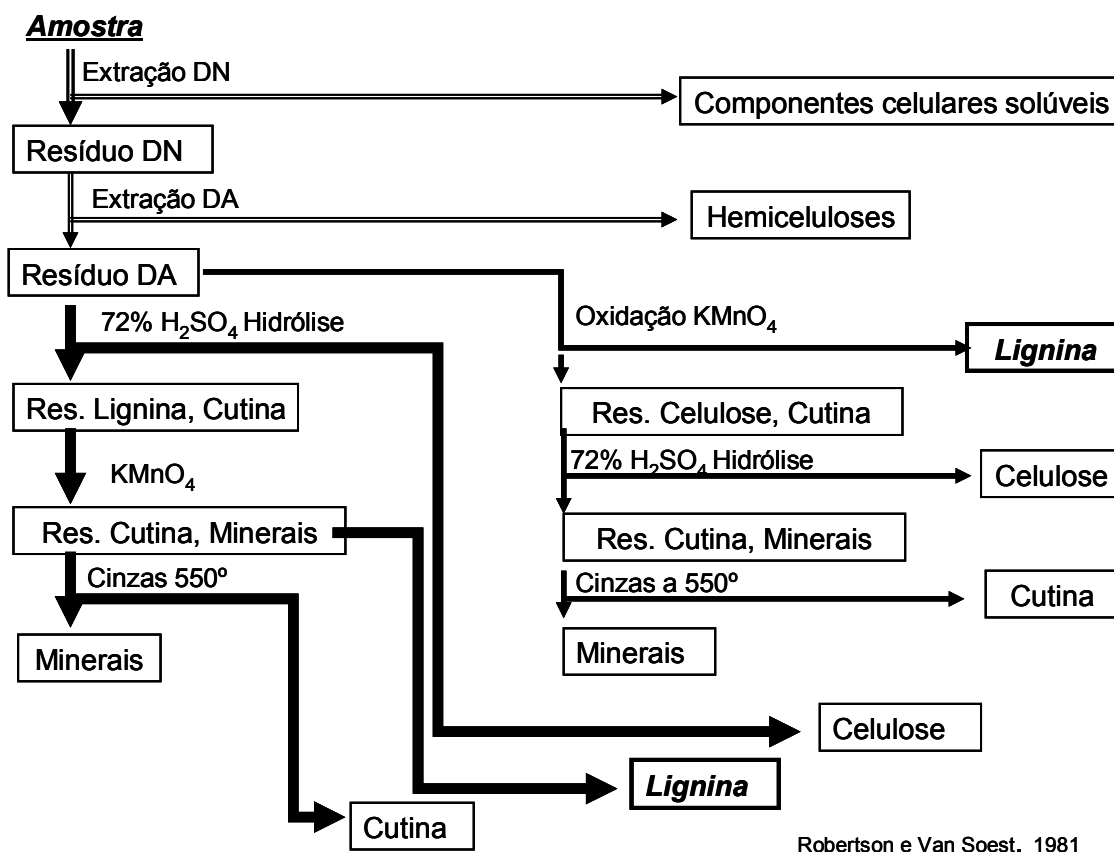


Figura 3 Esquema das etapas analíticas para determinação dos principais componentes da fibra

Apesar das desvantagens, Halfield et al (1994), comparando o método LK e LDA concluíram que valores de LK poderiam estar produzindo dados mais confiáveis de lignina total de plantas forrageiras, devido a possível parcial solubilização da lignina no tratamento LDA. Isso pode acontecer com diferentes métodos, os quais podem remover, além da lignina, contaminantes do FDA como resíduos de hemicelulose e pectina.

Outra técnica gravimétrica de quantificação da lignina é a oxidação da molécula por uma solução concentrada de permanganato de potássio (Van Soest & Wine, 1968). Porém, esta técnica analítica também apresenta desvantagens, pois partículas grandes não são uniformemente atingidas pelos reagentes, resultando em valores baixos para o composto em questão (Goering & Van Soest, 1970). A celulose pode ser parcialmente solubilizada se excessiva quantidade da solução de permanganato for empregada, particularmente em gramíneas imaturas (Van Soest & Wine, 1968). Esta técnica é amplamente utilizada pelas indústrias de papel e celulose, onde a lignina presente em pastas não branqueadas é prontamente oxidada pelo permanganato de potássio, sendo que o consumo deste reagente durante o processo fornece uma idéia do teor de lignina ainda presente na pasta.

Teores de lignina obtidos pela técnica do permanganato de potássio foram no geral mais altos que os valores obtidos por lignina ácida, o que levou Van Soest & Wine (1968) a especularem que talvez resultados provenientes do emprego deste primeiro método, estejam mais próximos de sua real concentração.

As vantagens do uso do método de permanganato sobre o do  $H_2SO_4$  são: rapidez, permitir determinar o teor de celulose e da sílica da amostra, ser menos corrosivo, além de ser menos afetado por danos da temperatura durante a secagem inicial da amostra. Como desvantagem, tem-se a não aceitação por alguns países de trabalhos onde se determinou a lignina por este método (maior capacidade de poluição). A combinação em seqüência da LPer e LK, ou vice versa, permite ora a obtenção da lignina por perda de peso, ora a celulose por perda de peso, e, conseqüentemente, a determinação da cutina, que é resistente a ambos.

Valores obtidos pelos métodos de Edwards, solubilizando macromoléculas em solução ácida de trietilenoglicol são muito similares aos obtidos utilizando-se o método da Lper. Revisões sobre a utilização deste método são escassas, restringindo maior abordagem sobre o mesmo.

Collings et al (1978), observaram a solubilização da lignina em água quase que completamente após o tratamento com clorito de sódio em solução diluída de ácido acético (Barton, 1950). Este reagente pode oxidar o anel aromático até sua completa ruptura (Sarkanen et al, 1962), podendo produzir fragmentos incolores e hidrossolúveis (Dence et al, 1962). Baseando-se nestas reações químicas, propuseram o método de clorito de sódio para determinação quantitativa da lignina, o qual, quando comparado a técnica de Lper produziu valores geralmente mais elevados. Entretanto, o clorito de sódio possui aproximadamente as mesmas limitações que o permanganato, pois deslignifica apenas parcialmente os tecidos vegetais (Ahlgren et al, 1971). Ford (1978), utilizando tal método obteve redução na concentração de lignina de 52 a 87% em amostras de folhas e caules de Capim Pangola.

Morrison (1975), observou que após duas horas de deslignificação todas as amostras tratadas ainda continham de um a dois pontos percentuais da lignina total. Embora, Ahlgren et al, (1971) detectasse perda mínima de carboidratos ao empregar este procedimento, Morrison (1975) reportou que o reagente  $NaClO_2$  removeu a hemicelulose da parede celular a taxas crescentes à medida que o processo de deslignificação ocorria.

Antes da aplicação de métodos analíticos não gravimétricos para determinação da lignina recomenda-se a preparação da parede celular bruta que é obtida por refluxo seqüencial com água destilada, etanol, clorofórmio e acetona, em aparelho de Soxhlet.

O tratamento da forragem durante o preparo das amostras em temperatura superior a  $55^\circ C$  poderá elevar o teor aparente da lignina devido à formação do complexo hemicelulose e proteína com lignina. Blance (1962) mostrou que um feno desidratado artificialmente, em temperatura baixa, tinha 10,4% de lignina e esta era 10,6% digestível, enquanto um feno produzido a temperatura de  $80^\circ C$  tinha 21% de lignina e somente 0,7% era digestível.

Dentre os métodos baseados nas propriedades ópticas podem ser citados a espectrofotometria por raios infra-vermelhos e a absorção da luz ultra-violeta. A espectrofotometria corresponde a um ramo da espectroscopia e se dedica a análises comparativas das intensidades das radiações, emitidas ou absorvidas por uma determinada substância. É mensurada por detector fotoelétrico em função do comprimento de onda e está baseada na alteração do estado de energia de átomos e moléculas ocorrendo emissão ou absorção radiação. Norris et al (1976) reportaram que a espectroscopia por raios infra-vermelhos além de realizar análises de MS, PB, FDN e estimar a digestibilidade da MS, também efetuam análises de lignina. As grandes vantagens seriam a rapidez nas determinações e nenhuma outra manipulação das amostras, além da moagem (Shenk et al, 1979).

O método requer, no entanto, a construção de curvas de calibração para cada elemento, e ainda assim, poderiam não funcionar adequadamente, mesmo para amostras de alimentos similares (Reeves III, 1988). A correta escolha do comprimento de onda para cada tipo de material ou nutriente analisado, seria de fundamental importância (Norris et al, 1976). Outro entrave, é que altas temperaturas e pressões são necessárias para extração da lignina em álcali, principalmente em leguminosas. Soluções alcalinas de lignina são lentamente oxidadas, a menos que sejam protegidas por gás nitrogênio, o qual irá alterar a densidade óptica. Outros componentes como proteínas e outros fenólicos (ácidos cinâmicos, taninos) são também dissolvidos nesse processo e interferem na absorção.

Morrison (1972), propôs um método para quantificar lignina em plantas forrageiras, que tinha sido originalmente desenvolvido para estimar lignina em amostras de madeira. Pelo isolamento de uma preparação de parede celular bruta, os compostos fenólicos solúveis que interferem na leitura ultra-violeta, são removidos, e permanece apenas a lignina, como único composto aromático. A preparação de parede celular é então solubilizada em uma solução a 25% de brometo de acetila em ácido acético glacial, originando a lignina solúvel em brometo de acetila (LSBA), que é determinada por leitura em densidade óptica no comprimento de onda a 280 nm. Entretanto, todo método espectrofotométrico requer o emprego de um padrão de referência, para com o qual as leituras de densidade óptica possam ser comparadas. Tanto Johnson et al (1961) como Morrison (1972) compararam as leituras de absorvância, através de equações de regressão, com teores de lignina ácida determinados para as mesmas amostras.

Alternativamente, valores de absorvância expressos em função da concentração de matéria orgânica na solução final, poderiam ser empregados (Fahey Jr et al, 1979). Chesson (1981), empregou a Indulina como padrão para estimar o conteúdo total de compostos fenólicos em palhadas de cereais e Johnson et al (1961), sugeriu que outras preparações de lignina podem ser empregadas como padrões, tais como a lignina nativa de Brauns (Brauns, 1939), lignina enzimaticamente obtida. A lignina nativa de Brauns, extraída da alfafa, foi empregada por Fukushima et al (1991) na obtenção de teores de lignina desta leguminosa.

Fukushima & Dehority (2000) propuseram como padrão à lignina extraída da planta pelo próprio reagente brometo de acetila. Fukushima & Hartfield (2001) recomendaram o emprego de uma outra forma de lignina que é extraída da planta por uma solução ácida de dioxana, e curvas –padrão desenvolvidas para cada tipo de lignina isolada. A lignina dioxana tem como principal vantagem, de obter, em curto espaço de tempo, a fração lignina com alto rendimento e alto grau de pureza, adequando-se, portanto, como padrão de referência. É, portanto, de consenso geral que nenhuma destas maneiras de relacionar leitura de densidade óptica com concentração de lignina na planta forrageira tem-se mostrado plenamente satisfatório.

Lacerda (2001), comparando os métodos analíticos LDA, LK, e Lper com o método LSBA (Figura 1), verificou que em média, os teores de LSBA foi aproximadamente o dobro às concentrações de LDA. Reeves III (1988), concluiu que a melhor concordância com a metodologia da espectroscopia de raios infra-vermelhos foi com a LSBA, enquanto as comparações com LDA e Lper, foram insatisfatórias.

Concentrações mais elevadas de lignina em LSBA em relação ao método LDA, poderiam ser explicadas pela hipótese que o método espectrofotométrico, quantificaria não apenas a porção interna da lignina como também na periferia da mesma, que seria removida pela ação drástica das soluções que compõem o método LDA (Fahey Jr. et al., 1979). Teores de ligninas obtidas através dos quatro métodos avaliados mostraram efeito na maturidade em quase todas as amostras.



Fukushima & Dehority (1995) observaram que na comparação entre LDA e LSBA, houve melhor concordância entre os valores, quando se corrigiu o fator cutina nas determinações de LDA.

A razão LSBA/Lper variou entre 1,02 a 5,78 aos 45 dias, 1,08 a 2,53 aos 55 dias e 1,17 a 2,53 aos 65 dias/corte. Entretanto estes resultados para permanganato podem estar superestimados uma vez que tanto a celulose a hemicelulose podem ser atacadas pela solução, principalmente em gramíneas imaturas (Van Soest e Wine, 1968), como citado anteriormente.

Os valores de LSBA/LK foram próximos entre si e maiores que os outros dois métodos concordando com Fukusima e Hatfield (2001). Segundo Jung (1989), a LK caracteriza-se por extrair a lignina nuclear ("core"), enquanto o método espectrofotométrico reproduz teoricamente o valor real da lignina na planta, tanto a nuclear quanto à periférica ("non core") (Fukusima e Hatfield, 2001). Estes métodos renderam maiores estimativas para concentração de lignina em amostras de aveia, sendo que o método LK apresentou os menores valores.

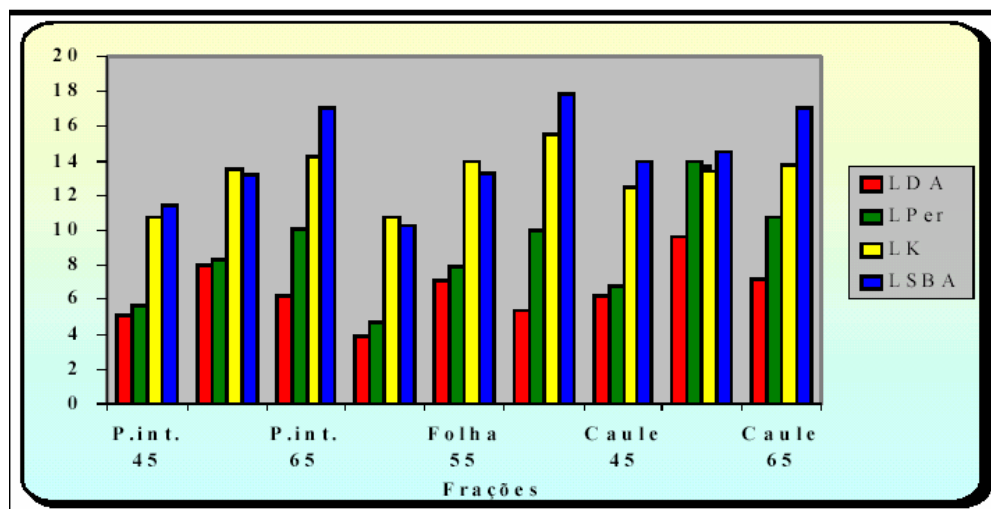


Figura 1. Médias entre oito cultivares de aveia, nos diversos estádios de maturidade, nos quatro métodos analíticos, para determinação das ligninas, das três frações, expresso em matéria seca (%).

Fukushima et al (2000), comparando os métodos LSBA com LDA e Lper na quantificação da lignina em quatro forrageiras em dois estágios de maturidade e duas amostras de madeiras (Tabela 1), pode inferir que, no geral, os valores de LSBA foram mais elevados que os valores da LDA e Lper e além dos teores de lignina variar entre espécies botânicas, aumentou com o avanço da maturidade influenciando na digestibilidade. A razão LSBA/LDA variou de 0,91 a 5,51 e LSBA/Lper entre 1,12 a 3,39. A explicação para os resultados superiores de LSBA é a mesma descrita por Lacerda (2001).

**Tabela 1. Concentrações de lignina obtidas por três diferentes métodos, razão, coeficiente de correlação entre os métodos e digestibilidade in vitro.**

### **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Os métodos analíticos mais freqüentemente utilizados para mensurar os teores de lignina em plantas forrageiras são o da lignina em detergente ácido (klason) e lignina em permanganato de potássio. Novos estudos realizados têm apresentado bons resultados quanto ao uso do brometo de acetila para determinação da lignina. No entanto, os métodos utilizados para determinação química da lignina ainda não apresentam precisão e segurança quanto aos resultados obtidos, devido a sérios percalços, como muitas vezes, resultados mascarados por artefatos de técnica (Van Soest, 1964).

## LITERATURA CITADA

1. AKIN, D.E. 1989. Histological and physical affecting digestibility of forages. **Agronomy Journal** (21):17-25.
2. AKIN, D.E. 1973. Rumen microbial degradation of grass tissue revealed by scanning electron microscopy. **Agronomy Journal** (65):825-828.
3. BARTON, J.S. The reaction products of lignin and sodium chlorite in acid solution. **TAPPI**, v.10, p.496. 1950.
4. BLANCE, D.E.; GAILARD, E.; The relationship of cells wool constituents of roughages and the digestibility of the organic matter. **J. agric. Sci.**, V.59, n.3, p: 369-373. 1962.
5. BRAUNS, F.E., Native lignin. I. Its isolation and methylation. **J. Am. Chem. Soc.**;v.61, p.2120, 1939.
6. BRITO, C.J.F.A., RODELLA, R.A., DESCHAMPS, F.C., *et al.* **Anatomia quantitativa e degradação in vitro de tecidos em cultivares de capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schumach).** Rev Bras Zootec, v.28, n.2, p.223-229, 1999.
7. CRAWFORD, R. L.; ROBINSON, L.E. and CHEH, A. M. <sup>14</sup>C-Labelid ligninis as substrates for the study of lignin biodegradation and transformation. In: **Lignin Biodegradation: micorbilogy, chemistry, and pontencial applications.** T.K. Kirk, T. Higuchi and H. Chag (Ed.). v.1, 1980. p.62.
8. CHESSON, A., Effects of sodium hidroxide on cereal straw in relation to the enhanced degradation of structural polysaccharides by rumen microorganisms **J. Sci. Food. Agric.** V.32, p. 8745. 1981.
9. COLLINGS, G.F.; YOKOYAMA, M.T. and BERGEN, W.G. Lignin as determined by oxidation with sodium chlorite and a comparison with permanganate lignin. **J.Dairy Sci**, v.61, p. 1156. 1978.
10. DENCE, C.W.; GUPTA, M.K. and SARKANEN, K.V. Studies on oxidative delignification mechanisms. II. Reactions of vanillyl alcohol with chlorine dioxide and sodium chlorite. **TAPPI**, v.45, p.29, 1962.
11. EDWARDS C.S. Determination of lignin and cellulose in forages by extraction with triethylene glycol. **J. Sci. Food Agric.** v. 24, p. 381, 1973.
12. ELLIS. G.M.; MATRONE, G. and MAYNARD L.A. A 72 percent H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> method for the determination fo lignin and its use in animal nutrition studies. **J. Anim. Sci.** v. 5, p. 285, 1946.
13. FAHEY JR., G.C., MCLAREN, G.A., WILLIAMS, J.E. 1979. Lignin digestibility by lambs fed both low quality and high quality roughages. **J. Anim. Sci.**, 48:941.
14. FORD, C.W. Effect of partial delignification on the in vitro digestibility of cell wall polysaccharides in *Digitaria decumbens* (Pangola grass). **Australian Journal of Agricultural Research**, v.29, p.1157- 1166, 1978.
15. FUKUSHIMA, R.S., HARTFIELD, R. D. Extraction and Isolation of lignin for utilization as a standard to determine lignin concentration using the acetil bromide spectrophotometric method. **J. Agric. Food Chem.** V. 49, n.7, p.3133-3139, 2001.
16. FUKUSHIMA, R.S., DEHORITY, B.A. 2000. Feasibility of using lignin isolated from forages by solubilization in acetyl bromide as a standard for lignin analyses. **J. Anim. Sci.**, 78:3135-3143.
17. FUKUSHIMA, R.S.; DEHORITY, B.A. **Modificação do método calorimétrico "lignina solúvel em brometo de acetila" na estimativa quantitativa da lignina.** Rev. Soc. Bras. Zootec., v.24, p 192-203, 1995.

18. FUKUSHIMA, R.S.; DEHORITY, B.A.; LOERCH, S.C. Modification of a colorimetric analysis for lignin and its use in studying the inhibitory effect of lignin on forage digestion by rumen microorganisms. **J. Anim. Sci.**, v.69, p.295-304, 1991.
19. GIGER, S. Revue sur les méthodes de dosage de la lignine utilisées en alimentation animale. **Anim. Zootech.** v.34, p.85, 1985.
20. GOERING, H.K.; VAN SOEST, P.J. Forage fiber analysis (Apparatus, reagents, procedures and some applications). Washington, DC: USDA, 1970. (Agricultural Handbook, 379).
21. GORDON, A. J. 1975. Comparison of some chemical and physical properties of alkali lignins from grass and lucerne hays before and after digestion by sheep. **J. Sci. Food Agric.** (26):1551-1559.
22. GLASSER, W.G. Lignin: **Pulp And Paper – Chemistry And Chemical Technology.** Casey, J.P.(Ed.), John Wiley & Sons Inc. 3ª ed., 1980. P.39-111.
23. HATFIELD, R. D.; JUNG, H. G.; RALPH, J.; BUXTON, D. R.; WEIMER, P. J. A comparison of the insoluble residues produced by the Klason lignin and acid detergent lignin procedures. **J. Sci. Food Agric**, Chichester, v. 65, p. 51-58, 1994.
24. HARTLEY, R.D.P. 1972. Coumaric and ferulic acid components of cell wall of regrass and their relationship with lignin and digestibility. **J. Sci. Food Agric.**, (23):1347-1354.
25. JOHNSON, D.B. MOORE, W.E. and ZANK, L.C. The spectrophotometric determination of lignin in small wood samples. **TAPPI.** V.44, p. 493. 1961.
26. JUNG, H.G., DEETZ, D.A. Cell wall lignification and degradability. In: **Forage cell wall structure and digestibility.** ed. JUNG, H.G., BUXTON, D.R., HATFIELD, R.D. et al. Madison: American Society of Agronomy, Crop Sci. Society of America, Soil Sci. Society of America, 1993. p.315-46.
27. JUNG, H.G. Forage lignins and their effects on fiber digestibility. **Agronomy Journal**, v.81, p.33-38, 1989.
28. JUNG, H.G. and FAREY J. R, G.C. Effects of phenolic monomers on rat performance and metabolism. **J. Nutr.**, v.113, p.546, 1983.
29. LACERDA, R. S. **Teores de lignina estimados através do método espectrofotométrico "lignina solúvel em Brometo de Acetila" em alguns cultivares de aveia.** Pirassununga: Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, 2001. p.93, Tese (mestrado em Zootecnia)- FZEA-USP, 2001.
30. IIYAMA, K., Lam, T.B.T. & Stone, B. A. (1993) Cell wall biosynthesis and its regulation. In: **Forage Cell Wall Structure and Digestibility** (Jung, H. G., Buxton, D. R., Hatfield, R. D. & Ralph, J., eds.), p. 621-665. ASA-CSSA-SSSA, Madi-University Press, Ithaca, NY. son, WI.
31. MORRISON, I. M. Improvements in the acetyl bromide technique to determine lignin and digestibility and its application to legumes. **J. Sci. Food Agric.**, Chichester, v. 23, p. 1463-1469, 1972.
32. MICIC, M.; ORBULESCU, J.; RADOTIC, K.; JERICIC, M.; SUI, G. ZHENG Y.; LEBLANC, R. M. ZL-DHP lignin model compound at the air – water interface. **Biophysical Chemistry**, V.99, p.55-62, 2002.
33. MIGITA, W. and KAWAMURA, I. Chemical analysis of wood. **J. Agric. Chem. Soc. Jpn.**, v.20, p.348, 1944.
34. NORRIS, K.H.; BARNES, R.F.; MOORE, J.E. and SHENK, J.S. Predicting forage quality by infrared reflectance spectroscopy. **J. Anim. Sci.** V.43, p. 889, 1976.
35. NORTON, B.W. Differences between species in forage quality. In: HACKER, J.B. (ed.). **Nutritional limits to animal production from pastures.** Farnham Royal: Commonwealth Agricultural Bureaux, 1982. p.89-110.
- 36.

37. PACIULLO, D.S.C. 2000. **Características anatómicas e nutricionais de lâminas foliares e Colmos de gramíneas forrageiras, em função do nível de inserção no perfilho, da idade e da estação de crescimento.** Tese (Doutorado em Zootecnia). Viçosa. Universidade Federal de Viçosa. 104p.
38. PACCIULLO, D.S.C. 2002. Características Anatómicas relacionadas ao valor nutritivo de gramíneas forrageiras. **Ciência Rural** 32 (2):357-364.
39. REEVES III J.B. Near infrared spectroscopic analysis of lignin componests in sodium chlorite-treated and untreated forage by-products. **J. Dairy Sci**, v.71, p.388, 1988.
40. RODELLA, R.A. ISHIY,C.M; MAIMONI,R.C.S. 1982. Estudo quantitativo de características anatómicas de folhas de duas espécies de Brachiaria. **Revista Agrociência** 2(2): 21-30.
41. SAKANEN, K.V. and LUDUIG, C.H. Lignins: occurrence, formation, structure and reactions. Wiley Interscience, N.Y, 1971.
42. SAKANEN, K.V.;KAKEHI,K.; MURPHY, R.A. AND WHITE, H. Studies on oxidative delignification mechanisms.I Oxidation of vanillin with chlorine dioxide. **TAPPI**,V.45,p.24, 1962.
43. SHENK.J.S; WESTERHAUS.M.O.; HOOVER, M.R. Analysis of forages by infrared reflectance. **J.Dairy Sci**. v.62, p.807.1979.
44. SULLIVAN, J.T. A rapid method for the determination of acid-insoluble lignin in forages and its relation to digestibility. **A. Anim. Sci**. v.18, p.1292, 1959.
45. THOMAS B. and HARMSTRONG .D.G. A study of some methods at present used for determination of lignin. **J. Agric. Sci**. v. 39, p. 335, 1949.
46. VAN SOEST, P. J. **Nutritional ecology of the ruminant.** Ithaca: Comstock Publishing Associates/Cornell University Press, 1994.p. 476.
47. 476.
48. VAN SOEST, P.J.; ROBERTSON, J.B. Systems of analysis for evaluating fibrous feeds. In: PIDGEN, W.J.; BALCH, C.C.; GRAHAM, M. (Eds.). Standardization of analytical methodology for feeds. Ottawa: International Development Research Center, 1980. p.49-60.
49. VAN SOEST, P.J.; WINE, R.H. The determination of lignin and cellulose in acid-detergent fiber with permanganate. Journal of the Association of Official Analytical Chemists, v.51, p.780-785, 1968.
50. VAN SOEST, P.J.; Nutritional ecology of the ruminants. **Cornell University Press**. Ithaca N.Y. 2ª ed., 1994.
51. VAN SOEST, P.J. 1963. Use of detergents in the analysis of fibrous foods. II. A rapid method for the determination of fiber and lignin. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, 46:829.
52. WHITEHEAD, D.L. and QUICKE, G.V. A comparison of six methods of estimating lignin in grass hay. **J. Sci. Food. Agric**. v.15, p.417. 1964.
53. WILSON, J.R., MERTENS,D.R. Cell wall accessibility and cell structure limitations to microbial digestion of forage. **Crop Science** (35): 251-259. 1995.

Trabajo recibido el 22/09/2006, nº de referencia 110614\_RED VET. Enviado por su autor principal. Publicado en [Revista Electrónica de Veterinaria REDVET®](http://www.veterinaria.org/revistas/redvet), ISSN 1695-7504 el 01/11/06. [Veterinaria.org®](http://www.veterinaria.org/) - [Comunidad Virtual Veterinaria.org®](http://www.veterinaria.org/) - Veterinaria Organización S.L.® Se autoriza la difusión y reenvío de esta publicación electrónica en su totalidad o parcialmente, siempre que se cite la fuente, enlace con [Veterinaria.org](http://www.veterinaria.org/) – <http://www.veterinaria.org/> y [REDVET® http://www.veterinaria.org/revistas/redvet](http://www.veterinaria.org/revistas/redvet) y se cumplan los requisitos indicados en [Copyright](http://www.veterinaria.org/) 1996 -2006