

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E AMBIENTAIS
CURSO DE ZOOTECNIA
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**

**CONCENTRAÇÕES DE LIGNINA DETERMINADAS POR
DIFERENTES MÉTODOS DOS COMPONENTES DA CANA-
DE-AÇÚCAR**

**Discente: Aline Nascimento
Ferreira**

**Orientador: Dr. Zinaldo Firmino
da Silva**

CHAPADINHA-MA

2020.2

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E AMBIENTAIS
CURSO DE ZOOTECNIA
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

**CONCENTRAÇÕES DE LIGNINA DETERMINADAS POR
DIFERENTES MÉTODOS DOS COMPONENTES DA CANA-
DE-AÇÚCAR**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao curso de Zootecnia da Universidade Federal do Maranhão como requisito básico para obtenção do grau de Bacharel em Zootecnia.

Discente: Aline Nascimento Ferreira

Orientador: Dr. Zinaldo Firmino da Silva

CHAPADINHA- MA

2020.2

ALINE NASCIMENTO FERREIRA

**CONCENTRAÇÕES DE LIGNINA DETERMINADAS POR
DIFERENTES MÉTODOS DOS COMPONENTES DA CANA-
DE-AÇÚCAR**

**Trabalho de conclusão de curso
apresentado ao curso de Zootecnia da
Universidade Federal do Maranhão
como requisito básico para obtenção
do grau de Bacharel em Zootecnia.**

Aprovada em: 27/04/2021

Banca examinadora

Prof. Dr. Zinaldo Firmino da Silva (Orientador)

Universidade Federal do Maranhão

Prof. Dr. Daniele de Jesus Ferreira

Universidade Federal do Maranhão

Prof. Dr. Alécio Matos Pereira

Universidade Federal do Maranhão

CHAPADINHA-MA

2020.2

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Diretoria Integrada de Bibliotecas/UFMA

Ferreira, Aline Nascimento.

CONCENTRAÇÕES DE LIGNINA DETERMINADAS POR DIFERENTES
MÉTODOS DOS COMPONENTES DA CANA-DE-AÇÚCAR / Aline
Nascimento Ferreira. - 2021.

31 p.

Orientador(a): Zinaldo Firmino da Silva.

Curso de Zootecnia, Universidade Federal do Maranhão,
Chapadinha MA, 2021.

1. Lignina em detergente ácido. 2. Lignina Klason. 3.
Oxidação em permanganato. I. Firmino da Silva, Zinaldo.
II. Título.

DEDICO

A Deus que me deu forças até este momento, a minha família que me ajudou desde o início e todos que estiveram comigo ao longo desses anos.

AGRADECIMENTOS

A Deus que me guiou desde o início, me dando forças para enfrentar cada obstáculo me mostrando que poderia ser mais forte do imaginava para alcançar meus objetivos.

A minha família, que não hesitou em me ajudar a conquistar esse sonho, meus pais Maria Elza e José Edvan por todo o esforço e confiança, aos meus dois irmãos José Rodrigo e João Henrique por todos os sacrifícios, por todas as vezes que me fizeram rir quando eu queria chorar, especialmente a você José Rodrigo, que da sua maneira sempre me fez ver um lado alegre no meio do caos. Sem vocês não teria conseguido chegar até aqui.

Ao grupo Gadleite por todas as experiências e oportunidades que me proporcionaram, assim como as amizades que construí que me ajudaram de alguma forma, especialmente a Adriene Benassuli, Carolaine Martins, Eryka Oliveira, Renata, Silas Souza, Emanuelle Cruz, José Fernando e Pedro Antônio. A equipe que me ajudou a realizar esse trabalho, Allana Mesquita, Paula Muniz, Isaías Viana, Paulo Junuio, por todos os momentos de aprendizados, sufocos, suporte e todas as alegrias compartilhadas.

Ao meu orientador Prof. Dr. Zinaldo Firmino por todo apoio, confiança, dedicação e incentivos passados durante esse anos.

A minha turma, Sameline Guedes, Inês Boaes, Dhara Gabriella, Larissa Almeida, Thaisa Sales, seu Eduardo, por todos os momentos vividos de alegrias e frustrações ao longo de todas as disciplinas, em especial a Lavínia Xavier e Yara Lima por toda ajuda, apoio e amizade com risos e choros compartilhados. As amizades conquistadas, Áurea Cintia, Segundo e Érico, Isabela Cortez, Madalena Silva, Emanuel Mesquita, Hermerson Gomes, Antônio Barbosa, Felipe Oliveira, Edson Matheus, Ramile Oliveira, Lídia Ferreira, Sabrina, Danrley Martins e Rita de Cassia, por todas as conversas e incentivos.

A republica mais alegre de Chapadinha, Maya Sousa, Larissa Carvalho, Marcus Paulo, Rodrigo de Sousa e Mikael Oliveirra, por terem se tornado minha segunda família, dividindo tristeza, alegrias, frustrações e conquistas, sempre de

maneira leve e divertida, vocês foram fundamentais para que eu continuasse minha jornada.

Ao Centro de Ciências Agrárias e Ambientais da Universidade Federal do Maranhão, e a todos que a compõem, que contribuíram para minha formação profissional, em especial ao corpo docente por toda dedicação e ensinamentos passados.

Ao Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC) pela bolsa e ao Programa de Biotecnologia na Ciência Animal- IECT pelo financiamento do trabalho.

A todos meu que estiveram comigo, muito obrigado!

“A vida é dura para quem é mole.”

Clarice Lispector

RESUMO

A lignina é definida quimicamente como um polímero aromático complexo encontrado na parede celular dos vegetais, intimamente relacionada a digestibilidade e, não pode ser extraída da estrutura molecular totalmente, fazendo com que as estimativas de sua concentração sejam muito variáveis. Os métodos mais empregados para determinar os teores de lignina são da Lignina em Detergente Ácido (LDA), Lignina Klason (LK) e Oxidação em Permanganato (LPer). Objetivou-se com o presente trabalho determinar as concentrações de lignina pelos métodos mais utilizados e comparar as metodologias de quantificação de lignina nos diferentes componentes da cana-de-açúcar (colmo inteiro, colmo descascado, ponteira, folha seca e casca). Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado com três tratamentos (metodologias de determinação de lignina) e sete repetições (amostras de cada componente de um “pool” de sete variedades de cana). As canas foram colhidas com 16 meses, feita as separações dos componentes e determinadas suas concentrações em LDA, LK e LPer. Houve diferença entre todos os métodos laboratoriais para determinação da lignina nos componentes da cana-de-açúcar. O método LK sobressaiu sobre o LDA, que apresentou valores reduzidos. Os valores obtidos pelo LPer foram inconsistentes e não adequados às comparações. Considerando o método LK foram os componentes com maiores concentrações de lignina, em ordem decrescente: folha seca e casca (19,0 %), ponteira (16,9 %), colmo integral (9,8 %) e colmo descascado (6,8 %). O método LK apresentou os melhores valores para determinação de lignina nos componentes da cana-de-açúcar.

Palavras chave: Lignina em Detergente Ácido. Lignina Klason. Oxidação em Permanganato.

ABSTRACT

Lignin is defined chemically as a complex aromatic polymer found in the cell wall of plants, closely related to digestibility, and cannot be extracted from the molecular structure completely, making the estimates of its concentration very variable. The most used methods to determine the lignin contents are the Acid Detergent Lignin (ADL), Klason Lignin (KL) and Permanganate Oxidation (PER). The objective of the present study was to determine the lignin concentrations by the most used methods and to compare the methodologies for quantifying lignin in the different sugar cane components (whole cane, dehusked cane, tip, dry leaf and peel). An entirely randomized design with three treatments (methodologies for lignin determination) and seven repetitions (samples of each component from a pool of seven sugarcane varieties) was used. Samples of plant cane were harvested at 16 months of age, separated into components and determined in LDA, LK and LPer. The LK method stood out over the LDA, which showed reduced values. The values obtained by the LPer were inconsistent and not suitable for comparisons. Considering the LK method, the components with the highest concentrations of lignin were, in decreasing order: dry leaf and bark (19.0%), tip (16.9%), whole cane (9.8%) and dehusked cane (6.8%). The LK method showed the best values for lignin determination in sugarcane components.

Key words: Acid Detergent Lignin, Klason Lignin, Permanganate Oxidation.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	OBJETIVO.....	16
2.1	Geral.....	16
2.2	Específicos	16
3	REVISÃO BIBLIOGRAFICA	17
3.1	Cana-de-açúcar	17
3.2	Lignina	19
3.3	Métodos de quantificação de lignina.....	21
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	23
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
6	CONCLUSÃO.....	28
	REFERÊNCIAS.....	29

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Composição percentual de lignina nos métodos de Lignina em Detergente Ácido (LDA), Lignina Klason (Lk) e Lignina em Oxidação de Permanganato (LPer) nos componentes da cana-de-açúcar.....	25
---	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Percentual dos teores médios de Lignina Klason (LK) dos componentes da planta cana-de-açúcar colhida aos 16 meses.....27

1 INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar que possui alto valor energético na época de entressafra é utilizada como uma alternativa de forragem suplementar para os animais durante a escassez de pasto (CRUZ et al., 2014).

Os ruminantes possuem a habilidade de transformar forragem em energia, que é usada na produção de carne e leite. Um maior aproveitamento dessa energia será em decorrência da maior digestibilidade da fibra da forragem. Contudo, a fibra da cana-de-açúcar possui baixa degradabilidade, o que reduz a sua taxa de ingestão (CARVALHO et al., 2010). Nesse contexto, a presença da lignina na parede celular das forragens, sobretudo das tropicais, é um dos fatores que dificulta a ação dos microrganismos ruminais, diminuindo seu valor nutritivo (FUKUSHIMA et al., 2017).

A lignina é definida quimicamente como um polímero composto de unidades de fenilpropanóides derivados principalmente de álcoois, que do ponto vista funcional garante rigidez a estrutura da planta e impede a degradação dos polissacarídeos, atuando assim como uma importante linha de defesa contra patógenos e insetos, sendo encontrada na parede celular das plantas (HATFIELD e FUKUSHIMA, 2005).

Ao longo dos anos, vários estudos foram feitos, testando diferentes métodos para quantificar a presença de lignina nos alimentos fornecidos para os animais. Contudo, a dificuldade em estudar o papel de lignina na digestibilidade da parede celular, é que este componente não pode ser extraído da estrutura molecular definitivamente, fazendo com que todas as estimativas de concentração da mesma, sejam muito variáveis, baseando-se somente, no método particular de análise escolhido (JUNG et al., 2006).

Segundo Fukushima et al. (2015) os métodos gravimétricos mais empregados entre os pesquisadores envolvidos com forragem a fim de determinar os níveis de lignina são: Lignina em Detergente Ácido (LDA) e Lignina Klason (LK). O limitante no uso dessas diferentes metodologias é que as estimativas de concentração de lignina vão sofrendo amplas variações durante sua determinação, implicando na falta de credibilidade dos resultados.

Dessa forma, no intuito de padronizar as análises laboratoriais, o Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Ciência Animal-INCT, publicou o livro Métodos para Análise de Alimentos, onde são citados os métodos Lignina em Detergente

Ácido (LDA), Lignina Klason (LK) e Lignina em Oxidação em Permanganato (LPer) para a determinação das concentrações de lignina em forragens. Portanto, objetivou-se comparar as metodologias na determinação do teor de lignina nas diferentes partes da cana-de-açúcar (colmo inteiro, colmo descascado, ponteira, folha seca e casca).

2 OBJETIVO

2.1 Geral

Determinar as concentrações de lignina pelos métodos de Lignina em Detergente Ácido (LDA), Lignina Klason (KL) e por Oxidação em Permanganato (LPer) nos componentes da planta de cana-de-açúcar.

2.2 Específicos

- Comparar os três métodos de determinação de lignina nos componentes (colmo integral, colmo descascado, ponteira, casca e folha seca) das amostras de cana-de-açúcar;
- Quantificar as concentrações lignina de cada componente da planta cana-de-açúcar.

3 REVISÃO BIBLIOGRAFICA

3.1 Cana-de-açúcar

O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, sendo de grande importância para o agronegócio brasileiro, com produção estimada para segunda safra 2020/2021 de 642,1 milhões de toneladas em 8.605 mil hectares, sendo uma das grandes alternativas para o setor de biocombustíveis devido ao grande potencial na produção de etanol e seus subprodutos (CONAB, 2020). Contudo, devido ao seu alto potencial produtivo, facilidade de cultivo juntamente com o período de colheita ocorrendo na época de estiagem, tornou-se uma cultura de grande interesse para alimentação de ruminantes, como uma alternativa para o período em que ocorre diminuição de oferta de forragem (PASUCH et al., 2012).

A cana-de-açúcar apresenta elevada produção de matéria seca por hectare, elevado teor de carboidratos solúveis, menor custo de produção e boa aceitabilidade pelos animais (FREITAS et al., 2006). Características como resistência a doenças e pragas, tombamento, rebrota, tolerância a seca são avaliadas na escolha da variedade de cana-de-açúcar para alimentação animal (CRUZ et al., 2014), sendo considerada por alguns autores como a opção forrageira de melhor desempenho bioeconômico para ser utilizado na alimentação de bovinos de corte e de leite (NUSSIO et al., 2003; RESENDE et al., 2005; SIQUEIRA et al., 2008)

Entretanto, uma das limitações quanto ao uso da cana-de-açúcar na alimentação animal é o seu baixo teor de proteína, aliado à baixa digestibilidade da fibra. Na seleção de variedades para a indústria, pouca atenção é dada à qualidade da fibra da planta, o que pode afetar de maneira adversa o seu valor nutritivo para bovinos (FREITAS et al., 2006).

Carvalho et al. (2010) avaliando nove genótipos de cana-de-açúcar que foram divididos em colmos, folhas e planta inteira, observou que o colmo apresentou menor digestibilidade da fibra, o que pode ser explicado pela maior lignificação da parede celular desta fração, evidenciado pelo maior teor de lignina na FDN, demonstrando que a digestibilidade da fibra está relacionada com a qualidade e não com a quantidade desta fibra.

Bonomo et al., (2009) encontrou para planta inteira da cana-de-açúcar a média de 5,11% de lignina utilizando o método de Lignina em Detergente Ácido (LDA) em 23 variedades. Média inferior foi encontrada por Leite (2018) para o

mesmo método, sendo 3,2% em quinze genótipos de cana-de-açúcar. Utilizando o método de permanganato de potássio, Freitas et al. (2006) encontrou média de 12.13% em treze genótipos.

A baixa digestibilidade da fração fibrosa devido à qualidade da fibra leva a um efeito negativo no consumo dessa forrageira pelos ruminantes (SIQUEIRA et al., 2012). Portanto, fica claro que para se avaliar o exato papel da lignina e dos mecanismos envolvidos na degradação dos carboidratos da parede celular, o conhecimento das concentrações de lignina nas forrageiras é de primária importância (HATFIELD e FUKUSHIMA, 2005).

3.2 Lignina

A lignina é um polímero aromático complexo, sendo encontrado nas paredes celulares das plantas, fortemente ligado à celulose e hemicelulose e pode ser considerado uma “cola celular” (FREI, 2013), que confere as paredes celulares rigidez, impedindo a degradação dos polissacarídeos, além de fornecer força aos tecidos e fibras vegetais, atuando como defesa contra patógenos e insetos (HATFIELD e FUKUSHIMA, 2005).

Os ruminantes por possuírem uma população microbiana ruminal, fermentam os polissacarídeos celulose e hemicelulose em ácidos graxos que servem como fonte de energia para esses animais, apesar disso, a lignina, do ponto de vista nutricional, representa um componente indesejado, por não ser prontamente fermentada pelas bactérias do rúmen, inibindo a degradabilidade dos carboidratos, limitando o valor nutritivo das forragens por tornar o conteúdo inacessível (KRAUSE et al., 2003). Desta forma, o conhecimento do efeito depressor da lignina na digestibilidade da fibra em alimentos para animais ruminantes não é um assunto novo (PATE, 1977).

Limitando o valor nutritivo, a produção dos animais tende a diminuir, principalmente no período seco, quando as forragens estão maduras, muitas vezes até como palhadas, com altos teores de lignina, baixa digestibilidade da parede celular, apresentando como resultado pouca energia disponível (FUKUSHIMA et al., 2017). Contudo, é notória a importância da quantificação de seus teores nas forragens (HATFIELD & FUKUSHIMA, 2005).

A medida que a planta amadurece, o teor de lignina aumenta limitando a degradação da parede celular (JUNG e DEETZ, 1993). Fato observado no trabalho de Velásquez et al. (2018), que usou cinco espécies de gramíneas colhidas em cinco estádios de maturação (pré-emergência da flor, pré-floração, floração inicial, floração total e pós floração), testando três métodos de quantificação de lignina, nos quais houve aumento no teor de lignina a medida que as plantas amadureciam.

Vários fatores vêm sendo estudados para tentar otimizar o desempenho dos animais que consomem forragens tropicais, sendo um deles a composição da parede celular que é responsável pelo menor consumo de forragem e conseqüentemente menor desempenho animal (DETMANN et al., 2008).

Alguns métodos foram desenvolvidos ao longo dos anos para quantificar o teor de lignina, ainda assim, entre os procedimentos analíticos mais utilizados para

forragem, ocorre divergência nos resultados (FUKUSHIMA e HATFIELD, 2004), não deixando claro qual método produz estimativas mais precisas do conteúdo de lignina nas forragens tropicais (GOMES et al., 2011).

3.3 Métodos de quantificação de lignina

Quantificar o valor nutricional dos alimentos para ruminantes requer estudos avaliando a fração fibrosa das forragens, principalmente nos trópicos, por fornecerem energia significativa a baixo custo (DETMANN et al., 2008). Dos componentes da parede celular, a lignina é considerada o principal fator limitante da degradação dos carboidratos no rúmen, sendo classificada como um composto existente na parede celular de vegetais, normalmente considerado indigestível pelos animais (VAN SOEST, 1994).

As análises laboratoriais para estimar a qualidade nutritiva e principalmente os fatores que limitam a digestibilidade se tornam um fator de grande relevância na nutrição animal (SAVIOLI et al., 2000). No entanto, esses métodos, durante a determinação dos níveis de lignina, apresentam valores bastante divergentes em relação à mesma amostra (FUKUSHIMA e HATFIELD, 2004).

Van Soest, Robertson, Barry (2018) afirmam que o método mais popular e utilizado em trabalhos com forragem é o de hidrólise ácida, também chamado Lignina em Detergente Ácido (LDA), usando ácido sulfúrico 72%, sequencial ao procedimento de fibra em detergente ácido (FDA).

Esse método foi desenvolvido como alternativa a análise de Lignina Klason (LK) para evitar a contaminação por proteína, utilizando fibra em detergente neutro (FDA) como preparação fibrosa (VAN SOEST, 1963). No entanto, essa metodologia resulta em valores mais baixos, devido à perda de uma fração de lignina que é potencialmente solúvel em detergente ácido, segundo Hatfield e Fukushima (2005) e Raffrenato e Amburgh (2011).

No trabalho de Fukushima e Savioli (2001), utilizando sete espécies forrageiras, no estágio de maturidade "início da fase reprodutiva", as concentrações de LDA variaram de 5,5 a 20,8% na planta inteira, 4,1 a 20,3% no caule e 4,1 a 20,3% na folha; no estágio de maturidade "plena frutificação", os valores de LDA foram de 7,7 a 27,4% na planta inteira, 7,0 a 22,8% no caule e 6,2 a 25,0% na folha. Quando comparados ao método LPer, que apresentou no estágio "início da fase reprodutiva", variação de 14,2 a 33,3% na planta inteira, 11,7 a 32,8% no caule e 14,4 a 36,4% na folha, no estágio "plena frutificação", 19,8 a 33,0% na planta inteira, 15,9 a 30,5% no caule e 18,2 a 37,7% na folha, as concentrações de LDA são inferiores para as mesmas frações das forrageiras.

O segundo método mais utilizado é o da Lignina Klason (LK), que também faz uso da solução de ácido sulfúrico a 72%, entretanto, não é um procedimento sequencial e seus resultados sempre são valores mais elevados (FUKUSHIMA et al., 2015).

O método LK foi inicialmente desenvolvido para avaliação do teor de lignina em madeira, sua utilização em forragens é questionada devido a possível contaminação por proteínas (JUNG et al., 2006). No trabalho de Gomes et al. (2011) houve contaminação maior por proteína nas leguminosas quando comparada as gramíneas, que mesmo com correção para contaminação permaneceu com valores mais elevados quando comparado aos outros métodos. Os resultados do trabalho de Velásquez et al. (2018) mostraram que os valores de LK foram em média 1,7 vezes os valores de LDA.

Outro método citado no livro do INCT é a Lignina em Oxidação em Permanganato (LPer), também realizada após o processo de FDA e não emprega reagentes tão corrosivos como ácido sulfúrico. Esse método é usado por pesquisadores que preferem evitar a utilização do ácido, seus valores normalmente são superiores aos encontrados no método LDA, no entanto, esses valores podem ser afetados pela presença de taninos, pigmentos ou proteínas que não são completamente removidos durante o processo de FDA (FUKUSHIMA e HATFIELD, 2004).

Devido a extração em detergente ácido, os valores de LPer apresentaram níveis de contaminação baixos por proteínas quando comparado ao método KL (GOMES et al., 2011). O método de LPer apresenta valores parecidos aos encontrados pelo LK, sendo o dobro dos encontrados pelo LDA (VELÁSQUEZ et al., 2018).

4 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no Centro de Ciências Agrárias e Ambientais da Universidade Federal do Maranhão, na Unidade de Pesquisa em Nutrição de Gado de Leite - UPNGL, localizada no município de Chapadinha-MA, sob as coordenadas de latitude 03°44'16" Sul e longitude 43°20' 48" Oeste. O clima do município, segundo a classificação de Köppen, é do tipo tropical quente úmido (Aw), com temperatura média anual superior a 27°C e precipitação pluvial média de 1.670 mm, com períodos de chuva entre os meses de janeiro e junho e de seca entre julho e dezembro.

As amostras de cana-de-açúcar de sete variedades (RB92579, CV4, RB962962, RB041443, RB951541, RB855035 e RB867515), de primeiro ciclo (cana-planta) foram colhidas aos 16 meses e seus componentes separados em colmo integral, colmo descascado, ponteira, folha seca e casca. O conjunto de um mesmo componente de todas as variedades de cana foram misturados e triturados para se gerar uma amostra composta. As amostras posteriormente foram pré-secadas em estufa de ventilação forçada de ar a 55°C por 72 horas e processadas em moinho de facas do tipo Willey, para obtenção de partículas com 1 mm.

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, com três tratamentos (metodologias de determinação de lignina) e sete repetições (amostras de cada componente de um "pool" de sete variedades de cana). Os resultados foram submetidos à análise de variância pelo teste F e suas médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, por meio do software estatístico Infostat.

Para o método de Hidrólise Ácida, as amostras passaram pela análise de fibra em detergente ácido (FDA), para posteriormente serem colocadas em solução de ácido sulfúrico a 72% durante três horas, sobre homogeneização a cada 30 minutos para permitir que o ácido entrasse em contato com todas as partículas, sendo lavados em seguida com água destilada quente e, colocadas em estufa de 105°C por dezesseis horas. Após esse processo, as amostras foram pesadas e colocadas em cadinhos de porcelana, para irem à mufla em temperatura de 550°C por duas horas (DETMANN et al., 2012). A lignina foi calculada pela perda de peso após a incineração pelo cálculo:

$$\%LIG\ ASA = \frac{RES - RM}{ASA} \times 100$$

$$\%LIG\ MS = \frac{\%LIG\ ASA}{\%ASE} \times 100$$

Onde: %LIG ASA= percentual de lignina com base na amostra seca ao ar; RES= massa do resíduo obtido após o tratamento com ácido sulfúrico (g); RM= massa do resíduo mineral obtido após a incineração em mufla (g); ASA= massa de amostra seca ao ar (g); %LIG MS= percentual de lignina com base na matéria seca; %ASE= percentual de amostra seca em estufa.

No método da Oxidação em Permanganato as amostras também passaram pela análise de FDA, e somente depois desse processo, em bandejas de polietileno com 2 a 3 cm de água destilada, as amostras foram colocadas em solução de permanganato durante duas horas sendo homogeneizadas a cada 30 minutos, e logo após em solução de desmineralização por trinta minutos, para então serem lavados com solução de etanol a 80% e acetona, para serem colocados em estufa de 105° C por dezesseis horas. A lignina foi calculada pela diferença entre o resíduo insolúvel em detergente ácido e o resíduo após o método de oxidação em permanganato pelo cálculo:

$$\%LIG\ ASA = \frac{RDA - RES}{ASA} \times 100$$

$$\%LIG\ MS = \frac{\%LIG\ ASA}{\%ASE} \times 100$$

Onde: %LIG ASA= percentual de lignina com base na amostra seca ao ar; RDA= massa de resíduo obtido após o tratamento com detergente ácido (g); RES= massa resíduo obtido após tratamento com solução de permanganato de potássio e com a solução desmineralizadora (g); ASA= massa de amostra seca ao ar (g); %LIG MS= percentual de lignina com base na matéria seca; %ASE= percentual de amostra seca em estufa (DETMANN et al., 2012).

Na análise de Lignina Klason, as amostras foram colocadas em banho-maria a 30 °C durante uma hora com solução de ácido sulfúrico (72%) sendo homogeneizadas com um bastão de vidro a cada 30 minutos, logo depois foi adicionada 80 ml de água destilada nos potes coletores para serem autoclavados durante uma hora a 105° C, logo após esse processo foram lavadas com água destilada quente. As amostras foram colocadas em estufa a 105°C durante dezesseis horas para secagem, colocadas em cadinhos de porcelana e queimados em mufla por duas horas conforme Detmann et al. (2012). A lignina foi calculada pelas formulas:

$$\%RES\ ASA = \frac{RES}{ASA} \times 100$$

$$\%RES\ MS = \frac{\%RES\ ASA}{\%ASE} \times 100$$

$$\%RM\ ASA = \frac{RM}{ASA} \times 100$$

$$\%RM\ MS = \frac{\%RM\ ASA}{\%ASE} \times 100$$

$$\%LIG = \%RES\ MS - \%RM\ MS$$

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os percentuais dos teores de lignina nos componentes da cana-de-açúcar pelos três métodos de quantificação de lignina estão apresentados na Tabela 1. Houve efeito para os teores de lignina nos diferentes métodos laboratoriais para todos os componentes da cana-de-açúcar.

Tabela 1- Composição percentual de lignina nos métodos de Lignina em Detergente Ácido (LDA), Lignina Klason (Lk) e Lignina em Oxidação em Permanganato (LPer) nos componentes da cana-de-açúcar colhida aos 16 meses após o plantio.

COMPONENTES	MÉTODOS			Média	CV (%)
	LDA	LK	LPer		
Folha seca	8,73b	18,15a	2,39c	9,76	28,9
Ponteira	5,32b	16,95a	1,85c	8,04	13,9
Colmo integral	5,71b	9,79a	1,03c	5,51	23,8
Colmo descascado	3,97b	6,84a	1,35c	4,05	14,7
Casca	8,91b	18,09a	1,92c	9,64	15,9

Médias seguidas pela mesma letra, na mesma linha, não diferiram entre si pelo teste Tukey a 5%.

O método LK sobressai sobre os demais métodos e apresentou valor superior para todos os componentes da cana-de-açúcar em relação ao LDA e LPer que foram diferentes entre si. Resultado também encontrado por Fukushima et al. (2015) que comparou o método LK com o LDA em dez espécies forrageiras, onde os valores de lignina pelo método LK foi 2,5 vezes maiores que do que os obtidos pelo LDA. Velásquez et al. (2018) encontrou valores de LK o dobro dos encontrados pelo LDA.

Os procedimentos LK e LDA são semelhantes por utilizarem ácido sulfúrico 72%, no entanto, a diferença entre os dois métodos é a sequência em que são utilizadas as diferentes concentrações de ácido sulfúrico (GOMES 2011). No LDA é utilizado o brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) que permite uma limpeza do material para se obter o FDA, que posteriormente é submetido ao ácido sulfúrico. Em contraste, no método LK a amostra é submetida ao ácido concentrado para depois ácido diluído em água destilada (FUKUSHIMA et al, 2015), causando

diferentes efeitos na hidrólise de polissacarídeos, pois o processo de FDA é responsável pela obtenção de um resíduo quase livre de interferência de proteínas (VAN SOEST, 1994).

O método LDA é o mais popular em análise de forragens (VAN SOEST, 2018) no entanto, há subestimação nos valores de lignina devido a solubilização parcial da mesma na solução de detergente ácido, podendo ter perdas de 50% ou mais (VAN SOEST, 1994), resultando sempre em valores mais baixos (HATFIELD e FUKUSHIMA, 2005; FUKUSHIMA, 2015).

Nos resultados obtidos neste trabalho é notória essa subestimação para todos os valores dos componentes da cana-de-açúcar (tabela 1), quando comparado com o método de LK que apresenta praticamente o dobro dos valores de LDA. Valores semelhantes foram encontrado por Carvalho et al. (2010) pelo método LDA, onde os colmos apresentaram teor de 5,6%, menor que as folha 6,5 % e 5,3% para a planta inteira. Média de 3,5% de lignina foi encontrada por Lima (2019) utilizando o mesmo método para o componente colmo e, 4, 38% média para planta inteira da cana-de-açúcar.

A contaminação por proteínas foi mais evidente em leguminosas do que em gramíneas, utilizando o método LK, possivelmente devido à concentração mais elevada de proteínas nas leguminosas segundo Gomes et al. (2011). O baixo teor de proteína em cultivares de cana-de-açúcar é uma característica desta espécie forrageira, variando de 1, 65 a 3,45% (BONOMO 2009; AZEVEDO et al., 2003), o que supõe que essa contaminação foi irrelevante na análise deste trabalho, devido a valores baixos de proteína da espécie.

Embora os métodos LDA e LPer sejam realizados após a análise de FDA, as estimativas de conteúdo de lignina mais altas foram encontradas com LPer em dez gramíneas tropicais (GOMES et al., 2011). Azevedo et al. (2003), analisando quinze variedades de cana-de-açúcar, encontrou média de 13% de lignina usando o método LPer, valor parecido com o encontrado por Freitas et al. (2006), analisando trezes variedades com o mesmo método encontrou média de 12,13% de lignina.

Diferentemente do que tem sido relatado na literatura (Detmann et al., 2012) os teores de LPer foram inferiores aos valores de lignina em LDA, isto pode está relacionado ao tamanho de partícula usado neste trabalho de 1 mm seguindo metodologia INCT. Segundo Silva & Queiroz (2002), o tamanho das partículas da

amostra de LPer deve ser rigorosamente menor que 1 mm, para que haja melhor contato com as soluções.

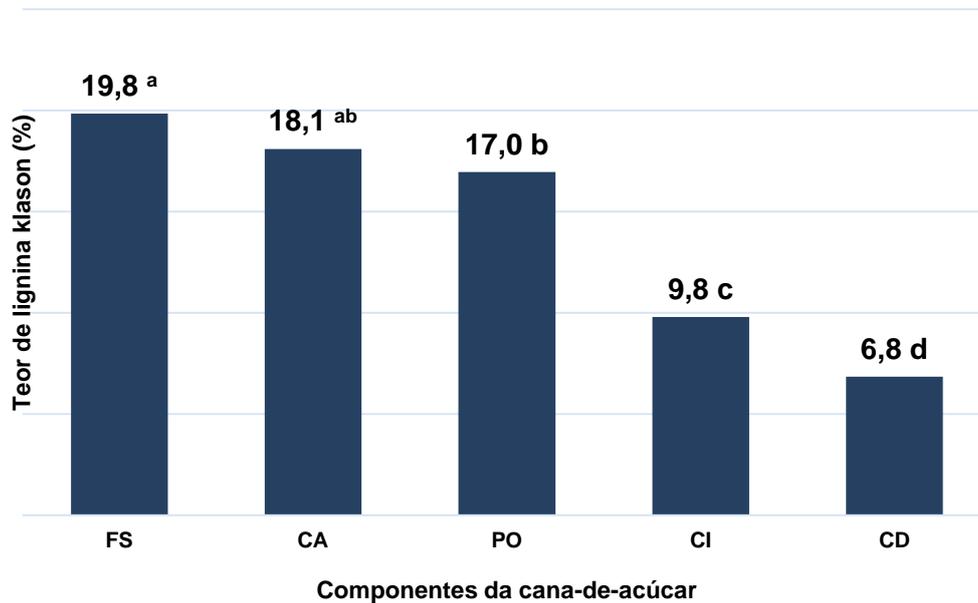


Figura 1- Teores médios de lignina Klason dos componentes das variedades de cana-de-açúcar colhidas aos 16 meses. FS (folha seca), CA (casca), PO (ponteira), CI (colmo integral), CD (colmo descascado).

Dentre os métodos estudados o LK apresentou os valores mais confiáveis para os componentes da cana-de-açúcar com maiores valores para folha seca, casca e ponteira. Estes componentes apresentaram cerca de dez unidades percentuais superiores ao do colmo integral e 13 unidades percentuais superiores ao colmo descascado, fato justificado pela sacarose está contida nos colmos enquanto as folhas são ricas em fibras de baixa digestibilidade (JÚNIOR et al., 2014).

No trabalho de Carvalho et al. (2010), a fração colmo apresentou menor teor de lignina que as folhas, devido ao maior teor de açúcares solúveis nesta fração da cana-de-açúcar. No entanto, apesar de apresentar maior digestibilidade na matéria seca quando comparada as folhas, o colmo apresentou menor digestibilidade da fibra devido a maior lignificação da parede celular, evidenciado pelo maior teor de lignina na fibra em detergente neutro (FDN).

6 CONCLUSÃO

Entre os três métodos analisados a Lignina Klason apresentou os melhores valores na determinação de lignina dos componentes da cana-de-açúcar. As maiores concentrações de lignina foram para folhas secas, casca e ponteira.

A despalha total e a remoção da casca reduzem as concentrações de lignina do colmo descascado, proporcionando a este maior valor nutritivo.

REFERÊNCIAS

- AZEVEDO, J. A. G.; PEREIRA, J. C.; QUEIROZ, A. C.; et al. Composição químico-bromatológica, fracionamento de carboidratos e cinética da degradação in vitro da fibra de três variedades de cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.32, n.6, p.1443-1453, 2003.
- BONOMO, P.; CARDOSO, C. M. M.; PEDREIRA, M. S. et al. Potencial forrageiro de variedades de cana-de-açúcar para alimentação de ruminantes. **Acta Scientiarum: Animal Sciences**, v.31, n.1, p.53-59, 2009.
- CARVALHO, M.V.; RODRIGUES, P.H.M.; LIMA, M.L.P. et al. Composição bromatológica e digestibilidade de cana-de-açúcar colhida em duas épocas do ano. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.47, n.4, p.298-306, 2010.
- CONAB, Companhia Nacional de Abastecimento da Safra Brasileira: cana-de-açúcar, v. 7- Safra 2020/21, n. 3, **Terceiro levantamento, dezembro 2020**. Brasília: Conab 2020.
- CRUZ, L. R. GERASEEV, L. C.; CARMO, T. D. et al. Características agronômicas e composição bromatológica de variedades de cana-de-açúcar. **Bioscience Journal. Uberlândia**, v. 30, n. 6, p. 1779-1786. 2014.
- DETMANN, E.; SOUZA, M. A.; VALADARES FILHO, S. C. et al. **Métodos para análise de alimentos**. Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia Visconde do Rio Branco: Suprema, p.214, 2012.
- DETMANN, E.; PAULINO, M.F.; FILHO, S.C.V. Avaliação nutricional de alimentos ou de dietas? Uma abordagem conceitual. **Anais do 2º Simpósio Internacional de Produção de Gado de Corte**. Viçosa, Brasil, 2008, pp. 21 – 52.
- FREITAS, A. W. P. Pereira, J. C.; Rocha, F. C. et al. Avaliação da divergência nutricional de genótipos de cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, n. 1, p.229-236, fev. 2006.
- FUKUSHIMA, R. S.; KERLEY, M. S.; KALLENBACH, R. et al. Avaliação nutricional de plantas forrageiras: um procedimento rápido e acurado para quantificar o teor de lignina em forrageiras. **Novos desafios da pesquisa em nutrição e produção animal**. 2017 ed. Pirassununga, 5D editora, 2017, 354p.
- FUKUSHIMA, R. S.; KERLEY, M. S.; RAMOS, M. H. et al. Comparison of acetyl bromide lignin with acid detergent lignin and Klason lignin and correlation with in vitro forage degradability. **Animal Feed Science and Technology**, 25–37. 2015.
- FUKUSHIMA, R. S.; HATFIELD, R. D. Comparison of acetyl bromide spectrophotometric method with other lignin analytical methods for determining lignin concentration in forage samples. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.52, n.12, 2004.

FUKUSHIMA, R. S.; SAVIOLI, N. M. F. Correlação entre digestibilidade in vitro da parede celular e três métodos analíticos para avaliação quantitativa da lignina. **Revista Brasileira de Zootecnia**. V 30 n2 Viçosa mar/abril 2001.

FREI, M. Lignin: characterization of a multifaceted crop componente. **The Scientific World Journal**. Volume 2013, Article ID 436517, 25 p.

GOMES, D. I.; DETMANN, E.; FILHO, S. C. V. et al. Evaluation of lignin contents in tropical forages using different analytical methods and their correlations with degradation of insoluble fiber. **Animal Feed Science and Technology**. 206– 222, 2011.

HATFIELD, R.; FUKUSHIMA, R. S. Can lignin be accurately measured?. **Crop science**, v.45, may–june 2005.

JUNG, H. G.; DEETZ, D. A. Cell wall lignification and degradability, in Forage Cell Wall Structure and Digestibility, Jung, H.G., Buxton, D.R., Hatfield, R.D., Ralph, J. (Eds.). **American Society of Agronomy**, Madison, WI, USA, pp 315-346, 1993.

JUNG, H. J. G; VAREL, V. H; WEIMER, P. J.; RALPH, J. Accuracy of klason lignin and acid detergent lignin methods as assessed by bomb calorimetry. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.47, n.5, 2006.

JÚNIOR, S. S.; BITENCOURT, L. L.; MELO, L. Q. et al. Despalha da cana-de-açúcar e desempenho de novilhas e vacas leiteiras. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.66, n.1, p.219-228, 2014.

Krause, D. O.; Denman, S. E.; Mackie, R. I. et al. “Opportunities to improve fiber degradation in the rumen: microbiology, ecology, and genomics. **FEMS Microbiology Reviews** , vol. 27, nº 5, pp. 663–693, 2003.

LIMA, A. T. M. **Desempenho agrônômico e digestibilidade ruminal de variedades de cana-de-açúcar cultivadas sob irrigação suplementar**. 2020. 53 f. Dissertação (Mestrado)- Universidade Federal do Maranhão (UFMA), Chapadinha, 2020.

LEITE, M. R. L. **Desempenho agrônômico e digestibilidade ruminal de genótipos de cana-de-açúcar cultivadas em regime de sequeiro**. 2017. 59 f. Dissertação (Mestrado)– Universidade Federal do Maranhão (UFMA), Chapadinha, 2017.

NUSSIO, L. G.; ROMANELLI, T. L.; ZOPOLLATTO, M. Tomada de decisão na escolha de volumosos suplementares para bovinos de corte em confinamento. In: SIMPÓSIO GOIANO SOBRE MANEJO E NUTRIÇÃO DE BOVINOS DE CORTE E LEITE, 5, 2003, Campinas. **Anais...** Campinas: CBNA, 2003. p.1-14.

PASUCH, B. D.; CAIONE, G.; RODRIGUES, M. et al. Desenvolvimento, produtividade e composição bromatológica da primeira soqueira da cana-de-açúcar em função de fontes de fósforo. **Comunicata Scientiae** 3(4): 263-270, 2012.

PATE, F. M. Nutritive value of sugarcane at different stages of maturity. **Tropical Animal Production**, v.2, n.1, p.108, 1977.

RESENDE, F. D.; SIGNORETTI, R. D.; COAN, R. M.; SIQUEIRA, G. R. Terminação de bovinos de corte com ênfase na utilização de alimentos conservados. In: REIS, R.A.; SIQUEIRA, G.R.; BERTIPAGLIA, L.M.A. (Eds). **Volumosos na produção de ruminantes**. Jaboticabal: Funep, 2005. p.83-104.

RAFFRENATO, E.; AMBURGH, M. E. V. Technical note: Improved methodology for analyses of acid detergent fiber and acid detergent lignin. **Journal of Dairy Science**, v.94, n.7, 2011.

SIQUEIRA, G. R.; RESENDE, F. D.; REIS, R. A. et al. Uso estratégico de forragens conservadas em sistemas de produção de carne. In: JOBIM, C.C.; CECATO, U.; CANTO, M.W. (Eds) **Produção e utilização de forragens conservadas**. Maringá: Masson, 2008. p.41-89.

SIQUEIRA, G. R.; ROTH, M. T. P.; MORETTI, M. H. et al. Uso da cana-de-açúcar na alimentação de ruminantes. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**. Salvador, v.13, n.4, p.991-1008 out./dez., 2012.

SILVA, D. J; QUEIROZ, A. C. **Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos**. 3 ed. Viçosa: ufv, p. 235, 2002.

SAVIOLI, N. M. F.; FUKUSHIMA, R. S.; LIMA, C. G.; GOMIDE, C. A. Rendimento e comportamento espectrofotométrico da lignina extraída de preparações de parede celular, fibra em detergente neutro ou fibra em detergente ácido. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v.29, n.4, Viçosa. 2000.

VAN SOEST, P. J.; ROBERTSON, J. B.; BARRY, M. C. Soluble lignin and its relation to klason lignin, acid-detergent lignin and digestibility of NDF. **Proceedings 2018 Cornell Nutrition Conference for Feed Manufacturers**, 80th Meeting 2018.

VAN SOEST, P. J. Nutritional ecology of the ruminant. **Journal of Nutrition**, v.125, n.4, p. 1025-1025, 1994.

VAN SOEST, P. J. Symposium on nutrition and forage and pastures: New chemical procedures for evaluating forages. **Journal of Animal Science** Volume 23, edição 3, páginas 838-845, 1963.

VELASQUEZ, A. V.; MARTINS, C. M. M. R.; PACHECO, P.; FUKUSHIMA, R. S. Comparative study of some analytical methods to quantify lignin concentration in tropical grasses. **Asian- Australasian Journal of Animal Sciences**, Vol 32, 2018.