

**FLAVIA CAROLINA MOREIRA VILAR**

**COMPARAÇÃO ENTRE DIFERENTES MÉTODOS PARA  
DETERMINAÇÃO DE LIGNINA EM TECIDOS VEGETAIS**

**MARINGÁ  
PARANÁ – BRASIL  
FEVEREIRO – 2012**

FLAVIA CAROLINA MOREIRA VILAR

COMPARAÇÃO ENTRE DIFERENTES MÉTODOS PARA  
DETERMINAÇÃO DE LIGNINA EM TECIDOS VEGETAIS

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Maringá, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, na área de concentração Produção Vegetal, para obtenção do título de Mestre.

MARINGÁ  
PARANÁ – BRASIL  
FEVEREIRO – 2012

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**  
**(Biblioteca Central - UEM, Maringá – PR., Brasil)**

Vilar, Flávia Carolina Moreira  
V697c Comparação entre diferentes métodos para determinação de  
lignina em tecidos vegetais / Flávia Carolina Moreira  
Vilar. -- Maringá, 2012.  
51 f. : il., figs., tabs.

Orientador: Prof. Dr. Osvaldo Ferrarese Filho.  
Co-orientador: Prof. Dr. Wanderley Dantas dos Santos.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Maringá,  
Centro de Ciências Agrárias, Departamento de  
Agronomia, Programa de Pós-Graduação em Agronomia,  
2012.

1. Lignina. 2. Tecidos vegetais - Lignina. 3. Ácido  
tioglicólico (Método). 4. Acetilbromida (Método). 5.  
Klason (Método). 6. Monolignóis. 7. Monossacarídeos.  
I. Ferrarese Filho, Osvaldo, orient. II. Universidade  
Estadual de Maringá. Centro de Ciências  
Agrárias. Departamento de Agronomia. Programa de Pós-  
Graduação em Agronomia. III. Título.

CDD 21.ed. 630.257158

ECSL-00368

Aos meus pais Airton e Natalina, aos meus irmãos Felipe e Cássio, aos meus avós e ao meu esposo e grande companheiro Cesar, pelo apoio, carinho e confiança de sempre.

**DEDICO.**

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela presença, proteção e amparo nos momentos de esgotamento.

Ao meu Anjo Guardião, pela presença e orações.

Aos meus familiares, que sempre me apoiaram nos estudos e na vida.

À Universidade Estadual de Maringá e ao Programa de Pós Graduação em Agronomia (PGA), pela oportunidade concedida.

Ao Professor Dr. Osvaldo Ferrarese Filho, pela orientação, motivação e confiança para a realização deste trabalho.

Ao Professor Dr. Wanderley Dantas dos Santos, pela orientação, companheirismo e conhecimentos transmitidos.

Ao meu primeiro orientador, que despertou em mim a vontade de seguir a carreira científica, Dr. Carlos Moacir Bonato.

Aos meus amigos e companheiros de laboratório Adriana Gremes Ita Manoel, Hingrid Ariane da Silva, Rita de Cássia Soares e Victor Hugo Salvador, que sempre estiveram ao meu lado em todas as situações, muito obrigada pela amizade, convivência, apoio e incentivo.

Aos funcionários da Universidade Estadual de Maringá, Aparecida Maria Dantas Ramos, Flausina Aparecida Cenerini e Fabiano, pela colaboração e auxílio dispensados.

Ao Rogério Lima, pela colaboração nas análises de monossacarídeos.

Aos meus colegas do Laboratório de Bioquímica Vegetal, que compartilharam comigo todo o caminho percorrido durante esse período.

Aos funcionários da secretaria do PGA, em especial a Érika Sato e Reinaldo Bernardes, pela amizade e apoio dispensados.

Aos professores do Departamento de Agronomia, pela contribuição para a formação.

Ao Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol (CTBE) e à Dra. Maria Teresa Borges Pimenta, pela oportunidade de estágio e concessão das amostras de bagaço de cana.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoas de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de estudo.

## **BIOGRAFIA**

Flavia Carolina Moreira Vilar, filha de Airton José Moreira e Natalina Francisco Moreira, nasceu na cidade de Terra Roxa, Estado do Paraná, no dia 28 de julho de 1987.

Em Março de 2005 iniciou o curso de Agronomia na Universidade Estadual de Maringá. Participou como bolsista do programa de Iniciação Científica (CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) durante a graduação, tendo atuado e desenvolvido atividades no Laboratório de Fisiologia e Homeopatia Vegetal.

Graduou-se em 2009 como Engenheira Agrônoma. Em março de 2010, iniciou o curso de Mestrado em Agronomia, área de concentração Produção Vegetal, na Universidade Estadual de Maringá.

## ÍNDICE

AGRADECIMENTOS .....	iii
BIOGRAFIA.....	v
ÍNDICE.....	vi
RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	ix
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 Aspectos gerais .....	3
2.2 Biossíntese da lignina .....	5
2.3 Parede Celular .....	7
2.4 Métodos de quantificação de lignina .....	10
2.4.1 Método do ácido tioglicólico (TGA).....	11
2.4.2 Método do acetilbromida (AB) .....	13
2.4.3 Método Klason.....	15
3. OBJETIVOS .....	18
4. MATERIAL E MÉTODOS .....	19
4.1 Obtenção dos tecidos .....	19
4.2 Obtenção das amostras de parede celular isenta de proteínas .....	19
4.3 Determinação de lignina pelo método LTGA.....	20
4.4 Determinação de lignina pelo método acetilbromida .....	20
4.5 Determinação de lignina pelo método Klason.....	21
4.6 Caracterização monomérica da lignina.....	23
4.7 Composição monossacarídica da parede celular .....	23
4.8 Análise estatística .....	24
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	25
6. CONCLUSÕES .....	33
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	34

## RESUMO

MOREIRA VILAR, Flavia Carolina, M.S. Universidade Estadual de Maringá, fevereiro de 2012. **Comparação entre diferentes métodos para determinação de lignina em tecidos vegetais.** Professor Orientador: Dr. Osvaldo Ferrarese Filho. Professor Conselheiro: Dr. Wanderley Dantas dos Santos.

A lignina é o segundo polímero mais abundante na natureza. Sua presença proporciona ao tecido vegetal rigidez e resistência, e pode, por exemplo, reduzir o dano causado por enzimas hidrolíticas de fitopatógenos, aumentar a resistência de grãos ao dano mecânico e determinar a viabilidade da produção de etanol celulósico. Graças a estas propriedades, a determinação do conteúdo de lignina tem se tornado progressivamente relevante para a agroindústria. No entanto, os métodos atualmente utilizados para quantificar os teores de lignina muitas vezes apresentam resultados conflitantes para as mesmas amostras. A causa das diferenças notáveis entre os métodos demanda uma investigação das causas que estão distorcendo os resultados. Assim, o objetivo deste trabalho foi investigar as causas das discrepâncias de resultados entre os métodos acetilbromida, ácido tioglicólico e Klason em bagaço de cana-de-açúcar, raízes de plântulas de soja e tegumento de soja por meio da análise de resíduos, quantificação dos monolignóis e monossacarídeos da parede. Os teores de lignina determinados pelos três métodos diferiram entre si ( $p < 0,05$ ), exceto os métodos acetilbromida e Klason no bagaço de cana. O método acetilbromida apresentou as maiores médias, porém, tais resultados devem ser vistos com cautela, uma vez que eles podem estar superestimando os valores, devido a possível formação de furfuranóides e a interferência de compostos aromáticos não extraídos da parede celular. O método ácido tioglicólico apresentou as menores estimativas do teor de lignina. A análise dos resíduos do método tioglicólico indicou possível presença de lignina, principalmente no resíduo insolúvel. O método Klason apresentou resultados intermediários entre os outros métodos estudados, sugerindo uma possível perda de sensibilidade quando aplicado aos materiais com teores menores de lignina. A composição monossacarídica apresentou

resultados diferenciados para as amostras vegetais em análise. A concentração do monossacarídeo xilose possivelmente não explica a discrepância dos resultados, para o tegumento de soja, entre os métodos Klason e acetilbromida. A composição monomérica da lignina aparentemente não se correlaciona com as diferenças encontradas entre os métodos de quantificação de lignina. Os resultados encontrados sugerem que, antes de tirar qualquer conclusão sobre o teor de lignina nos tecidos vegetais e sua influência nas propriedades desejáveis ou indesejáveis da agroindústria, devem-se atentar as particularidades dos métodos de determinação.

Palavras-Chave: ácido tioglicólico, acetilbromida, Klason, monolignóis.

## ABSTRACT

MOREIRA VILAR, Flavia Carolina, M.S. Universidade Estadual de Maringá, february 2012. **Comparison between different lignin determination methods in plant tissues.** Adviser: Dr. Osvaldo Ferrarese Filho. Committee Member: Dr. Wanderley Dantas dos Santos.

Lignin is the second most abundant polymer in nature. Its presence gives the plant tissue stiffness and strength, which can, for example, reduce the damage caused by hydrolytic enzymes of plant pathogens, increase resistance to mechanical damage to the grains and determine the feasibility of cellulosic ethanol production. Because of these properties, the lignin content determination has become increasingly relevant to agroindustry. However, the methods currently used to quantify the lignin often have conflicting results for the same samples. The causes of the striking differences between the methods demand an investigation of the causes that are skewing the results. The aim of this study was to investigate the causes of the discrepancies in lignin determination results between acetyl bromide, thioglycolic acid and Klason methods in cane sugar bagasse, soybean roots and seed coat by means of residual analysis, and quantification of monolignol and monosaccharides of cell wall. The lignin contents determined by three methods differed ( $p < 0.05$ ), except acetyl bromide and Klason methods from bagasse. The acetyl bromide method had the highest averages however such results should be viewed with caution, since they may be overestimating the values, due to possible formation of furfuranes and interference of aromatic compounds from not extracted cell wall. The thioglycolic method showed the lowest lignin content estimates. The analysis of thioglycolic residuals indicated possible presence of lignin, mainly in the insoluble residue. The Klason method presented intermediate results between the other two methods, suggesting a possible loss of method sensitivity when applied to materials with lower lignin contents. The monosaccharide composition showed different results for plant samples analyzed. The xylose monosaccharide concentration may not explain the discrepancy of the results, for seed coat,

between Klason and acetyl bromide methods. The monomeric composition of lignin apparently does not correlate with the differences between the lignin quantification methods. The results suggest that, before drawing any conclusion about the lignin content in plant tissues and its influence in desirable or undesirable properties on agroindustry utilities, it should be aware of the specific determination method.

Key-words: acetylbromide, thioglycolic acid, Klason, monolignol

## 1. INTRODUÇÃO

A lignina é um dos principais componentes da parede celular e da lamela média das células vegetais. É um polímero fenólico altamente ramificado e constituído de alcoóis fenilpropenóides (BOERJAN et al., 2003). Além de desempenhar papel importante na absorção, transporte e secreção de substâncias, a presença da lignina está intimamente ligada à resistência mecânica que, por sua vez, está associada a uma das principais formas de defesa das plantas (BUCHANAN, 2000), bem como ao uso da biomassa como matéria-prima industrial.

A composição da lignina é variável entre as espécies de plantas e tecidos de uma mesma planta e mesmo entre as diferentes camadas da própria parede celular. Atualmente, nenhum método de determinação da lignina é suficientemente informativo *in situ* e a lignina não pode ser extraída da parede celular sem modificações estruturais. A presença de diferentes unidades precursoras e o elevado número de combinações possíveis entre essas unidades fazem com que a estrutura da macromolécula de lignina seja bem mais complexa que a apresentada por outros biopolímeros.

A caracterização de materiais lignocelulósicos deve ser eficiente de modo que os resultados conduzam para a apropriada manipulação da biomassa com as menores perdas possíveis. Para ser empregada com estas e outras finalidades, a lignina precisa ser determinada com elevados graus de precisão. No entanto, os métodos utilizados em laboratório para quantificar os teores de lignina apresentam sérias limitações e, como consequência, apresentam diferentes resultados para as mesmas amostras analisadas.

Os três métodos mais empregados atualmente para mensurar o teor de lignina são: o método acetilbromida (AB) preconizado por Johnson et al. (1961), o método do ácido tioglicólico (TGA) de Browning (1967) e o método Klason desenvolvido por Theander e Weterlund (1986). Embora desenvolvidos para quantificar lignina, estes métodos podem nem sempre refletir o real valor de lignina. Por exemplo, por ser um método direto, AB pode superestimar os valores

caso sejam produzidas ou solubilizadas substâncias não pertencentes ao polímero, mas que absorvam luz no comprimento de onda. O TGA está mais vulnerável a subestimar os valores, devido à especificidade com certo tipo de ligação química da macromolécula lignina. Além disso, por ser um método com muitas etapas, está sujeito a significativas perdas no processo. Em contraste com os outros, o método Klason é de caráter gravimétrico, e se baseia na hidrólise ácida dos componentes da parede celular, exceto a lignina. Deste modo, o conteúdo de lignina pode ser superestimado em função da presença de contaminantes insolúveis, como cutina, proteínas etc.

Resultados conflitantes para as mesmas amostras quando são empregados métodos gravimétricos ou espectrofotométricos demandam uma investigação das causas que os distorcem os resultados. Ainda que sejam relativamente fáceis de serem executados, os métodos AB, TGA e Klason nem sempre fornecem dados seguros sobre o teor de lignina. Assim, os objetivos deste trabalho foram: determinar os teores de lignina em bagaço de cana-de-açúcar, raiz e tegumento de soja, por meio dos métodos AB, TGA e Klason; quantificar o teor de monolignóis; e comparar com os resultados de lignina. O alcance destes objetivos permitirá avaliar as causas das discrepâncias e propor inovações metodológicas adequadas que possibilitem uma análise mais confiável do conteúdo de lignina.

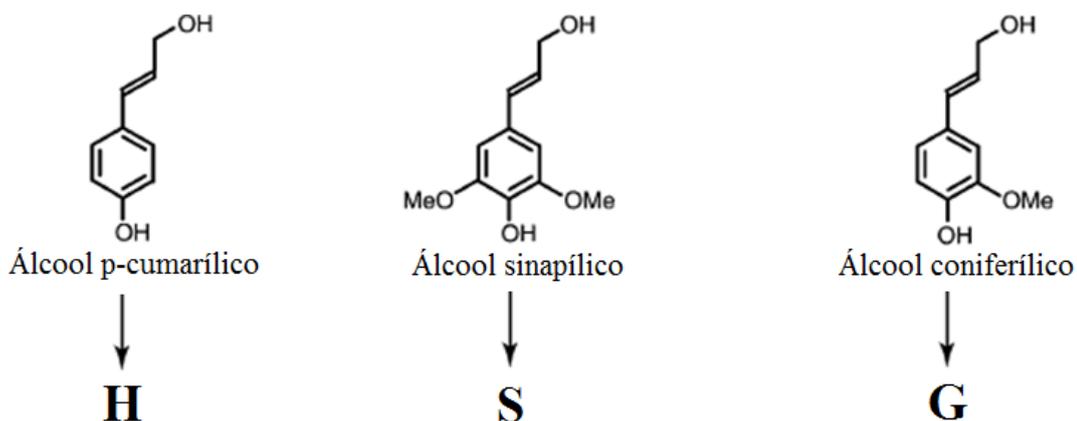
## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Aspectos gerais

Lignina é um dos principais componentes da biomassa vegetal. Depois da celulose, é o polímero mais abundante da biosfera, correspondendo a 30% do carbono orgânico (BOERJAN et al., 2003). Lignina é uma macromolécula aromática e pobremente cristalina, localizada nos espaços intercelulares e na parede celular (FENGEL E WEGNER, 1989). Durante o desenvolvimento das células, ela é incorporada como último componente da parede, interpenetrando as fibrilas, garantindo a integridade estrutural, rigidez e resistência aos tecidos lignificados (VANHOLME et al., 2010).

Do ponto de vista evolucionário, a capacidade de sintetizar lignina permitiu que os vegetais conquistassem o ambiente terrestre, fornecendo rigidez para o caule e redução da transpiração para o ambiente (SARKANEN E LUDWIG, 1971). Por estar em estreita associação com os carboidratos da parede celular, lignina é responsável por fornecer um revestimento protetor da estrutura celulose-hemicelulose, promovendo, assim, forte barreira física contra a entrada de microorganismos (BOUDET, 2007). A arquitetura molecular deste polímero difere segundo a origem botânica dos táxons, entre as células e até mesmo dentro da parede celular, respondendo aos efeitos abióticos e bióticos do ambiente (CAMPBELL E SEDEROFF, 1996; TRONCHET et al., 2010). Além de oferecer suporte mecânico para as plantas, a lignina permite que a água e os sais minerais possam ser transportados através do xilema sob pressão negativa, sem que ocorra o colapso deste tecido (JONES et al., 2001).

Lignina é formada pela desidrogenação enzimática de fenilpropanóides. Os radicais livres formados se estabilizam por polimerização (SALIBA et al., 2001). As principais unidades precursoras, chamadas monolignóis, são os alcoóis *p*-cumarílico, coniferílico e sinapílico (Figura 1).



**Figura 1.** Precursores primários da lignina. H: monômero *p*-hidroxifenil; S: monômero siringil; G: monômero guaiacil.

Uma vez polimerizados, os resíduos derivados de cada um destes precursores são denominados de *p*-hidroxifenil (H), guaiacil (G) e siringil (S), respectivamente (FREUDENBERG E NEISHI, 1968). Desta forma, é possível classificar ligninas segundo a presença dessas unidades. Ligninas de angiospermas são formadas principalmente de unidade G e S; ligninas gimnospermas são fundamentalmente compostas de unidades G; e ligninas de gramíneas apresentam quantidades equivalentes de G-S-H (BOERJAN et al., 2003). No entanto, muitos outros fenilpropenóides são incorporados na macromolécula além dos três principais monolignóis (H, G, S) (VANHOLME et al., 2008, RALPH et al., 2004). Algumas unidades, como as derivadas do sinapaldeído, podem corresponder até 85% de todas as unidades S no polímero (MATÍNEZ et al., 2008).

Os termos “*core*” e “*não core*” têm sido utilizados para diferenciar tipos de lignina (JUNG & DEETZ, 1993; LAPIERRE; 1993). A lignina *core* corresponde aos polímeros fenilpropenóides da parede celular que são altamente condensados e muito resistentes à degradação. Eles são compostos de unidades H, G e S, em proporções diferentes de acordo com sua origem. A lignina *não core* é representada pelos compostos de baixo peso molecular liberados da parede por hidrólise, representados pelos ácidos *p*-cumárico, ferúlico e seus oligômeros. Estes ácidos fenólicos podem estar ligados à lignina *core*, aos polissacarídeos da parede ou a ambos, concomitantemente (JUNG, 1989). A lignina pode estar ligada a hemicelulose através da xilose e arabinose (JUNG & VOGEL, 1992).

No entanto, não há evidência de ligação covalente entre a lignina e a celulose (CHESSON & FORSBERG, 1988).

A avaliação *in situ* da lignina *core* é normalmente feita através do extrato livre de parede celular, o qual pode ser obtido após extração prévia de componentes solúveis com solventes orgânicos. Isto é importante para minimizar os problemas de interferência entre a lignina *core* e outros fenólicos solúveis (MORAIS et al., 1991).

Estudos bioquímicos da lignina têm atraído a atenção de inúmeros pesquisadores. Sua remoção dos tecidos é o foco principal nas indústrias de papel e celulose. Já, na nutrição animal, os teores de lignina estão intimamente associados à qualidade nutritiva das forragens. Atualmente, investigações têm sido dedicadas à remoção da lignina visando melhorar a produção de biocombustível a partir da celulose (LI et al., 2008).

## 2.2 Biossíntese da lignina

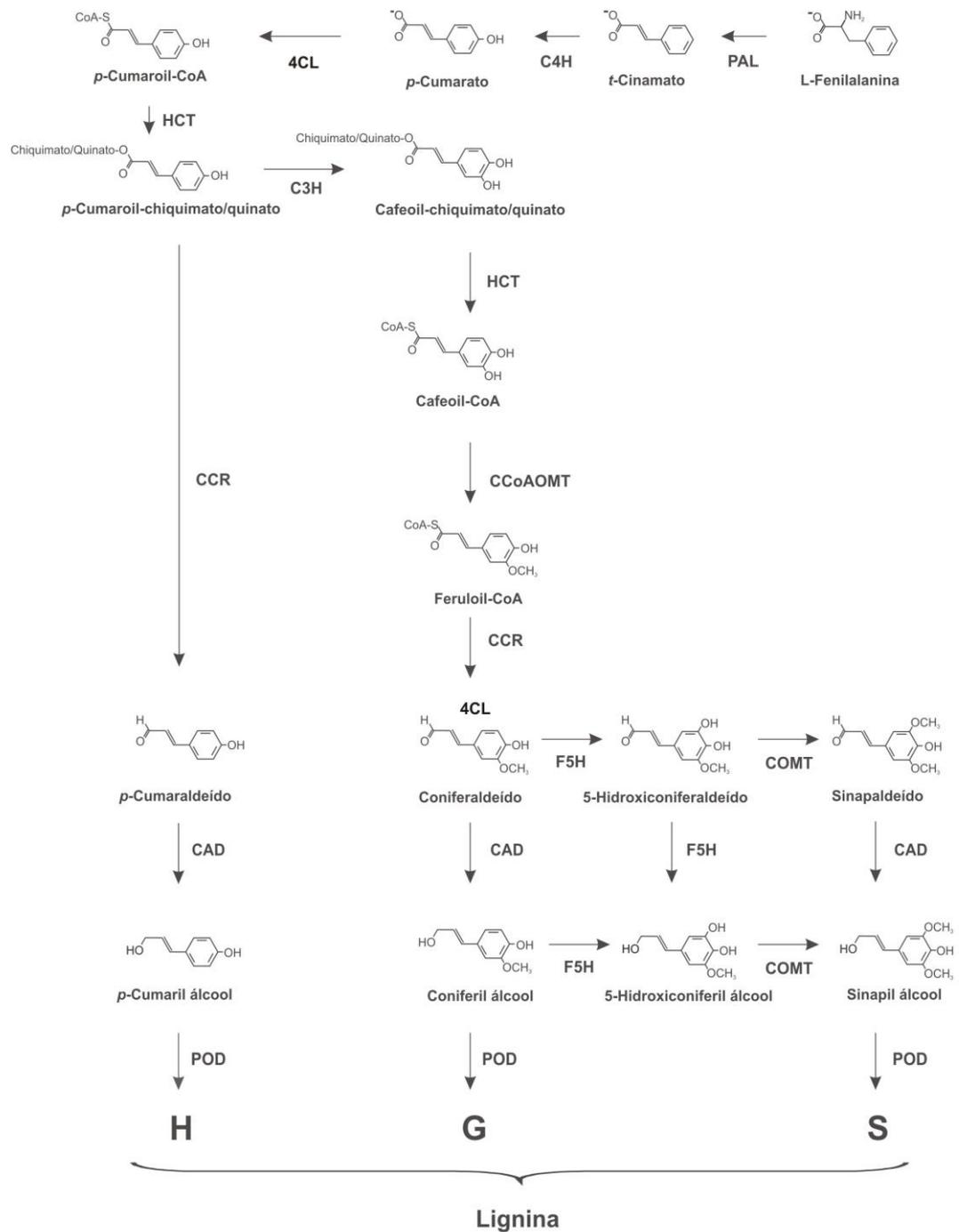
A via dos fenilpropenóides (Figura 2) produz os monolignóis H, G e S. Esta via inicia-se com a deaminação da fenilalanina formando o ácido *t*-cinâmico que, apesar de não ser um composto fenólico, é o precursor imediato dos monolignóis (ANTEROLA et al., 2002). Esta reação é catalisada pela enzima fenilalanina amônia liase (PAL) que desempenha um papel fundamental na regulação do metabolismo fenólico nas células vegetais. As gramíneas são as únicas espécies vegetais que conseguem converter a L-tirosina, outro aminoácido aromático, em ácido *t*-coumárico, em uma reação catalisada pela enzima tirosina amônia liase (TAL) (HIGUCHI et al., 1967). Portanto, as gramíneas podem utilizar qualquer dos dois aminoácidos para gerar a lignina.

O ácido *t*-cinâmico é hidroxilado no carbono 4 do anel aromático pela enzima cinamato 4-hidroxilase (C4H). O ácido *p*-cumárico é então esterificado à coenzima A pela ação da 4-coenzima A ligase (4CL). Após sofrer transesterificação com o ácido chiquímico, o ácido *p*-cumárico é hidroxilado no carbono 3 do anel aromático para formar o cafeoil ester. A hidroxila no carbono

3 é então metoxilada para gerar o resíduo feruloil que é novamente transferido com a coenzima A. O próximo passo é a redução dos produtos ligados a CoA para sua forma aldeídica. O coniferaldeído livre pode seguir duas rotas ou ser conduzido ao álcool correspondente através da cinamil álcool desidrogenase (CAD), ou passar por nova rodada de hidroxilação e metoxilação, agora no carbono 5, para então dar origem ao aldeído sinapílico. Este, por sua vez é reduzido ao álcool correspondente, gerando o álcool sinapílico (BUCHANAN et al., 2000).

Logo após a biossíntese, os monolignóis são transportados do citosol para a parede celular, por um mecanismo que não está totalmente elucidado (VANHOLME et al., 2010). Existem duas hipóteses para o transporte dos precursores da lignina. A primeira consiste no transporte de monolignóis através da membrana plasmática por meio de suas formas glicosiladas. Já, na segunda hipótese, os monolignóis seriam transportados por meio de vesículas derivadas do complexo de Golgi. Atualmente, não há provas suficientes que suportem um dos dois modelos de transporte (VANHOLME et al., 2010). Todavia, os alcoóis coniferil e sinapil parecem ser capazes de difundirem-se através da membrana plasmática, sem o auxílio de transportadores (BOIJA e JOHANSSON, 2006).

O passo final na biossíntese da macromolécula lignina é a polimerização via oxidação enzimática dos monômeros a radicais fenólicos, seguido de acoplamento aleatório dos radicais. A desidrogenação é promovida por peroxidases, enquanto a polimerização é espontânea, gerando ligações complexas entre os radicais, as proteínas e os polissacarídeos da parede celular (POLLE et al., 1994). A elevada heterogeneidade das ligações entre as subunidades de lignina e os constituintes da parede, torna difícil caracterizá-la e purificá-la (CARPITA et al., 1993). Altamente hidrofóbica, a lignina não é extraída dos tecidos das plantas com solventes aquosos ou inorgânicos. Conseqüentemente, muito do conhecimento sobre sua estrutura tem origem nas análises dos produtos de sua degradação química.



**Figura 2.** Via dos fenilpropenóides e dos monolignóis. A rota segue em direção à produção de monolignóis e ocorre favoravelmente nas angiospermas.

### 2.3 Parede Celular

Nas análises de isolamento e quantificação da lignina utiliza-se uma preparação de parede celular, que deve satisfazer no mínimo as duas condições

básicas: estar livre de proteínas e de compostos aromáticos não pertencentes ao polímero. No entanto, a composição e as propriedades da parede celular podem variar consideravelmente entre as espécies, com o tipo de tecido e com a idade da planta. Assim, torna-se necessário compreender a base estrutural da parede celular dos tecidos em análise.

A parede celular é o principal componente estrutural das células vegetais, as quais envolvem e dão forma ao protoplasto. É composta principalmente de celulose, hemiceluloses, pectinas, proteínas e lignina. São estruturas muito complexas que possuem grande diversidade de funções, dentre elas: manter a morfologia das células, controlar a expansão celular e o transporte intercelular, proteger contra a maioria de organismos potencialmente patogênicos e contribuir, em alguns casos, como reserva alimentar (BUCHANAN et al., 2000).

A célula vegetal apresenta parede primária e secundária e uma lamela média, rica em pectato de cálcio. A parede celular primária é formada durante a divisão celular e pode rapidamente aumentar em área superficial durante a expansão celular. A parede secundária forma-se após cessar o crescimento celular, e se caracteriza pela alta concentração de lignina que confere rigidez as células, impedindo, assim, o crescimento vegetal (TAIS & ZEIGER, 2006). A lamela média, por sua vez, forma a interface entre as paredes primárias das células vizinhas.

Segundo o modelo clássico, a parede celular primária é constituída por duas fases, a microfibrilar e a matricial. A fase microfibrilar é composta por estruturas longas e finas designadas microfibrilas, constituídas por moléculas de celulose associadas entre si por pontes de hidrogênio e alinhadas paralelamente ao longo das microfibrilas. A fase matricial consiste numa variedade de polissacarídeos, glicoproteínas e compostos fenólicos, variando a sua composição com as diferentes camadas da parede, tipos de células e diferentes fases do ciclo celular. Atualmente o modelo descontínuo da parede celular é o mais utilizado no estudo deste componente estrutural. Este modelo consiste de três domínios independentes: pectinas, celulose-hemicelulose e proteínas que

coexistem independentemente, ou seja, sem ligações químicas covalentes, mas por interações fracas, como as pontes hidrogênio.

A arquitetura da parede celular primária pode ser classificada em Tipo I e Tipo II, que além de variarem na composição química, podem diferenciar táxons vegetais garantindo a eles características intrínsecas (CARPITA e GIBEAUT, 1993). A parede celular Tipo I está presente em grande parte das dicotiledôneas. O domínio celulose-hemicelulose é composto por xiloglucanos com diferentes tipos de ramificações que lhe conferem diferentes níveis de adesão às microfibrilas. Os xiloglucanos ocorrem em locais distintos da parede, ligando-se a glucanas expostas das fibras de celulose, posicionando-as entre si. A rede xiloglucano e celulose encontram-se embebidas na matriz da fração pectica, que conferirá, entre outras propriedades, maior porosidade a parede celular destes vegetais (BUCHANAN et al., 2000; NICK CARPITA e DAVID GIBEAUT, 1993).

Segundo CARPITA & GIBEAUT (1993), as gramíneas e os cereais apresentam parede do Tipo II. Neste grupo, os glucuronoarabinoxilanos (GAXs) constituem a hemicelulose principal, apresentando ligações com ácidos ferúlicos que interagem com as microfibrilas de celulose, formando o domínio celulose-hemicelulose da parede celular (BUCKERIDGE et al., 2004). Esses polissacarídeos são constituídos por uma cadeia carbônica principal de resíduos de xilose  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) com ramificações de arabinose e de ácido glucurônico. Os GAXs, em conjunto com a celulose e os  $\beta$ -glucanos, constituem o arcabouço das paredes celulares das gramíneas, formando parte do esqueleto da parede, o qual mantém a integridade do tecido (FINCHER & STONE 1986).

A camada de aleurona da maioria dos cereais é composta predominantemente de GAXs (60-70%), com exceção de cevada (20%) e arroz (40%) (IZYDORCZYR, 1995).

Paredes do Tipo II são pobres em pectinas, mas adicionalmente contribuem com a densidade de carga da parede. Além disso, essas paredes apresentam poucas proteínas estruturais comparadas com as do Tipo I, no entanto

podem ter fortes interligações com os fenilpropenóides, particularmente naquelas células cujo crescimento cessou.

Para muitas células, a diferenciação está associada à formação de uma parede celular secundária, junto à membrana plasmática, ao lado da parede primária logo após o alongamento celular. As paredes secundárias podem conter três camadas distintas, S1, S2 e S3, que diferem em espessura, orientação de microfibrilas e composição. A camada exterior (S1) e a interior (S3) possuem microfibrilas orientadas de maneira transversal e a camada intermediária (S2) é mais espessa que as outras duas e apresenta microfibrilas orientadas longitudinalmente em relação ao comprimento da celular. Esta orientação proporciona à célula grande resistência à tensão e à compressão (FENGEL e WAGENER, 1984). A presença de lignina na parede secundária é um dos elementos que mais distinguem as paredes celulares secundárias das primárias.

## **2.4 Métodos de quantificação de lignina**

A determinação quantitativa da lignina é utilizada frequentemente para caracterizar materiais lignocelulósicos. A quantificação da lignina é uma tarefa especialmente difícil, que se deve não somente por causa da variação na sua composição monomérica, mas também por causa das ligações covalentes que ela realiza entre carboidratos, proteínas e outros compostos fenólicos. Estes compostos podem interferir na determinação da lignina superestimando ou subestimando os valores (BRINKMANN et al., 2002).

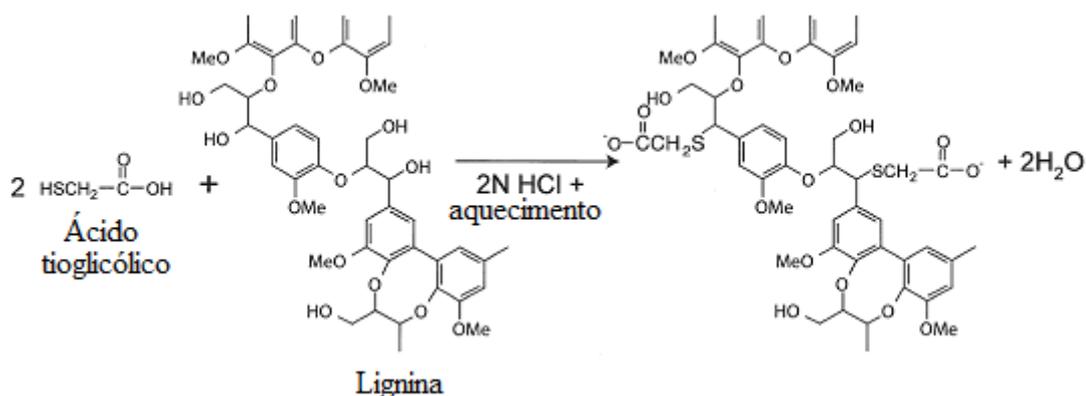
A composição da lignina pode variar com a camada da parede celular onde se deposita, com o tipo de parede e com a espécie, tornando necessário considerar caso a caso a eficácia e as limitações dos procedimentos analíticos empregados (ANTEROLA et al., 2002). As principais abordagens analíticas para a determinação da lignina podem ser divididas em métodos gravimétricos e não-gravimétricos (GIGER 1985). O primeiro grupo inclui o método da lignina solúvel em solução a 72% de ácido sulfúrico – também conhecido por lignina ácida ou lignina Klason (ELLIS et al., 1946); oxidação pelo permanganato de

potássio (VAN SOEST e WINE, 1968) e oxidação da lignina pelo clorito de sódio (COLLINGS et al., 1978). Os métodos não-gravimétricos incluem aqueles baseados nas propriedades ópticas da lignina como a técnica da lignina solúvel em brometo de acetila (JOHSON et al., 1961; MORRISON, 1972b) o método do ácido tioglicólico (TGA), os métodos citotóxicos como o floroglucinol e a coloração de Maule, além da espectroscopia dos raios infravermelhos. As principais análises empregadas atualmente para quantificar a lignina são ácido tioglicólico, acetilbromida e Klason.

#### ***2.4.1 Método do ácido tioglicólico (TGA)***

Os primeiros trabalhos de determinação de lignina têm sua origem na Engenharia Florestal. A quantificação deste polímero é importante para a análise da madeira, bem como para a caracterização de polpas celulósicas. Sua remoção é o principal objetivo dos processos de obtenção de polpa celulósica e branqueamento (FENGEL e WEGNER 1989). Assim, em 1967, B. L. Browning utilizou o TGA para desenvolver uma técnica de determinação do conteúdo de lignina em madeiras.

Este procedimento baseia-se na derivatização da lignina pelo ácido tioglicólico, promovendo o deslocamento das ligações covalentes da lignina com a parede celular (Figura 3). O resultado desta reação é a formação de tioéteres de grupos álcool benzil, também conhecidos como complexo ácido lignotioglicólico (LTGA) que são solúveis em condições alcalinas devido à presença dos grupos ácidos (HATFIELD e FUKUSHIMA, 2005). A acidificação do extrato alcalino precipita o LTGA. Depois de ressolubilizado, o LTGA pode ser determinado quantitativamente pela medição da absorbância a 280 nm.



**Figura 3.** Mecanismo de derivatização da lignina pelo ácido tioglicólico. (Adaptado de HATFIELD e FUKUSHIMA 2005).

No procedimento original do TGA, as amostras de parede celular (40 g) eram tratadas com 30 mL de ácido tioglicólico e 400 mL de HCl 2M, sendo aquecido por 7 horas a 100° C (BROWNING, 1967). Logo após, o material era filtrado e o resíduo insolúvel, lavado com água antes de ser colocado para secar. O material seco era colocado em etanol por 48 horas. Subsequentemente as amostras eram homogeneizadas com 400 mL de NaOH 0,5 M por uma noite. O ácido lignotioglicólico era, então, dissolvido em solução alcalina e separado do remanescente de parede celular por filtração. O filtrado era acidificado com HCl concentrado para precipitar a lignina. O LTGA era recuperado por filtração e lavagem com água para retirar os resíduos de ácido.

Esta técnica de análise de lignina foi várias vezes modificadas para permitir sua aplicação em outros tipos de amostras vegetais, como as plantas herbáceas não lenhosas (BRUCE e WEST, 1989; DEAN, 1997; SUZUKI et al., 2009). As principais adaptações constituíram-se na diminuição da massa das amostras e no tempo de reação e a substituição da filtragem por centrifugação. Atualmente, o TGA pode ser utilizado para quantificar e isolar lignina de espécies como *Glycine max*, *Nicotiana tabacum* e *Oriza sativa* (CAPELETI et al., 2005; dos SANTOS et al., 2008; BRINKMANN et al, 2002; SUZUKI et al., 2009).

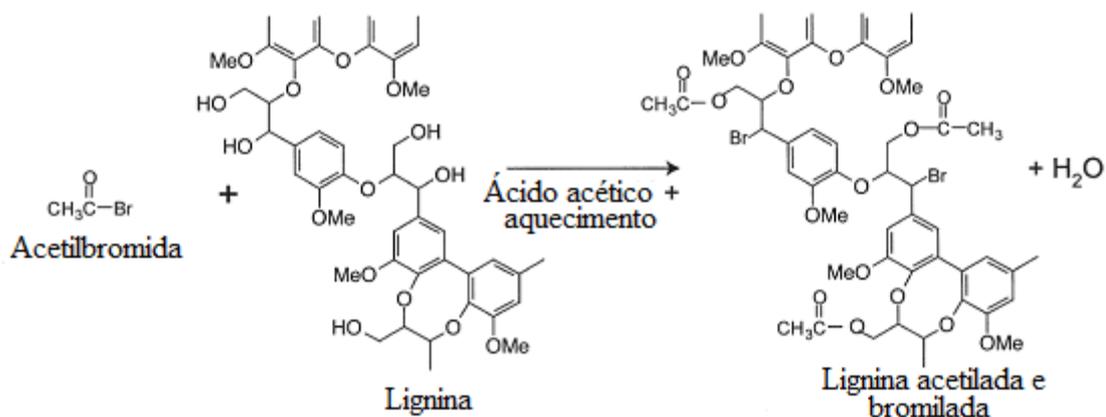
Segundo FREUDENBERG e NEISH (1968), a formação de derivados de tiolignoglicolato é considerada um critério para a lignina “genuína”. Estes mesmos autores afirmam que o método do ácido tioglicólico exclui os compostos

fenólicos que não pertencem ao polímero, além de excluir também os polissacarídeos. Entretanto, o ácido reage especificamente com as ligações tipo éter das ligninas, que fazem as ligações dos monômeros com as unidades propenóides. Devido a esta especificidade, este procedimento pode subestimar a concentração total de lignina (BRINKMANN et al, 2002). Além disso, é possível a formação de ligninas solúveis em ácido que podem permanecer em solução (HATFIELD e FUKUSHIMA 2005).

#### **2.4.2 Método do acetilbromida (AB)**

O método do acetilbromida pode ser considerado rápido, de fácil execução, apropriado para pequenas massas de amostras e ser utilizado rotineiramente para determinar lignina em amostras vegetais (FUKUSHIMA e KERLEY 2011). A técnica dispensa a correção com a lignina solúvel em ácido, fornecendo valores de absorvância precisos para estimar a lignina total, além de sofrer menor interferência de compostos não pertencentes ao polímero (DENCE 1992).

MORRISON (1972a) propôs o método do acetilbromida para quantificar lignina em plantas forrageiras, baseando-se no trabalho de JOHSON et al. (1961). Pelo isolamento de uma preparação de parede celular bruta, os compostos fenólicos solúveis, que interferem com as leituras no ultravioleta, são removidos, e permanece apenas a lignina, como único composto aromático. A amostra de parede celular é então solubilizada em uma solução a 25% de brometo de acetila em ácido acético glacial. Esta reação resulta na formação de grupos acetil substituindo as hidroxilas dentro do polímero, e a substituição dos grupos OH no carbono  $\alpha$  pelo bromo (Figura 4), tornando a molécula de lignina solúvel em ácido acético (HATFIELD e FUKUSHIMA, 2005).



**Figura 4.** Mecanismo de reação para a acetilderivatização da lignina pelo reagente brometo de acetila (Adaptado de HATFIELD e FUKUSHIMA 2005).

A preparação da parede celular, utilizada nos métodos de quantificação e isolamento da lignina, deve ser eficiente na remoção dos compostos que não pertencem ao polímero lignina e que absorvem nos comprimentos de onda correspondentes ao UV para que, ao final do processo, a verdadeira leitura da absorbância não seja ocultada por esses interferentes. A maior parte das proteínas deve ser removida nesta etapa. Na solução brometo de acetila/ácido acético, as proteínas remanescentes são insolúveis (MORRINSON, 1972a). Entretanto, se essas não forem isoladas pela centrifugação ou filtração após a reação, a solução ácida contendo lignina ficará turva e a leitura no espectrofotômetro será prejudicada. IYAMA e WALLIS (1988) questionaram a respeito da completa solubilização da parede celular no método brometo de acetila e estabeleceram o uso do ácido perclórico na reação original. Entretanto, o ácido perclórico acelera a degradação de xilanas à furfuranóides (furfural e hidroximetilfurfural), que absorvem na região de 280 nm (HATFIELD et al., 1999). Esta característica é única para as xilanas, sendo que os outros polissacarídeos da parede não apresentam a mesma amplitude de degradação (HATFIELD et al., 1999).

Os métodos espectrofotométricos de determinação de lignina pressupõem a existência de um padrão de referência com o qual as leituras de absorbância possam ser comparadas (FENGEL & WEGENER, 1984). FUKUSHIMA & DEHORITY (2000) apresentaram para o método AB o padrão de lignina extraída pelo próprio reagente brometo de acetila. Entretanto, uma nova forma de lignina

extraída da planta por uma solução ácida de dioxana mostrou-se mais eficiente que a lignina brometo de acetila (FUKUSHIMA & HARTFIELD, 2001).

### ***2.4.3 Método Klason***

O método Klason consiste na digestão parcial do material vegetal em ácido sulfúrico 72% onde todos os polissacarídeos da parede são dissolvidos, deixando a lignina como único resíduo insolúvel. Este resíduo é denominado de lignina Klason (BROWNING, 1967).

O procedimento de hidrólise ácida pode ser separado em duas etapas. Na primeira, também conhecida com pré-hidrólise, a amostra de parede celular é tratada com o  $H_2SO_4$  72%, à temperatura ambiente. Na segunda etapa, ocorre uma diluição do ácido a aproximadamente 3% seguido de aquecimento até completa hidrólise. Várias modificações têm sido propostas ao longo dos anos para aumentar a eficácia da técnica, como o uso de autoclave para acelerar o processo de hidrólise (YOSHIHARA et al., 1984), determinação de carboidratos totais (PETTERSEN et al., 1984) e composição de açúcares (HATFIELD et al., 1994).

O procedimento da lignina Klason foi inicialmente desenvolvido para uso em espécies pertencentes ao grupo das gimnospermas. Esta técnica pode incluir uma variedade de componentes que não pertencem à lignina, como polímeros de aldeído fenol, taninos, polímeros de Maillard, cutina e proteína (GOERING & VAN SOEST, 1970). A determinação da lignina em vegetais não lenhosos apresenta sérios problemas, mais precisamente por causa da alta concentração de proteínas e frequente aparecimento de ceras, quando materiais folhosos são analisados (HATFIELD e FUKUSHIMA 2005). O tratamento das amostras com enzimas proteolíticas ajudariam a remover este material proteínico. Entretanto, o processo não é completamente eficiente (SULLIVAN, 1959). A remoção das proteínas é essencial porque, se isso não ocorrer, elas serão mensuradas como lignina (SANTANA e CAVALI et al., 2006).

VAN SOEST (1963) empregou a solução de detergente ácido para obter uma preparação lignocelulósica isenta de proteínas, denominada de fibra em detergente ácido (FDA), com o objetivo de tratá-la com ácido sulfúrico 72%, ao qual o autor denominou de lignina detergente ácido. No entanto, o nitrogênio não foi completamente removido e traços de proteínas continuariam a ser mensurados como lignina. Outra maneira para contornar esta interferência seria a mensuração do conteúdo proteico e realização das devidas correções (THOMAS & ARMSTRONG, 1949).

Talvez o maior problema do procedimento da lignina ácida seja que considerável fração da lignina é solúvel ao ácido sulfúrico (MIGITA e KAWAMURA, 1944). No trabalho realizado com lignina radioativamente marcada, CRAWFORD et al. (1980) observaram altos teores de fenóis marcados, os quais são eliminados no efluente líquido após o tratamento ácido. Aparentemente, os monômeros incorporados na periferia da molécula são mais suscetíveis à hidrólise ácida do que o núcleo da lignina (SARKANEN e LUDWIG, 1971). Para solucionar este problema, foi desenvolvido um protocolo padrão para mensurar a lignina solúvel descrita na Norma TAPPI Useful Method UM-250. Este protocolo baseia-se em determinar a absorvância da solução ácida em 200 e 205 nm e calcular a concentração final de lignina com um único coeficiente de extinção. Contudo, HATFIELD e FUKUSHIMA (2005) apontaram dois problemas neste protocolo. O primeiro é a respeito do coeficiente de extinção, onde o mesmo valor é utilizado para todas as amostras vegetais mesmo sabendo que o coeficiente pode variar com o tipo de lignina em estudo. O segundo ponto é o comprimento de onda utilizado para se fazer as leituras. A 280 nm é possível a interferência dos furfuranóides, que são formados durante o processo de hidrólise ácida e absorvem fortemente naquele comprimento de onda. Por outro lado, comprimentos de onda próximos a 210 nm correspondem ao espectro de absorção de diversos carboidratos.

Atualmente, uma modificação do método Klason, proposto por GOUVEIA et al. (2009), parece quantificar a lignina de forma mais precisa, desde que a preparação da parede celular remova as proteínas e demais

interferentes. A modificação consiste em analisar separadamente as frações solúveis e insolúveis geradas com a hidrólise ácida, descontando os furfurenóides na lignina solúvel e as cinzas na lignina Klason. Como pode ser notado, os métodos de análise de lignina são bastante complexos e exigem estudos aprofundados.

### 3. OBJETIVOS

A grande diversidade de compostos envolvidos na formação da lignina torna sua determinação uma tarefa especialmente difícil. A causa das diferenças notáveis entre os resultados das determinações feitas pelos atuais métodos ainda não está bem elucidada. Assim, o objetivo geral deste trabalho foi investigar as causas das discrepâncias entre os seguintes métodos de determinação de lignina: (1) ácido tioglicólico; (2) acetilbromida; e (3) Klason, no bagaço de cana-de-açúcar, em raízes de plântulas de soja e no tegumento das sementes de soja. Os objetivos específicos foram:

1. Analisar os resíduos dos métodos que apresentarem os menores valores de lignina;
2. Determinar o conteúdo de monolignóis e monossacarídeos dos diferentes tecidos e compará-los com os métodos de quantificação de lignina.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Obtenção dos tecidos**

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Bioquímica Vegetal, da Universidade Estadual de Maringá, PR.

As sementes de soja, cultivar BRS 232, foram imersas em água por 12 horas. Após esse período, os tegumentos foram retirados das sementes e colocados para secar em estufa a 60 °C até peso constante. O material foi resfriado em dessecador à vácuo e, em seguida, triturados e pesados, para então serem avaliadas quanto ao teor de lignina.

Para a obtenção de plântulas de soja, as sementes foram desinfestadas em hipoclorito de sódio (2%) durante cinco minutos e lavadas em água destilada. Logo após, as sementes foram distribuídas em papel tipo Germitest previamente umedecido com água destilada, em uma quantidade aproximada de três vezes a sua massa. Os rolos confeccionados foram acondicionados em recipientes plásticos e levados para câmara de germinação a 25 °C na ausência de luz, por um período de três dias.

O bagaço de cana-de-açúcar foi obtido junto ao Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol (CTBE), Campinas – São Paulo.

### **4.2 Obtenção das amostras de parede celular isenta de proteínas**

As biomassas secas dos diferentes tecidos (0,3 g) foram homogeneizadas em 7 mL de tampão fosfato de sódio e potássio (50 mM, pH 7,0) e transferido para tubos de centrífuga de 15 mL (FERRARESE et al., 2002). O precipitado foi centrifugado (1.400g, 5 min) sucessivamente como segue: mais 2 vezes com 7 mL de tampão fosfato (50 mM, pH 7,0); 3 vezes com 1% (v/v) Triton<sup>®</sup> em tampão fosfato pH 7,0 (7 mL); 2 vezes com 1 M NaCl em tampão pH 7,0 (7 mL); 2 vezes com água destilada (7 mL) e 2 vezes com acetona (5 mL). O precipitado

foi seco em estufa (60 °C, 24 horas) e resfriado em dessecador a vácuo. A massa seca foi definida como a fração da parede celular livre de proteínas.

#### **4.3 Determinação de lignina pelo método LTGA**

As amostras de parede celular, isentas de proteína, das raízes, dos tegumentos, ou do bagaço de cana-de-açúcar, foram acondicionadas em tubos de vidro, juntamente com a mistura reativa de ácido tioglicólico (1,2 mL) e 2 M HCl (6 mL), sendo aquecido por 4 horas a 95°C, em banho-maria. Após resfriamento a temperatura ambiente, as amostras foram centrifugadas (1.500g, 5 min) e o sobrenadante descartado. Os precipitados continham o complexo ácido lignotioglicólico (LTGA). Os precipitados foram lavados três vezes com água destilada e o LTGA foi extraído por agitação (115 oscilações min<sup>-1</sup>, 30 °C, por 18 horas,) em 0,5 M NaOH (6 mL). A mistura resultante foi centrifugada a 1.500g, durante 5 minutos, e o sobrenadante estocado. O precipitado obtido anteriormente foi lavado novamente com 0,5 M NaOH (3 mL), centrifugado e o sobrenadante adicionado ao anterior. Os extratos alcalinos combinados foram acidificados com HCl (1,8 mL) concentrado. Após precipitação (4 °C, *overnight*) o LTGA foi recuperado por centrifugação (1.500g, 5 minutos) e lavado 2 vezes com água destilada (7 mL). O precipitado foi seco a 60 °C, dissolvido em 0,5 M NaOH e diluído para produzir absorvância apropriada para determinação espectrofotométrica a 280 nm. A concentração de lignina foi determinada de acordo com uma curva padrão e foi expressa em mg lignina g<sup>-1</sup> de parede celular.

#### **4.4 Determinação de lignina pelo método acetilbromida**

As amostras (20 mg) de parede celular, isenta de proteínas, foram acondicionados em tubos de vidro com rosca. Em seguida, foi adicionado 0,5 mL do reagente acetilbromida 25% (preparado em ácido acético gelado). Os frascos foram aquecidos por 30 minutos em banho-maria a 70 °C. Após este

procedimento, as amostras foram resfriadas em banho de gelo e a reação foi interrompida com a adição de 0,9 mL de NaOH 2M. A seguir, foram adicionados 0,1 mL de hidroxilamina-HCl, 5 M e 2 mL de ácido acético gelado. As amostras foram centrifugadas (1.000g, 5 minutos) e o sobrenadante diluído e utilizado para a realização das leituras em espectrofotômetro a 280 nm. A concentração de lignina foi determinada de acordo com uma curva padrão e foi expressa em mg lignina g<sup>-1</sup> de parede celular.

#### **4.5 Determinação de lignina pelo método Klason**

Amostras de 1.000 mg de parede celular dos diferentes tecidos foram colocadas em béqueres de 100 mL e tratadas com 10 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 72% v/v, sob vigorosa agitação, em banho termostatizado (45 °C, 7 minutos). Logo após, as amostras foram transferidas quantitativamente para frascos erlenmeyers de 500 mL, adicionando-se 275 mL de água destilada. Os erlenmeyers foram fechados com papel alumínio e autoclavados por 30 minutos a 121°C. Após a decompressão da autoclave, os frascos foram retirados e resfriados à temperatura ambiente, sendo a fração sólida separada da fração líquida por filtração em papel de filtro qualitativo.

O material retido no papel de filtro foi lavado com água destilada para a remoção do ácido remanescente e, posteriormente, acondicionado em estufa a 100 °C por 24 horas. A percentagem de lignina insolúvel foi calculada em relação à massa de amostra de parede celular seca conforme a equação:

$$\text{(mg g parede)}K = [(I - C) / P] * 1000$$

Onde: K – Lignina Klason insolúvel em mg de lignina g<sup>-1</sup> parede; I – massa de lignina insolúvel seca; C – massa de cinzas; P – massa da amostra de parede celular seca.

A quantidade de lignina solúvel foi determinada através da medida de absorvância a 215 e 280 nm. O cálculo da lignina solúvel foi determinado conforme a equação:

$${}_{(g L^{-1})} S = (4,53 A_{215} - A_{280}) / 300$$

A equação é resultante da resolução simultânea de duas equações:

$$A_{280} = 0,68 F + 18 S$$

$$A_{215} = 0,15 F + 70 S$$

Onde,  $A_{280}$  = valores de absorvância da solução a 280 nm;

$A_{215}$  = valores de absorvância da solução a 215 nm;

F = concentração dos furfurenóides ( $g L^{-1}$ );

S = concentração da lignina solúvel ( $g L^{-1}$ ).

Os valores 0,68 e 0,15 são as absorvidades molares dos furfurenóides em 280 e 215 nm, respectivamente, e os valores 18 e 70 são absorvidades molares da lignina solúvel em 280 e 215 nm, respectivamente (GOLSCHIMDT, 1971).

Após a determinação da lignina insolúvel, a mesma, juntamente com o papel de filtro, foi transferida para um cadinho de porcelana, previamente tarado. A amostra foi calcinada em mufla a 550 °C por 4 horas. Por diferença de massa, o teor de cinzas da lignina insolúvel foi determinado conforme a equação:

$${}_{(mg)} C = (M/P)$$

Onde: mg cinzas – quantidade de cinzas, em mg; M – massa de cinzas (diferença entre a massa do cadinho com cinzas e a massa do cadinho vazio); P – massa da amostra de parede celular seca.

O teor de lignina total foi determinado pelo somatório dos teores de lignina insolúvel e solúvel expressos em mg lignina  $g^{-1}$  parede.

#### 4.6 Caracterização monomérica da lignina

Para determinar a composição monomérica da lignina, foi usada a oxidação com nitrobenzeno (DEAN, 1997). Uma fração da parede celular livre de proteínas (50 mg) foi colocada em uma ampola Pyrex<sup>®</sup> contendo 1 mL de NaOH 2 M e 100 µL de nitrobenzeno. A ampola foi selada e aquecida a 170°C por 2,5 h, com agitação na metade do tempo de reação. Após oxidação, a amostra foi resfriada, lavada duas vezes com clorofórmio, acidificada HCl 5 M e extraída duas vezes com clorofórmio. Os extratos orgânicos foram combinados, secos e ressuspendidos em metanol. Todas as amostras foram filtradas em filtro de 0,45 µm e analisadas por HPLC, como descrito anteriormente. A fase móvel foi metanol/ácido acético 4% em água (20/80, v/v), com fluxo de 1,2 mL min<sup>-1</sup> para análise isocrática de 20 min. As quantificações de *p*-hidroxibenzaldeído, vanilina e siringaldeído foram realizadas a 290 nm utilizando os padrões correspondentes. Os resultados foram expressos como mg do monômero g<sup>-1</sup> de parede celular.

#### 4.7 Composição monossacarídica da parede celular

As amostras de parede celular foram solubilizadas e parcialmente hidrolisadas com 72% (v/v) H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> por 2 h a 0-4 °C, diluídas a 8% e mantidas a 100 °C por 8 h. O hidrolisado foi neutralizado com BaCO<sub>3</sub> e o material insolúvel removido por filtração. A amostra foi evaporada e seca em centrífuga a vácuo (Savant). Logo após, o material foi dissolvido em água (0,5 mL) e o produto foi reduzido com NaBH<sub>4</sub> (16 h a 25 °C), tratado com ácido acético e levado para secar. Foi adicionado metanol (1 mL, três vezes) sendo esta mistura novamente levada para secar. O resíduo foi acetilado com ácido anidro acético (30 min a 100° C) (VINOGRADOV; WASSER, 2005).

Os acetatos de alditol foram analisados por cromatografia líquido-gasosa (GLC). As análises foram efetuadas em cromatógrafo gasoso Hewlett–Packard, modelo 5890 S II, com detector de ionização de chama e injetor à temperatura de

250 °C, coluna capilar DB 210 (30 m x 0,25 mm de diâmetro interno) com espessura filme de 0,25 µm a 220 °C e nitrogênio como gás de arraste em fluxo 2,0 mL min<sup>-1</sup>.

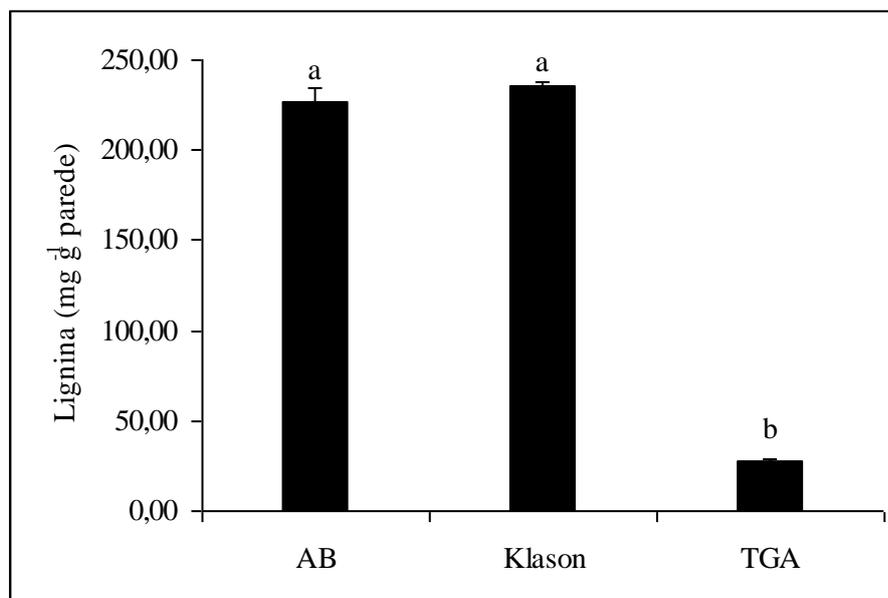
A concentração final dos monossacarídeos foi expressa em percentagem.

#### **4.8 Análise estatística**

Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste Scott Knott a 5% de probabilidade.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como pode ser observado na Figura 5, o teor de lignina no bagaço de cana-de-açúcar, determinado pelos métodos acetilbromida e Klason, não apresentou diferenças significativas, pelo teste Scott Knott a 5% de probabilidade.



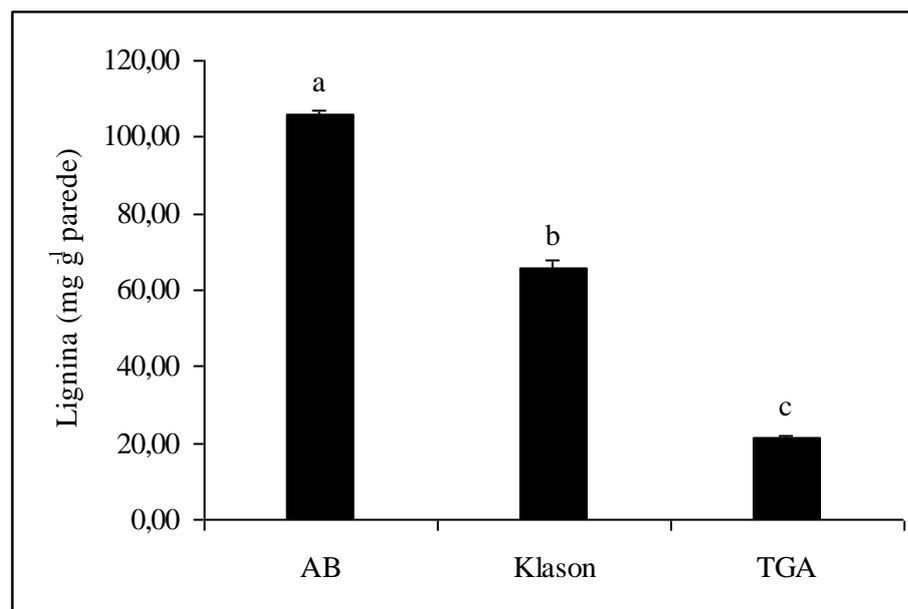
**Figura 5.** Teor de lignina no bagaço de cana-de-açúcar determinada pelos métodos acetilbromida (AB), Klason e ácido tioglicólico (TGA). Médias ( $n= 6 \pm$  erro padrão da média) seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste Skott Knott a 5% de probabilidade.

O método Klason baseia-se essencialmente na hidrólise ácida dos componentes da parede celular, exceto a lignina. Uma das principais críticas dirigidas a este método é a inclusão de proteínas no resíduo insolúvel (WHITEHEAD e QUICKE, 1964). Esta contaminação pode ocorrer naqueles materiais que apresentam elevados teores proteicos, como as plantas forrageiras leguminosas. No entanto, a preparação da parede celular realizada no presente trabalho é fundamentada em uma estratégia para retirar as proteínas interferentes, permitindo uma análise mais precisa da lignina (FERRARESE et al., 2002).

Outro ponto importante relatado para a metodologia Klason é a possível solubilização da lignina no meio ácido (MIGITA e KAWAMURA, 1944). Para

contornar este problema, a quantificação da lignina foi baseada na equação de GOLSCHIMDT (1971), que visa também eliminar a interferência de furfuranóides. No entanto, é utilizada como fórmula geral. Possivelmente a especificação para determinados tecidos e/ou espécies poderá expressar com maior exatidão o real teor de lignina.

Os resultados contidos na Figura 6 revelam que os três métodos de quantificação da lignina, na raiz de soja, apresentaram diferenças significativas entre si. O método acetilbromida mostra-se com o maior valor, seguido do método Klason. A mesma tendência pode ser observada para a concentração de lignina do tegumento de soja (na Figura 7), embora em menor magnitude de valores.

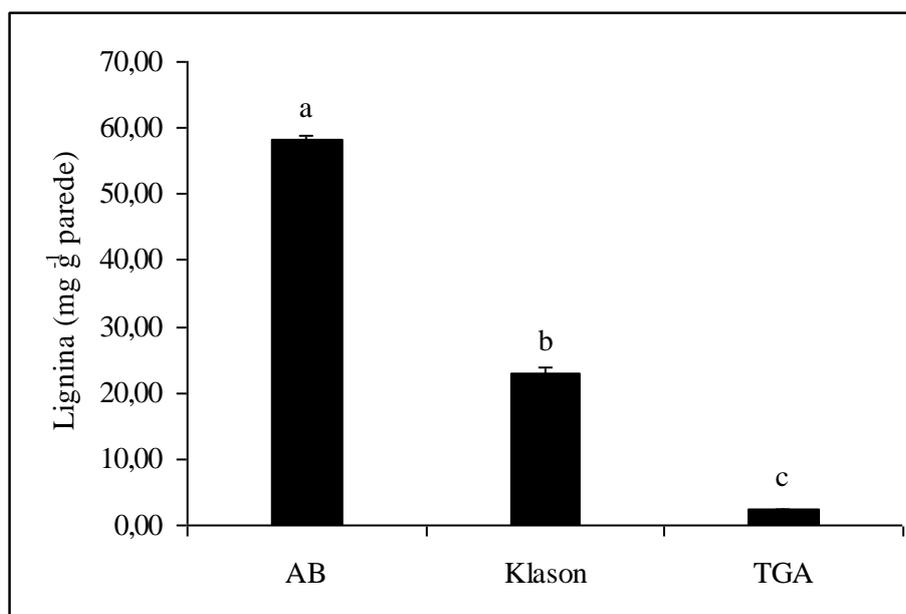


**Figura 6.** Teor de lignina na raiz de soja determinada pelos métodos acetilbromida (AB), Klason e ácido tioglicólico (TGA). Médias ( $n= 6 \pm$  erro padrão da média) seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste Skott Knott a 5% de probabilidade.

Os teores de lignina determinados pelo método AB foram mais elevados do que os valores apresentados pelos demais métodos testados (Figura 6 e 7), exceto para o bagaço de cana, onde a metodologia Klason não diferiu do método acetilbromida (Figura 5). A notável e persistente diferença entre os resultados espectrofotométricos AB e TGA nos diferentes tecidos, bem como a consistente subestimativa do segundo também em relação ao método gravimétrico de

Klason, exigiu uma investigação mais detalhada do método TGA, que será discutida posteriormente.

As diferenças entre os teores de lignina estimados pelos métodos AB e Klason são tecido-dependentes, que pode ser depreendido dos resultados similares apresentados por ambos os métodos quando aplicados à análise do bagaço da cana-de-açúcar (Figura. 5), porém significativamente distintos quando aplicados sobre os demais tecidos (Figura. 6 e 7).



**Figura 7.** Teor de lignina no tegumento de soja determinada pelos métodos acetilbromida (AB), Klason e ácido tioglicólico (TGA). Médias ( $n= 6 \pm$  erro padrão da média) seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste Skott Knott a 5% de probabilidade.

As altas temperaturas e baixos pHs produzidos durante a extração da lignina podem provocar o aparecimento de produtos de degradação da hemicelulose – particularmente das xilanas – capazes de interferir nas leituras de absorvância. Nestas condições, a hemicelulose é degradada aos seus monossacarídeos constituintes, sobretudo a xilose, mas também outras pentoses que podem ser então desidratadas a furfural e hidroximetilfurfural que absorvem fortemente a 280 nm (BUCKERIDGE et al., 2010). Para minimizar esta possível fonte de erros, HATFIELD et al. (1999) sugerem a diminuição da temperatura de reação de 70 °C para 50 °C, e o aumento do tempo de reação de 30 min para 1 hora.

A análise dos monossacarídeos presentes nos diferentes tecidos (Tabela 1) revela que, de fato, a xilose é o monossacarídeo encontrado em maior quantidade, tanto no bagaço da cana-de-açúcar quanto no tegumento de soja. Os altos teores de xilose nestes tecidos sugerem que a eventual formação de furfuranóides poderia resultar numa superestimativa do conteúdo de lignina, uma vez que o método AB não contempla a remoção prévia destes açúcares. Entretanto, a Tabela 1 também aponta que o conteúdo de pentoses no bagaço da cana-de-açúcar é semelhante ao encontrado no tegumento da soja e, como se pode observar na Figura 5, os métodos AB e Klason produziram resultados estatisticamente equivalentes. Como método Klason utiliza um procedimento capaz de eliminar a interferência de furfuranóides na porção solúvel, a presença de xilose não pode ser responsável pelas diferenças apontadas pelos métodos na análise das amostras de tegumento (Figura 7).

**Tabela 1.** Composição monossacarídica da parede celular do bagaço de cana-de-açúcar, raiz e tegumento de soja

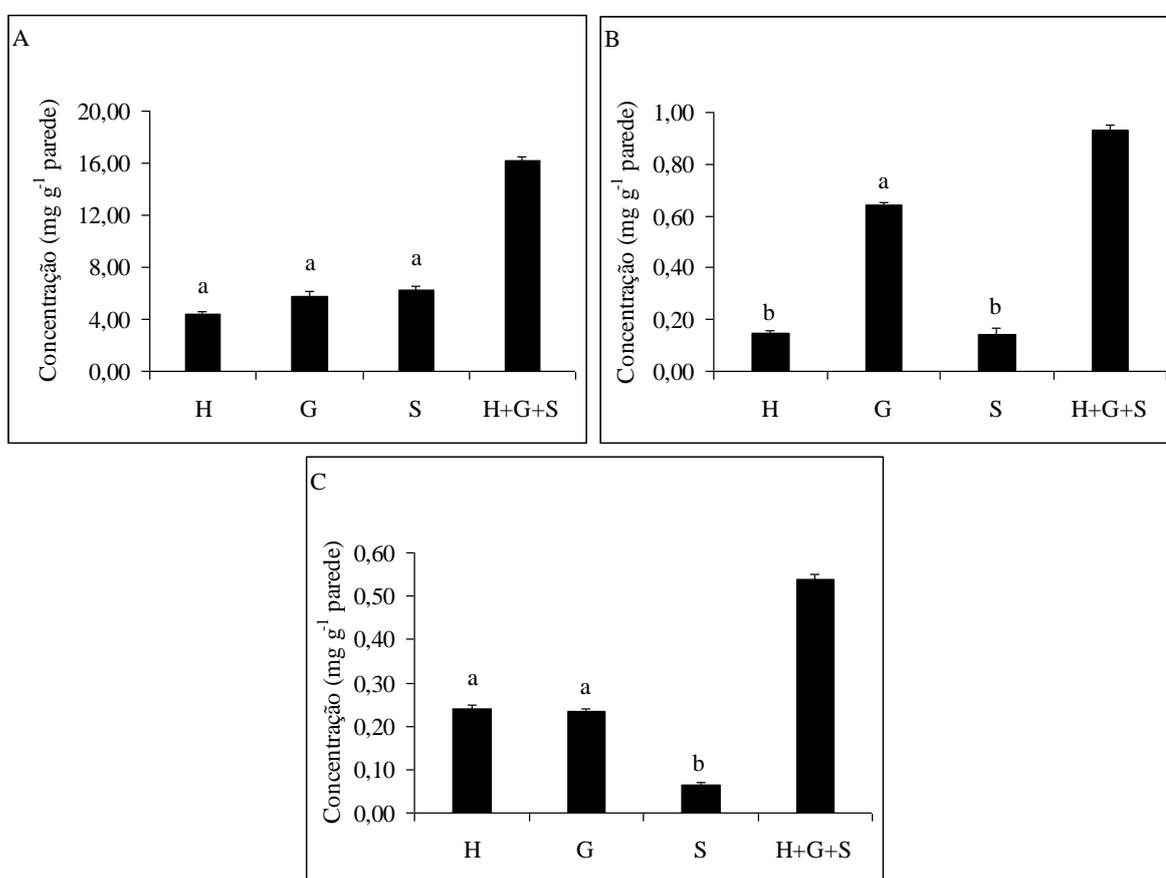
Amostra	Ram	Fuc	Ara	Xil	Man	Gal	Glu	Pentoses	Hexoses
%									
Bagaço	0 Ec	0 Eb	7,00 Cc	77,00 Aa	0 Ec	0,66 Dc	15,66 Bns	84,03	16,12
Raiz	2,66 Fa	0,66 Ga	39,00 Aa	21,33 Cb	4,33 Eb	8,66 Da	23,66 Bns	60,4	39,54
Tegumento	2,00 Db	1,00 Da	21,66 Bb	51,00 Ac	5,30 Da	3,00 Db	16,30 Cns	72,52	27,66

Médias ( $n=3$ ) seguidas da letra maiúscula, na linha ou da mesma letra minúscula, na coluna, não diferem entre si pelo teste Skott Knott a 5% de probabilidade. Ram: ramnose, Fuc: fucose, Ara: arabinose, Xil: xilose, Man: manose, Gal: galactose, Glu: glucose, ns: não significativo.

Outra possível fonte de interferência para os elevados teores de lignina apontados pelo método AB é a interferência do íon polibrometo, que absorve fortemente na região UV. Entretanto, seu pico de absorção ocorre em 260 nm, enquanto que o comprimento de onda utilizado no método AB é 280 nm. Além disso, na técnica analítica, foi utilizada uma solução de hidroxilamina, cuja principal finalidade é complexar o íon polibrometo minimizando a absorbância deste composto no UV. A interferência de proteínas também pode ser descartada, uma vez que proteínas não são solúveis na solução final de acetilbromida/ácido acético (MORRISON, 1972a). Entretanto, os altos valores exibidos pelo método AB podem refletir a presença de outros componentes fenólicos, como tirosina e

taninos não removidos na preparação da parede celular. Estes compostos podem ser dissolvidos na solução acetilbromida/ácido acético proporcionando um aumento na sua absorbância em 280 nm.

Para verificar se a composição monomérica da lignina poderia interferir nas análises quantitativas, efetuamos a oxidação da lignina em uma solução alcalina com nitrobenzeno. Esta metodologia libera os derivados *p*-hidroxibenzaldeído, vanilina e siringaldeído, que correspondem aos respectivos resíduos de monolignóis *p*-hidroxifenil (H), guaiacil (G) e siringil (S). O rendimento pode chegar a 75% do total de lignina, dependendo do tipo de tecido, entretanto, 25-30% é a faixa mais comum de rendimento (DEAN, 1997).



**Figura 8.** Composição monomérica da lignina no bagaço de cana-de-açúcar (A), raiz de soja (B) e tegumento de soja (C). Médias ( $n = 6 \pm$  erro padrão da média) seguidas de mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste Scott Knott a 5% de probabilidade. H: *p*-hidroxifenil, G: guaiacil, S: siringil.

A análise indicou uma diferença significativa nos tecidos analisados (Figura 8.). O bagaço de cana-de-açúcar apresenta uma proporção uniforme entre os monômeros com uma pequena variação em que a proporção de  $S > G > H$ . Já na

raiz da soja, o monômero G é dominante (16:69:15 %), enquanto o tegumento apresenta maiores quantidades de unidades H e G (44:44:12 %).

Comparando os resultados dos teores de lignina com os monolignóis, podemos observar que a diferença na proporção dos monômeros da lignina oriundas dos diferentes tecidos não pode ser correlacionada com as diferenças encontradas entre os métodos. Exceto se considerarmos a possibilidade de o método Klason ser mais sensível à presença de unidades S, que parece improvável. Contudo, é possível especular que o método Klason, até mesmo por sua natureza gravimétrica, pode perder eficiência em tecidos com teores menores de lignina, como é o caso da raiz e do tegumento de soja, comparados ao bagaço de cana.

Finalmente, as diferenças tecido-dependentes verificadas entre os métodos AB e Klason pode ser devida às especificidades dos dois métodos (FAHEY JR. et al. 1979). Segundo JUNG (1989), a lignina Klason caracteriza-se por extrair apenas a lignina nuclear, enquanto o método AB é, em tese, capaz de extrair tanto a lignina nuclear quanto a periférica (FUKUSHIMA e HATFIELD, 2001).

A técnica do ácido tioglicólico tem sido considerada a mais adequada para o isolamento e quantificação da lignina em plantas herbáceas (BRUCE AND WEST, 1989; SUZUKI et al., 2009). Tal procedimento já foi tão bem aceito que a formação de lignotioglicólico (LTGA) foi considerada um critério para a presença de lignina em uma amostra (FREUDENBERG e NEISH, 1968). FAHEY JR. et al. (1979) afirmam que o método TGA é sensível para detectar componentes fenólicos que seriam rapidamente removidos pela solução de ácido sulfúrico a 72%. BAUNS (1952) caracteriza o LTGA como o derivado com menor mudança na estrutura real da lignina na planta. Apesar de ser altamente reprodutível, este método não é frequentemente utilizado para quantificar o polímero (DEAN, 1997). Todavia, reconhece-se que o método TGA está propenso a subestimar os valores, devido à especificidade com que reage com a lignina (BRINKMANN et al, 2002). Como se pode observar nas Figuras 5, 6 e 7, nesta investigação, o método TGA de fato apresentou teores de lignina muito inferiores aos demais métodos em todos os tecidos analisados. Tais diferenças

entre diferentes métodos para determinar lignina tem sido reportadas por outros autores (FUKUSHIMA e HATFIELD, 2004; LACERDA et al., 2006; BRINKMANN et al., 2002).

O ácido tioglicólico reage com ligações tipo éter ( $\beta$ -O-4) que estabelece ligações entre as cadeias propenil dos monolignóis. Este tipo de ligação é dominante no polímero, podendo corresponder a aproximadamente 50% das ligações tanto para vegetais lenhosos e não lenhosos (SJÖSTRÖM, 1993). Embora dominantes, há outros tipos de ligações que poderiam não reagir com o ácido tioglicólico evitando a liberação total da lignina para a solução alcalina. Desta forma, fragmentos de lignina podem ser perdidos como resíduos insolúveis, que, de acordo com a metodologia, são descartados. Para testar esta hipótese, utilizamos o método AB para efetuar uma análise do conteúdo de lignina no resíduo insolúvel do TGA. De fato, como se pode observar na Tabela 2, o resíduo insolúvel da reação com TGA apresenta ainda teor significativo de lignina. Para a raiz e o tegumento, estes valores são superiores àqueles encontrados pelo método TGA padrão (41,08 e 26,92 mg g<sup>-1</sup> parede celular). O método AB solubiliza a lignina em meio ácido e demonstra que, possivelmente, nem toda molécula foi solubilizada no meio alcalino pelo método TGA.

A metodologia TGA envolve várias etapas de centrifugação até a leitura final do teor de lignina. Nestas etapas, são descartados resíduos solúveis. HATFIELD e FUKUSHIMA (2005) questionaram a respeito da possível solubilização da lignina na etapa ácida. Com o intuito de investigar se este descarte poderia ser o responsável pelos baixos valores de lignina determinados pelo método TGA, em relação às metodologias Klason e acetilbromida, analisamos a absorvância a 280 nm e calculamos o teor de lignina correspondente desses resíduos.

**Tabela 2.** Determinação de lignina nos resíduos do método ácido tioglicólico

Procedimento	Bagaço	Raiz	Tegumento
	mg g <sup>-1</sup> parede		
Acetilbromida (resíduo sólido)	22,31 ± 0,40	41,08 ± 1,34	26,92 ± 1,48
Etapa Ácida TGA	0,27 ± 0,01	0,11 ± 0,01	0,06 ± 0,00
TGA padrão	28,05 ± 0,94	21,25 ± 0,77	2,46 ± 0,94
SOMA	50,630	62,44	29,44

Médias ( $n = 3 \pm$  erro padrão da média). TGA: metodologia do ácido tioglicólico.

A Tabela 2 apresenta o teor de lignina correspondente para cada amostra, considerando-se o coeficiente de extinção molar da lignina como única contribuição para as absorvâncias observadas. Esta presunção baseia-se no fato de que os procedimentos para remoção de extrativos da parede celular utilizados nesta investigação retiram a maior parte dos interferentes solúveis, como proteínas e outros compostos aromáticos. É possível observar que, no primeiro resíduo analisado correspondente a etapa ácida, o bagaço de cana apresenta o maior teor médio seguido pela raiz de soja e pelo tegumento, nesta ordem. Estes resíduos correspondem à etapa ácida, onde o ácido tioglicólico e o ácido clorídrico são adicionados à amostra. Os dados demonstram que os elevados valores de lignina dos resíduos ácidos do método TGA podem também explicar os baixos valores de lignina apresentados para técnica de TGA.

## 6. CONCLUSÕES

1. O método Klason não apresentou diferença significativa com o método acetilbromida para o teor de lignina no bagaço de cana. No entanto, para a raiz e tegumento de soja, esta técnica apresentou resultados intermediários entre as metodologias acetilbromida e tioglicólico.
2. A quantificação de lignina pelo método acetilbromida mostrou-se mais simples, rápida e com resultados superiores aos métodos tioglicólico e Klason, exceto para a amostra de bagaço de cana onde o método Klason apresentou resultados similares.
3. As diferenças encontradas para o procedimento Klason e acetilbromida, no tegumento de soja, possivelmente não são explicadas pela presença do monossacarídeo xilose.
4. O método do ácido tioglicólico apresentou as menores estimativas do teor de lignina nos diferentes tecidos em estudo.
5. A análise dos resíduos do método tioglicólico indicou possibilidade de presença de lignina, principalmente no resíduo insolúvel. No entanto, maiores estudos são necessários para fornecer resultados mais conclusivos.
6. A composição monomérica da lignina apresenta resultados diferenciados para o bagaço de cana, raiz e tegumento de soja. Embora a quantificação de monômeros aparentemente seja ineficiente para quantificar o conteúdo de lignina, é um método completamente distinto daqueles que estamos avaliando e que nos permite afirmar que há menos lignina na raiz e no tegumento que no bagaço.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANTEROLA, A.M.; JEON, J-H.; DAVIN, L.B.; LEWIS, N.G. Transcriptional control of monolignol biosynthesis in *Pinus taeda*. Factors affecting monolignol ratios and carbon allocation in phenylpropanoid metabolism. **Journal of Biology Chemistry**. v.277, p. 18272–80, 2002.
- BOERJAN W., RALPH J., BAUCHER M. Lignin biosynthesis. **Annual Reviews Plant Biology**, v. 54, p. 519-546, 2003.
- BOIJA, E.; JOHANSSON, G. Interactions between model membranes and lignin-related compounds studied by immobilized liposome chromatography. **Biochimica et Biophys Acta**, v. 5, p. 620–626, 2006.
- BOUDET, A.M. Evolution and current status of research in phenolic compounds. **Phytochemistry**, v. 68, p. 2722-35, 2007.
- BRINKMANN, K.; BLASCHKE, L.; POLLE, A. Comparison of different methods for lignin determination as a basis for calibration of Near-infrared reflectance spectroscopy and implications of lignoproteins. **Journal of Chemical Ecology**, v. 28, n. 12, 2002.
- BROWNING, B.L. **Methods of wood chemistry**. New York. Wiley-Interscience.. 1967.
- BRUCE, R. AND WEST, C. Elicitation of lignin biosynthesis and isoperoxidase activity by pectic fragments in suspension cultures of castor bean. **Plant Physiology**, v. 91, p. 889–897, 1989.
- BUCKERIDGE, M.S., RAYON, C., URBANOWICZ, B., TINÉ M.A.S & CARPITA, N.C. Mixed linkage (1→3)(1→4)-β-glucans of grasses. **Cereal Chemistry**, v. 81, n 1, p 115-127, 2004.
- BUCHANAN, B.B.; GRUISSEM, W.; JONES, R.L. **Biochemistry and Molecular Biology of Plants**. 1ªed. USA, 2000. 1367 p.
- CAMPBELL, B.; SEDEROFF, R. Variation in lignin content and composition. Mechanisms of control and implications for the genetic improvement of plants. **Plant Physiology**, v.110, p. 3–13, 1996.
- CAPELETI, I.; FERRARESE, M. L. L.; KRZYZANOWSKI, F. C.; FERRARESE-FILHO, O. A new procedure for quantification of lignin in soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) seed coat and their relationship with resistance to mechanical damage. **Seed Science and Technology**, Virum, Denmark, v. 33, n. 2, p. 511-515, 2005.

CARPITA, N.C. AND GIBEAUT, D.M. Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of the molecular structure with the physical properties of the walls during growth. **Plant Journal**, v. 3, p. 1-30, 1993.

CHESSON A., FORSBERG C.W. Polysaccharide degradation by rumen microorganisms. In: HOBSON P.N. (Ed.) **The rumen microbial ecosystem**. London: Elsevier Applied Science, 1988. 251-284 p.

COLLINGS, G. F.; YOKOYAMA, M. T.; BERGEN, W. G. Lignin as determined by oxidation with sodium chlorite and a comparison with permanganate lignin. **Journal Dairy Science**, v. 61, n. 8, p. 1156, 1978.

CRAWFORD, R. L.; ROBINSON, L.E. and CHEH, A. M. <sup>14</sup>C-Labelled lignins 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.). 1980, v.1, 62 p.

DEAN J. F. D. Lignin analysis. In **Methods in Plant Biochemistry and Molecular Biology**. Dashek WV (ed.). CRC Press: Boca Raton, 1997. 199-215 p.

DENCE, C.W. The determination of lignin. In S.Y. Lin and C.W. Dence (ed.) **Methods in Lignin Chemistry**. Germany: Springer Verlag, Heidelberg, 1992. 33-61 p.

DOS SANTOS, W. D.; FERRARESE, M. L. L.; NAKAMURA, C. V.; MOURÃO, K. S. M.; MANGOLIN, C. A.; FERRARESE-FILHO, O. Soybean (*Glycine max*) root lignification induced by ferulic acid. The possible mode of action. **Journal of Chemical Ecology**, v. 34, p. 1230-1241, 2008.

ELLIS, G. H.; MATRONE, G. MAYNARD, L. A. A 72 percent H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> method for the determination of lignin and its use in animal nutriion studies. **Journal of Animal Science**, v. 5, p. 285, 1946.

FAHEY JR., G.C., McLAREN, G.A., WILLIAMS, J.E. Lignin digestibility by lambs fed both low quality and high quality roughages. **Journal of Animal Science**, v. 48, p. 941, 1979.

FENGEL D., WEGENER G. **Wood Chemistry**, Ultra structure, Reactions. Berlin: Walter de Gruyter, 1989. 613 p.

FENGEL, D., WEGENER, G. **Wood chemistry**, ultrastructure, reactions. New York : Waster & Grugter, 1984. 613 p.

- FERRARESE, M.L.L.; ZOTTIS, A.; FERRARESE-FILHO, O. Protein-free lignin quantification in soybean (*Glycine max*) roots. **Biologia**, v.57, p.541–543, 2002.
- FINCHER, G.B. and STONE, B.A. Cell walls and their components in cereal grain technology. **Advances in Cereal Science and Technology**, v. 8, 372-275, 1986.
- FREUDENBERG, K.; NEISH A. C. **Constitution and Biosynthesis of Lignin**. Berlin: Springer-Verlag, 1968. 129 p.
- FUKUSHIMA, R. S. AND KERLEY, M. S. Use of lignin extracted from different plant sources as standards in the spectrophotometric acetyl bromide lignin method. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 59, p. 3505–3509, 2011.
- 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.; HATFIELD, R. D. Extraction and isolation of lignin and its utilization as a standard to determine lignin concentration through a spectrophotometric method. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**. v 49. p 3133-3139, 2001.
- FUKUSHIMA, R.S., AND R.D. HATFIELD. 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.
- GIGER, S. Revue sur les methods de dosage de la lignine utilises en alimentation animale. **Annales de Zootechnie**, v. 34, p. 85, 1985.
- GOERING, G. K.; VAN SOEST, P. J. **Forage Fiber Analysis Apparatus, Reagents, Procedures and Some Applications**, Washington USDA: Agricultural Handbook; U.S. GPO, 1970. 379 p.
- GOLSCHIMDT, O. **Ultraviolet spectra in Lignins**: occurrence, formation, structure and reactions. New York: J. Wiley and Sons, 1971.
- GOUVEIA, E. R.; NASCIMENTO, R. T.; SOUTO-MAIOR, A. M.; ROCHA, G. J. M. Validação de metodologia para a caracterização química de bagaço de cana-de-açúcar. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 6, 2009.
- HATFIELD R.; FUKUSHIMA, R. S. Can lignin be accurately measured? **Crop Science**, v. 45, p. 832–839, 2005.

- HATFIELD, R. D., GRABBER, J., RALPH, J., and BREI, K. Using the acetylbromide assay to determine lignin concentrations in herbaceous plants: some cautionary notes. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.47, p. 628–632. 1999.
- HATFIELD, R.D., H.G. JUNG, J. RALPH, D.R. BUXTON, AND P.J. WEIMER. A comparison of the insoluble residues produced by the Klason lignin and acid detergent lignin procedures. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 65, p. 51–58, 1994.
- HIGUCHI, T.; ITO, Y.; SHIMADA, M.; KAWAMURA, I. Chemical properties of milled wood lignin of grasses. **Phytochemistry**, v. 6, n. 1, p. 1551, 1967.
- IYAMA, K., AND A.F.A. WALLIS. An improved acetyl bromide procedure for determining lignin in woods and wood pulps. **Wood Science Technology**, v. 22, p. 271–280, 1988.
- IZYDORCYYK, M.S. & BILARDERIS, C.G. Carbohydrate Polymers, v. 29, p. 33-48, 1995
- JOHNSON, D.B., W.E. MOORE, AND L.C. ZANK. The spectrophotometric determination of lignin in small wood samples. **Tappi** v. 44, p 793–798, 1961.
- JONES, L.; ENNOS, A. R.; TURNER, S. R. Cloning and characterization of irregular xylem4 (irx4): a severely lignin-deficient mutant of *Arabidopsis*. **The Plant Journal**. v. 26, p. 205-216, 2001.
- JUNG H.G. Forage lignins and their effects on fiber digestibility. **Journal of Agriculture**. v. 81, p. 33-38, 1989.
- JUNG H.G., DEETZ D.A. Cell wall lignification and degradability. In: JUNG H.G., BUXTON D.R., HATIFIELD R.D. et al. (Ed.) **Forage cell wall structure and digestibility**. Madison: America Society of Agronomy, 1993. 315-346p.
- JUNG H.G., VOGEL K.P. Lignification of switchgrass (*Panicum virgatum*) and big bluestem (*Andropogon gerardii* Vitman) plant parts during maturation and its effect on fibre degradability. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v. 59, p. 769-776, 1992.
- LACERDA, R. S.; GOMIDE, C. A.; FUKUSHIMA, R.S.; SCHMIDT, R.J.; HERLING, V.R. Lignin concentration in oat (*Avena byzantina* L.) aerial part as measured by four analytical methods. **Brazilian Journal of Veterinary Research Animal Science**, v. 43, n. 3, p. 400-407, 2006.

- LAPIERRE C. Application of new methods for the investigation of lignin structure. In: JUNG H.G., BUXTON D.R. HATFIELD, R.D., et al. **Forage cell wall structure and digestibility**. Madison: American Society for Agronomy, 1993. 133-163 p.
- LI, X.; WENG, J-K.; CHAPPLE, C. Improvement of biomass through lignin modification. **The Plant Journal**, v. 54, p. 569-581, 2008.
- MARTÍNEZ, A.T.; RENCORET, J.; MARQUES, G.; GUTIÉRREZ, A.; IBARRA, D. Monolignol acylation and lignin structure in some nonwoody plants: A 2D NMR study. **Phytochemistry**, v.69, p. 2831-2843, 2008.
- MIGITA, W. and KAWAMURA, I. Chemical analysis of wood. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. Soc. Jpn., v. 20, p. 348, 1944.
- MORAIS S.A.L., NASCIMENTO E.R., PILÓ-VELOSO D. Studies of lignin and polyphenols content in *Eucalyptus grandis* by infrared spectroscopy. **Journal of Botanic Chemistry Society**. v. 2, p. 129-131, 1991.
- MORRISON, I.M. Improvements in the acetyl bromide technique to determine lignin and digestibility and its application to legumes. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v 23. p 1463–1469, 1972b.
- MORRISON, I.M. Semimicro method for the determination of lignin and its use in predicting the digestibility of forage crops. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 23, p. 455–463, 1972a.
- PETTERSEN, R.C., V.H. SCHWANDT, AND M.J. EFFLAND. An analysis of the wood sugar assay using HPLC: A comparison with paper chromatography. **Journal of Chromatographic Science**, v. 22, n. 11, p. 478-484, 1984.
- POLLE, A.; OTTER, T.; SEIFERT, F. Apoplastic peroxidases and lignification in needles of Norway spruce (*Picea abies* L.). **Plant Physiology**, v.106, p. 53-60, 1994.
- RALPH, J.; LUNDQUIST, K.; BRUNOW, G.; LU, F.; KIM, H.; SCHATZ, P. F.; MARITA, J. M.; HATFIELD, R. D.; RALPH, S.A.; CHRISTENSEN, J. H.; BOERJAN, W. Lignins: Natural polymers from oxidative coupling of 4-hydroxyphenylpropanoids. **Phytochemistry Reviews**, v. 3, p 29–60, 2004.
- SAKANEN, K.V. and LUDUIG, C.H. **Lignins**: occurrence, formation, structure and reactions. Wiley Interscience, N.Y, 1971.
- SALIBA, E. O. S.; RODRIGUEZ, N. M.; LEMOS DE MORAIS, S. A.; PILÓ-VELOSO, D. Ligninas métodos de obtenção e caracterização química. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.31, n.5, p.917-928, 2001.

SANTANA, M. C.A.; CAVALI, J. Fundamentos e Avaliação Comparativa de Métodos para Análise de Lignina em Forragens. **Revista Eletrônica de Veterinária**, v. 7, n. 11, 2006.

SARKANEN, K.V.; LUDWIG, C.H. **Lignins**: occurrence, formation, structure, and reactions. New York: Wiley-Intersci. 1971. 916 p.

SJÖSTRÖM, E. **Wood Chemistry. Fundamentals and Applications**. San Diego: Academic Press, 1993. 80–86 p.

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

SUZUKI, S.; SUZUKI, Y.; YAMAMOTO, N.; HATTORI, T.; SAKAMOTO, M.; UMEZAWA, M. High-throughput determination of thioglycolic acid lignin from rice. **Plant Biotechnology**, v. 26, p. 337–340, 2009.

TAIZ L, ZEIGER E. **Fisiologia Vegetal**. Artmed: Porto Alegre, 3ª edição, 2006.

THOMAS B. and HARMSTRONG .D.G. A study of some methods at present used for determination of lignin. **Journal of Agriculture Science**, v. 39, p. 335, 1949.

TRONCHET, M.; BALAGUÉ, C.; KROJ T.; JOUANIN, L.; ROBY, D. Cinnamyl alcohol dehydrogenases-C and D, key enzymes in lignin biosynthesis, play an essential role in disease resistance in *Arabidopsis*. **Molecular Plant Pathology**, v. 11, p.83–92, 2010.

VAN SOEST, P. J. Lignin. In **Nutritional Ecology of the Ruminant**; Cornell University Press NY: Ithaca, 1994, 177-195 p.

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

VAN SOEST, P.J. Use of detergents in the analysis of fibrous foods. II. A rapid method for the determination of fiber and lignin. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v. 46, p. 829, 1963.

VANHOLME R., DEMEDTS B., MORREEL K., RALPH J., BOERJAN W. Lignin Biosynthesis and Structure. **Plant Physiology**, v. 153, p. 895–905, 2010

VANHOLME, R.; MORREEL, K.; RALPH, J.; BOERJAN, W. Lignin engineering. **Current Opinion in Plant Biology**, v.11, p. 278–85, 2008.

VINOGRADOV, E.; WASSER, S. The structure of a polysaccharide isolated from *Inonotus levis* P. Karst. mushroom (Heterobasidiomycetes). **Carbohydrate Research**, v. 340, n. 18, p. 2821-2825, 2005.

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

YOSHIHARA, K., T. KOBAYASHI, T. FUJII, AND I. AKAMATSU. A novel modification of Klason lignin quantitative method. **Japan Tappi Journal.**, v. 38, p. 86–95, 1984.