

Determinación de lignina con clorito de sodio y permanganato de potasio en forrajes y alimentos concentrados¹

W.A. GONZALEZ²
D.E. ULLREY³

RESUMEN

Se ha demostrado que la oxidación con clorito de sodio (NaClO_2), una técnica que ha sido usada en investigación de plantas por treinta años, consiste en una oxidación del anillo fenil de la lignina sin remover los polisacáridos. El objetivo de este estudio fué aplicar esta técnica a forrajes, alimentos y heces y comparar sus valores con los valores de la lignina obtenidos por oxidación con permanganato de potasio. Se seleccionaron siete materiales para representar una amplia sección de substratos fibrosos. Los substratos se secaron a 60°C por cuarenta y ocho horas, se molieron en un molino Wiley (malla de 1 mm). Muestras de un gramo se dispersaron en oxalato de amonio al 0,5 por ciento, se hirvieron durante dos horas y se filtraron. La fibra extraída con oxalato de amonio se suspendió en ácido acético al 1 por ciento a 70°C ; se añadió después 1,25 g de clorito de sodio y se oxidó la lignina por un máximo de cuarenta y cinco minutos. Se interrumpió la oxidación añadiendo ácido ascórbico, y la suspensión fué filtrada y secada a 60°C por cuatro horas. La diferencia en peso fué definida como la lignina por clorito de sodio. Los valores de la lignina por permanganato y los de la lignina por clorito de sodio, para los substratos examinados fueron, respectivamente: pasto Kentucky 5,56 y 6,06; pasto Reed Canary 5,33 y 6,06; pasto Brome 5,54 y 5,54; pasto Orchard 4,68 y 6,73; Alfalfa 6,21 y 5,56; paja de trigo 12,44 y 8,72; heces de ovino 9,61 y 13,07. Se encontraron diferencias considerables en los valores de la lignina con los diferentes substratos, pero en general los valores de la lignina por clorito de sodio tendieron a ser superiores a los valores de la lignina por permanganato de potasio.

ABSTRACT

Sodium Chlorite oxidation, a technique which has been used in plant research for thirty years, has been demonstrated to be an oxidation of the phenyl ring of lignin without removal of polysaccharides. The objective of this study was to apply this technique to forages, feeds and feces, and to compare its values with permanganate lignin values. Seven feedstuffs were selected in order to represent a broad cross section of fibrous substrates. Substrates were dried at 60°C for forty eight hours then ground in a Wiley Mill (1 mm screen). One gram samples were dispersed in 0.5 per cent ammonium oxalate, boiled for two hours and then filtered. The ammonium oxalate extracted fiber was resuspended in per cent acetic acid at 70°C ; sodium chlorite (1,25 g) was then added, and the linnin oxidized for a maximum

¹ Recibida para su publicación 30-11-79.

² Ing. Agr. M.S. Dpto. de Zootecnia. Facultad de Agronomía. Universidad del Zulia, Apartado 526, Maracaibo, Venezuela.

³ Department of Animal Husbandry. Michigan State University East Lansing. Michigan 48823.

of forty five minutes. Oxidation was stopped by adding ascorbic acid, and the suspension was filtered and dried at 60°C for four hours, the difference in weight was defined as sodium chlorite lignin. Permanganate lignin and sodium chlorite lignin values were determined for the substrates: Kentucky blue grass 5,56 and 6,06; Reed Canary grass 5,33 and 6,06; Brome grass 5,54 and 5,54; Orchard grass 4,68 and 6,73; Alfalfa 6,21 and 5,66; Weat straw 12,44 and 8,72; Sheep feces 9,61 and 13,07. Considerable differences in lignin values were found with the various substrates, but in general, sodium chlorite lignin values tended to be higher than permanganate lignin values.

INTRODUCCION

La lignina, el principal compuesto no carbohidrato de la pared celular de las plantas, podría ser un marcador ideal para estudios de pesaje (6, 7, 9, 16) y un indicador de la calidad del forraje. Sin embargo, análisis presentes de la lignina por hidrólisis con ácido sulfúrico (11, 12) o por oxidación con permanganato de potasio (15) son complicados por aparentes artefactos (5, 9, 13, 14, 15). Durante más de treinta años, la oxidación con clorito de sodio en ácido diluído ha sido usada para aislar holocelulosa de la madera y de muestras de forraje (2). El mecanismo por el cual la oxidación con clorito de sodio delignifica la madera no está entendido completamente, sin embargo, durante la oxidación con clorito de sodio se genera gas cloro el cual es saturado con agua, formando ácido hipocloroso.

El objetivo de este estudio fué realizar la determinación de la lignina con clorito de sodio tal como es descrita por Collings(*) para usarlo en la evaluación de alimentos y forrajes en estudios de nutrición animal. Los valores obtenidos por este método fueron comparados con los valores de la lignina obtenidos por el método de oxidación con permanganato de potasio, desarrollado por Van Soest (15).

MATERIALES Y METODOS

Siete materiales entre alimentos concentrados, forrajes y heces fueron seleccionados para representar una amplia sección de substratos fibrosos. Cada substrato fué coleccionado y secado a 60°C en un horno cerrado por cuarenta y ocho horas y después pasado a través de una malla de 1 mm en un molino Wiley. Una segunda determinación de materia seca (A) fué realizada a 60°C en la mezcla molida, antes de los análisis.

El procedimiento de oxidación descrito por Collings(*) ha sido utilizado de manera que pueda ser obtenido el porcentaje de la lignina en una muestra. Una muestra de un gramo se pesó en un Beaker de Berzelius y se añadió 200 ml de una solución de oxalato de amonio al 0,5 por ciento. La solución se calentó hasta ebullición (5 a 10 minutos) en un aparato de reflujo. El calor se redujo para obtener una ebullición constante y se calentó a reflujo por dos horas desde el inicio de la ebullición. Crisoles con filtro de vidrio (Porosidad 1) se pesaron y se colocaron en un tubo múltiple (manifold) para filtrado a vacío. La muestra se vació en el crisol y se filtró con vacío. El residuo se lavó dos veces con cincuenta ml de agua destilada caliente. El crisol más la fibra se secó por cuatro horas o más a 60°C. El crisol más la fibra se pesó después de treinta minutos en un desecador y otra vez después de treinta minutos a la temperatura del laboratorio. Esto se hizo para medir la absorción de agua por la fibra, dato que más tarde será tomado en cuenta para hacer los cálculos. El residuo de fibra fué sacado del crisol y pesado (B), después transferido a un beaker de Phillips de 250 ml y se añadió 100 ml de una solución de ácido acético al 1 por

(*) Collings F. George. *A guide to forage and feed fiber analysis*. Animal Husbandry Department. Nutrition Laboratory. Michigan State University. East Lansing. 1978.

ciento. Esta mezcla se calentó a 70°C y después se añadió un gramo de clorito de sodio. Fué necesario realizar esta operación en una campana extractora porque el dióxido de cloro generado es tóxico y explosivo. El calentamiento continuó por treinta minutos, agitando constantemente. Después de treinta minutos se añadió una cantidad adicional de 0,25 g de clorito de sodio y el calentamiento continuó por quince minutos adicionales. Al final del período total de oxidación (cuarenta y cinco minutos), la solución se enfrió y se añadió suficiente ácido ascórbico (hasta 0,5 g) para parar la reacción de oxidación. Un cambio de color de amarillo brillante a claro fué la indicación del cese completo de la oxidación por clorito de sodio. La solución fué vertida en un crisol con filtro de vidrio previamente tarado y el crisol y su contenido secados a 60°C por cuatro horas o más. El crisol se pesó después de ser enfriado por treinta minutos en el desecador y los cálculos hechos fueron los siguientes:

Pesos Obtenidos y Cálculos:

1. (A) Materia seca de la muestra molida
2. (B) Residuo de fibra oxálica(**)
3. (C) (Peso del crisol 1 + fibra oxálica) — Peso del crisol 1 = Peso de la fibra oxálica al minuto cero.
4. (D) (Peso del crisol 1 + fibra oxálica) — Peso del crisol 1 = Peso de la fibra oxálica al minuto treinta.
5. (E) (Peso del crisol 2 + holocelulosa) — Peso del crisol 2 = Peso de holocelulosa.

$$6. \text{ Peso de la lignina} = \frac{(C) \times (B)}{(D)} - (E)$$

7. Porcentaje de la lignina en la materia seca:

$$\frac{(C) \times \text{Peso de la lignina}}{(D) \times 100} = \frac{\text{Peso de la lignina} \times (C)}{\text{Peso de la muestra X (A)}} \times 100$$

RESULTADOS Y DISCUSION

El desarrollo del procedimiento de extracción de la lignina con clorito de sodio fué usado para separar holocelulosa y no para determinación de la lignina. Sin embargo, por ebullición con una solución diluída de oxalato de amonio, el citoplasma de la pared celular y algunos ácidos urónicos son extraídos de la pared celular dejando una fracción de la pared celular que puede ser usada para posteriores análisis, tales como la determinación de la lignina por oxidación con clorito de sodio(***) .

Los valores para la lignina por clorito de sodio y permanganato de potasio, para los siete substratos, son mostrados en la Tabla 1. Con dos de las muestras analizadas, los valores de la lignina con clorito de sodio fueron significativamente ($P < 0,05$)

(**) Fibra extraída con oxalato de amonio.

(***) MORT, A.J. Partial Characterization of extension by selective degradation of cell walls. Ph. D. Tesis. Michigan State University. East Lansing. 1977.

TABLA 1. Comparación de valores de lignina obtenidos con clorito de sodio y permanganato de potasio

Substrato	Valores de lignina		S.E.
	Clorito de Sodio	Permanganato de Potasio	
Pasto Kentucky	6,06 ^a	5,56 ^a	0,28
Pasto Reed Canary	4,94 ^a	5,33 ^a	0,23
Pasto Brome	5,54 ^a	5,54 ^a	0,30
Pasto Orchard	6,73 ^a	4,68 ^b	0,05
Alfalfa	5,66 ^a	6,21 ^a	0,29
Paja de trigo	8,72 ^a	12,44 ^b	0,30
Heces de Ovino	13,07 ^a	9,61 ^b	0,39

^a Cada valor es el promedio de seis determinaciones.

^b Los valores son significativamente diferentes ($P < 0,05$) con "The Student-Newman-Keuls múltiple comparison test".

mayores que los valores por permanganato de potasio. El valor con clorito de sodio para la paja de trigo, sin embargo, fué significativamente ($P < 0,05$) menor que el valor obtenido con permanganato. No se encontraron diferencias significativas entre los valores de las otras cuatro muestras analizadas.

Las diferencias observadas entre los dos valores de la lignina pueden en parte ser debido: a) la compleja variedad de componentes estructurales de los substratos, b) la naturaleza del residuo fibroso después del tratamiento con oxalato de amonio, y c) el mecanismo de ataque de los dos agentes oxidantes. Talmadge (10) ha descrito la complejidad de la estructura del carbohidrato conseguido en la fracción hemicelulosa y las fuertes asociaciones que existen entre los azúcares celulosa y hemicelulosa. La lignina unida a carbohidratos ha sido también extensamente investigado por Morrison (8). Estas interacciones físicas y químicas entre los carbohidratos se espera que varíen entre los substratos y contribuirán a las variaciones conseguidas con un procedimiento analítico. El residuo fibroso inicial, con ambos ácidos detergente o oxalato de amonio, podría tener una considerable influencia en los valores de la lignina. La extracción con ácido detergente removerá la hemicelulosa dejando detrás una fracción conteniendo lignocelulosa y ceniza insoluble (8). Recientemente, se ha demostrado que esta fracción también contiene Pectina (1). El tratamiento también puede resultar en la pérdida parcial del complejo de lignina-hemicelulosa, aunque este efecto no ha sido examinado. La extracción con oxalato de amonio es un proceso más débil y remueve solo el citoplasma de la pared celular y algunos ácidos urónicos. Esto deja la fracción de holocelulosa virtualmente intacta. Por otro lado el mecanismo de ataque del clorito y permanganato en la lignina puede ser diferente, especialmente con relación al residuo inicial usado. El permanganato es un agente oxidante más poderoso que el clorito de sodio y su exacta reacción con la lignina no es conocida. Se cree que afecta los componentes de los carbohidratos. La oxidación de la lignina con clorito de sodio, aunque no está completamente elucidada, ha sido examinada en forma más completa (4) y ha sido usada por muchos años en estudios botánicos (2, 3).

Estos resultados pueden ser significantes en estudios de balances para calidad de forrajes, y estudios de pesajes con la lignina como un marcador interno. Los valores indeterminados para la lignina podrían erróneamente sugerir alta digestibilidad de la lignina (4). El procedimiento descrito con clorido de sodio ofrece ser un método relativamente económico y exacto para determinar la lignina.

LITERATURA CITADA

1. BAILEY, R.W. & ULYATT, M.J. Pasture quality and ruminant nutrition II. Carbohydrate and lignin composition of detergent extracted residues from pasture grasses and legumes. *New Zealand Journal Agricultural Research*. 13: 591. 1970.
2. BRUCHALA, A.J. & WILKIE, K.C.B. Total hemicelluloses from wheat at different stages of growth. *Phytochemistry Journal* 12: 499. 1973.
3. BRUCHALA, A.J., FRASER & WILKIE, K.C.B. Quantitative studies on the polysaccharides in the non-endospermic tissues of the oat plant in relation to growth. *Phytochemistry Journal* 10: 1285. 1971.
4. COLLINGS, G.F., ERICKSON, J.P., YOKOYAMA, M.T. & MILLER, E.R. Effect of weat middlings of fiber component digestibility and metabolites. *Michigan State University Swine Research Repor* p. 94. 1977.
5. GOERING, H.K. & VAN SOEST, P.J. Forage fiber analyses. (Apparatus reagents, procedures and some applications). *Agricultural Handbook 379*. United, State Department of Agriculture. (U.S.D.A.) ARS, 1970.
6. HOGAN, J.P. The digestion of food by the grazing sheep. I the rate of flow of digesta. *Australian Journal of Agricultural Research*. 15: 384. 1964.
7. MAC RAE, J.C. The use of intestinal markers to measure digestive functions in ruminants. *Proceeding Nutrition Society*. 33: 147. 1974.
8. MORRISON, I.M. Structural investigations on the lignin-carbohydrate complexes of *Lolium perenne*. *Biochemistry Journal*. 139: 197. 1974.
9. PORTER, P. & SINGLETON, A.G. The degradation of lignin and quantitative aspects of ruminant digestion. *British Journal of Nutrition*. 25: 3. 1971.
10. TALMADGE, K.W., KEEGSTRA, K., BANER, W.D. & ALBERSHEIM, P. The structure of plant all walls. I. The macromolecular components of the walls of suspension-cultured sycamore cells with a detailed analysis of the pectic polysaccharides. *Plant physiology*. 51: 158. 1973.
11. VAN SOEST, P.J. Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. II. A rapid method for the determination of fiber and lignin. *Journal of Association of Official Agriculture Chemistry (J.A.O.A.C.)* 46: 829. 1963.
12. VAN SOEST, P.J. Symposium on nutrition pastures: New Chemical procedures for evaluating forages. *Journal of Animal Science* 23: 838. 1964.
13. VAN SOEST, P.J. Plant fiber and its role in herbivore nutrition. *Cornell Veterinarian*. 67: 307. 1977.
14. VAN SOEST, P.J. & MC QUEEN, R.W. The chemistry and estimation of fiber. *Proceeding Nutrition Society*. 32: 123. 1973.
15. VAN SOEST, P.J. & WINE, R.H. Determination of lignin and cellulose in acid detergent fiber with permanganate. *Journal Association of Official Agriculture Chemistry (J.A.O.A.C.)* 51: 780. 1968.
16. WESTON, R.H. & HOGAN. The digestion of pastured plants by sheep. V. studies with subterranean and berseem clovers. *Australian Journal of Agriculture Research* 22: 139. 1971.