

DETERMINACION DE LIGNINA, CELULOSA Y SILICE (CENIZAS INSOLUBLES) POR  
PERMANGANATO

PRINCIPIO.

Un método directo para la determinación de la lignina por medio del permanganato, permite la determinación de la celulosa y cenizas insolubles también. La determinación de cenizas insolubles es una manera de estimar el contenido de sílice que en muchos forrajes, es factor sobresaliente en la reducción de la digestibilidad. El método de lignina por permanganato presenta una alternativa al método del ácido sulfúrico al 72%. Considerando que cada uno tiene sus propias ventajas, la escogencia del método depende de las muestras que se van a analizar y el uso que se le destine a los resultados.

Las ventajas del método por permanganato sobre el método del ácido sulfúrico al 72% pueden resumirse en los siguientes puntos:

1. El procedimiento es más corto.
2. Los reactivos son menos corrosivos y no exigen normalización.
3. Los resultados están menos afectados por el daño que sufre la muestra debido al calor de los aparatos empleados y por consiguiente, se aproximan más al verdadero valor de contenido en lignina.

Sin embargo, la cutina que es una fracción muy importante en muchas de las cubiertas exteriores de las semillas, no se determina con este método. Una

variación que se introduce en estos casos, es la de preparar el permanganato para celulosa y tratar la muestra con ácido sulfúrico al 72% y asbestos, por espacio de 3 horas. Este procedimiento resulta en el fraccionamiento de la lignina cruda en las dos fracciones descritas seguidamente.

Una desventaja que se le puede atribuir al método por permanganato, es que las partículas de mayor tamaño no las penetran completamente los reactivos y por lo tanto en estos casos, los resultados dan valores bajos. En consecuencia, los materiales con alto contenido de humedad deberán secarse parcialmente y molerse a través de un tamiz de 1 mm para reducir el tamaño de las partículas. Este método por lo tanto no es adecuado para heces y forrajes frescos que han sido molidos en un molino para carnes, cuya forma física es inapropiada. Debido a la posibilidad de dañar la muestra con calor, es preferible usar ácido sulfúrico al 72% para determinar lignina.

#### TEORIA DEL METODO.

Los materiales que interfieren con la determinación, se separan con la preparación de la fibra ácido-detergente que está compuesta principalmente por lignina, celulosa y minerales insolubles. La lignina se oxida con una solución de ácido acético amortiguada con permanganato de potasio conteniendo hierro trivalente y plata monovalente como catalíticos. Los óxidos de manganeso y hierro que se depositan, se disuelven con una solución alcohólica de ácido oxálico é hidrociorhídrico, permanenciando la celulosa y los

minerales insolubles. El contenido de lignina se determina en base a la pérdida de peso de la muestra, ocasionado por los tratamientos a que ha sido sometida; mientras que la celulosa se determina en base en la pérdida de peso de la muestra al ser incinerada. El residuo de cenizas consiste principalmente de sílice y gran parte del material no silicato residual, puede eliminarse por medio del lavado con ácido hidrobrómico concentrado.

#### EQUIPO.

1. El mismo que se emplea en la determinación de lignina ácido detergen te.

#### REACTIVOS.

1. Permanganato de potasio saturado. Disuelva 50 g de  $\text{KMnO}_4$  grado de reactivo por litro de agua destilada o 900 g  $\text{KMnO}_4$  para un volumen de 18 litros de agua destilada. Manténgase la solución protegida de la luz solar directa.
2. Solución buffer de lignina. Para preparar un litro de solución, disuelva 6.0 g de nitrato férrico nonahidratado ( $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ ) y 0.15 g de nitrato de plata en 100 ml de agua destilada. Combine esta mezcla con 500 ml de ácido acético glacial y 5.0 g de acetato de potasio (grado de reactivo). Agregue 400 ml de alcohol butílico terciario

./.

(grado de reactivo) y mézclase la solución. Para preparar 12 litros se emplean las siguientes cantidades de reactivos:

- Nitrato férrico nonahidratado	72.0 g
- Nitrato de plata	1.8 g
- Acido acético	6.0 litros
- Acetato de potasio	60.0 g
- Alcohol butílico terciario	4.8 litros
- Agua destilada	1.2 litros

3. Solución de permanganato combinada. Antes de ser usada, combine y a la vez mezcle la solución de permanganato de potasio saturada con la solución buffer de lignina en la relación de 2:1 por volúmen. La porción no utilizada de esta mezcla puede mantenerse por una semana en refrigeración en ausencia de luz. Esta solución puede utilizarse si mantiene el color morado y está libre de precipitado.
4. Solución desmineralizadora. Para cada litro de solución, disuelva 50 g de ácido oxálico dihidratado en 700 ml de alcohol etílico de 95%. Agregue 50 ml de ácido hidrociorhídrico concentrado (aproximadamente 12 N) y 250 ml de agua destilada y luego mézclase. Para preparar 18 litros se emplean las siguientes cantidades de los reactivos:

./.

Acido oxálico	900 g
Etanol 95%	12.6 Litros
Acido hidrociorhídrico conc.	900.0 mililitros
Agua destilada	4.5 litros

5. Alcohol etílico de 80%. Para un litro mezcle 155 ml de agua destilada y 845 ml de alcohol etílico de 95%. Para preparar 18 litros mezcle 2.8 litros de agua destilada y 15.2 litros de alcohol etílico de 95%.
6. Acido hidrobromico, grado de reactivo.

#### PROCEDIMIENTO.

1. El residuo de la determinación de fibra por el método ácido detergente puede utilizarse (aplicando el peso original de la muestra). Si no se usa este residuo, se deben seguir los pasos 2, 3 y 4 a continuación.
2. Pese aproximadamente un gramo de muestra que haya sido previamente molido a través de un tamiz de 1 mm. Si la muestra tuviera más de 15% de lignina, use 0.5 g.
3. Se coloca el crisol en un horno de incineración a 500°C por espacio de una hora o más y luego se enfría en desecador y se pesa.
4. Prepare la fibra ácido detergente de acuerdo al procedimiento descrito

./.

en la determinación de fibra por el método ácido-detergente.

5. Coloque los crisoles que contienen la fibra ácido detergente en una bandeja de vidrio de poca profundidad que tenga aproximadamente una capa de 1 cm de espesor de agua fría. La fibra dentro de los crisoles no se debe mojar.
6. Agréguele a los crisoles aproximadamente 25 ml de la solución combinada de permanganato de potasio sin llenarlos demasiado. Ajuste el nivel del agua en la bandeja a manera de reducir la corriente de paso de la solución a través de los crisoles. Coloque una varilla corta de vidrio en cada crisol, con el objeto de revolver su contenido, deshacer los grumos y bañar todas las partículas que se adhieren a las paredes internas del crisol con la solución de permanganato.
7. Permítase a los crisoles permanecer  $90 \pm 10$  minutos a temperatura de 20 a 25°C agregando si fuera necesario, una cantidad adicional de la solución combinada de permanganato. Hay que recordar que el color morado lo debe conservar constantemente.
8. Traslade los crisoles al dispositivo de filtración y filtre toda la porción líquida remanente. No se lave la muestra. Coloque seguidamente los crisoles en bandejas limpias de vidrio o porcelana y llénelos hasta la mitad con la solución desmineralizadora. Después de transcurridos unos 5 minutos, filtre la porción líquida remanente y

./.

vuélvase a llenar hasta la mitad con la misma solución. Se debe tomar la precaución de evitar el derrame debido a la producción de espuma. Repita la adición de la solución desmineralizadora por tercera vez si se nota que el filtrado del segundo tratamiento se encuentra de color café oscuro. Lave las paredes internas de los crisoles con una corriente fina de la solución desmineralizadora contenida en una botella de lavado por compresión, hasta que el color de la fibra sea el blanco. El tiempo total necesario en este paso es de 20 a 30 minutos.

9. Llene y lave el contenido de los crisoles con alcohol etílico de 80%; fíltrelo y repita este lavado por dos veces consecutivas.

Lave y filtre la muestra dos veces también con acetona, de igual manera que se hizo con el alcohol.

#### PARA OBTENER EL CONTENIDO DE LIGNINA.

Seque los crisoles durante la noche a 105°C de temperatura, luego déjense enfriar en un desecador y péselos. El contenido de lignina se calcula en base a la pérdida en peso original de la fibra obtenida por el método ácido detergente.

#### PARA OBTENER EL CONTENIDO DE CELULOSA.

Incínere la muestra procedente de la determinación de lignina a 500°C durante 3 horas; déjese enfriar en un desecador y pésela. La pérdida de

peso equivale al contenido de celulosa.

PARA OBTENER EL CONTENIDO DE SILICE.

Se puede obtener un valor supuesto del contenido de sílice mediante la percolación del residuo de ceniza en los crisoles, con ácido hidrobromico concentrado (48%) hasta que todo el color haya desaparecido. (La muestra que se usa en este caso es el residuo de cenizas obtenido anteriormente en la determinación de celulosa). Se lava la muestra con acetona y se filtra. Luego se incinera a 500°C por 3 horas, se enfría en desecador y se pesa. (Este paso no es necesario si el residuo de ceniza es menor del 2% de la muestra original).

PRECAUCIONES.

1. Los crisoles que contienen la fibra con un contenido alto a su vez en lignina, necesitarán una mayor cantidad de la solución de permanganato, pero evite el uso de cantidades innecesarias.
2. La aparición de un color amarillo o café es indicativo de que el permanganato se ha agotado.
3. Si el crisol está lleno, filtre la solución con ayuda del vacío y agréguele más solución.
4. Si persiste un color amarillo después de haber tratado la fibra con

./.

la solución desmineralizadora, ello es indicativo de una remoción in completa de la lignina. Esto ocurre únicamente en materiales con un alto contenido de lignina.

5. La cutina presente en algunas cubiertas de semillas y otras plantas, no se oxida con el permanganato y por lo tanto no aparece como parte de la fracción de lignina, ni se blanquea con los tratamientos.
6. Las cubiertas de las semillas aparecen como manchas o vetas de colores entre las partículas de celulosa y no deben confundirse con un proceso de oxidación incompleta.
7. Un exceso en el uso y por lo consiguiente en el paso de la solución de permanganato a través de los crisoles debe evitarse cuando se trata de muestras con un contenido bajo de lignina; principalmente con los pastos tiernos o inmaduros en cuyo caso, una sóla aplicación de permanganato es suficiente. La fibra en los pastos inmaduros es rápidamente deslignificada y por lo tanto, existe el peligro de una pérdida de los carbohidratos contenidos en la celulosa, si se usa un exceso de la solución.
8. Se puede obtener una disminución en el tiempo de paso de la solución a través del crisol mediante el ajuste del nivel de agua en la bandeja, regulándolo a una altura casi igual a la que tiene la solución dentro del crisol.

./.

9. Las precauciones descritas anteriormente no es necesario tomarlas al usar la solución desmineralizadora.

CALCULOS.

Porcentaje de lignina en base "parcialmente seco" ó "tal como ofrecido":

$$\frac{(\text{peso fibra ácido detergente} - \text{peso residuo de fibra por permanganato}) \times 100}{\text{peso de la muestra antes de la determinación de fibra ácido detergente}}$$

Porcentaje de celulosa en base "parcialmente seco" ó "tal como ofrecido":

$$\frac{(\text{peso del crisol} + \text{residuo de fibra por permang.} - \text{peso crisol y ceniza}) \times 100}{\text{peso de la muestra antes de la determinación de fibra ácido detergente}}$$

Porcentaje de sílice en base "parcialmente seco" ó "tal como ofrecido":

$$\frac{(\text{peso de la ceniza después del lavado con ácido hidrobrómico})}{\text{peso de la muestra antes de la determinación de fibra ácido detergente}} \times 100$$

Ajuste a base seca (lignina, celulosa ó sílice):

$$1. \frac{\% \text{ analizado en muestra "tal como ofrecido"}}{\% \text{ de materia seca en muestra "tal como ofrecido"}} \times 100$$

ó

$$2. \frac{\% \text{ analizado en muestra "parcialmente seco"}}{\% \text{ de materia seca en muestra "parcialmente seco"}} \times 100$$