REVISTA DE LA FACULTAD DE AGRONOMIA Y VETERINARIA DE BUENOS AIRES
16 (Entrega III): 27-35 Dic. 1966

543:547.458.84: 633.2/3

Contribución al estudio analítico del complejo ligno-celulósico y lignina en pasturas

POR

Dr. EUGENIO E. VONESCH* e Ing. Agrón. MARIA H. C. K. DE RIVEROS (**)

Desde el punto de vista del análisis forrajero se considera fibra a los componentes de las estructuras vegetales, la que se halla integrada por celulosa, hemicelulosa, lignina, pectina, elementos minerales y cantidades menores de compuestos nitrogenados. La técnica analítica establecida por Weende hace más de un siglo, no ha sido modificada sustancialmente. Subsisten las limitaciones para el correcto conocimiento químico de los distintos componentes, así como el de su utilización por el organismo animal. Sobre el tema existe una apreciable literatura relacionada con la fibra y el extractivo no nitrogenado, entidades éstas incorrectamente definidas desde el punto de vista químico-nutricional, pero no por ello dejado de utilizar en la práctica. La distribución de los distintos componentes celulares en fibra y extractivo no nitrogenado y el cálculo de este último por diferencia de la suma de los demás constituyentes, es otra causa de error. El complejo ligno-celulósico expresado como fibra, presenta características propias no sólo para las diferentes especies, sino también para los distintos períodos vegetativos. En cuanto a la lignina, ha sido estudiada preferentemente en maderas y materiales similares, más que en las forrajeras.

Entre las modificaciones propuestas para la determinación de fibra y lignina; algunos procedimientos sugieren separar la fibra de la lignina, por atribuir a esta última poca o ninguna digestibilidad y ejercer además una influencia negativa en la utilización de la pastura.

(*) Profesor de Química Biológica.
(**) Investigadora de la cátedra de Química Biológica.
Trabajo realizado con subsidio de CAFPTA.

El presente estudio se inició por la falta de reproducibilidad y concordancia en las determinaciones efectuadas en nuestros ensayos con la técnica de Gaillard (7); y motivó verificar la influencia de la prehidrólisis sulfúrica en las diferentes pasturas con distinto grado de lignificación, que las hace desigualmente resistentes a la hidrólisis ácida.

Parte experimental

Se examinaron las siguientes pasturas: De origen norpatagónico, dos gramíneas: Imperata condensata y Agrostis leptotricha, recolectadas en octubre y enero de 1959 respectivamente. De la zona bonaerense, seis gramíneas y una leguminosa: Stipa neesiana y Hordeum stenotachys, recolectadas en noviembre de 1962; Paspalum dilatatum (cañas), Paspalum dilatatum (hojas), Paspalum distichum y Bromus unioloides, de marzo de 1963 y Medicago sativa de abril de 1963.

La técnica de valoración del complejo lignocelulósico y de lignina se basó en el método indicado por Gaillard (7); tomando en cuenta las indicaciones de Fisher (6).

La marcha analítica seguida se detalla a continuación:

1.ª Parte: *Valoración del complejo lignocelulósico.*

1) Preparación de la muestra: Presecado a 60-70°C. y molienda en molino Labconco a finura máxima.

2) Desecación a 60-70°C. hasta constancia de peso.

3) Extracción con solvente: etanol-benceno (1:2), en extractor de grasas Goldfish por 4 ½ a 5 horas.

4) Proteolisis con pepsina clorhídrica al 0,5 % por 16 horas a 40°C.

5) Prehidrólisis en extractor de fibra-Laboratory Construction- a reflujo con ácido sulfúrico al 5 % por 2, 3 y 4 horas a fin de ajustar el tiempo de hidrólisis sobre los resultados en lignocelulosa.

6) Filtración, lavado y secado con alcohol y éter etílico.

7) Desecado del residuo ligno-celulósico a 70°C. hasta constancia de peso y posterior pesada.

2.ª Parte: *Determinación de lignina.*

8) Hidrólisis principal del complejo ligno - celulósico con ácido sulfúrico al 72 % por dos horas a 18°C. ± 2°C.

9) Hidrólisis final con ácido sulfúrico al 3 % por dos horas a reflujo.

10) Filtrado por papel y lavado.

11) Desecado a 70°C. y pesado: lignina más cenizas.

12) Calcinado a 500°C. y pesado.

13) Corrección de la lignina por descuento de cenizas.

14) Corrección de los resultados de ligno-celulosa y de lignina a muestra original.

En la marcha analítica seguida se observó la acción importante y decisiva de la prehidrólisis sulfúrica, como la posible causa de las inconstancias y variaciones anotadas. Cabe destacar que ninguno de los autores consultados hace mención sobre este inconveniente; posiblemente por haber operado con pasturas «blandas» más facilmente hidrolizables. Por esta razón las técnicas por ellos indicadas, no resultan aplicables para pasturas fuertemente incrustadas, como es el caso particular de algunas provenientes de la zona norpatagónica. Se varió el tiempo de hidrólisis llevándolo de 2 a 3 y 4 horas

Con el aumento del tiempo de hidrólisis a 3 horas se obtuvieron mejores resultados, con disminución de la dispersión en la mayoría de los casos. Corresponde también señalar que con 4 horas de hidrólisis se producen reacciones de condensación y humificación que elevan los valores.

Los resultados de determinaciones realizadas se detallan en el cuadro N.° 1, y en los N.° 2 y 3 se dan los valores máximos, medios y mínimos, y la desviación standard, aun cuando en algunas especies el número de valoraciones fue limitado debido al escaso material disponible. En los gráficos N.° 1 y 2 se dan en forma comparativa los valores extremos y medios obtenidos con 2 y 3 horas de prehidrólisis sulfúrica.

Conclusiones

El complejo ligno-celulósico de las pasturas presenta distinta resistencia a la hidrólisis sulfúrica, la que es atribuible a su forma de incrustación y estructura físico-química.

Determinadas especies requieren una prehidrólisis más prolongada, que el lapso de 2 horas aconsejado en las técnicas.

El aumento del tiempo de prehidrólisis superior a 4 horas ocasiona procesos de condensación y humificación que elevan los resultados.

El período óptimo de prehidrólisis de 3 horas, permite obtener resultados más concordantes y uniformes. Los mejores resultados en las valoraciones de ligno-celulosa, se refleja también en las determinaciones de lignina.

Si bien las diferencias entre 2 y 3 horas de prehidrólisis sulfúrica en algunos casos no son muy significativas, con 3 horas se obtienen valores más constantes con menor dispersión.

Resumen

Se propone una modificación a la técnica de valoración del complejo ligno-celulósico y lignina, basado en el aumento del tiempo de prehidró-

lisis sulfúrica, lo que permite obtener resultados más concordantes y una menor dispersión.

SUMMARY

A modification to the estimation technique of the ligno-cellulosic complex a well as lignin is proposed, based on the increase time of sulphuric prehydrolisis, which permits to obtain better results with minor dispersion.

BIBLIOGRAFIA

1. ARMITAGE, E. R., ASHWORD, R. DE B. y FERGUSON, W. S., 1948. *The determination of lignin in plant material of high protein content. J. Soc. Chem. Ind.* 67:421.
2. BALCH, D. A., BALCH, C. C. y ROWLAND, S. J. 1954. *The influence of the method of the determination of lignin on the lignin-ratio technique for digestibility in the cow. J. Sci. Food. Agr.* 5:584.
3. CRAMPTON, E. W. y MAYNARD, L. A. 1938. *The relation of cellulose and lignin content to the nutritive value of animal feeds. J. Nutr.* 15:383.
4. DERIAZ, R. E. 1962. *Routine analysis of carbohydrates and lignin in herbage. J. Sci Food Agr.* 12:152.
5. ELLIS, G. H., MATRONE, G. y MAYNARD, L. A. 1946. *A 72 percent SO^4H^2 method for the determination of lignin and its use in animal nutritio studies. J. Anim. Sci.* 5:285.
6. FISHER, H. 1961. *Quantitative determination of lignin in hay.* Acta Agriculturoe Scandinavica, Supplementum 10. Stockholm.
7. GAILLARD, B. D. E. 1958. *A detailed summative analysis of the crude fibre and nitrogen-free extractives fractions of roughages. I. Proposed scheme of analysis. J. Sci. Food. Agr.* 9:170.
8. GAILLARD, B. D. E. 1958. *A detailed summative analysis fo the crude fibre and nitrogen-free extractives fractions of roughages. II. The analysis of straw, hay, grass and mangold. J. Sci. Food Agr.* 9:346.
9. GAILLARD, B. D. E. 1962. *The relationship between cell-wall constituents of roughages and the digestibility of the organic matter. J. Agr. Sci.* 59:369.
10. JARRIGE, R. 1960. *The membrane constituents of herbage. Procc. fo the eight Int. Grassland. Cong.* Paper 813/5: 628.
11. JONES, D. I. H. y GRIFFITH, G. 1962. *Normal acid fibre method for evaluating roughages. Nature* 193:882.
12. MOON, F. E. y ABOU-RAYA, A. K. 1952. *The lignin fractions of animal feedingstuffs. I. Preliminary examination of lignin. Determination procedures. J. Sci. Food Agr.* 3:399.
13. MOON, F. E. y ABOU-RAYA, A. K. 1952. *The lignin fractions of animal feedingstuffs. II. Investigation of lignin determination procedures. Development of a method for acid-insoluble lignin. J. Sci. Food. Agr.* 3:407.
14. MOON, F. E. y ABOU-RAYA, A. K. 1952. *The lignin fractions of animal feedingstuffs. III. The determination of total lignin. J. Sci. Food. Agr.* 3:595.
15. SULLIVAN, J. T. 1955. *Cellulose and lignin in forage grasses and their digestion coefficients. J. Anim. Sci.* 14:170.
16. SULLIVAN, J. T. 1959. *A rapid method for the determination of acid-insoluble lignin in forages and its relation to digestibility. J. Anim. Sci.* 18:1292.
17. THACKER, E. J. 1954. *A modified lignin procedure. J. Anim. Sci.* 13:501.
18. THOMAS, B. y ARMSTRONG, D. G. 1949. *A study of some methods at present used for the determination of lignin. J. Agric. Sci.* 39:335.
19. TOMLIN, D., JOHNSON, R. R. y DEHOROTY, B. A. 1965. *Relationship of lignification to in vitro cellulose digestibility of grasses and legumes. J. Anim. Sci.* 24:161.
20. VAN SOEST, P. J. 1962. *The use of detergents in the analysis of fibrous feeds. II.A rapid method for the determination of fiber and lignin. J. Assoc. Agric. Chem.* 46:829.
21. WHITEHEAD, D. L., y QUICKE, G. V. 1964. *A comparison of six methods of estimating lignin in grass hay. Sci. Food. Agr.* 15:417.

CUADRO N.º 1

Prehidrólisis controlada del complejo ligno-celulósico en función del tiempo con SO_4H_2 al 5 %

Ligno-celulosa % s/s/s.		Lignina % s/s/s.		Ligno celulosa % s/s/s.		Lignina % s/s/s.		Ligno-celulosa % s/s/s.			Lignina % s/s/s.		
2 h	3 h	2 h	3 h	2 h	3 h	2 h	3 h	2 h	3 h	4 h	2 h	3 h	4 h
Paspalum dilatatum (hojas)				Hordeum stenotachys				Paspalum dilatatum (cañas)					
47,8	45,4	7,2	7,5	43,3	41,3	7,8	6,9	53,6	39,4	42,7	6,0	5,7	6,3
49,5	44,9	9,3	7,3	45,5	43,2	6,8	8,1	45,6	38,5	41,1	8,5	4,5	5,4
45,5	45,7	7,2	6,9	42,5	43,7	7,3	7,8	41,8	39,3	42,1	9,1	4,9	6,8
47,0	41,3	6,8	6,5	43,9	41,4	8,8	7,6	42,2	40,8	43,2	8,2	4,9	6,1
45,6	44,1	7,2	7,0	39,1	37,5	5,8	5,7	43,2	41,5	42,9	9,1	5,5	6,7
46,5	43,6	7,1	6,9	39,2	37,6	5,6	5,5	42,8		40,7	8,5		
45,2	44,6	7,8	7,3	39,0		7,2							
44,9	45,1	7,7		40,3		8,1							
48,4				42,6		7,7							
46,7				42,9		6,6							
Imperata condensata				Stipa neesiana				Medicago sativa					
42,5	41,3	9,3	9,5	47,7	46,7	7,8	7,8	21,2	23,5	25,5	2,4	4,6	3,7
42,8	42,3	9,4	9,1	46,9	47,6	7,1	7,0	22,3	26,0	28,1	2,3	4,3	4,5
41,3	42,2	10,4	9,7	49,5	42,2	8,1	8,6	21,9	24,0	26,1	2,6	5,3	3,2
39,2	42,8	10,5	9,8	41,5	42,9	7,1	8,4	22,5	25,1	25,5	2,1	3,0	3,8
41,5	41,3	10,6	9,5	43,5	43,0	8,2	6,8	21,6	26,1	27,5	5,5	5,5	3,2
42,6	41,3	11,6	9,5	47,4	43,1	7,8	7,0	22,9	26,1		4,7	3,9	
42,0	41,3	9,3	9,7	47,1	41,7	8,2	6,2	24,9	26,3		2,9	3,3	
41,4	42,7	12,4	9,7	44,5	41,6	6,4	6,4	24,6	25,9		3,9	4,2	
40,7	42,2	10,8	9,1	40,0		7,5		27,0	26,5		3,1	3,5	
40,5	42,8	11,2	9,4	43,6		7,2		33,2			3,4		
41,4	40,3	11,5	10,0	47,1		8,2		25,1			4,0		
42,5	41,6	10,6	9,5	44,5		6,4		23,7			6,3		
42,8	41,1	10,5	9,0										
41,3	41,6	10,4	9,3										
Bromus unioloides				Agrostis leptotricha				Paspalum distichum					
35,7	35,2	5,7	4,8	46,4	30,2	6,2	4,0	32,0	31,3	32,7	3,1	2,1	4,0
36,1	35,9	4,7	4,7	39,0	29,1	6,2	3,7	33,1	31,7	32,8	3,1	2,2	3,1
37,0	35,7	5,2	4,0	40,5	33,7	7,0	4,7	33,8	31,1	33,4	3,7	2,2	3,7
34,6	34,0	5,4	5,0	46,1	34,1	5,9	3,9	34,1	31,9	34,4	3,9	2,5	3,9
36,7	35,0	5,7	4,8	43,0	32,8	6,2	4,5	33,6	31,5	33,6	3,2	2,4	3,2
35,7	34,3	5,2	4,9	44,3	32,1	7,0	4,2			33,8			3,6
35,8	35,5												
36,3	34,9												

CUADRO N.º 2

Prehidrólisis controlada del complejo ligno-celulósico en función del tiempo con SO_4H_2 al 5 %

Nombre científico	Hidrólisis tiempo	N.º de análisis	Ligno-celulosa % s/s/s.			
			Máx.	Media	Mín.	S.
Paspalum dilatatum (hojas)	2 horas	10	49,5	46,7	44,9	1,50
	3 »	8	45,7	44,3	41,3	1,40
Hordeum stenotachys	2 »	10	45,5	41,8	39,0	2,51
	3 »	6	43,7	40,8	37,5	2,67
Paspalum dilatatum (cañas)	2 »	6	53,6	44,9	41,8	4,48
	3 »	5	41,5	39,9	38,5	1,21
	4 »	6	43,2	42,1	40,7	1,01
Imperata condensata	2 »	14	42,8	41,6	39,2	1,02
	3 »	14	42,8	41,8	40,3	0,74
Stipa neesiana	2 »	12	49,5	45,3	40,0	3,37
	3 »	8	47,6	43,6	41,6	2,27
Medicago sativa	2 »	12	32,2	24,2	21,2	3,30
	3 »	9	26,5	25,5	23,5	1,06
	4 »	5	28,1	26,5	25,5	1,14
Bromus unioloides	2 »	8	37,0	36,0	34,6	0,73
	3 »	8	35,7	35,1	34,0	0,66
Agrostis leptotricha	2 »	6	46,4	43,2	39,0	2,98
	3 »	6	34,1	32,0	29,1	1,97
Paspalum distichum	2 »	5	34,1	33,3	32,0	0,82
	3 »	5	31,9	31,5	31,1	0,32
	4 »	6	34,4	33,4	32,7	0,64

CUADRO N.º 3

Prehidrólisis controlada del complejo ligno-celulósico en función del tiempo con SO_4H_2 al 5 %

Nombre científico	Hidrólisis tiempo	N.º de análisis	Lignina % s/s/s.			
			Máx.	Media	Mín.	S.
Paspalum dilatatum (hojas)	2 horas	8	9,3	7,5	6,8	0,78
	3 »	7	7,5	7,1	6,9	0,34
Hordeum stenotachys	2 »	10	8,8	7,2	5,6	1,00
	3 »	6	8,1	6,9	5,5	1,10
Paspalum dilatatum (cañas)	2 »	5	9,1	8,2	6,0	1,15
	3 »	6	5,7	5,1	4,5	0,49
	4 »	6	6,8	6,3	5,4	0,56
Imperata condensata	2 »	14	12,4	10,6	9,3	0,89
	3 »	14	10,0	9,5	9,0	0,28
Stipa neesiana	2 »	12	8,2	7,5	6,4	0,66
	3 »	8	8,6	7,3	6,2	0,89
Medicago sativa	2 »	12	6,3	3,6	2,1	1,30
	3 »	9	5,5	4,2	3,0	0,86
	4 »	5	4,5	3,7	3,2	0,54
Bromus unioloides	2 »	6	5,7	5,3	4,7	0,37
	3 »	6	5,0	4,7	4,0	0,35
Agrostis leptotricha	2 »	6	7,0	6,4	5,9	0,46
	3 »	6	4,7	4,2	3,7	0,38
Paspalum distichum	2 »	5	3,9	3,4	3,1	0,37
	3 »	5	2,5	2,3	2,1	0,16
	4 »	6	4,0	3,6	3,1	0,37

GRAFICO Nº 1

DETERMINACION COMPARATIVA DEL COMPLEJO LIGNOCELULOSICO EN RELACION CON EL TIEMPO DE PREHIDROLISIS
Valores máximos, medios y mínimos

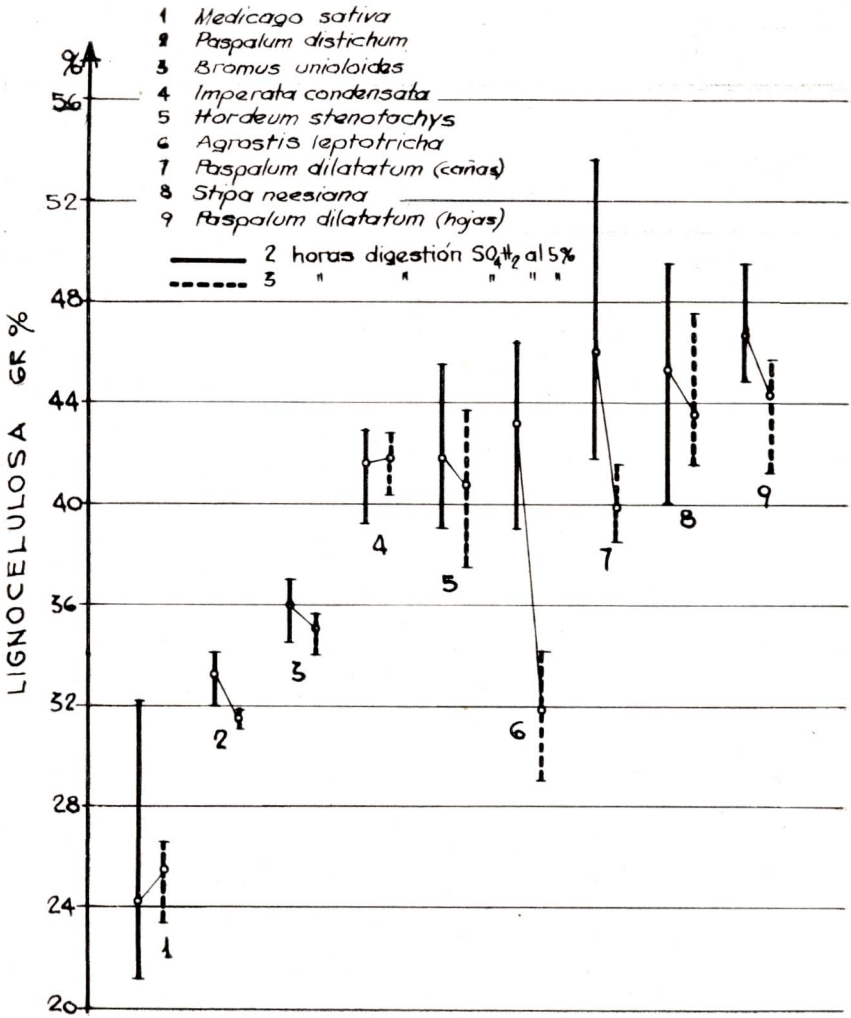
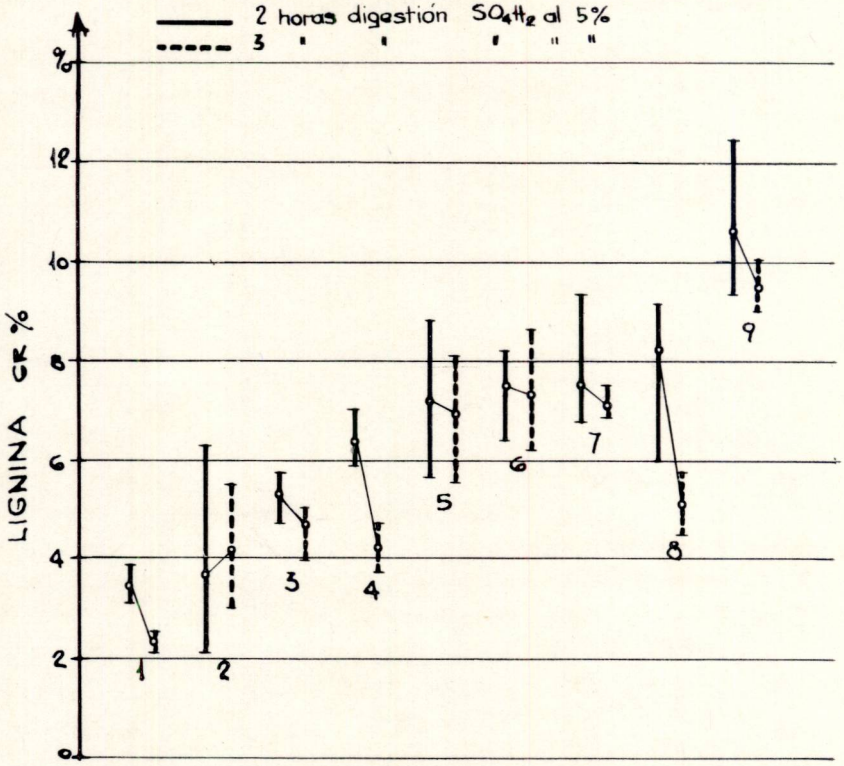


GRAFICO Nº 2

DETERMINACION COMPARATIVA DE LIGNINA INSOLUBLE EN RELACION CON EL TIEMPO DE PREHIDROLISIS

Valores máximos, medios y mínimos

1 *Paspalum distichum*
2 *Medicago sativa*
3 *Bromus unioloides*
4 *Agrostis leptotricha*
5 *Hordeum stenotachys*
6 *Stipa neesiana*
7 *Paspalum dilatatum (hojas)*
8 *Paspalum dilatatum (cañas)*
9 *Imperata condensata*