

DETERMINACIÓN RÁPIDA DE LIGNINA EN EFLUENTES DE MATADEROS

María Teresa DERREGIBUS

Instituto de Ingeniería Química, Facultad de Ingeniería, Julio Herrera y Reissig 565, Montevideo, Uruguay
E-mail dregibus@fing.edu.uy

(Recibido noviembre 1996, aceptado noviembre 1997)

Palabras clave: análisis de lignina, efluentes, mataderos

RESUMEN

Se presenta un método analítico para determinar rápidamente lignina en muestras de pequeño volumen provenientes de efluentes de mataderos. El método permite determinar también diversos residuos: sólidos, de extracción y fijos, así como analizar azúcares reductores.

ABSTRACT

This work presents an analytical method to quickly determine lignin in small volume samples collected from slaughterhouse wastewater. This method also allows the detection of solids, extraction and fixed residues and the analysis of reducing sugars.

INTRODUCCIÓN

Los efluentes de los mataderos resultan de los procesos de desangrado, desosado, mondontería, tripería y lavado de corrales. La mezcla de las distintas líneas produce un efluente complejo que contiene proteínas, compuestos lignocelulósicos y grasa. Dado el tenor de materia orgánica que presenta, los sistemas biológicos anaerobios son los más apropiados para su tratamiento, pero el alto contenido de compuestos sólidos de tipo lignocelulósico, que puede alcanzar al 25% en peso según Colberg (1988), ocasiona problemas operativos, especialmente en reactores anaerobios de alta velocidad (Martínez *et al.* 1995). Los compuestos lignocelulósicos son resistentes al ataque bacteriano por la presencia de lignina y como consecuencia de su lenta biodegradación son retenidos en los reactores de biomasa dispersa, diluyendo la biomasa activa.

El estudio de reactores que mejoren la degradación de estos compuestos requiere el establecimiento de técnicas analíticas que permitan determinar rápidamente el contenido de lignina y carbohidratos en el material particulado en las corrientes de entrada y salida del reactor, para controlar el proceso de degradación parcial de los diferentes componentes del residuo sólido. De esta manera, se podrán ajustar el diseño y la operación del reactor para mejorar dicha degradación.

Existe abundante bibliografía referente a la determinación de lignina asociada con métodos para obtener carbohidratos. Después de un proceso de extracción, la muestra es tratada con un ácido fuerte; así la celulosa se hidroliza y solubiliza

(Giger y Pochet 1987) y queda un residuo insoluble de lignina ya que su estructura condensada impide su hidrólisis. Por acción de los ácidos fuertes se produce la ruptura de los compuestos lignocelulósicos en los que hemicelulosas y lignina forman una matriz macromolecular que rodea a la celulosa protegiéndola contra el ataque bacteriano (Lee 1992) ya mencionado pero que también interfiere en su hidrólisis total.

La acción de ácidos concentrados sobre la lignina puede solubilizarla parcialmente, reprecipitando por dilución; este proceso de solubilización-reprecipitación está sujeto a discusión ya que como indica Van Soest (1994), algunos investigadores plantean que no sería la lignina la que se disolvería sino otros compuestos fenólicos de menor peso molecular también presentes. El sólido residual puede estar formado no solamente por lignina, en particular algunos métodos pueden producir algún tipo de residuo sólido (artifacts).

Giger y Pochet (1987) indican que ocurre reprecipitación de la "lignina ácido soluble" si se diluye después del tratamiento con ácido concentrado. La hidrólisis en medio ácido diluido permite a su vez, la disolución de la hemicelulosa y de las sustancias pécticas. Todo lo antedicho beneficia la determinación gravimétrica de la lignina y garantiza la reprecipitación de la lignina soluble. Es decir, que por la acción sucesiva de ácido concentrado y diluido se llega a romper la estructura de los compuestos lignocelulósicos, permaneciendo la lignina en estado sólido e hidrolizándose el resto.

Aparecen como métodos más apropiados para el análisis de efluentes, el de Effland (1977) que, aunque referido a madera y

pulpa de madera, usa muestras de 200 a 300 mg y el de Kraus y Marlett (1990) que también trabajan con muestras del orden de los 100 mg en determinaciones en materia fecal. En ambos casos, hay una etapa previa de extracción que permite eliminar parte de las interferencias de la matriz tales como la materia fecal o compuestos nitrogenados que contribuyen a aumentar el residuo de lignina; presenta el inconveniente de que extrae cierta cantidad de azúcares neutros, pero los autores que lo han estudiado consideran que se mantiene dentro de valores aceptables.

La lignina también puede ser analizada por métodos instrumentales de análisis pero cabe aclarar que el término "lignina" no se refiere a un solo compuesto químico, sino a una serie de grandes moléculas poliméricas estructuralmente semejantes. Esto significa que esos métodos sólo pueden aplicarse en caso de contarse con una "lignina patrón".

En este trabajo se presenta un método para la determinación de lignina relativamente rápido, simple y para muestras pequeñas, que permite además determinar celulosa bajo la forma de sus productos de hidrólisis por procedimientos ya conocidos como se indica más adelante.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizaron ensayos preliminares, buscando el tipo de extracción más adecuado para la eliminación de los interferentes arriba mencionados. En el caso de la realizada con etanol-benceno (1:2 en volumen) recomendada por Effland (1977), el porcentaje de extracción fue de 46% mientras que con ácido acético-acetato de etilo (1:1 en volumen) propuesto por Kraus y Marlett (1990), fue de 40%. Tal como indican Giger y Pochet (1987), el mayor porcentaje de sólido extraído, se debe a la solubilización parcial de la lignina por la utilización de alcohol en caliente. Además en el primer caso, el residuo queda aún fuertemente teñido cuando la extracción parece estar finalizada. Se opta entonces, por la extracción con ácido acético y acetato de etilo.

Para la determinación de lignina y ante la imposibilidad de realizar liofilizaciones, se eligió la técnica de Kraus y Marlett (1990) modificada.

Debe realizarse también la corrección de cenizas (presencia de sílice) sobre el precipitado, porque de otra manera serían incluidas como lignina.

Procedimiento operativo

La suspensión que se va a analizar se trata de manera intensa con agitador magnético. Se toman 50 ml y se centrifugan a velocidad 7 (máxima) durante 15 min. Se tira el líquido sobrenadante. Se trasvasa a una cápsula pesada, se seca en baño de agua a ebullición (BM) y luego en estufa a 105°C, se pesa: **residuo sólido**. Se humedece bien el residuo y se arrastra con ayuda de 6 ml de ácido acético-acetato de etilo 1:1 (v:v) a tubo de centrifuga; se pone a BM en ebullición durante 2 1/2 h cuidando de mantener volumen. Se centrifuga durante 15 min

a velocidad 7, se tira el líquido sobrenadante. Se lava con 3 ml de acetato de etilo, se centrifuga a velocidad 7 durante 15 min, se tira el líquido sobrenadante. Se arrastra con ayuda de agua a la cápsula pesada, se seca en BM y en estufa a 105°C, se pesa: **residuo de la extracción**. Se trata en la misma cápsula con 1 ml de H₂SO₄ concentrado (12 M) durante 1 h a temperatura ambiente. Se arrastra con ayuda de 11 ml de agua a un erlenmeyer, se calienta a ebullición durante media hora, manteniendo el volumen. Se filtra al vacío producido con bomba de agua por filtro Whatman GF/A calcinado a 550°C y previamente pesado, se lava hasta pH neutro. Se seca hasta peso constante:

- a 105°C: **peso lignina bruta**

- a 550°C: **peso residuo fijo**

El filtrado se afora a 50 ml y se utiliza para la determinación de azúcares reductores.

Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron tratados según los criterios de Lacroix (1973) para el rechazo de resultados con una probabilidad del 95% que establecen que se deben descartar las medidas individuales que queden fuera de los límites:

$$\bar{x} \pm (d.e.) t \quad (1)$$

donde:

$\bar{x}$ = media de los resultados individuales x

d.e. = desviación estándar

t = de Student con $P > 0.05$

n = cantidad de muestras

$n-1$ = grados de libertad

Se efectuaron un total de 9 corridas en 2 condiciones de extracción diferentes: extracción durante 20 horas a temperatura ambiente tal como lo proponen Kraus y Marlett (1990) (5 medidas) y una alternativa más rápida, extracción en BM a 100°C durante 2 horas y media (4 medidas).

Se obtuvieron 2 series de medidas (**Tabla I**): **residuo sólido** (obtenido por secado de la muestra a 105°C), **residuo de la extracción** con ácido acético-acetato de etilo secado a 105°C y de la **lignina** (obtenido por diferencia entre el peso del residuo de la reacción con H₂SO₄ a 105°C y 550°C y que se expresa en la columna peso neto).

La **tabla I** presenta también los valores de las medias al pie de las columnas correspondientes a los pesos, los valores de los desvíos d y de sus cuadrados d^2 con la suma correspondiente al pie de estas columnas, los que permiten calcular la desviación estándar (d.e.) para el **residuo sólido**, el **residuo de extracción** y el peso neto del **residuo de lignina**. Estos valores aparecen también en la **tabla I** y permiten calcular para cada uno de los tres casos los límites de confianza definidos por la expresión (1).

Para determinar si las dos series de medidas presentan resultados estadísticamente semejantes, se les trató para el caso: comparación de la influencia de un solo factor cuando el número de medidas es diferente (Lacroix 1973). Este autor propone el cálculo de una t_{exp} a partir de los datos individuales x , sus medias y el número de grados de libertad de cada serie tal

TABLA I. DETERMINACIÓN DE LIGNINA

Extracción durante 20 h en frío										
Residuo sólido				Residuo de extracción			Residuo de lignina			
Muestra	Peso (g)	d	d ²	Peso (g)	d	d ²	P. bruto	P. neto	d	d ²
a	0.0737	-2.20E-04	4.84E-08	0.0394	-4.76E-03	2.27E-05	0.0220	0.0193	2.42E-03	5.86E-06
b	0.0723	-1.62E-03	2.62E-06	0.0418	-2.36E-03	5.57E-06	0.0225	0.0176	7.20E-04	5.18E-07
c	0.0769	2.98E-03	8.88E-06	0.0476	3.44E-03	1.18E-05	0.0225	0.0179	1.02E-03	1.04E-06
e	0.0725	-1.42E-03	2.02E-06	0.0455	1.34E-03	1.80E-06	0.0205	0.0147	-2.18E-03	4.75E-06
f	0.0742	-2.80E-04	7.84E-08	0.0465	2.34E-03	5.48E-06	0.0207	0.0149	-1.98E-03	3.92E-06
	0.0739		1.36E-05	0.0442		4.73E-05	0.0216	0.0169		1.61E-05
		d.e. = 0.0018			d.e. = 0.0034					d.e. = 0.0020
rechazo según Lacroix:										
P = 95%										
n - 1 = 4 t = 2.776										
Límites:	0.0688			0.0346				0.0113		
	0.0790			0.0537				0.0224		
Extracción durante 2.5 h en caliente										
Residuo sólido				Residuo de extracción			Residuo de lignina			
Muestra	Peso (g)	d	d ²	Peso (g)	d	d ²	P. bruto	P. neto	d	d ²
d	0.0663	-3.98E-03	1.58E-05	0.0489	2.85E-03	8.12E-06	0.0210	0.0149	-1.50E-03	2.25E-06
g	0.0682	-2.07E-03	4.31E-06	0.0439	-2.15E-03	4.62E-06	0.0189	0.0160	-4.00E-04	1.60E-07
h	0.0729	2.63E-03	6.89E-06	0.0464	3.50E-04	1.22E-07	0.0221	0.0184	2.00E-03	4.00E-06
n	0.0737	3.42E-03	1.17E-05	0.0450	-1.05E-03	1.10E-06	0.0183	0.0163	-1.00E-04	1.00E-08
	0.0703		3.87E-05	0.0461		1.40E-05	0.0201	0.0164		6.42E-06
		d.e. = 0.0036			d.e. = 0.0022					d.e. = 0.0015
rechazo según Lacroix:										
P = 95%										
n - 1 = 3 t = 3.182										
Límites:	0.0588			0.0392				0.0117		
	0.0817			0.0529				0.0211		
Para la totalidad de las muestras:										
Residuo sólido				Residuo de extracción			Residuo de lignina			
Medias:	0.0723			0.0450				0.0164		
	d.e. = 0.0032			d.e. = 0.0029				d.e. = 0.0017		
rechazo según Lacroix:										
Límites:	0.0649			0.0382				0.0128		
	0.0797			0.0518				0.0206		

como se detalla en la **tabla II**. Ese valor es comparado a la *t* de Student obtenida de tablas para las mismas condiciones.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados que se presentan en la **tabla I** indican que los valores de todas las muestras quedan dentro de sus respectivos intervalos de confianza y que ninguno debe ser rechazado.

En la **tabla II** se comparan los resultados encontrados en cada tiempo de extracción. En ésta se observa que la *t_{exp}* es mucho menor que la obtenida en las tablas corrientes para la *t* de Student, de donde se concluye que no hay diferencia estadística significativa entre ambos casos, lo que permite que todos los datos sean tratados como pertenecientes a un solo grupo.

En el pie de la **tabla I** se encuentra el tratamiento de datos correspondiente a la totalidad de las corridas.

Con relación al análisis de carbohidratos, se puede indicar

muy rápidamente que se conocen diferentes métodos instrumentales para la determinación de glucosa, los enzimáticos entre otros. En ensayos preliminares, no se consiguió analizar glucosa en el filtrado por métodos enzimáticos; esto sería causado por la presencia de algún inhibidor de la enzima (fenoles, por ejemplo, que podrían estar presentes por disolución parcial de lignina) ya que ese filtrado es una matriz química relativamente compleja.

En el caso en estudio, esta determinación se realizó midiendo azúcares reductores por volumetría redox (método de Luff-Schoorl).

CONCLUSIONES

Se encuentra un método relativamente rápido para analizar lignina en efluentes de mataderos que se puede realizar con medios muy sencillos. El método permite además hacer, en una manipulación única, otras medidas como las de residuos a 110

TABLA II. COMPARACIÓN DE DOS VARIANTES EN LAS EXTRACCIONES DEL RESIDUO LIGNOCELULÓSICO

Media de a: $\bar{x}_a = 0.0169$
 Media de b: $\bar{x}_b = 0.0164$
 Diferencia: $d = 0.0005 \text{ g/l}$

Desviación estándar: d.e.

$$(d.e.)^2 = \frac{\sum [(x - \bar{x}_a)^2 + (x - \bar{x}_b)^2]}{(n_a - 1) + (n_b - 1)} = 3.2 \times 10^{-6}$$

$$(d.e.)_d = \sqrt{\frac{(d.e.)^2}{n_a} + \frac{(d.e.)^2}{n_b}} = 1.2 \times 10^{-3}$$

$$t_{exp} = \frac{d}{(d.e.)_d} = 0.415$$

t de tablas para $N = (5-1) + (4-1)$ y $P = 95\%$

$t = 2.365$

y 550°C. La opción de efectuar la extracción en caliente permite disminuir el tiempo de extracción de veinte horas a dos y media.

Una vez separada la lignina, es posible analizar glucosa y otros azúcares reductores en la solución remanente.

Teniendo en cuenta que en la mayoría de los efluentes producidos por las agroindustrias (malterías, por ejemplo) se presenta el problema de sólidos suspendidos de tipo ligno-celulósico, el desarrollo de esta técnica analítica puede tener un uso general, más allá del problema específico para el cual fue desarrollada.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se realizó con el apoyo financiero del Proyecto BID-CONICYT 49/94 "Tratamiento anaerobio de efluentes de frigorífico".

REFERENCIAS

- Colberg P. (1988). Anaerobic microbial degradation of cellulose, lignin, oligolignols and monoaromatic lignin derivatives. En: *Biology of Anaerobic Microorganisms* (A. Zehnder, Ed.) Wiley, Nueva York, 847 p.
- Effland M. (1977). Modified procedure to determine acid-insoluble lignin in wood and pulp. *Tappi* 60, 143-144
- Giger S. y Pochet S. (1987). Méthodes d'estimation des constituants pariétaux dans les aliments destinés aux ruminants. *Bull. Tech. C.R.Z.V.Theix.I.N.R.A.* 70, 49-60
- Kraus R.J. y Marlett J.A. (1990). Measuring lignin in human and rat faeces. *J. Sci. Food Agric.* 52, 275-286
- Lacroix Y. (1973). *Analyse chimique: interprétation des résultats par le calcul statistique*. Masson, Paris, 68 p.
- Lee J. (1992). *Biochemical Engineering*. Prentice Hall, Nueva Jersey, 321 p.
- Martínez J., Borzacconi L., Mallo M., Galisteo M. y Viñas M. (1995). Treatment of slaughterhouse wastewater. *Wat. Sci. Tech.* 32, 99-104
- Van Soest P. (1994). *Nutritional ecology of the ruminants*. Wiley, Nueva York.