

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

N.º de publicación: **ES 2 069 461**

Número de solicitud: 9300233

Int. Cl.⁶: G01N 21/79
C07G 1/00

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación: **08.02.93**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **01.05.95**

Fecha de concesión: **08.11.95**

45 Fecha de anuncio de la concesión: **16.02.96**

45 Fecha de publicación del folleto de patente: **16.02.96**

73 Titular/es: **Joxé Iñaki Alava Marquínez**
Villa Kabitxu - Cº de Larraga, 10
20013 San Sebastián, Guipúzcoa, ES

72 Inventor/es: **Alava Marquínez, Joxé Iñaki**

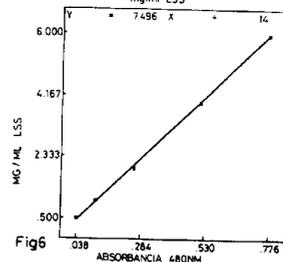
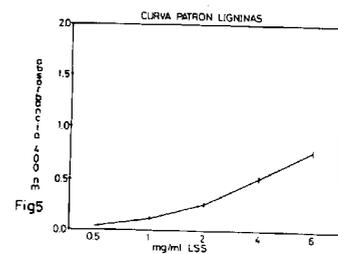
74 Agente: **Izquierdo Faces, José**

54 Título: **Procedimiento para la determinación y cuantificación de ligninas.**

57 Resumen:

Procedimiento para la determinación y cuantificación de ligninas, que consiste en la adición de NO_3K a una solución básica y reducida de la muestra, lo que provoca una oxidación parcial de la lignina, y tras su condensación con floro-glucina clorhídrica en fase líquida, produce una coloración específica, y de intensidad proporcional a la concentración de ligninas presentes en la muestra. Se prevé la aplicación del procedimiento a muestras en estado sólido y a muestras químicamente deterioradas, oxidadas o hidrolizadas.

El procedimiento está especialmente indicado para el estudio y control del medio ambiente.



ES 2 069 461 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el artº 37.3.8 LP.

DESCRIPCION

La presente Memoria Descriptiva tiene como fin la declaración del objeto sobre el que ha de recaer el privilegio de explotación industrial y comercial exclusivo en el territorio nacional de una Patente de Invencción, de acuerdo con la vigente Legislación sobre Propiedad Industrial que, como el título indica, se trata de “procedimiento para la determinación y cuantificación de ligninas”.

Campo de la invención

Las ligninas se encuentran en la Naturaleza principalmente como componente de la pared celular vegetal, sirviendo como cemento entre las fibras vegetales y como freno a la degradación enzimática de la pared celular.

La descomposición natural de las plantas da lugar a una “corteza” formada por ligninas, que a su vez, se degradan paulatinamente en ácidos húmicos, componentes del humus.

Las ligninas son también un subproducto de la industria papelera, ya que en el tratamiento de la madera para la obtención de celulosa sódica, la lignina de la madera pasa a formar parte de la lejía de sosa, fundamentalmente en forma de ácido lignosulfónico.

Las lejías residuales procedentes de la industria papelera, al verterse en los ríos, pueden arrastrar lignosulfonatos en solución hacia los estuarios, donde suelen dar lugar a fangos de muy lenta degradación formados por ácidos húmicos de color amarillo-marrón. Los materiales disueltos y en suspensión de las lejías residuales vertidas a los ríos, ocasionan unos altísimos valores de Demanda Biológica de Oxígeno (D.B.O.), con el consiguiente efecto sobre el medio ambiente.

La invención que se reivindica propone un Procedimiento para la determinación y cuantificación de ligninas mediante la adición de Nitrato Potásico a una solución básica y reducida de la muestra, lo que provoca una oxidación parcial de la lignina, y tras su condensación con floroglucina clorhídrica en fase líquida, aparece una coloración específica, y de intensidad proporcionar a la concentración de ligninas.

Este procedimiento para la determinación y cuantificación de ligninas, tiene su principal aplicación en el estudio y control del medio ambiente.

Estado de la técnica anterior

Son conocidos algunos métodos de análisis de ligninas, que varían en cuanto a precisión, sencillez, cantidad de muestra o el estado de la misma. Citamos a continuación los métodos más usuales.

Un método muy utilizado en suelos permite una determinación aproximada del contenido en ligninas de los mismos, mediante sucesivas extracciones soxhlet con agua-eter y una hidrólisis ácida continuada; este método necesita una corrección mediante la determinación de nitrógeno Kjeldal y corrección de la cantidad de proteína presente en la muestra. Además el tamaño de la muestra debe de ser considerable (1 á 3 gr.) y es muy poco preciso.

Mucho más preciso es el Método de Almgren y colaboradores para la determinación de ligninas solubles por fluorescencia específica, sin embargo, el método no distingue entre el polímero más o menos intacto y las sustancias húmicas de él derivadas.

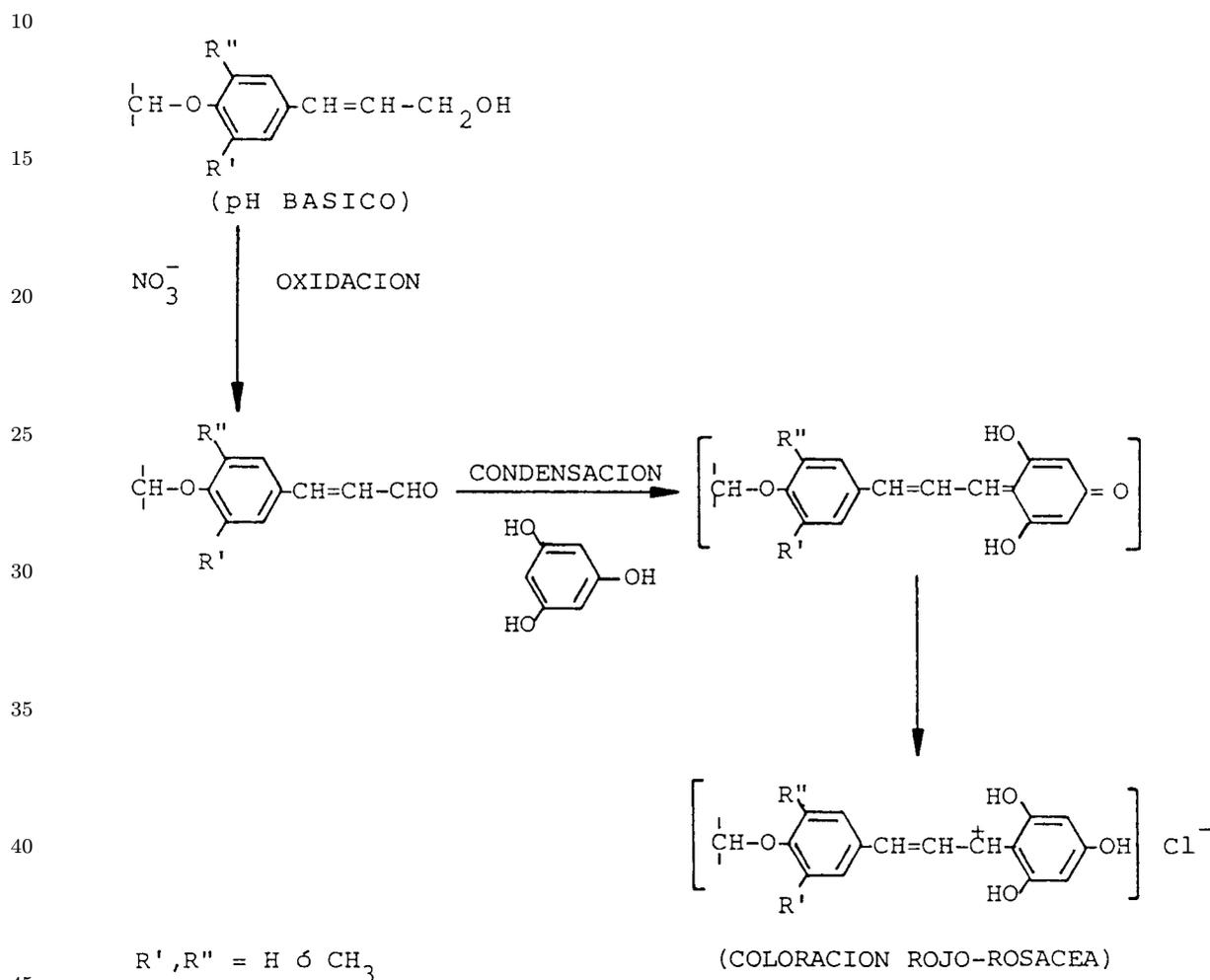
Más específico de la fracción polimérica es el método de Pearl Benson o nitroso basado en la formación por tautomerización del polímero de quinonas coloreadas, mediante la oxidación del nitrito sódico. Si bien este método es específico, exige la utilización de una célula de cuarzo de 10 cm. debido al bajo color de las quinonas formadas y aunque se puede utilizar en espectrofotómetros modernos de gran resolución con célula de cuarzo de 1 cm., la linealidad del sistema y el gran número de interferencias que posee lo hacen desaconsejable en muestras de sólidos, de líquidos coloreados o en avanzado estado de degradación.

Por último, la reacción de identificación más habitual de ligninas, es la reacción de Wiesner que produce una coloración púrpura magenta por reacción con floroglucinol en ácido clorhídrico concentrado. Esta reacción sólo tiene carácter cualitativo dado que requiere que el polímero de lignina se halle en estado sólido y según Geiger y Fuggerer los 4-0-alquil-4-hidroxicinamil alcoholes de las ligninas condensan con el floroglucinol para dar similares compuestos sólo en presencia de oxígeno.

Explicación de la invención y ventajas

El procedimiento que reivindica, parte de una muestra reducida en fase acuosa y medio alcalino (hidróxido sódico), a la que se añade Nitrato potásico, que oxida a la lignina presente en la muestra, de tal forma que a reaccionar la lignina oxidada con floroglucina clorhídrica da una coloración rojo-rosácea característica proporcional a la cantidad de lignina presente en la muestra.

El mecanismo del procedimiento analítico que se propugna puede esquematizarse de la siguiente forma:



La cantidad de ligninas presentes en la muestra se determina mediante la lectura de la absorbancia en el espectrofotómetro, extrapolando la concentración a partir de los valores de absorbancia aparecidos en una curva patrón, o bien sustituyendo la medida de absorbancia leída en la fórmula matemática obtenida a partir de dicha curva.

Para la obtención de la curva-patrón y de la fórmula correspondiente, se procede de la siguiente manera:

En primer lugar, es necesario obtener una muestra purificada de lignina, para ello se parte de un homogenado de células pétreas vegetales (molienda de cáscara de frutos secos), lavado tres veces con éter en caliente. Este homogenado se trata con sosa caústica (NaOH/hidróxido sódico) al 8-10% á 90°C durante 3 h. y posterior digestión de 24 h. á 21°C; el residuo sobrante se trata con una solución de metabisulfito sódico a saturación en baño maría durante 2 h. y digestión de 24 h. Los lignosulfonatos obtenidos en ambas fracciones se reunieron y precipitaron a pH=7 con ácido sulfúrico. El precipitado lavado se resuspende en NaOH 2N y se precipita con ácido sulfúrico 0,5N y cloruro sódico a saturación hasta pH=7. El precipitado así obtenido se seca a 40°C en estufa hasta semicristalización. Este precipitado se somete a seis lavados soxhlet con tolueno, recuperándose la fracción disuelta en el tolueno

ES 2 069 461 B1

por secado a temperatura ambiente. Esta fracción se resuspende en NaOH 0,1N y se pasa a través de una columna de cromatografía por exclusión de Sephadex G-25 equilibrada previamente en NaOH 0,1N pH=11 a una velocidad de flujo de 0,5 ml/min., en una columna de vidrio Pobel de 20 cm. de altura y 1 cm. de diámetro (N°0). Como se muestra en la figura 1, después de calibrar la columna con rojo dextrano y naranja dextrano, las fracciones obtenidas se agrupan de los 11,35 á 15 min., de los 15 min. á los 19 min. y de los 19 min. á los 33 min. Sólo la fracción I (de 11,35 á 15 min.) da reacción positiva con el reactivo floroglucina-clorhídrica que se ensaya y corresponde a la lignina de mayor peso molecular. La suma de fracciones del estandar obtenido, después de para toda la resuspensión de ligninas, se seca y pesa en una balanza de precisión, ajustándose el peso seco de la solución obtenida a 10 mg. de lignosulfonato sódico puro por ml. Esta es la solución que se utiliza como patrón para el desarrollo de las curvas de calibrado.

A continuación, se realiza un estudio comparativo de absorbancia/transmitancia para determinar la longitud de onda más adecuada para la medida en el espectrofotómetro. Para ello, se toman los valores de transmitancia/absorbancia de una muestra de ligninas sin reaccionar (muestra amarilla), y otra muestra a la que se ha aplicado el procedimiento de análisis objeto de la invención (muestra rojo-rosácea), ajustando el espectrofotómetro a longitudes de onda comprendidas entre los 300 y 700 nm. Los resultados de las mediciones realizadas se muestran en la figura 2, resultando el máximo de transmitancia a 400 nm., y el máximo de absorbancia a 480 nm., siendo esta longitud de onda dónde se aprecia la máxima discriminación con la muestra original sin reaccionar.

Una vez establecida la longitud de onda de trabajo (480 nm), se miden los valores de absorbancia para diferentes valores estandar de a muestra patrón formada por lignosulfonato sódico (lignina soluble) (LSS), resultando la siguiente tabla de valores:

Tabla I

N° EXP.	1	2	3	4	5	6	7	$\bar{x} \pm DS$	h
Mg/ml									
0.25	0.02	-	-	-	-	-	-	-	-
0.5	0.032	0.052	0.05	0.047	-	-	0.040	0.037 \pm 0.012	5
0.75	0.054	0.046	-	-	-	-	-	-	-
1	0.095	0.119	0.099	0.110	0.115	0.120	0.150	0.115 \pm 0.018	7
2	0.261	0.320	-	0.270	0.240	0.260	0.221	0.261 \pm 0.033	6
4	0.592	-	-	0.550	0.480	0.490	0.480	0.518 \pm 0.050	5
6	0.92	-	-	0.820	0.651	0.770	0.720	0.776 \pm 0.102	5
8	1.45	-	-	1.331	-	-	-	-	-
10	1.90	-	2	-	-	-	-	-	-
r	0.995	0.997	0.999	0.992	0.996	0.999	0.997	1	
r ²	0.990	0.993	0.998	0.984	0.993	0.998	0.994	0.999	

Cada valor de la tabla I es la medida de al menos dos muestras duplicadas para cada ocasión; los valores "r" y "r²" nos indican la linealidad y precisión de la curva. El valor \bar{x} corresponde a la curva patrón establecida como media de los resultados.

Con los resultados obtenidos en la Tabla arriba señalada, se confecciona una primera curva patrón considerando un amplio rango de valores a fin de estudiar la linealidad de la respuesta para una amplia variedad de concentraciones. Con la figura 3 se muestra la curva resultante, y en la figura 4 aparece su ajuste por regresión lineal simple, resultando la ecuación:

$$Y = 5,191x + 0,540$$

dónde x es la absorbancia e Y es la concentración de ligninas en mg/ml.

ES 2 069 461 B1

Se procede a continuación a la verificación de la fiabilidad de la curva patrón y fórmula halladas, y para ello se toman 9 muestras de lignina de concentración conocida, se mide su absorbancia y se establece la concentración que le correspondería según la curva patrón, resultando la siguiente tabla:

Caso	Concentración Real	Concentración Calculada	Diferencia
1	0,250	0,644	-0,394
2	0,500	0,706	-0,206
3	0,750	0,821	-0,071
4	1,000	1,033	-0,033
5	2,000	1,895	0,105
6	4,000	3,613	0,387
7	6,000	5,316	0,684
8	8,000	8,067	-0,067
9	10,000	10,403	-0,403

Como puede observarse, existen desviaciones más acusadas de la linealidad para los valores de concentración por debajo de 0,5 mg/ml o por encima de 6 mg/ml. Por ello se realiza una nueva curva patrón centrada en los márgenes de estas concentraciones, que corresponde a la figura 5, realizándose el correspondiente ajuste por regresión lineal que aparece en la figura 6, y que corresponde a la ecuación:

$$Y = 7,496x + 0,14$$

Se realiza una nueva comprobación de la curva resultante mediante el análisis de muestras de concentración conocida, que proporcionan los siguientes resultados:

Caso	Concentración Real	Concentración Calculada	Diferencia
1	0,500	0,420	0,080
2	1,000	1,002	-0,001
3	2,000	2,100	-0,100
4	4,000	4,023	-0,023
5	6,000	5,954	0,046

De esta tabla de valores se deduce la alta fiabilidad del procedimiento propuesto, ya que las diferencias aparecidas son porcentualmente muy pequeñas.

Este procedimiento para la determinación y cuantificación de ligninas es rápido, sencillo, específico y sensible en un rango de concentración lo suficientemente amplio, incluyendo bajas concentraciones como para su utilización directa en muestras líquidas y semisólidas o sólidas con y sin extracción previa.

Dibujos y referencias

Para comprender mejor la naturaleza del presente invento, en los dibujos adjuntos representamos una forma preferente de realización industrial, la cual tiene carácter de ejemplo meramente ilustrativo y no limitativo.

La figura 1 muestra en el eje de abscisas el tiempo en minutos transcurridos en la purificación de ligninas al pasar por una columna de cromatografía Sephadex G-25, y en el eje de ordenadas de absorbancia observada.

ES 2 069 461 B1

La figura 2 representa en el eje de abscisas la longitud de onda del espectrofotómetro medida en nanómetros (nm), y en el eje de ordenadas la transmitancia observada para dos muestras, una amarilla (muestra original sin reaccionar), y una roja-rosácea (muestra resultante de la reacción).

5 La figura 3 presenta una curva patrón de lignina con valores de concentración de LSS de 0,25 á 10 mg/ml en el eje de abscisas, y de 0 á 2 de absorbancia en el eje de ordenadas.

La figura 4 representa un ajuste por mínimos cuadrados de los valores representados en la figura 3, correspondiendo en este caso el eje de abscisas a la absorbancia, y el eje de ordenadas a la concentración
10 en mg/ml.

La figura 5 representa una curva patrón de ligninas para valores de concentración de 0,5 á 6 mh/ml en el eje de abscisas, y de 0 á 2 de absorbancia en el eje de ordenadas.

15 La figura 6 corresponde al ajuste por mínimos cuadrados de los valores señalados en la figura 5, apareciendo en este caso la absorbancia en el eje de abscisas y la concentración en mg/ml en el eje de ordenadas.

Exposición de una realización preferente

20 A 0,5 ml. de la muestra de ligninas, suspendida o solubilizada en NaOH 0,1 N se añade al menos 1 mg. de Nitrato potásico (P.A.) cristalizado y se agita hasta solubilización de la mayoría de los cristales. Sobre ésto se añade el reactivo de floroglucina clorhídrica preparado según el método de Merck (8 gr. de floroglucina 1,3,5 trihidroxi benceno (P.A.), a la que se añaden 20 ml. de ácido clorhídrico fumante min.
25 37% (P.A.)). Se agita de nuevo y transcurrido al menos 1 min. se lee la absorbancia de la muestra a 480 nm. en el espectrofotómetro. Mediante la comparación con la curva trazada con el patrón (figura 5) o su fórmula matemática ($Y = 7,496x + 0,14$) se obtiene la concentración de ligninas en una muestra desconocida. La lectura en el espectrofotómetro debe realizarse entre el primer y el quinto minuto después de la mezcla, tiempo en el que el cambio de color producido se mantiene muy estable. Simultáneamente
30 se determina un blanco de absorción con reactivos y disolventes pero sin muestra de ligninas.

Si la muestra de partida se encuentra en estado sólido, se extraen las ligninas presentes con hidróxido
sódico 1 M. y metabisulfito sódico 0,1 M.

35 En el caso de que la muestra a analizar se encuentre químicamente deteriorada, oxidada y/o hidrolizada química o enzimáticamente, se trata previamente pasándola a un estado reducido, y añadiendo un azúcar, que puede ser un dímero o un polímero. La sensibilidad del método se ve incrementada en estas circunstancias si la lectura en el espectrofotómetro se prolonga más de 5 minutos hasta un máximo de 24 horas.

40 Descrita suficientemente la naturaleza del presente invento así como su realización industrial, sólo cabe añadir que en su conjunto y partes constitutivas es posible introducir cambios de forma, materia y disposición dentro del contenido del invento en cuanto tales alteraciones no desvirtúen su fundamento.

45 El Solicitante, al amparo de los convenios internacionales sobre Propiedad Industrial se reserva el derecho de extender la presente demanda a los países extranjeros, aplicándoles la fecha de prioridad de la presente solicitud.

50 Igualmente, el solicitante se reserva el derecho de solicitar los adecuados Certificados de adición, en la forma señalada por la ley, al introducir en la presente invención cuantos perfeccionamientos se deriven de la misma.

55

60

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la determinación y cuantificación de ligninas, **caracterizado** porque a una muestra a analizar reducida y en estado líquido, se somete a un medio básico (preferentemente NaOH y pH=11), al que se añade nitrato potásico (NO₃K) cristalizado, y se agita hasta la solubilización de la mayoría de los cristales; posteriormente, se añade con agitación floroglucina clorhídrica, apareciendo una coloración rojo-rosácea, que denota la existencia de ligninas; esta coloración rojo-rosácea se hace muy estable entre el 1° y 5° minuto a partir de la reacción, pudiéndose efectuar una lectura de su absorbancia en un espectrofotómetro, ajustado a la longitud de onda de 480 nm, lo que permite calcular la concentración en mg/ml de ligninas presentes en la muestra mediante una curva patrón a partir del valor medido de absorbancia.

2. Procedimiento para la determinación y cuantificación de ligninas, de acuerdo con la reivindicación anterior, **caracterizado** porque la concentración de ligninas presente en las muestras se calcula mediante la ecuación:

$$Y = 7.496x + 0,14$$

donde x es el valor de la absorbancia e Y la concentración en mg/ml.

3. Procedimiento para la determinación y cuantificación de ligninas, de acuerdo con las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque, si la muestra a analizar es sólida, se extraen las ligninas presentes en dicha muestra con hidróxido sódico, preferentemente 1 M. y metabisulfito sódico, preferentemente 0,1 M.

4. Procedimiento para la determinación y cuantificación de ligninas, de acuerdo con las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque está previsto que en el caso de que la muestra se encuentre deteriorada, oxidada y/o hidrolizada química o enzimáticamente, se trate previamente la muestra pasándola a un estado reducido, y añadiendo un azúcar, preferentemente un dímero o un polímero, y prolongando posteriormente el tiempo de lectura en el espectrofotómetro por encima de los 5 minutos hasta un máximo de 24 horas.

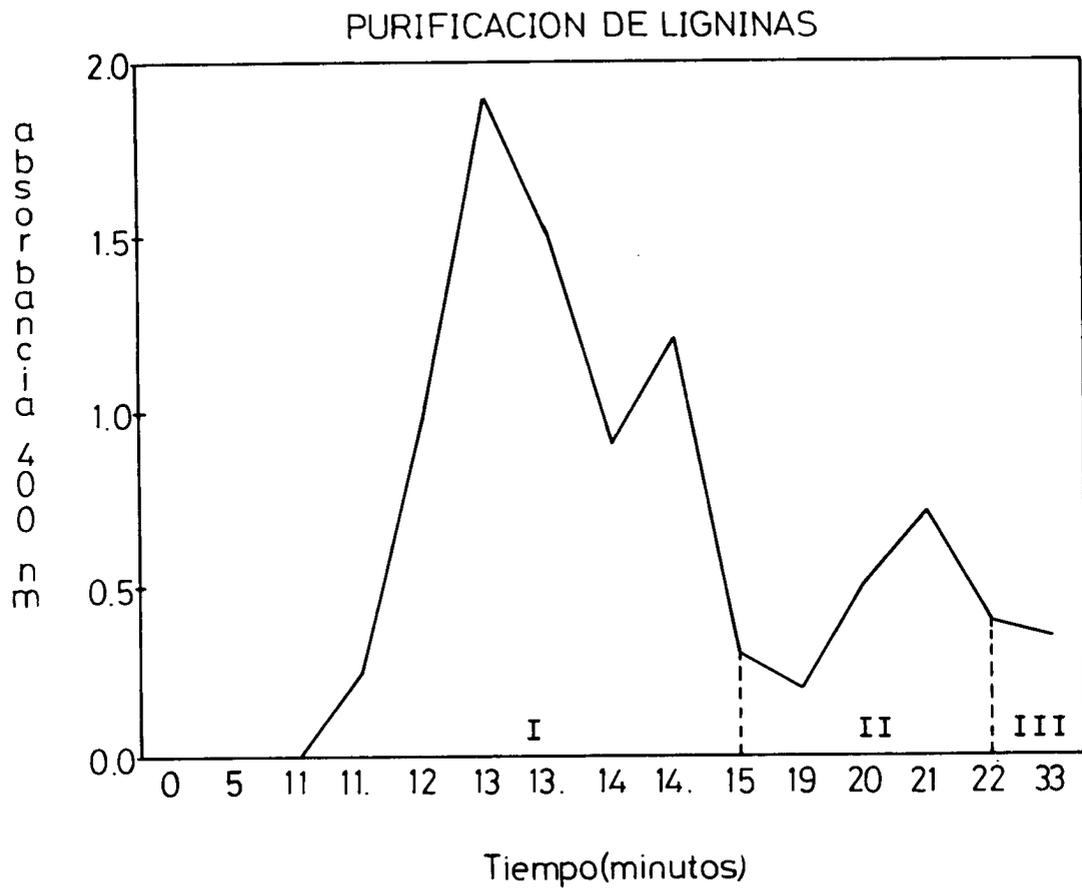


Fig1

ESTUDIO COMPARATIVO DE TRANSMITANCIA

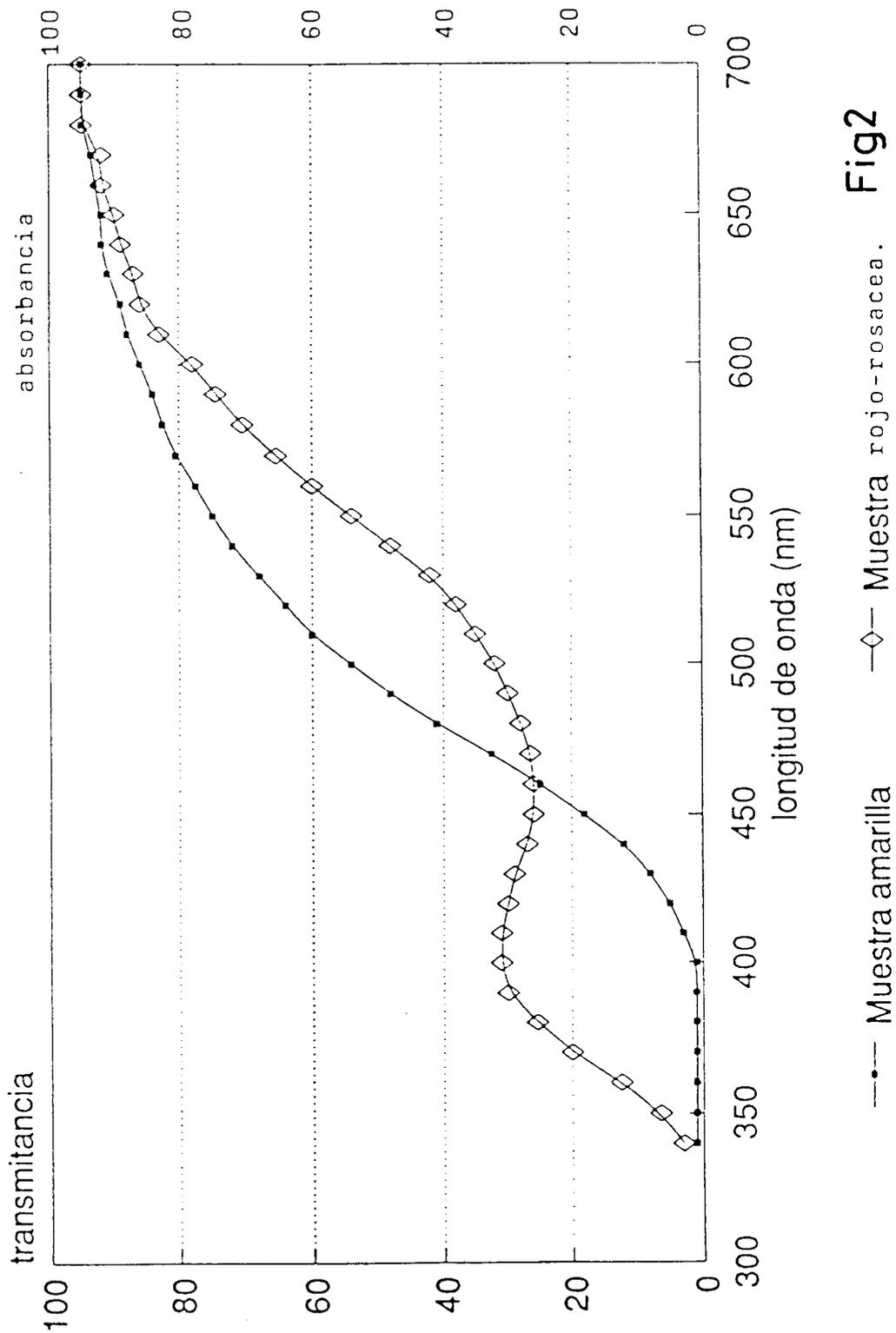
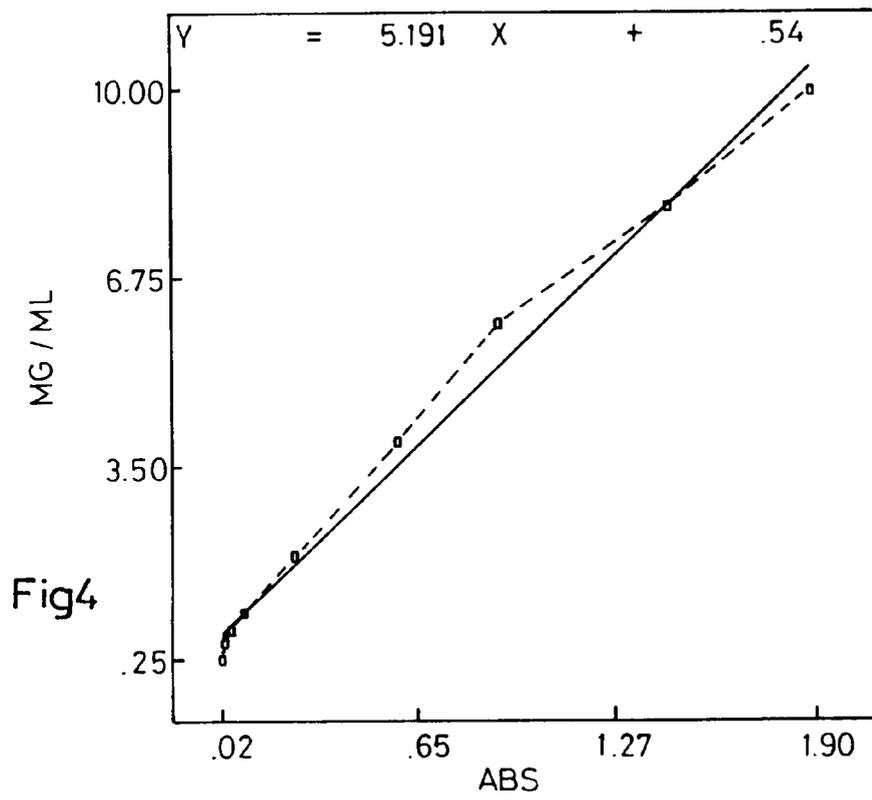
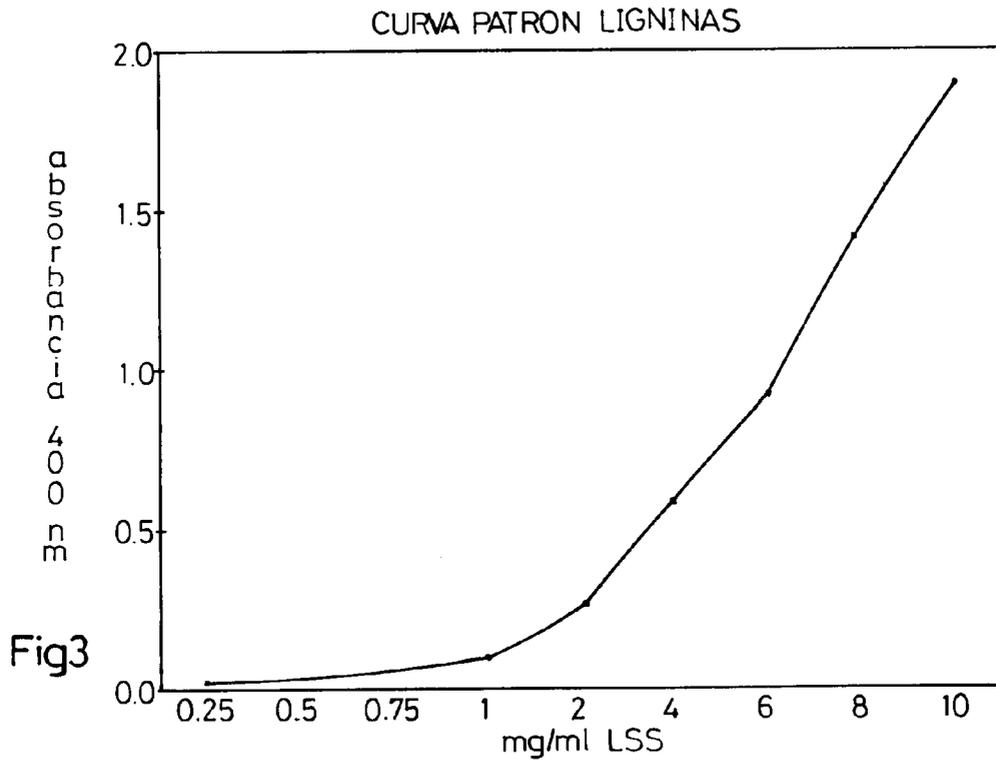
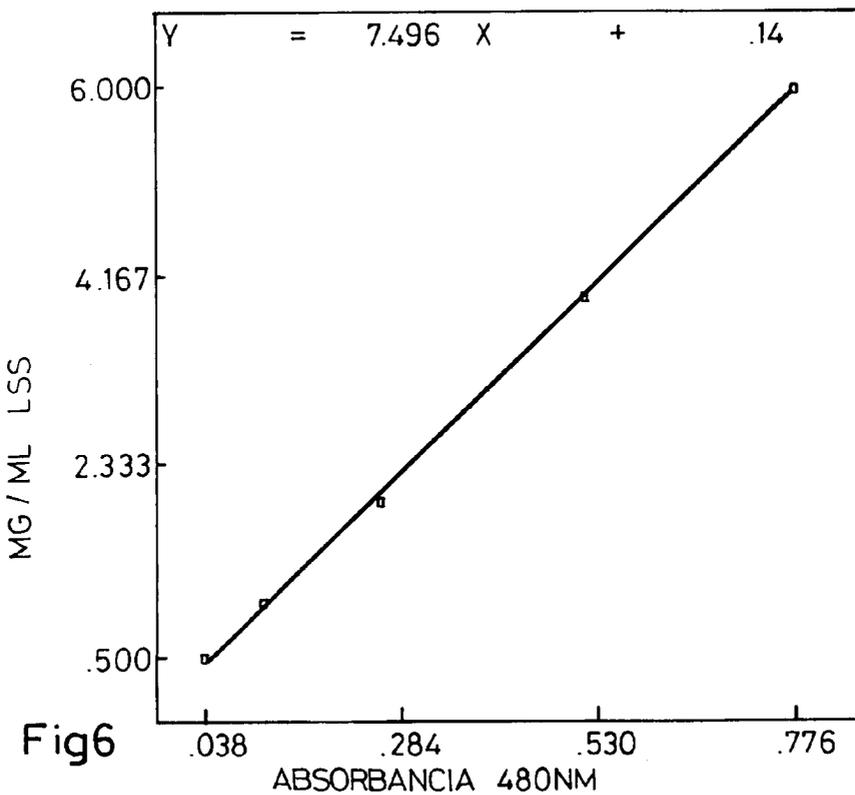
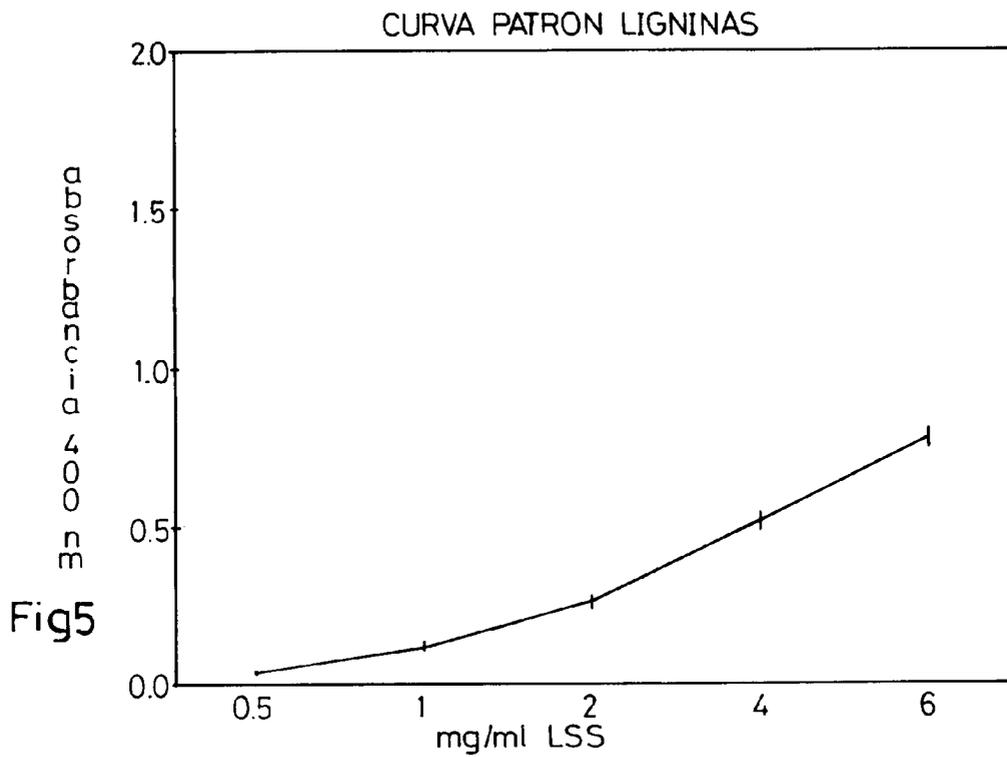


Fig2







① ES 2 069 461

② N.º solicitud: 9300233

③ Fecha de presentación de la solicitud: **08.02.93**

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤ Int. Cl.⁶: G01N 21/79, C07G 1/00

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	US-A-4971441 (DAMLIN) * Todo el documento *	1-4
A	US-A-4296260 (ZIELKE) * Todo el documento *	1-4
A	BASE DE DATOS WPIL, 90-003275 [01], 1990, Derwent Publications Ltd., London, GB, & JP-A-1285855 (NIKKEN KAGAYU KENKY), 16-Noviembre-89	1-4
A	BASE DE DATOS WPIL, 89-052432 [07], 1989, Derwent Publications Ltd., London, GB, & SU-A-1411665 (UKR POLESE LIVESTOC), 23-Julio-88	1-4

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones n.º:

Fecha de realización del informe

28.03.95

Examinador

M. Ojanguren Fernández

Página

1/1