



Memoria del proyecto desarrollado durante el período de investigación del
Master en “Estudios Avanzados en Química”



**Composición química de diversos materiales
lignocelulósicos de interés industrial y
análisis estructural de sus ligninas**

Pepijn Prinsen

Supervisores:

Dra. A. Gutiérrez y Dr. J. C. del Río

Departamento de Biotecnología Vegetal,

INSTITUTO DE RECURSOS NATURALES Y AGROBIOLOGIA DE SEVILLA (IRNAS)

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS (CSIC)



Trabajo Fin de Máster
Estudios Avanzados en Química

**Composición química de diversos materiales
lignocelulósicos de interés industrial y análisis
estructural de sus ligninas**

Directora

Dra. Ana Gutiérrez Suárez
Investigador Científico del CSIC
IRNAS - CSIC

Co-director

Dr. José Carlos del Río
Investigador Científico del CSIC
IRNAS - CSIC

Tutor

Prof. Dr. José María Fernández Bolaños Guzman
Departamento de Química Orgánica
Facultad de Química

Sevilla, a 20 de Septiembre 2010

AGRADECIMIENTOS

Este proyecto se realizó en el Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla (IRNAS CSIC). Ha sido financiado por una beca de FPI (Formación Personal Investigadora) del Ministerio de Educación y Ciencia y por el proyecto europeo LIGNODECO.

En primer lugar quiero expresar mis agradecimientos a Dra. Gutiérrez Ana (IRNAS), a mi director de este proyecto Dr. Río José Carlos (IRNAS) y a Prof. Angel T Martínez (Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, Madrid), por darme esta oportunidad para trabajar en un campo interesante y dinámico, por su paciencia con mi expresión de la lengua castellana, por sus consejos y ayuda en todos los campos y en general por sus esfuerzos y gran motivación elevando el nivel de investigación.

A mi tutor Prof. José María Fernández-Bolaños, por su atención amable, ayuda, consejo y charlas interesantes.

A mis compañeros Esteban Daniel, Alejandro Rico, Edith Cadena y mis ex – compañeros Dra. Gisela Marques, Setefilla Molina y Dr. Rencoret Jorge, por su compañía, ayuda y detalles.

A Lidia Nieto, por sus esfuerzos para medir todas mis muestras de NMR, su aportación de conocimientos valiosos sobre NMR y sobretodo por su atención amable.

A Dr. Craig Faulds, por compartir sus conocimientos y a sus compañeros del CIB, por recibirme en su grupo.

A mis compañeros del Master, Ana, Azucena, Yesica, Carmen, Teresa, Cristina, Eva, Renato, Paco, Fernando, José Ignacio, José Blas, Jonathan y Sorel.

A mi novia, Susana, que siempre está allí para mi a pesar de situaciones difíciles.

Y a mi madre Kathy y padre Herman.

INDICE

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN.....	1
1. Materiales lignocelulósicos	2
1.1. Materiales lignocelulósicos de interés industrial.....	2
1.2. Composición.....	3
1.2.1. Celulosa.....	3
1.2.2. Hemicelulosas.....	3
1.2.3. Lignina.....	8
1.2.3.1. Biosíntesis.....	9
1.2.3.2. Biodegradabilidad.....	11
1.2.3.3. Análisis.....	13
1.2.4. Compuestos minoritarios.....	19
1.3. Entrecruzamiento de celulosa, hemicelulosa y lignina: organización estructural y funcional en la pared celular	19
1.3.1. Complejos de lignina-carbohidratos (LCC)	22
1.3.2. LCC de plantas herbáceas	23
2. Lignina como factor limitante en procesos industriales.....	25
2.1. Producción de papel.....	25
2.1.1. Pasta de papel.....	25
2.1.2. Blanqueo de pasta de papel.....	26
2.1.3. Degradación enzimática de lignina.....	26
2.2. Biorrefinería.....	27
2.2.1. Pretratamiento.....	28
2.2.2. Hidrólisis.....	30
2.2.3. Conversión a productos.....	30
2.2.4. Ingeniería genética	30
CAPÍTULO II: OBJETIVOS.....	32
CAPÍTULO III: MATERIALES Y MÉTODOS.....	34
1. Materiales.....	35
1.1. Reactivos.....	35
1.2. Materiales lignocelulósicos.....	35
1.2.1. Sisal.....	35
1.2.2. Abacá.....	36
1.2.3. Hierba elefante.....	37
1.2.4. Paja de trigo.....	38
1.2.5. Salvado de trigo.....	39
1.2.6. BSG.....	40
2. Métodos analíticos para materiales lignocelulósicos.....	40
2.1. Análisis de metales y otros elementos.....	41
2.2. Determinación del contenido en cenizas.....	41
2.3. Determinación del contenido en extraíbles lipofílicos.....	41
2.4. Determinación del contenido en compuestos hidrosolubles.....	41
2.5. Análisis de lignina.....	41

2.5.1. Lignina Klason.....	41
2.5.2. Lignina ácido-soluble.....	42
2.5.3. Aislamiento de lignina: preparación de MWL.....	42
2.5.4. Análisis de MWL mediante pirólisis (Py-GC/MS).....	43
2.5.5. Análisis de MWL mediante 2D-NMR.....	43
2.5.6. Análisis de MWL mediante DFRC.....	44
2.6. Determinación del contenido en celulosa.....	46
CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	47
1. Composición química.....	48
2. Análisis de MWL.....	51
2.1. Pirólisis (Py-GC/MS).....	51
2.2. 2D-NMR.....	53
2.3. DFRC.....	61
3. Conclusiones	71
3.1. Investigación próxima.....	72
CAPÍTULO V: REFERENCIAS.....	73

ABREVIATURAS

- AFM: 'atomic force microscopy'
- CAD: 'cinnamyl alcohol dehydrogenase'
- CCoAOMT: 'caffeoyl CoA 3-O-methyltransferase'
- CCR: 'cinnamoyl-CoA reductase'
- COMT: 'caffeic acid 3-O-methyltransferase'
- C3H: 'coumaroyl shikimate 3-hydroxylase'
- C4H: 'cinnamate 4-hydroxylase'
- 4CL: '4-coumarate- CoA ligase'
- DMSO: dimetilsulfóxido
- ECF: 'elementary chlorine free'
- EDTA: ácido etilendiaminotetraacético
- Fer: ácido ferulico
- F5H: 'ferulate 5-hydroxylase'
- Glcp: unidad de glucopiranososa en cadena de polisacárido
- HBT: (1-hidroxibenzotriazol)
- HCT: 'hydroxycinnamoyl CoA : shikimate hydroxycinnamoyl transferase'
- HMBC: 'heteronuclear multiple bond coherence'
- HSQC: 'heteronuclear single quantum correlation'
- LCC: 'lignin-carbohydrate complex' (complejo de lignina-carbohidrato)
- MWL: 'milled wood lignin'
- NMI: N-metilimidazola
- NMR: 'nuclear magnetic resonance' (resonancia magnética nuclear)
- PCA: grupo de p-cumarico
- PAL: 'phenylalanine ammonia-lyase'
- Rpm: 'rates per minute' (revoluciones por minuto)
- SEM: 'scanning electron microscopy'
- TBAF: tetrabutylammonium fluoruro
- TMAH: tetrametil amonio hidróxido
- TCF: 'totally chlorine free'

RESUMEN

Las plantas son materiales lignocelulósicos. Constituyen principalmente en celulosa, hemicelulosas y lignina. La composición química y la morfología de la pared celular están relativamente bien conocidos. Sin embargo las características estructurales de sus biopolímeros, sobretodo de lignina en relación con su biosíntesis y con la funcionalidad en la pared celular no han sido investigado tan extensivamente (sobretodo de especies herbáceas). La estructura de celulosa es universal y bien conocido, sin embargo se desconoce en gran parte los mecanismos de su organización estructural y plegamiento en las paredes celulares (láminas de microfibrillas). Estos conocimientos podrían cambiar drásticamente las estrategias para aumentar el aprovechamiento lignocelulósico mediante técnicas de biorrefinería. Actualmente el contenido y la estructura de lignina y su entrecruzamiento con polisacáridos son factores limitantes en el aprovechamiento lignocelulósico. En procesos con biomasa se requieren pretratamientos optimizados para aumentar la accesibilidad de enzimas hidrolíticas a los polisacáridos, por ejemplo para aumentar el rendimiento de sacarificación con el fin de producir biocombustibles o para conversión en otros productos (por ejemplo por fermentación). Por ello se debe conocer los cambios estructurales de la lignina durante el proceso. Pueden servir muy bien los conocimientos de las técnicas analíticas usadas para estudiar la lignina durante la fabricación de papel. Un pretratamiento idóneo sería el fraccionamiento completo de celulosa, hemicelulosa y lignina y su conversión en productos puros aumentando la viabilidad económica de plantas de biomasa y la descarbonización del suministro de materias primas y energía.

La lignina representa aproximadamente entre 20 y 35 % de la materia seca en fibras madereras y entre 10-25 % en fibras no-madereras. Presente una estructura polimérica macromolecular. Sus unidades repetitivas son fenoles sustituidos con respectivamente 0, 1 y 2 grupos de metoxilo en la subunidad fenólica de respectivamente unidades H, G y S. Estas unidades derivan de los monolignoles, respectivamente los alcoholes p-cumarílico, coniferílico y sinapílico. Estudios recientes demostraron que unidades acetiladas en el carbono γ de sobretodo S también se comportan como monolignoles y demuestran la flexibilidad en la biosíntesis de lignina a partir de sus precursores en cultivos naturales, pero sobretodo en cultivos transgénicos que pueden aportan más información sobre la regulación de su biosíntesis. Los monolignoles se unen entre si mediante diversos tipos de enlaces aumentando la complejidad de su estructura. Se distinguen principalmente enlaces carbono-carbono formando estructuras más condensadas y ramificadas y enlaces éter (principalmente enlaces β -O-4') formando estructuras más lineales. La proporción de cada enlace depende principalmente de la proporción de unidades H, G y S y es el principal factor que determina su biodegradabilidad.

En este proyecto se analizó la composición química de diferentes materiales de interés industrial (fibras de sisal, abacá, hierba elefante, paja de trigo, material de salvado de trigo y 'brewers spent grain' (BSG)), poniendo especial énfasis en el aislamiento de lignina (preparación de MWL ('milled wood lignin')) y su caracterización estructural. La hierba elefante se separó manualmente en una fracción de corteza y una de médula. Se analizó los MWL por Py-GC/MS, 2D-NMR y DFRC. El rendimiento de extracción para preparar MWL es bajo comparado con el contenido total presente en las fibras. Sin embargo las condiciones de preparación hacen que la estructura de MWL es representativa para la estructura nativa. Las técnicas de análisis también se aplicaron in situ (directamente sobre la fibra) obteniendo espectros y cromatogramas más complejos debido a las

señales de los carbohidratos. Sin embargo son análisis rápidos (sin aislar lignina) y está garantizada la representatividad de la estructura.

El contenido de lignina de hierba elefante es 20.5 %, aproximadamente 3 % más que paja de trigo y 6 % más que sisal y abacá. Los contenidos de lignina Klason (no ácido-soluble) de hierba elefante y paja de trigo son aproximadamente los dobles de los contenidos de sisal y abacá y los contenidos en lignina ácido-soluble de ambos son más bajo que los de abacá y sisal. Consecuentemente sisal y abacá contienen 30 % más holocelulosa que hierba elefante y paja de trigo. Sin embargo la diferencia entre ambos 'grupos' en el contenido de α -celulosa es más pequeño. Sisal por ejemplo contiene 11 y 19 % más α -celulosa que respectivamente hierba elefante y paja de trigo.

Los contenidos lipofílicos de hierba elefante y paja de trigo se sitúan entre 3 y 6 veces mayores que abacá y sisal. Son compuestos minoritarios de cuales algunos pueden causar problemas graves en la industria de papel. Hierba elefante y paja de trigo contienen \pm 10 % de compuestos hidrosolubles y 6 % de cenizas, ambos aproximadamente 6 veces mayor que en abacá y sisal.

En cuanto a la estructura de las ligninas aisladas, se observó que ambas fracciones de la hierba elefante (médula y corteza) se parecen mucho. Respectivamente 32 y 48 % de sus MWL están acilados en el carbono γ , estimado a partir de la integración de las intensidades de los señales cruzados en el espectro ^1H - ^{13}C HSQC del carbono γ acilado y hidroxilado. Los grupos de acilación son sobretodo p-cumaratos y pocos acetatos, ambos identificados por Py-GC/MS (pirólisis), DFRC ('Derivatization Followed by Reductive Cleavage') y HMBC (2D-NMR). En el espectro HSQC se observaron señales intensas de p-ácido cumárico (PCA) y en baja proporción ácido ferulico (Fer). Ambos también se detectaron en proporciones parecidas por Py-TMAH-GC y DFRC, tanto en la MWL como en la fibra. Mientras Py-GC/MS es un método semicuantitativo, el método de DFRC permite estimar la proporción de las diferentes unidades de la lignina. Se estimó que sólo 3 y 4 % de unidades respectivamente G y S están acetilados en la MWL de la corteza. En la médula el grado de acetilación es 10 y 3 % de unidades G y S. Sin embargo los grupos de p-cumarato sólo se encontraron en baja proporción (7 %) acilados sobre la posición γ , conforme a los análisis de (HMBC) 2D-NMR y DFRC de la corteza. El resto del acoplamiento con PCA está correlacionado con un señal desconocido a 4,9/66 ppm. No queda claro si el señal corresponde a una estructura que pertenece a la lignina. Sin embargo el espectro HSQC indica un alto grado de acilación en γ (48 %). En el análisis de DFRC se encontraron pocas unidades G y S p-cumarilados. Sin embargo se produjeron señales muy intensas de p-ácido cumárico y en mucho menos proporción ácido ferulico.

En abacá y sisal se observó un alto grado de acetilación y un alto contenido en unidades S, favoreciendo la formación de enlaces β -O-4'. Sus ligninas presentan una estructura más lineal que por ejemplo la de hierba elefante. La lignina de abacá también contiene p-ácido cumárico, pero en mucho menos proporción que la de hierba elefante. Sisal no contiene ácido p-cumárico y ácido ferulico. La lignina de paja de trigo también contiene ácido p-cumárico y niveles de ácido ferulico más altos que la hierba elefante. La presencia de ácido p-cumárico en la lignina de hierba elefante, abacá y paja de trigo se demostró por Py-TMAH-GC/MS, 2D-NMR y DFRC. Sin embargo no queda claro en que posición está unida a la lignina. Una fracción está esterificada a C_γ de sobretodo unidades S y otra fracción está esterificada a C_α y/o C_β a base de los resultados obtenidos por DFRC (señales intensas de p-ácido cumárico libre). También se observó ácido ferulico, identificado por Py-TMAH-GC/MS, DFRC y 2D-NMR en el caso la fibra de hierba elefante. La posición de unión de ácido ferulico no queda clara.

Salvado de trigo y BSG son residuos agro-industriales. No son materiales 'puramente' lignocelulósicos; también contienen una fracción considerable de proteínas, vitaminas, etc. Además sus componentes de polisacáridos se diferencian estructuralmente de fibras 'puramente' lignocelulósicas. Existe la posibilidad que hubo interferencia en los análisis usados para materiales lignocelulósicos. De BSG no se pudo aislar MWL según el procedimiento de (Björkman, 1956) y de salvado de trigo justamente suficiente para un análisis de 2D-NMR. No se encontraron unidades S y G, ni en las fibras en situ. Sin embargo hay señales en la zona aromática del espectro HSQC, identificado por unidades H en el BSG. Las unidades G y S se detectaron en poca cantidad por Py-GC/MS y por DFRC. Curiosamente BSG y salvado de trigo contiene respectivamente 12 y 9 % de lignina Klason. Puede resultar interesante estudiar la interferencia de proteínas y de ácidos hidróxínicos presentes en los polisacáridos para explicar esta diferencia en resultados.

Actualmente se está investigando la estructura química de los compuestos lipofílicos y se está analizando la lignina presente en las fracciones de celulosa y hemicelulosas según un método recién publicado y universal. En investigaciones próximas se cuantificarán las proporciones de las diferentes enlaces y unidades H, G y S de las ligninas aisladas medido por 2D-NMR y DFRC. Más adelante se podría intentar optimizar técnicas analíticas (sobretudo en situ en la fibra) durante tratamientos químicos y enzimáticos.

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

1. Materiales lignocelulósicos

En general las paredes celulares de plantas consisten en polisacáridos, compuestos fenólicos y compuestos minoritarios (minerales, lípidos, proteínas, etc.). Los polisacáridos se clasifican en celulosa, hemicelulosas y pectinas. Gran parte de los compuestos fenólicos están presentes en la estructura de lignina. La pared celular primaria envuelve la célula que durante la fase de expansión celular crece hasta un tamaño 100 veces más larga que su tamaño justo después de dividirse. Después ciertas células empiezan a desarrollar una pared secundaria. Los compuestos fenólicos pueden alcanzar hasta 30 % en peso seco de las paredes celulares secundarias (Scheller, 2010). Relativamente poco se conoce sobre la organización y coordinación de celulosa, hemicelulosa y lignina durante y después la biosíntesis que determinan la morfología y funcionalidad de la pared celular

1.1. Materiales lignocelulósicos de interés industrial

Fibras de plantas conocen multitud de aplicaciones industriales, principalmente en el sector de papel y textil. En la última década ha crecido mucho el interés en estos materiales lignocelulósicos como fuente de energía. Actualmente se producen biocombustibles a partir de cultivos que son materias primas para productos comestibles y mientras se está investigando cultivos que no compiten en el mercado de materias primas comestibles. Sobretodo las plantas herbáceas han recibido mucho interés en el sector de biomasa y cultivos energéticos por su renovabilidad y su disposición de stocks de biomasa que alcanzó 1549 millones de toneladas/año a nivel mundial (Kim y Dale, 2004).

Plantas herbáceas se caracterizan por su bajo contenido leñoso. En general suelen tener tallos verdes, finos y blandos, aunque existen especies herbáceas con tallo ancho como el plátano y papaya. Las plantas herbáceas están clasificadas dentro de la división *Spermatophyta* y subdivisión *Angiospermae*, dentro de las clases *Dicotyledoneae* y *Monocotyledoneae* (*Liliopsida*). La mayoría pertenece a la familia de *Poaceae* (*Gramineae* (las gramíneas)), la familia de mayor importancia económica. Crecen rápidamente y producen flores y semillas en relativamente poco tiempo. La mayoría de ellos es anual; mueren después de perder sus semillas. Las bienales y perennes viven respectivamente dos y más hasta 25 años. También pierden sus tallos y hojas, pero al año sobrevive la parte de la planta bajo tierra. En general las plantas perennes pueden ser una mejor opción que plantas anuales, porque no generan los costes anuales de sembra, cosecha, combustibles, etc. Además suelen desarrollar raíces más profundas que fijan más carbono de la atmósfera. Sin embargo no se garantiza la continuidad de la disponibilidad de stocks.

La información de lignina en cultivos herbáceos es relativamente escasa y poco uniforme en comparación con la de especies madereros (Buranov, 2008). Tabla 1 muestra la composición de varios cultivos lignocelulósicos de interés industrial (Carroll, 2009).

Tabla 1: Composición de algunos cultivos lignocelulósicos de interés industrial

Cultivo	Extraíbles	Cenizas	Lignina	Acido urónico	Arabinano	Xilano	Manano	Galactano	Celulosa
Bagazo de caña de azúcar (Saccharum officinarum)	3.78	3.66	23.09	2.16	2.06	22.05	0.35	0.46	39.01
Rastrojo de maíz	5.61	10.06	18.59	2.99	2.42	21.61	0.38	0.87	37.69
Paja de trigo	12.95	10.22	16.85	2.24	2.35	19.22	0.31	0.75	32.64
Pinus radiata	2.7	0.3	25.9	2.5	1.6	5.9	10.7	2.4	41.7
Alamo híbrido	6.89	2.03	25.18	4.31	0.89	13.07	1.81	0.88	39.23
Eucalyptus	4.15	1.22	26.91	4.07	0.3	10.42	1.23	0.74	48.07
'Switchgrass (alamo)' (Panicum virgatumis)	16.99	5.76	17.56	1.17	2.75	20.42	0.29	0.92	30.97
Sorgo dulce (Sorghum bicolor)	22.03	5.04	16.09	1.07	1.65	14.14	0.2	0.52	34.01

1.2. Composición

Evidentemente celulosa, hemicelulosas y lignina son los principales constituyentes de la pared celular de fibras de plantas. La morfología de fibras depende principalmente de la composición y la organización estructural de estos constituyentes. Sin embargo contiene compuestos minoritarios no poliméricos que pueden ser de vital importancia para los procesos fisiológicos de la célula. La cantidad y el tipo de estos compuestos pueden influir mucho en procesos industriales.

A continuación se describen cada uno de los compuestos de una fibra o un material lignocelulósico.

1.2.1. Celulosa

Celulosa es el biopolímero más abundante en la Tierra. Consiste en cadenas lineales de celobiosa (D-glucopiranosil- β -1,4-D-glucopiranososa) de aproximadamente 10.000 unidades glicosídicas en celulosa nativa de fibras madereras donde representan más de 50 % del peso. En la célula vegetal gran parte de la celulosa está presente como microfibrillas empaquetadas muy densamente. Poco se conoce sobre la regulación de este plegamiento. Contiene zonas amorfas y cristalinas. Las cadenas en la zona amorfa son susceptibles a bioconversión (celulasas).

Estudios recientes investigan derivados de celulosa como por ejemplo la esterificación con cloruros de ácidos grasos para su uso en materiales compuestos de construcción para fortalecer (Freire *et al.*, 2006). La superficie de las microfibrillas de celulosa es altamente polar debido a los grupos hidroxílicos que se asocian entre si por puentes de hidrógeno (Sjöstrom, 1993). Eso dificulta la compatibilidad con materiales no polares y afecta a la agregación entre fibras y a la absorción de humedad que hacen disminuir respectivamente su dispersión en materiales compuestos y su rigidez. Con técnicas analíticas como XPS y TOF-SIMS (Freire *et al.*, 2006) caracterizaron las modificaciones químicas y físicas en superficies menos polares de derivados de celulosa con ácidos grasos. Celulosa contiene regiones cristalinas y amorfas.

1.2.2. Hemicelulosas

Hemicelulosas son más difíciles de clasificar, es decir, son polisacáridos con grupos heterogéneos. Tienen un grado de polimerización entre 100 y 200 en fibras madereras. Son insolubles en agua, pero en medio alcalino se disuelven. Plantas herbáceas suelen contener más hemicelulosas y menos ramificados. Las pajas de cereales (trigo, arroz, centeno, cebada, etc.) suelen contener entre 30 y 40 % de hemicelulosas con algunas excepciones (Fang *et al.*, 2000b; Xiao *et al.*, 2001; Sun *et al.*,

2000a; Sun *et al.*, 2000b; Klinke *et al.*, 2002; Sun y Tomkinson, 2003). Residuos agrícolas de éstas (principalmente salvado) contienen entre 40-50% (Claye *et al.*, 1993; Saulnier *et al.*, 1995; Chanliaud, 1995).

Los autores no siempre clasifican las hemicelulosas de la misma forma. Se pueden clasificar según la cadena principal en xilanos (Xyl), xiloglucanos (XyG), mananos y glucomananos (Scheller, 2010). Son ramificados con una cadena principal de glucosa, xilosa y/o manosa con enlaces β -(1 \rightarrow 4) entre sí, todos en posición ecuatorial en el C₁ y C₄ (Figura 1). Otros autores lo clasifican en xilanos, glucuronoxilanos, arabinoxilanos, mananos, glucomananos y galactoglucomananos.

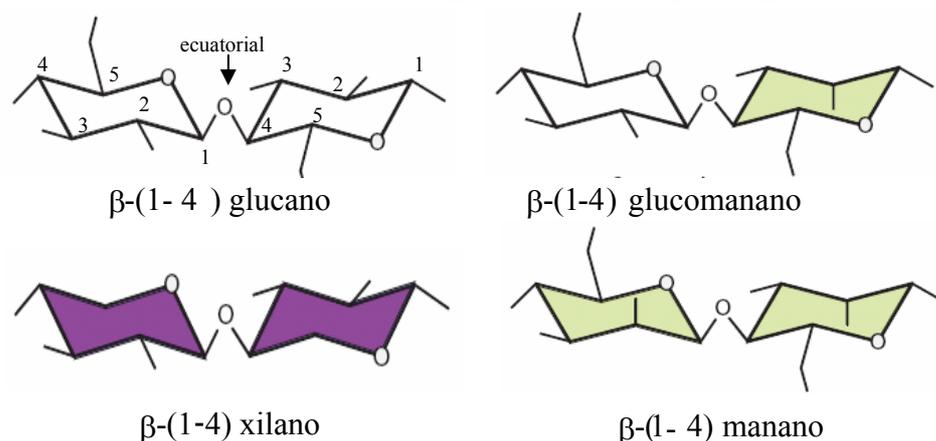


Figura 1: En hemicelulosas los enlaces β -(1 \rightarrow 4) unen los átomos C₁, O y C₄ en posición ecuatorial, entre unidades de glucosa, xilosa y manosa.

Las hemicelulosas de la pared celular de las gramíneas normalmente contienen una cadena principal de β -(1,4) xilopiranosil con α -L-arabinofuranosil en las ramificaciones (Izydorczyk, 1995; Sun *et al.*, 2002a; Xiao *et al.*, 2001). En algunos casos como en plantas del orden de los *Poales* (principalmente cereales) se alternan los enlaces β -(1 \rightarrow 4) con β -(1 \rightarrow 3). Las ramificaciones de hemicelulosas consisten en oligosacáridos, una cadena pequeña típicamente entre 1 y 4 unidades de D-galactosa, D-manosa, L-arabinosa, D-xilosa, L-fucosa, L-ramnosa y/o D-ácido glucurónico. Figura 2 demuestra todos los posibles monosacáridos presentes en las cadenas de hemicelulosas (Fengel y Wegener, 1984). Sin embargo las unidades constituyentes, la estructura y el contenido total de la hemicelulosa varían entre los tipos de especies, dentro de la misma especie y incluso según el tejido anatómico y fisiológico del organismo vegetal. Figura 3 ilustra la estructura típica de la cadena principal y las ramificaciones observados en las hemicelulosas de dicotiledones, monocotiledones y coníferas y Tabla 2 compara el contenido típico en hemicelulosas.

La función principal es su interacción con la celulosa y lignina para proporcionar rigidez a la pared celular. Las cadenas de hemicelulosas se asocian con las microfibrillas de celulosa tras su carácter polar (puentes de hidrógeno). Su comportamiento físico-químico, principalmente su capacidad de enlace y su comportamiento visco-elástico, es de gran importancia para proporcionar propiedades deseadas como grado de hinchamiento, (re)hidratación, plasticidad, flexibilidad, rigidez, dureza, etc. durante el proceso de fabricación de papel. Sin embargo en procesos de biorrefinería tratan de

convertir hemicelulosa con mezclas de enzimas que actúan sobre celulosas y hemicelulosas simultáneamente, frecuentemente en la segunda fase de hidrólisis

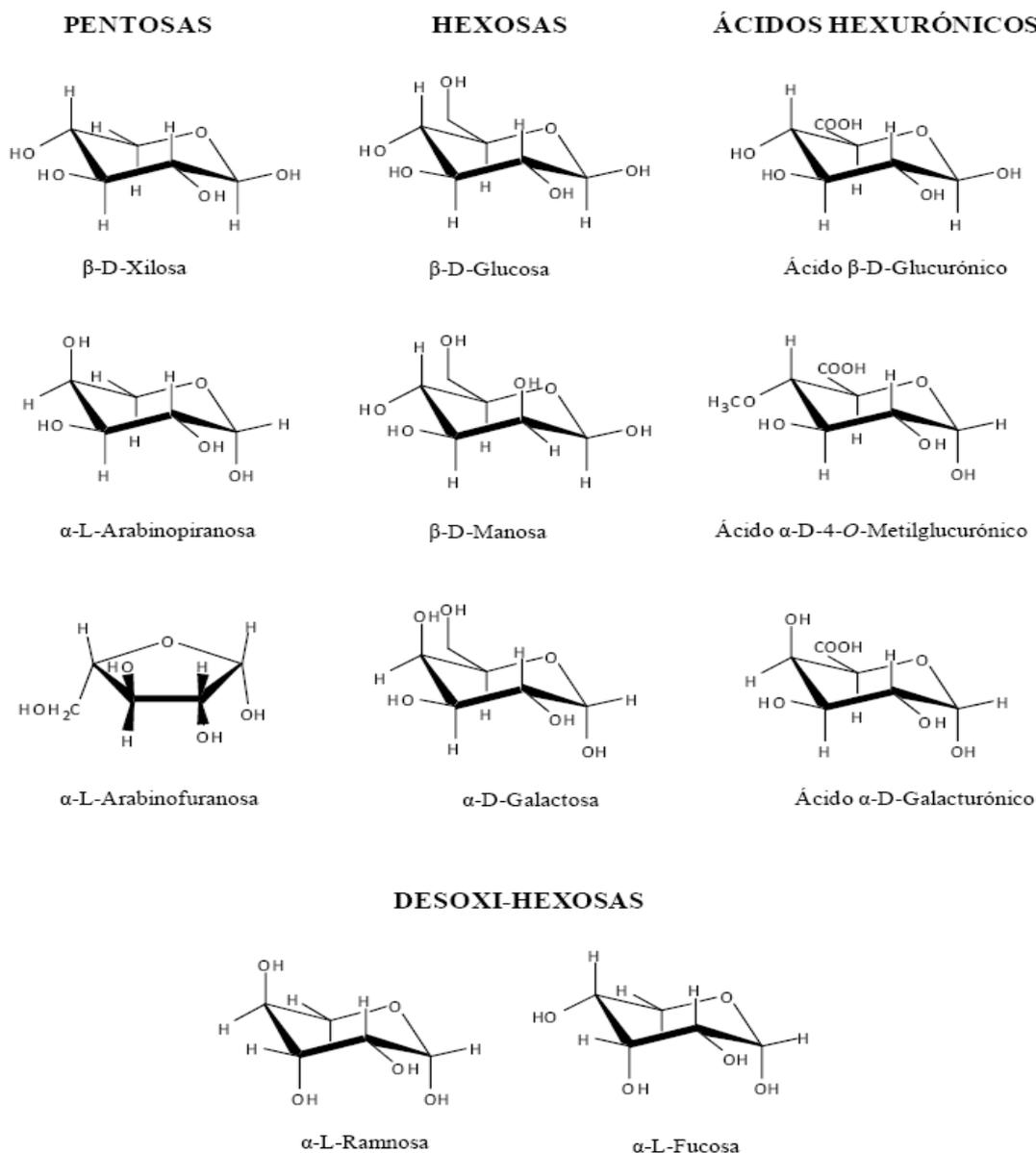


Figura 2: Diferentes posibles monómeros presentes en cadena principal y cadena lateral de hemicelulosas (adaptado de Fengel y Wegener, 1984).

Tabla 2: Contenido en polisacáridos de hemicelulosas (%) de la pared primaria y secundaria de dicotiledones, monocotiledones y coníferas (ausente: -, presente sin dato cuantitativo: +).

Polisacárido	Pared de dicotiledones		Pared de monocotiledones		Pared de coníferas	
	Primaria	Secundaria	Primaria	Secundaria	Primaria	Secundaria
Xiloglucanos	20-25	Menor	2-5	Menor	10	-
Glucuronoxilanos	-	20-30	-	-	-	-
Glucorono-arabinoxilanos	5	-	20-40	40-50	2	5-15
(Gluc)mananos	3-5	2-5	2	0-5	-	-
Galactoglucomananos	-	0-3	-	-	+	10-30
β -(1 \rightarrow 3,1 \rightarrow 4)-glucanos	-	-	2-15	Menor	-	-

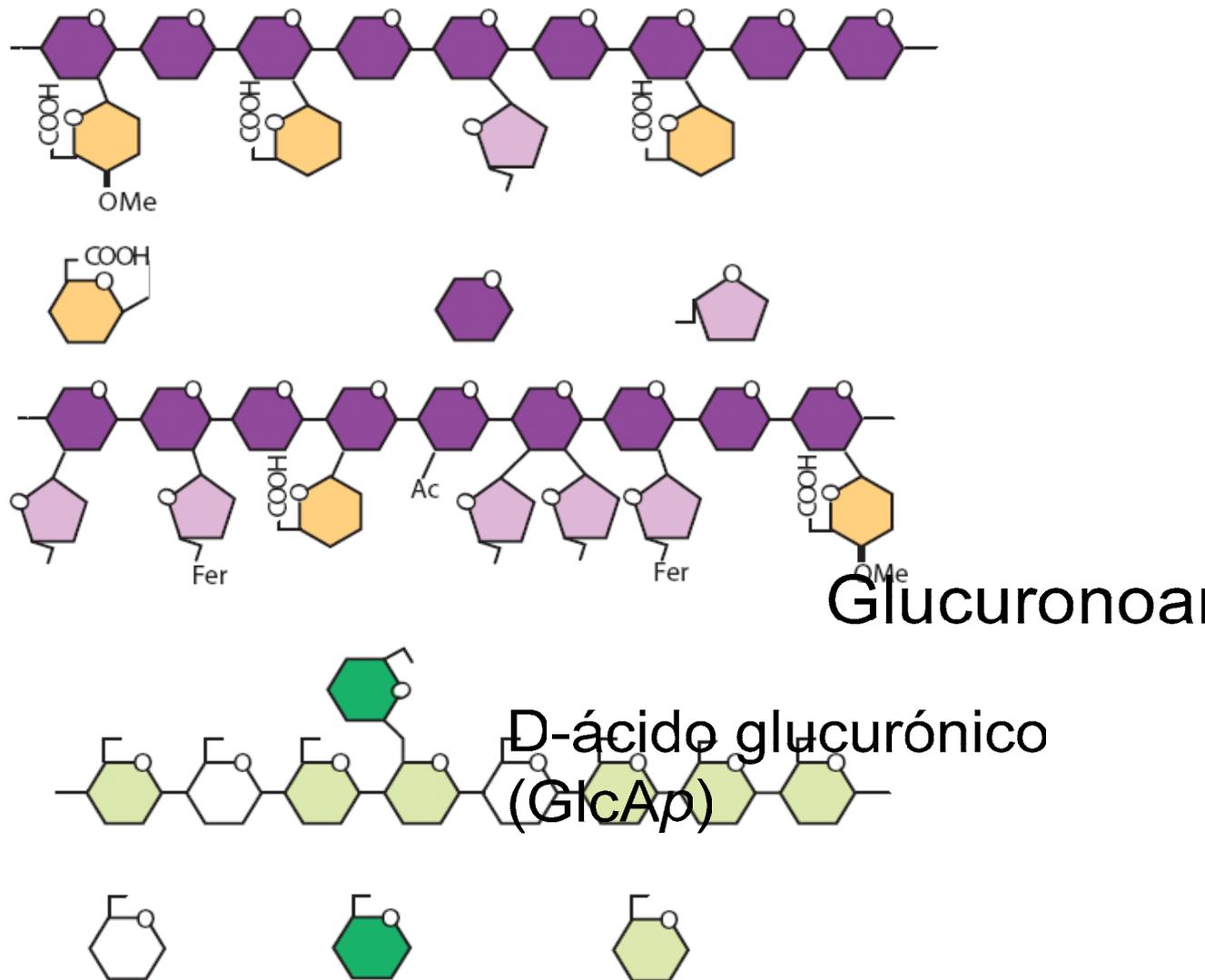


Figura 3: Estructura de la cadena central y de las ramificaciones de glucurono-arabinoxilano (Gax), glucuronoxilano y galactoglucomanano típico en respectivamente monocotiledones, dicotiledones y coníferas. (Fer = ferulato) (adaptado de (Scheller, 2010)).

Xilanos

Los xilanos forman un grupo de polisacáridos muy diversos, pero todas disponen de una cadena principal de unidades de xilosa con enlaces β -(1,4) entre sí. Se encontraron sustituciones muy diversos, frecuentemente arabinofuranosa que se sitúa principalmente sobre átomo O-3 en xilosa en plantas herbáceas y sobre átomo O-2 en dicotiledones. Frecuentemente en plantas herbáceas se encuentran sustituyentes de feruloilarabinofuranosil (Wende, 1997). Los glucuronoxilanos y los glucuronoarabinoxilanos abundan respectivamente en dicotiledones y monocotiledones (Figura 3). Los galactoglucomananos son típicos en coníferas. En dicotiledones y monocotiledones no perteneciendo a las gramíneas, xiloglucanos representan la mayor fracción de la hemicelulosa. Los dicotiledones contienen más sustituciones sobre las unidades de xiloglucanos. Otra diferencia es que contienen más xiloglucanos que monocotiledones (Tabla 2).

Xiloglucanos

Consisten en una cadena principal de β -(1,4)-D-Glcp. Hasta 75 % de las unidades de Glcp pueden estar ramificadas con un monosacárido u oligosacárido (con α -L-fucosa en muchas especies como ilustrado en Figura 4).

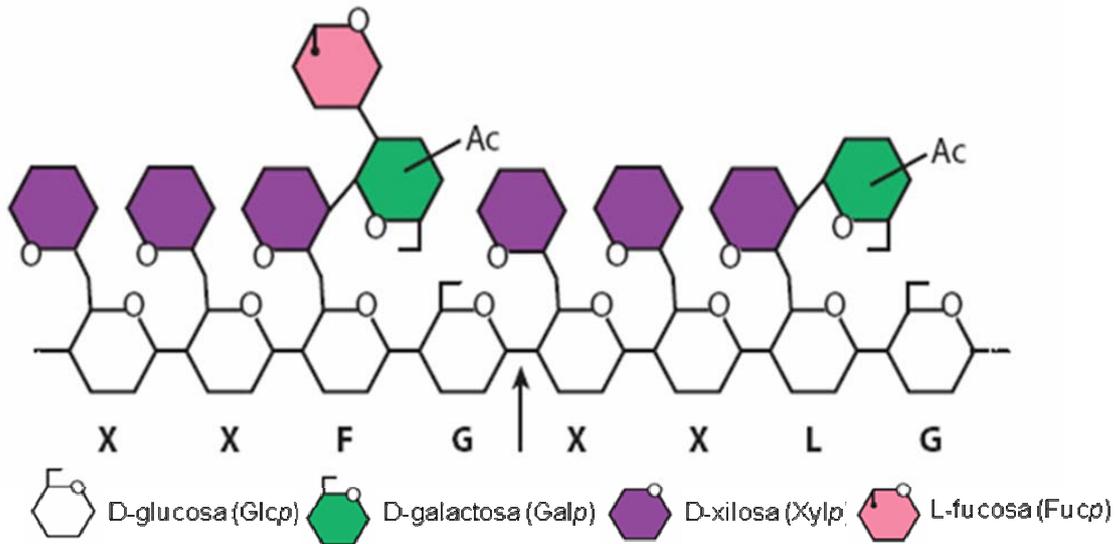


Figura 4: Ilustración de la cadena central y cadenas laterales en xiloglucanos (Scheller, 2010).

El grado de ramificación divide los xiloglucanos en 2 tipos: XXXG y XXGG. Las cadenas principales contienen respectivamente 3 unidades ramificadas con Xylp (X) + 1 unidad no ramificada (G) y 2 unidades ramificadas + 2 no ramificadas. G y X representan respectivamente β -(1,4)-D-Glcp y α -D-Xylp-(1,6)- β -4-D-Glcp- β -(1,4). El grado de ramificación determina el grado de bioconversión por β -(1,4)-glucanasas. Estos endoglucanos rompen el enlace glicosídico entre unidades no ramificadas (G). De xiloglucanos tipo XXXG generan una mezcla típica de oligosacáridos (tetrasacáridos) mientras con tipo XXGG el patrón de oligosacáridos generado depende de la especificidad enzimática y el grado de acetilación de grupos hidroxílicos de las unidades no ramificadas.

Xiloglucanos forman un red con celulosa que es el principal fuente de rigidez de la pared primaria. 'Cubren' la celulosa y reducen la agregación entre microfibrillas de celulosa. La fijación de xiloglucanos a celulosa es un proceso complejo y puede mostrar varias conformaciones. La formación y rotura de los enlaces glicosídicos de xiloglucanos por transglucosil hidrolasas podrían estar involucrados en garantizar la rigidez mecánica de la pared celular de células en crecimiento.

Glucuronoxilanos

Los glucuronoxilanos juegan un papel importante durante la formación de la pared secundaria. Mutantes *IRX8* y *IRX9* (Persson *et al.*, 2007) desarrollaron un xilema irregular y contienen menos glucuronoxilanos indicando su importancia en el enlazamiento entre xilanos y la pared secundaria. Estudios de NMR (Pena *et al.*, 2007) descubrieron la secuencia de 4- β -D-Xylp-(1,4)- β -D-Xylp-(1,3)- α -L-Rhap-(1,2)- α -D-GalpA-(1,4)-D-Xylp en los grupos terminales reductores de glucuronoxilanos de *Arabidopsis thaliana*. Encontraron una relación directa entre la cantidad de esta secuencia, la cantidad de cadenas de glucuronoxilanos y la longitud de la cadena (dispersidad). *IRX9* contiene más cadenas de glucuronoxilanos y más cortas, *IRX8* al revés (dispersidad más alta). Esta secuencia también está presente en glucuronoxilanos de *Betula verrucosa* ('birch') y *Picea*

abies ('spruce'), indicando la conservación de éste grupo terminal durante la evolución hasta especies coníferas y herbáceas. Resulta interesante encontrar genes comunes que han sido conservado durante la evolución. (Pena *et al.*, 2007) indica que los genes *IRX8* regulan la biosíntesis de la secuencia encontrada en el grupo terminal reductor de glucuronoxilanos y la terminación de la elongación en éste grupo terminal reductora . Los genes *IRX9* regulan la elongación de las cadenas por adición de xilosa en el grupo terminal no reductor. Esta secuencia podría servir como 'primer' en la biosíntesis de glucuronoxilanos.

Pectinas

Pectinas son polisacáridos heterogéneos y contienen un alto porcentaje de ácidos galacturónicos. Se caracterizan normalmente por extracción con ácidos a temperatura elevada o con reactivos quelantes. Son polisacáridos con estructuras y propiedades físico-químicos altamente variados y la caracterización por su solubilidad (extracción) no es lo más apropiado (Scheller, 2010).

1.2.3. Lignina

La lignina representa entre 25 y 33 % de la biomasa en madera de especies coníferas y entre 18 y 34 % de frondosas (Aitken *et al.*, 1988). Detrás de celulosa y hemicelulosa, es el tercer biopolímero más abundante en la Tierra. Este polímero se encuentra principalmente en la lámina media de la pared celular y en las capas de la pared celular. Con las hemicelulosas forman una matriz alrededor de las microfibrillas de celulosa.

Lignina es de vital importancia para el organismo vegetal. Desempeña funciones en el transporte de agua, nutrientes y metabolitos en el sistema vascular facilitado por sus propiedades como estructura macromolecular. Su hidrofobicidad junto con el nivel de entrecruzamiento con los polisacáridos (ver apartado 2) es importante para la permeabilidad de los poros entre las células vegetales. Se encuentra sobretodo en el xilema. Juega un papel importante en el sistema de defensa de la planta frente a patógenos y protegen los polisacáridos de la pared celular frente a despolimerización (Sarkanen y Ludwig, 1971; Hüchelhoven, 2007). Lignina tiene una estructura ópticamente inactiva (Ralph *et al.*, 1999b). Sin embargo los dímeros de monolignoles, los denominados lignanes, tienen actividad óptica y biológica (antibacterial y antioxidante). Cultivos herbáceos y legumbres contienen hasta 5 % lignanes (Ralph, 1999). Lignanes han sido identificados en extractos de varias especies incluido en cereales como salvado de trigo (Smeds *et al.*, 2007). También se detectaron en el extracto lipofílico de paja de trigo (Sun y Sun, 2001).

La composición química de lignina (biopolímero) consiste principalmente en tres tipos de unidades repetitivas: cumaril (H), guaiacil (G) y siringil (S). Están derivadas de los denominados monolignoles, los alcoholes p-cumárico (4-hidroxicinámico), coniferílico (4-hidroxi-3-metoxicinámico) y sinapílico (4-hidroxi-3,5-dimetoxicinámico). Son los precursores en la biosíntesis de lignina. Se diferencian en la sustitución con un grupo metoxilo (-OMe) en las posiciones 3 y 5 de la unidad aromática (Figura 5).

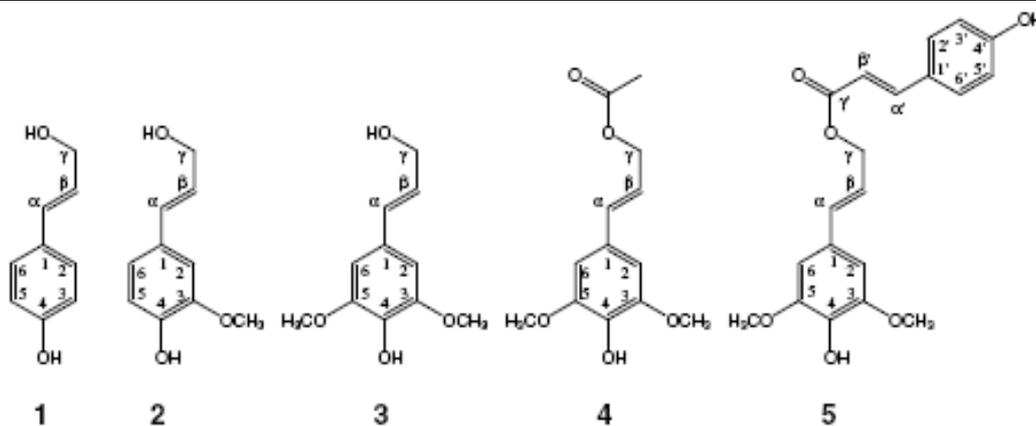


Figura 5: Estructura de los precursores alcohol p-cumarílico (1), alcohol coniferílico (2), alcohol sinapílico (3), sinapil acetato (4) y sinapil p-cumarato que se incorporan en la biosíntesis de lignina.

En general se distingue entre lignina de gimnosperma ('softwoods' o coníferas), angiosperma ('hardwoods' o frondosas) y herbáceas ('non-woody'). Sus ligninas constituyen respectivamente principalmente en unidades G, unidades G y S, mientras lignina de fibras herbáceas contienen los tres unidades G, S y H en proporciones muy variables (Lapierre *et al.*, 1995; Billa *et al.*, 1998). Paja de trigo por ejemplo contiene respectivamente 5, 49 y 46 % de unidades H, G y S (Lapierre *et al.*, 1995).

Las proporciones relativas con que se incorporan los monolignoles durante la lignificación pueden alterarse en los diferentes estadios de la vida de una planta. Además la estructura de lignina depende en que tipo de tejido se encuentra. Por ejemplo lignina del xilema es de tipo 'hardwood' (sólo unidades S y G y < 1 % de unidades H). El contenido y la composición de lignina entre varias especies se deben comparar en el mismo estado vegetativo y en el mismo tejido.

1.2.3.1. Biosíntesis

Lignina es un biopolímero sintetizado a partir de fenilalanina. La lignina presenta una estructura macromolecular con unidades unidas por varios tipos de enlaces que no se repiten con cierta frecuencia, es decir, tiene una estructura tridimensional irregular. El estudio de la biosíntesis de ligninas de varias plantas naturales y transgénicas permite explicar la alta variedad de enlaces encontrada y controlar en cierto modo la estructura y composición a nivel de expresión de los genes que intervienen en la biosíntesis. La biosíntesis de monolignoles a partir de fenilalanina está regulada por genes. Figura 6 muestra la ruta de la biosíntesis de dichos precursores de las de unidades G, H y S en lignina (Vanholme *et al.*, 2008). Su expresión regula la actividad de las enzimas PAL ('phenylalanine ammonia-lyase'), C4H ('cinnamate 4-hydroxylase'), CCR ('cinnamoyl-CoA reductase'), 4CL (4-coumarate- CoA ligase), HCT ('hydroxycinnamoyl CoA : shikimate hydroxycinnamoyl transferase'), C3H ('coumaroyl shikimate 3-hydroxylase'), CCoAOMT ('caffeoyl CoA 3-O-methyltransferase'), CCR (''), F5H ('ferulate 5-hydroxylase'), COMT ('caffeic acid 3-O-methyltransferase') y en menos grado CAD ('cinnamyl alcohol dehydrogenase').

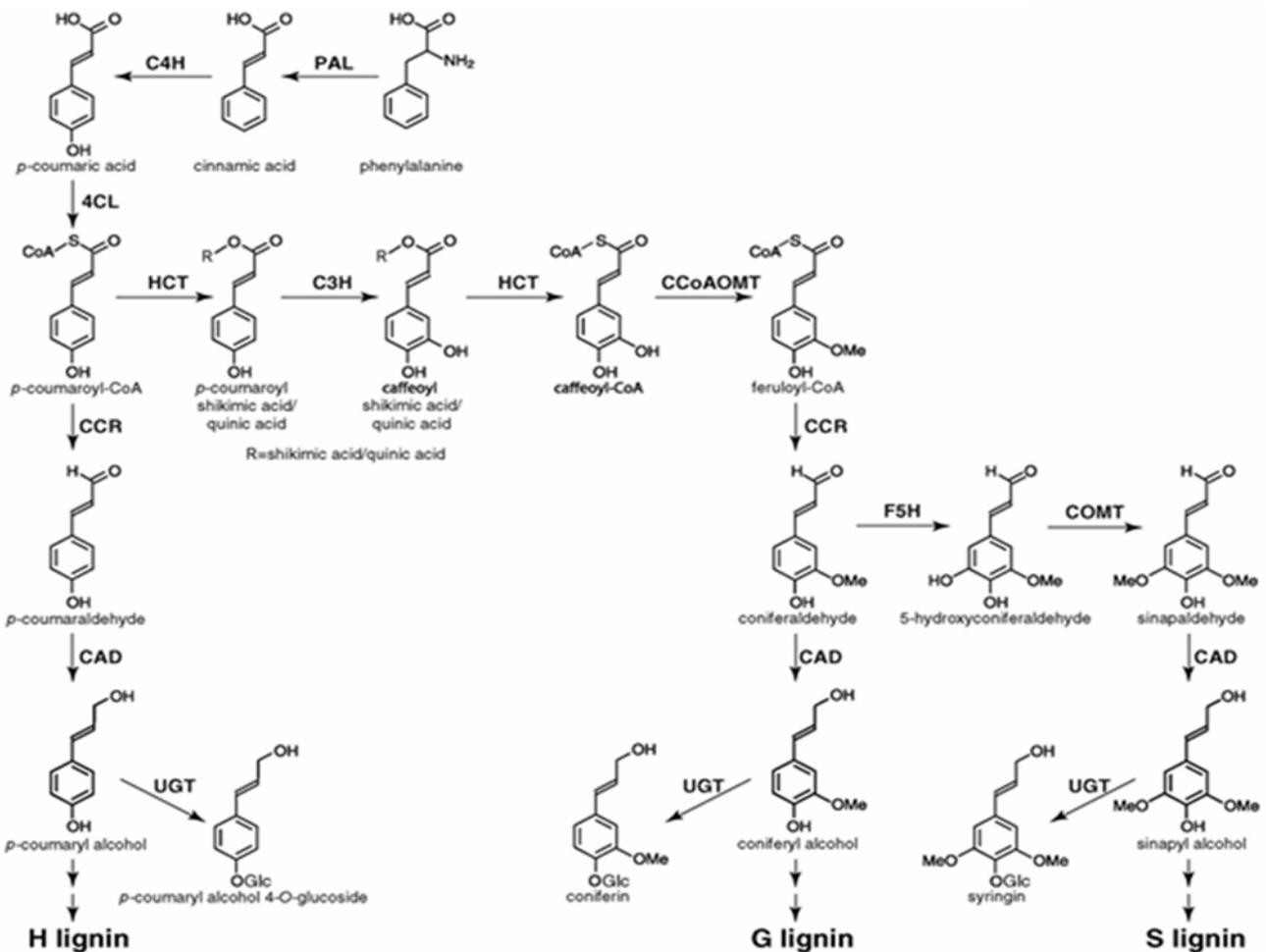


Figura 6: Biosíntesis de los precursores (alcoholes p-cumarílico, coniferílico y sinapílico) a partir de fenilalanina dando lugar a su polimerización en lignina (Vanholme *et al.*, 2008)

La alteración genética de la regulación ('downregulation') de HCT y C3H resulta en lignina enriquecida en unidades H y de F5H en lignina enriquecida en unidades G mientras la sobre-expresión resulta en lignina casi únicamente con unidades S. Cultivos con 'downregulation' de COMT sintetizan lignina con menos unidades S y incorpora alcohol 5-hidroxiconiferílico. Estudios recientes demuestran que la biosíntesis de los monolignoles dispone de una cierta flexibilidad, tanto en plantas naturales como en transgénicas (Boerjan *et al.*, 2003; Ralph *et al.*, 2004; 2007). En general los tres precursores más abundantes son los alcoholes p-cumarílico, coniferílico y sinapílico, los denominados monolignoles (respectivamente compuesto 1, 2 y 3 en Figura 5). Demostraron (del Río *et al.*, 2004; 2007; 2008; Martínez *et al.*, 2008) que no sólo estos 3 monolignoles se incorporan en la lignina durante la biosíntesis. También los alcoholes p-cumarílico, coniferílico y sinapílico con una acilación en el carbono γ (compuestos 4 y 5 en Figura 5) se comportan como monolignoles. Las acilaciones consisten en la formación de enlaces éster que se producen enzimáticamente (Vanholme *et al.*, 2008). Los monolignoles acilados se encuentran sobretodo en lignina de angiospermas madereras y no-madereras (Lu y Ralph, 2002; Lu *et al.*, 2004; Lu y Ralph, 1999; Ralph *et al.*, 1994; del Río *et al.*, 2007b) como en la de kenaf (*Hibiscus cannabinus L.*), *Carpinus betulus L.*, maíz (*Zea mays L.*) y abacá (*Musa textilis N.*). De esta última más que 80 % de las unidades S están acetiladas (del Río *et al.*, 2007). También se reportaron unidades p-hidroxibenzoilados en varias especies (Landucci *et al.*, 1992; Sun *et al.*, 1999). La acilación no ocurre a nivel de polímero; los monómeros respectivos están acilados antes de

acoplarse por lo cual se le consideran como otro monolignol más. Poco está conocido sobre la funcionalidad de estas acetilaciones. También se observaron que ácidos dihidroxicinámicos (5-hidroxiconiferílico) y aldehídos derivados de los monolignoles se incorporaron en la estructura de lignina en plantas transgénicas (Ralph *et al.*, 1997; 1998; Sederoff *et al.*, 1999). (Morreel *et al.*, 2004) encontraron nuevas estructuras de coniferil benzodioxano en la lignina de álamos transgénicos deficientes en COMT. Incluso derivados ácidos - y ésteres hidroxicinámicos, arilpropano-1,3-dioles, arilgliceroles y tiramina hidroxicinamatos a veces se encuentran en lignina (Ralph, 2007; Vanholme *et al.*, 2008). En general de origen natural suelen abundar en baja proporción, pero pueden contribuir significativamente en la lignina de organismos transgénicos porque son intermedios de la biosíntesis que no terminan de convertirse en monolignoles. El estudio de la alteración de la biosíntesis en plantas transgénicas puede revelar más información sobre los mecanismos bioquímicos y genéticos.

Los monolignoles biosintetizados se polimerizan en la lignina tras acoplamiento oxidativo por la acción de peroxidasas y lacasas (Vanholme *et al.*, 2008). No queda claro si existe una selectividad regulada por proteínas de los sitios de incorporación y la preferencia por un tipo de monolignol o si está sujeta a las condiciones físico-químicas.

1.2.3.2. Biodegradabilidad

La biodegradabilidad de lignina es de gran importancia en la producción de pasta de papel para separar la celulosa. Ligninas más recalcitrantes resulta en más lignina residual, lo que baja el rendimiento de la separación de celulosa y consecuentemente la calidad del papel. Esto a su vez hace aumentar el tiempo de residencia con el riesgo de degradar la celulosa. Se compara la composición (G/H/S) y los diferentes tipos de enlaces presentes en la lignina inicial y la lignina residual. Figura 7 resume todos los tipos de enlaces encontrados en varios tipos de especies. La biodegradabilidad depende de las proporciones de estos enlaces que a su vez dependen principalmente de las proporciones de unidades G, H y S incorporados durante la biosíntesis. No está claro si es un proceso regulado genéticamente por proteínas.

Los enlaces éster y éter son enlaces más fáciles de degradar que los enlaces carbono-carbono, tanto químicamente como enzimáticamente. Estructuras de lignina con menos enlaces carbono-carbono son más abiertas (menos condensadas). A los enlaces éter pertenecen β -O-4' (A, A'), β '-O-4' (E), α -O- γ ' (B), α -O- α ' (B'), α -O-4' (C y G), α '-O-4' (E) y 4-O-5' (H). Los enlaces carbono-carbono encontrados incluyen β - β ' (B, B'), β -5' (C), β -1' (D y F) y 5-5' (E).

En la producción de pasta de papel existe una correlación directa entre la biodegradabilidad y la relación de unidades S y G presente en la lignina (S/G). Relaciones de S/G mayores resulta en rendimientos mayores y menos gastos de reactivo (González-Vila *et al.* 1999; del Río *et al.* 2005). Las unidades S tienen 2 sustituciones aromáticas con un grupo metoxilo. Las unidades G tienen un grupo metoxilo en posición C-3 mientras la posición C-5 no está sustituida y queda disponible para la formación de enlaces carbono-carbono. Lignina con mayor cantidad de unidades G suelen tener una estructura más condensada y es más recalcitrante. Tras análisis de varias fibras herbáceas (del Río *et al.*, 2007; del Río *et al.*, 2008a) encontraron una relación entre la relación S/G, la proporción

de enlaces $\beta\text{-}\beta'/\beta\text{-O-}4'$ y el grado de acetilación. La proporción $\beta\text{-}\beta'/\beta\text{-O-}4'$ es una indicación para la proporción de enlaces condensados/menos condensadas, porque estos enlaces suelen ser los más frecuentes de los enlaces carbono-carbono/carbono-oxígeno-carbono (éteres). Por tanto ligninas con un alto grado de acetilación muestran una estructura más lineal, porque la sustitución en la posición 5 con un grupo metoxilo de unidades S hace que se formen más estructuras $\beta\text{-O-}4'$ y por tanto menos estructuras como $\beta\text{-}5'$ (enlaces que aumentan grado de ramificación). Análisis por DFRC y DFRC' de MWL de diferentes fibras revelaron que el alcohol sinapílico acetilado tiende menos a formar enlaces $\beta\text{-}\beta'$. Tras muchos estudios de la composición (G/H/S) y de los diferentes tipos de enlaces encontrados en diferentes tipos de especies, se han propuestos modelos de estructuras de lignina de especies coníferas, frondosas y herbáceas (Figura 8).

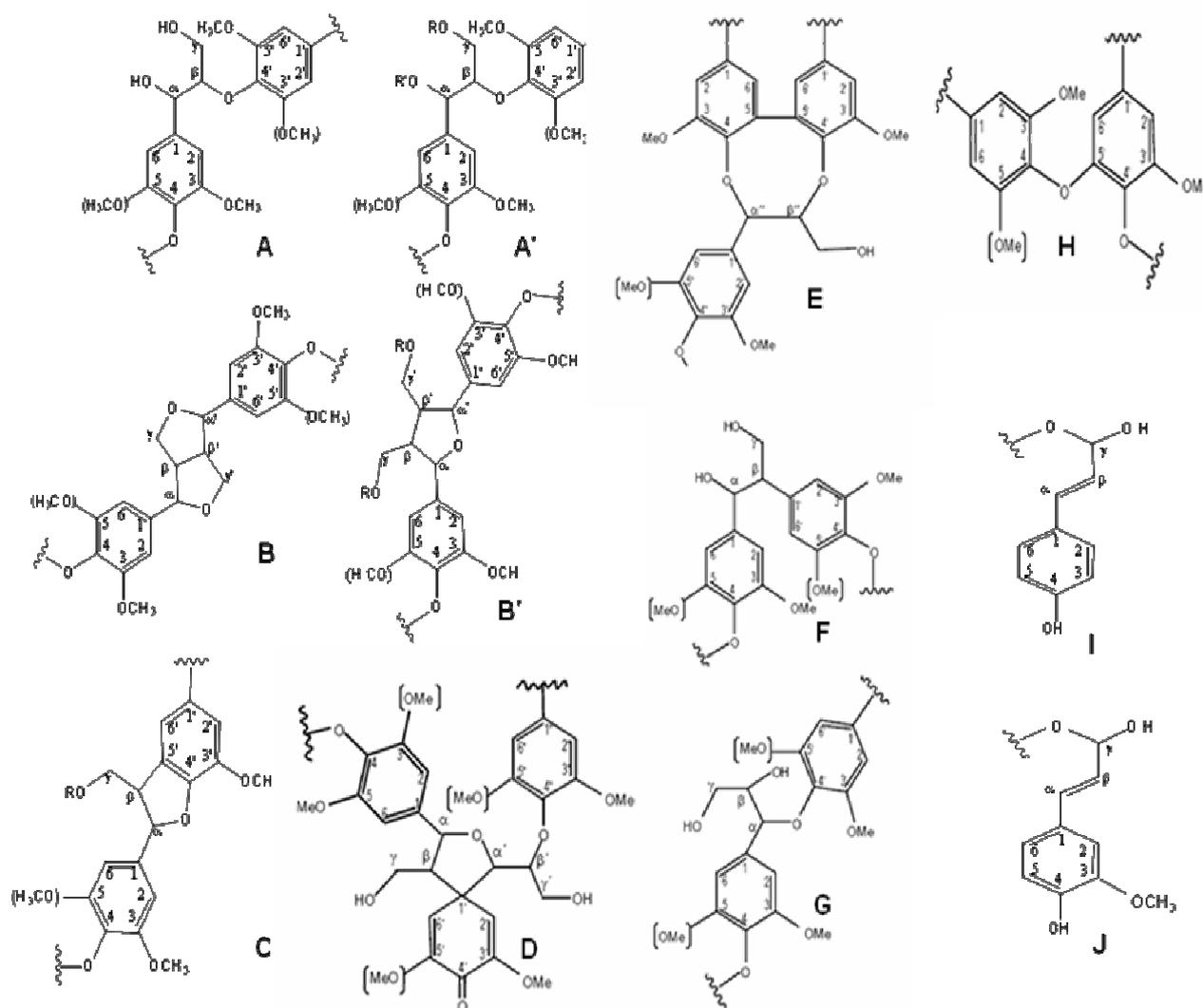


Figura 7: Resumen de todas las subestructuras observadas en especies naturales y transgénicas (**A:** $\beta\text{-O-}4'$, **A':** $\beta\text{-O-}4'$ con acilación en posición γ , **B:** $\beta\text{-}\beta'/\alpha\text{-O-}\gamma'$ (resinol), **B':** $\beta\text{-}\beta'/\alpha\text{-O-}\alpha'$ (resinol a partir de alcohol sinapílico acetato), **C:** $\beta\text{-}5'/\alpha\text{-O-}4'$ (fenilcumarano), **D:** $\alpha\text{-O-}\alpha'/\beta\text{-}1'/\beta'\text{-O-}4''$ (espirodienona), **E:** $5\text{-}5'/\alpha''\text{-O-}4'/\beta''\text{-O-}4'$ (dibenzodioxocina), **F:** $\beta\text{-}1'$, **G:** $\alpha\text{-O-}4'$, **H:** $4\text{-O-}5'$, **I:** p-cumarato y **J:** ferulato)

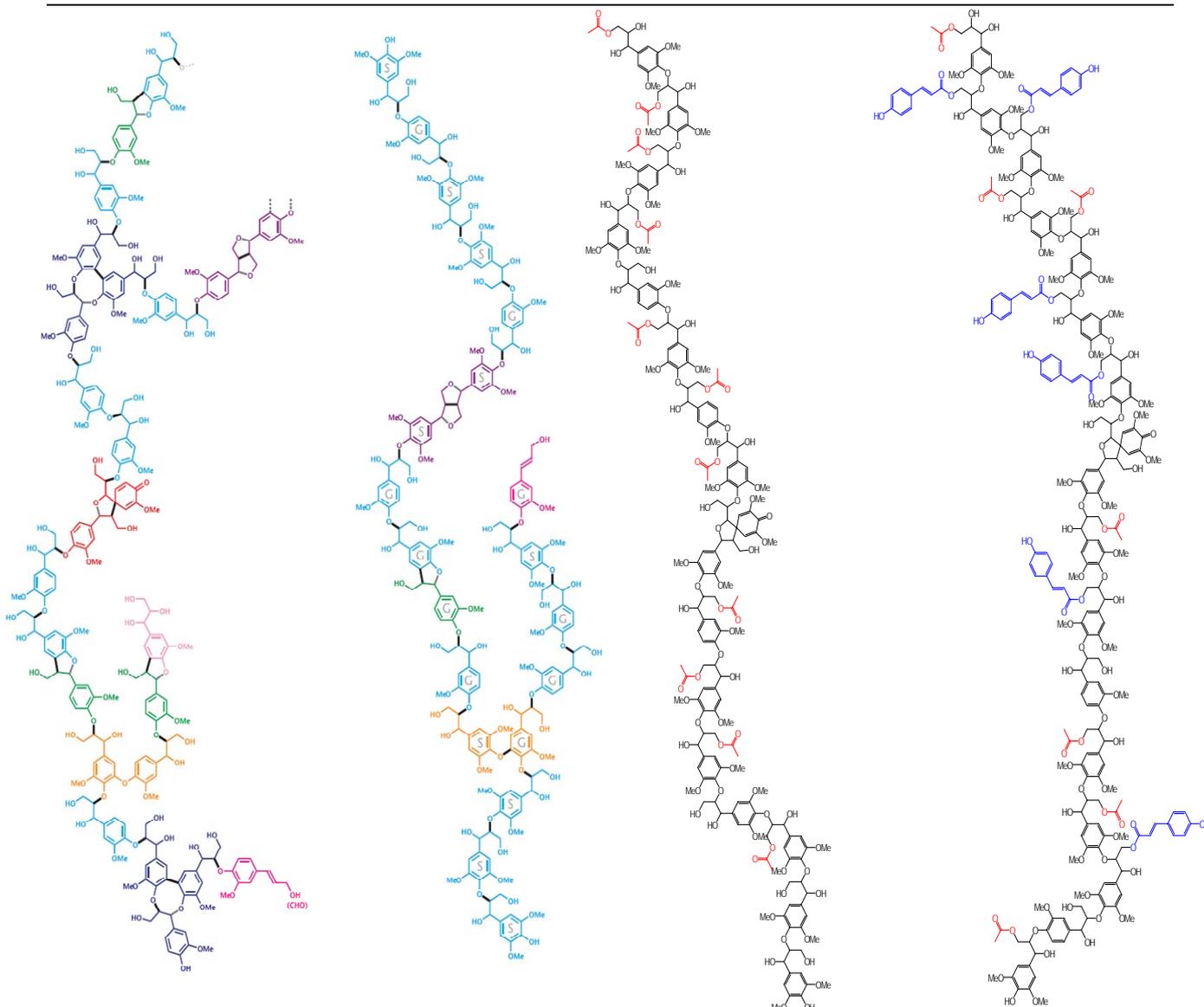


Figura 8: Estructura de modelos de lignina de especies coníferas, frondosas y herbáceas.

1.2.3.3. Análisis

No existe un método general para el análisis cuantitativo de lignina (Hatfield, 2005). Se distingue entre métodos gravimétricos invasivos y métodos no-invasivos manteniendo la estructura de la lignina intacta. La aptitud del método depende principalmente del tipo de material lignocelulósico. Para el análisis de lignina en plantas herbáceas se usan las mismas técnicas analíticas como usadas para lignina de plantas madereras con posibles adaptaciones debido a la presencia de compuestos que interfieren durante el análisis como proteínas, ciertos carbohidratos y en menor proporción ceras que provienen de hojas (Hatfield, 2005). En general el contenido de proteínas en plantas herbáceas es mayor que en especies madereras.

Contenido de lignina

Los métodos más empleados son los de detergente ácido, Klason, permanganato y más recientemente con acetil bromuro. En la lignina Klason puede que interfieren las proteínas, en los

otros análisis no. Se determinó la lignina de tallos de una especie de alfalfa y de *Zea mays L.* con diferentes métodos (Hatfield, 2005). Los resultados variaron bastante entre los diferentes métodos (respectivamente 132.7 ± 28.1 y 59.7 ± 30.3 g lignina/kg pared celular), sobretodo en *Zea mays L.* dónde se prevé más interferencia (herbáceas).

Lignina ácido-soluble

La determinación de lignina ácido-soluble se basa en la determinación de la absorción del extracto soluble en la región UV después la extracción con ácido sulfúrico diluido usado en la determinación de lignina no ácido-soluble (lignina Klason). En esa región los compuestos fenólicos de la lignina absorben mucho más que los carbohidratos. La exactitud del método depende principalmente del uso de un coeficiente de extinción apropiado. Además (Fergus, 1970) encontró una máxima de absorción a 280 y 270 nm para compuestos modelos basados en respectivamente guaiacilo y siringilo. Especies herbáceas en general tienen un contenido más alto en lignina ácido-soluble que especies madereras. En la pared celular de plantas herbáceas pueden haber compuestos fenólicos que no pertenecen a la lignina y pueden interferir en la determinación. Sin embargo en plantas herbáceas puede existir una subestimación del contenido total de lignina debido a una subestimación del contenido en lignina ácido-soluble, sobretodo posteriormente a una extracción en medio alcalino (Hatfield, 2005).

Análisis no-invasivo de lignina nativa

- 2D-NMR

2D-NMR es la técnica más potente para análisis de lignina nativa en general. En 2D-NMR se miden correlaciones ^1H - ^{13}C que resuelvan señales que aparecían solapadas en los espectros unidimensionales. En HSQC se mide correlaciones de acoplamientos a corta distancia (a 1-2 enlaces de distancia entre protón y heteronúcleo). Figura 9 muestra las señales cruzadas en el espectro HSQC de diferentes enlaces que se puede encontrar en lignina y de las unidades S y G presentes en la lignina de sisal (del Río *et al.*, 2008a). Los espectros se dividen en una zona alifática, alifática oxigenada y aromática. Durante la lignificación se forman varios tipos de enlaces entre las unidades de lignina. Con 2D-NMR se puede identificar estos enlaces, principalmente en la región alifática oxigenada, y estimar sus proporciones presentes en la lignina.

Durante el análisis HMBC el protón puede acoplar con un heteronúcleo a distancia más larga (1-4 enlaces). Por ejemplo el protón H_α puede acoplar con C_β y con C_1 de la unidad aromática (2 enlaces de distancia), pero también con C_γ , C_2 y C_6 (3 enlaces de distancia). Además en una unidad S (simétrica) C_2 y C_6 resuenan al mismo desplazamiento, en una unidad G (no simétrica) resuenan a desplazamientos distintos. En la zona aromática del espectro HSQC se observan señales a tres desplazamientos distintos en ambas dimensiones de los núcleos en posición 2, 5 y 6 de unidades G, mientras solapan en unidades S. Al contrario de HSQC, el análisis HMBC da información sobre carbonos cuaternarios (carbonilos y carbonos aromáticos en lignina). Sin embargo el espectro HSQC basta para estimar la relación S/G. En algunos casos el espectro HMBC da más información sobre enlaces con otras unidades y permite diferenciar y cuantificar los diferentes grupos de acilación (acetato, p-cumarato, etc.).

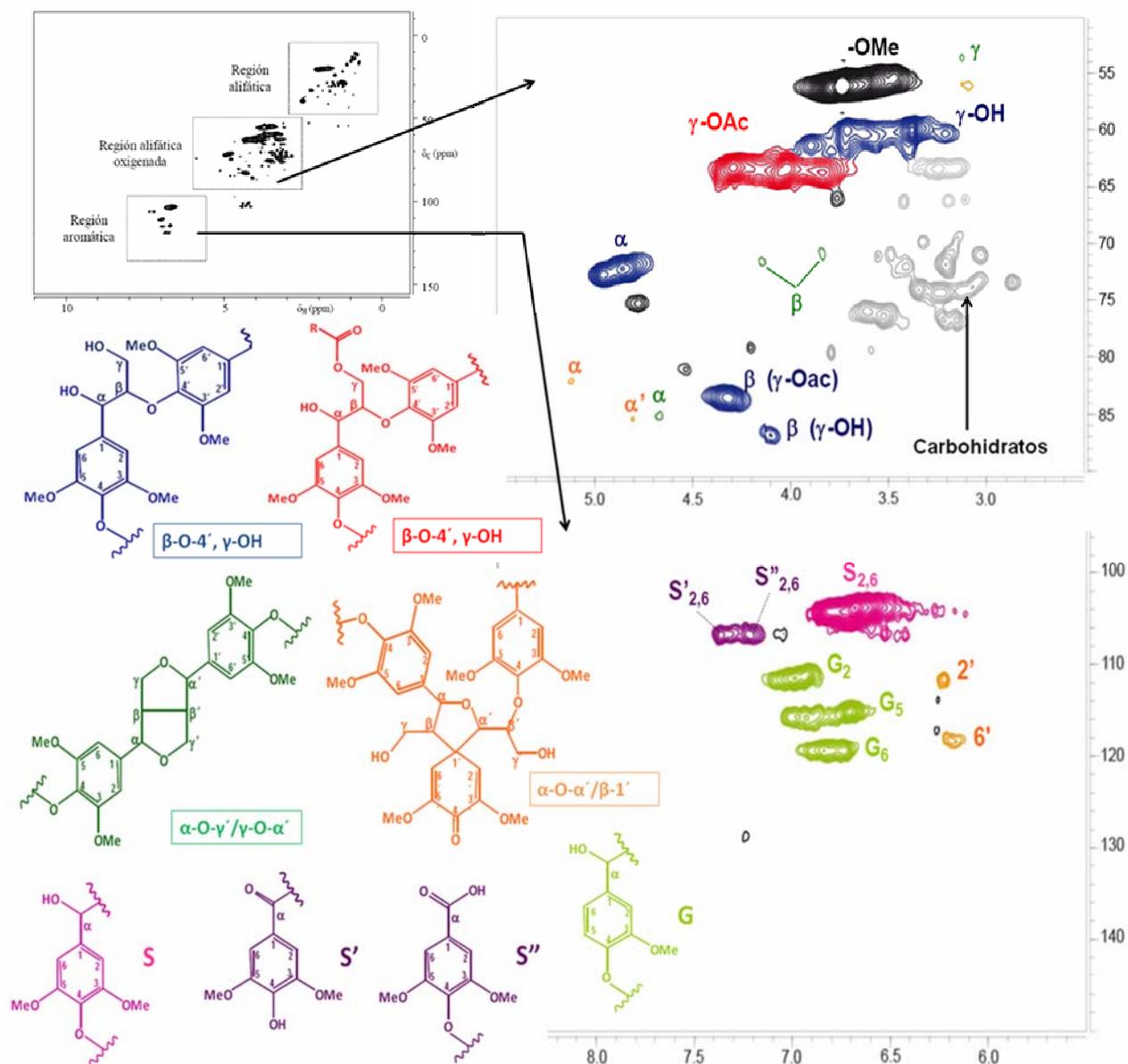


Figura 9: Espectros expandidos de HSQC de la región alifática oxigenada (posiciones α , β , y γ) y de la región aromática (posiciones 1-6 de unidades S y G) de lignina de sisal

Resultan atractivas técnicas que estudian la lignina nativa en situ en la fibra. En NMR se usan disolventes como DMSO o mezclas de disolventes como DMSO/piridina, DMSO/TBAF, DMSO/NMI, etc. La interacción de DMSO con los polisacáridos hace que se forma un estado de gel. La piridina ayuda a disolver, facilita la preparación de geles homogéneos y puede aumentar la resolución (Kim y Ralph, 2010). De tal forma se puede analizar la lignina en cuestión de días sin aislarla previamente. La preparación de MWL es un proceso con un rendimiento bajo (hasta máximo 15 % de extracto del contenido total de lignina). Además se analiza la fracción completa de la lignina al contrario de MWL (solo fracción de la lignina nativa).

(Lu y Ralph, 2003) analizaron la pared celular molida en CD_3Cl después de acetilarla in situ. En muestras de geles resulta difícil obtener un espectro de HMBC útil, porque no se llega a registrar suficientes adquisiciones debido a la atenuación rápida de la relajación en un medio de tal viscosidad (polisacáridos).

La presencia de metales acelera la atenuación de la relajación. Su presencia en la pared celular se puede reducir por acetilación, precipitación y posterior lavado con EDTA, mejorando el comportamiento de relajación (Ralph *et al.*, 1994; 1999a). Se obtienen espectros complejos pero el uso de imanes de NMR cada vez más potentes y de criosondas acopladas a ello, permite obtener una resolución y sensibilidad cada vez mejor (detalles que no se observa en NMR de estado sólido).

Un aspecto a optimizar es el tiempo de molienda con bolas ('ball-milling') para minimizar la alteración de enlaces y grados de polimerización. Durante la molienda de bolas se puede transformar la celulosa del estado cristalino parcialmente en estado amorfo, pero no se oxida. Se aconseja la molienda de fibras dispersadas en tolueno. Próximamente se registraran espectros de 3D-NMR con que se puede resolver las diferentes cadenas alifáticas de cada estructura presenten la lignina, porque se resuelven cada uno en una dimensión (Ralph *et al.*, 1999; Marita *et al.*, 2001).

- *Espectroscopía de infrarrojo*

Debido a la detección de los diferentes modos de vibración de los enlaces C-O, C=O, y O-H, se puede obtener información estructural valiosa de una pequeña muestra de lignina. Para determinar la lignina en situ (en la pared celular) es más complicado, porque gran parte de las bandas de absorción de lignina está solapada con bandas de otros compuestos de la pared celular. Sin embargo quedan algunas bandas características no solapadas para la cuantificación de lignina (Hatfield, 2005). Permite comparar diferencias estructurales y de composición entre varias especies, pero no se puede correlacionar al contenido total en lignina.

Análisis invasivo de lignina nativa

Los 3 métodos destructivos más usados son tioacidólisis, DFRC y pirólisis (Py-GC/MS). Se les pueden aplicar a MWL y en situ directamente con la fibra.

- *DFRC*

En el método de DFRC (Figura 10) se producen derivados acetilados y bromurados en posición α o β . El bromo se elimina posteriormente con Zn, rompiendo selectivamente los enlaces éter y formando un doble enlace α - β . Los productos son monómeros y oligómeros. La identificación y cuantificación de monómeros y dímeros puede dar información muy valiosa, por ejemplo para cuantificar la relación H:G:S. En las condiciones de la reacción se mantiene intacto el grupo de sustitución sobre C_γ . En el método modificado (DFRC') se usa un reactivo propionilado en vez de acetilado, lo que hace posible diferenciar entre productos acetilados (sobre C_γ) de forma sintética y de forma natural por el análisis de los principales iones registrados en el análisis de los productos por GC/MS.

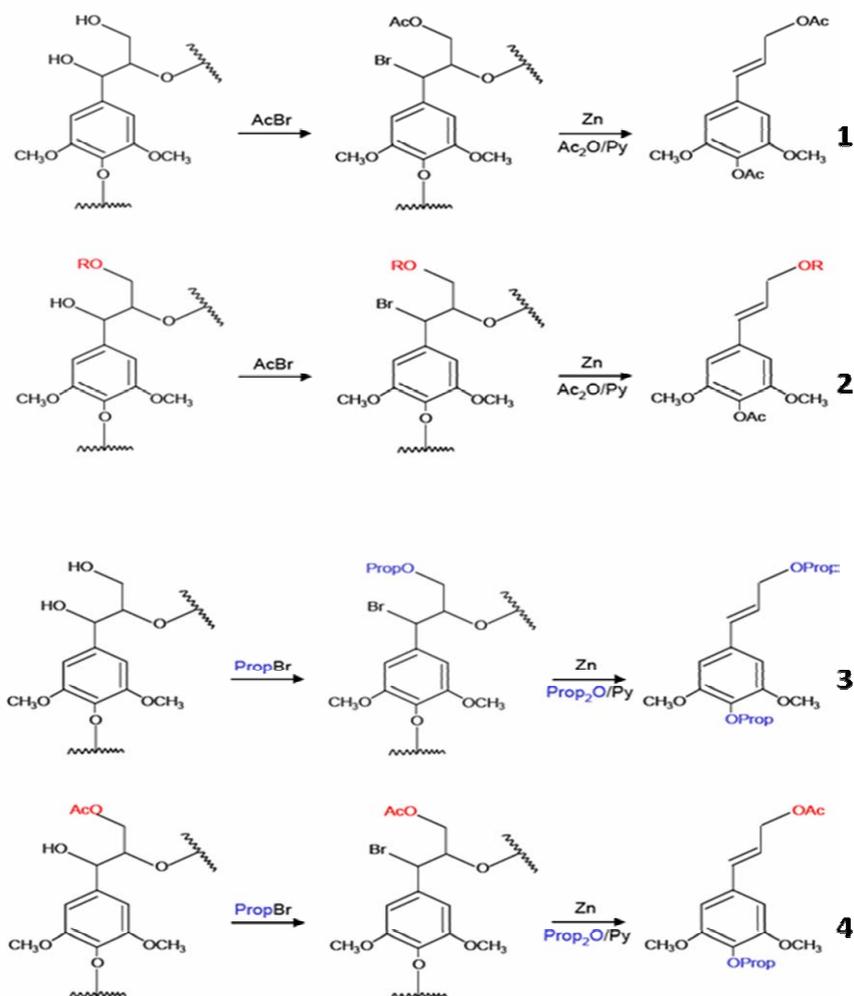


Figura 10: Rotura selectiva de enlaces éter de unidades S por sustitución nucleofílica con acetil – y propionil bromuro (AcBr (DFRC) y PropBr (DFRC')) y posterior eliminación reductiva produciendo monómeros de unidades acetilados (1+2) de cual una fracción está acetilado de forma sintética (3) y una fracción de forma natural (4)

- Pirólisis (Py-GC/MS)

El pirólisis también es un método destructivo que ofrezca varias ventajas frente a otros métodos destructivos. Sólo se requiere \pm entre 0.5 y 1 mg de MWL. Además es posible analizar la lignina in situ en la fibra (1-2 mg de fibra). El análisis es relativamente rápido (\pm 0,5 horas) y sencillo. También se pueden metilar los grupos de hidroxilo antes de analizarlo. Para ello se usa el reactivo TMAH en una solución de 25 %. De este modo se puede identificar ácido ferulico y ácido p-cumárico que están esterificados al carbono γ de unidades de la lignina (Figura 11). Py-GC/MS ofrece un análisis cualitativo y semicuantitativo.

Durante la pirólisis se fragmenta la muestra en compuestos volátiles por descomposición térmica (normalmente entre 400 y 800 °C) en ausencia de oxígeno (Meier y Faix, 1992; Fullerton y Franich, 1983). Cuando la energía térmica supera la energía de ciertos enlaces como enlaces éter incluso algunos enlaces C-C, se produce la disociación de estos enlaces produciendo una mezcla de compuestos fenólicos volátiles. El tipo y la proporción de la sustitución aromática en la lignina se pueden deducir del espectro mediante separación (GC) e identificación (MS) de estos compuestos volátiles con la ayuda de librerías de espectros. La identificación de la sustitución aromática de estos compuestos volátiles hace posible deducir su origen (proveniente de una unidad G, H y/o S).

La suma de las cuantificaciones de cada compuesto da una estimación del contenido (%) en unidades G,H y/o S de la lignina analizada.

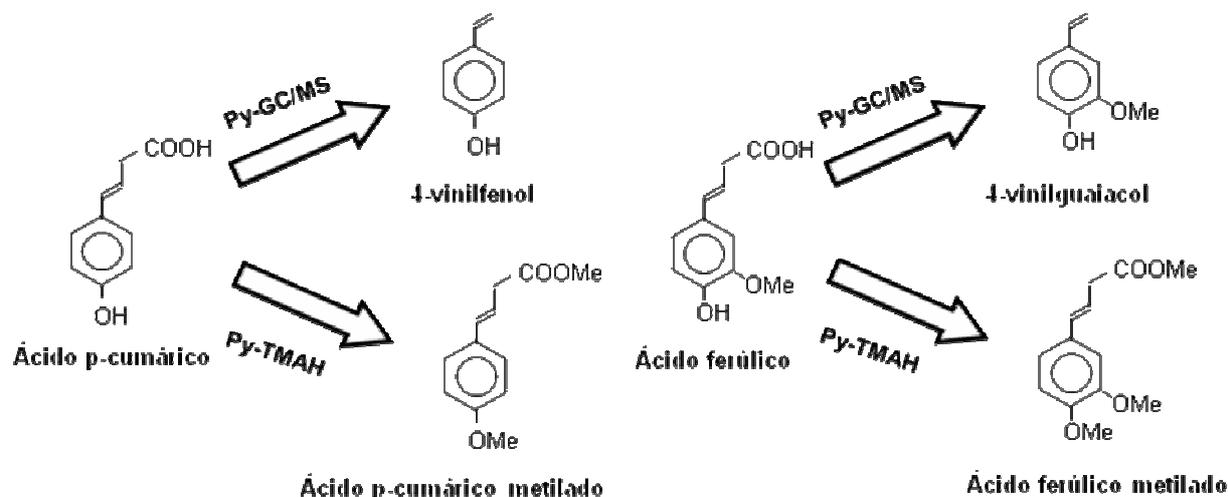


Figura 11: Productos de pirólisis en ausencia (Py-GC/MS) y presencia de TMAH (Py-TMAH) de ácido p-cumárico y ácido ferúlico

- Tioacidolisis

Tioacidolisis (Figura 12) es un método destructivo basado en la solvólisis de MWL o la fibra en una mezcla de dioxano, etanotiol (EtSH) y éterato de trifluoruro de boro ($\text{Et}_2\text{O} \cdot \text{BF}_3$) en atmósfera libre de oxígeno (Lapierre *et al.*, 1985; Rolando *et al.*, 1992; Grabber *et al.*, 1996). La reacción se basa en la actuación de $\text{Et}_2\text{O} \cdot \text{BF}_3$ como ácido de Lewis fuerte y en EtSH como nucleófilo suave. Se rompen selectivamente los enlaces éter aril-alquil ($\beta\text{-O-4'}$ y $\alpha\text{-O-4'}$). La cuantificación de los monómeros permite estimar la proporción de estos enlaces en la estructura de lignina. A parte de monómeros, también se obtienen oligómeros unidos por enlaces más difíciles de degradar ($\beta\text{-5'}$, $\beta\text{-}\beta'$, $\beta\text{-1'}$, 5-5' y 4-O-5') que pueden dar información valiosa sobre la estructura de la lignina.

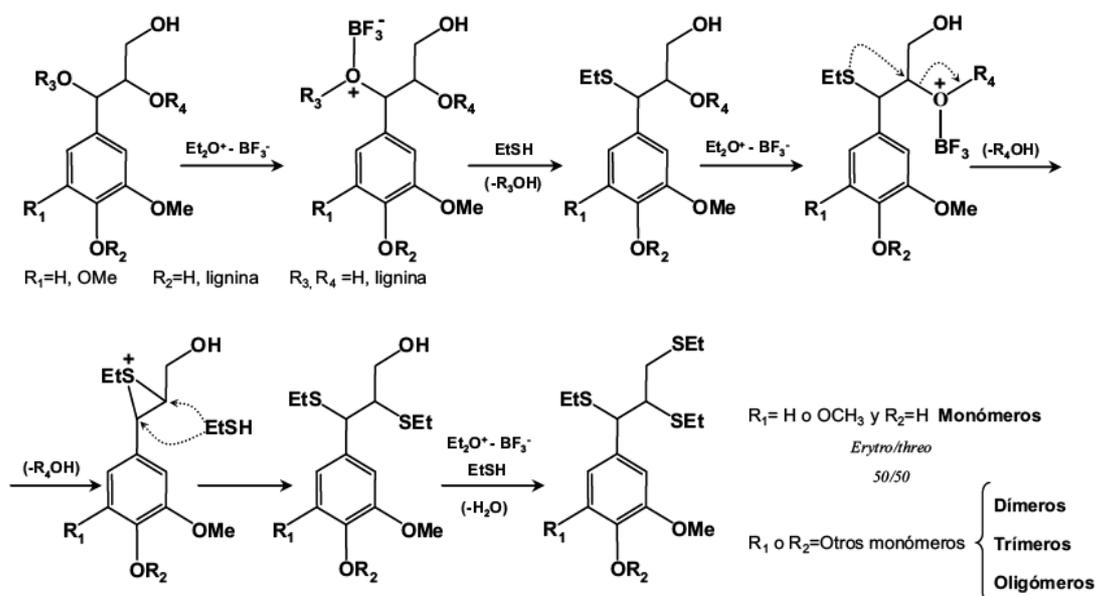


Figura 12: Mecanismo de tioacidolisis de lignina (adaptado de (Lin y Dence, 1992)).

1.2.4. Compuestos minoritarios

Los compuestos minoritarios representan poco del peso total del material lignocelulósico. En general se clasifican en compuestos extraíbles, proteínas y cenizas (principalmente metales). Aunque presente en baja concentración, desempeñan funciones fisiológicas de vital importancia.

Los compuestos extraíbles se clasifican según su solubilidad (Hillis W.E., 1962; Fengel y Wegener, 1984; Rowe 1989.; Sjöström, 1981) en compuestos lipofílicos (lípidos y derivados) y compuestos hidrofílicos (hidrosolubles). Son compuestos de bajo peso molecular en comparación con los otros constituyentes de la pared celular (biopolímeros). En muchas plantas el olor, color y gusto les determinan casi únicamente los lípidos. Además son importante en la defensa contra patógenos. Los extraíbles hidrosolubles son compuestos más polares. Son compuestos fenólicos libres como estilbeno, lignanes (oligolignoles y derivados), tanines, flavonoides, etc. Los extraíbles lipofílicos consisten principalmente en ácidos y alcoholes grasos libres, ácidos resínicos, hidrocarburos, terpenoides, esteroides (sitosteroles libres y esterificados con ácidos grasos y compuestos glicosídicos), glicéridos libres y esterificados y ceras).

El contenido en metales es importante en para evaluación de fibras para procesos industriales como combustión, pero también para la producción de pasta de papel y procesos de biorefinería (Samson y Mehdi, 1998). El contenido alto en K^+ no crea problemas debido a su alta solubilidad en agua, pero el contenido en silicio crea problemas. De plantas herbáceas cabe esperar un alto relativamente contenido, sobretodo de plantas perennes C3 y en menos proporción C4 como la hierba elefante. También influye mucho el tipo de suelo y la parte de la planta.

1.3. Entrecruzamiento de celulosa, hemicelulosa y lignina: organización estructural y funcional en la pared celular

El descubrimiento de entrecruzamientos entre polisacáridos por enlaces covalentes (por diferuloil diésteres) en hidrolizados enzimáticos de células en crecimiento dio lugar a muchas investigaciones sobre el contenido y la función de ácidos hidroxicinámicos (ácido p-cumárico, ácido ferulico) y p-cumaratos, ferulatos y dehidrodiferulatos) en la pared celular de numerosas especies de plantas. Juegan un papel importante en la investigación fundamental de las funciones y morfología de la pared celular. Se sugirió que el nivel de entrecruzamiento juega un papel en la regulación del tamaño de poros. Figura 13 muestra un esquema citado frecuentemente para representar la organización estructural de los diferentes polímeros en la pared celular. Relativamente poco está conocido sobre su organización funcional y su actividad biológica. El estudio del perfil de expresión de cultivos transgénicos puede relevar información valiosa. Por ejemplo un estudio imaginario de evolución dirigida con cultivos transgénicos, que selecciona cultivos con un contenido reducido de ácido ferulico, podría proporcionar más información sobre la actividad biológica de ferulatos. Están investigando la posibilidad de producir cultivos transgénicos con una pared celular más digerible o más fácil de desintegrar y aprovechar. Sin embargo es importante conocer la funcionalidad de los compuestos en cuestión para garantizar el éxito de dichos cultivos transgénicos. Por ejemplo está conocido que oligosacáridos feruloilados tienen actividad biológica (Ishii y Nishijima, 1995) y anti-oxidativa (Ohta *et al.*, 1994). Desempeñan funciones en la regulación del crecimiento celular y en la transducción de señales entre organismos vegetales y

microbiológicas, pero sus mecanismos de acción no están conocidos. Estudios con isótopos también pueden generar información valiosa.

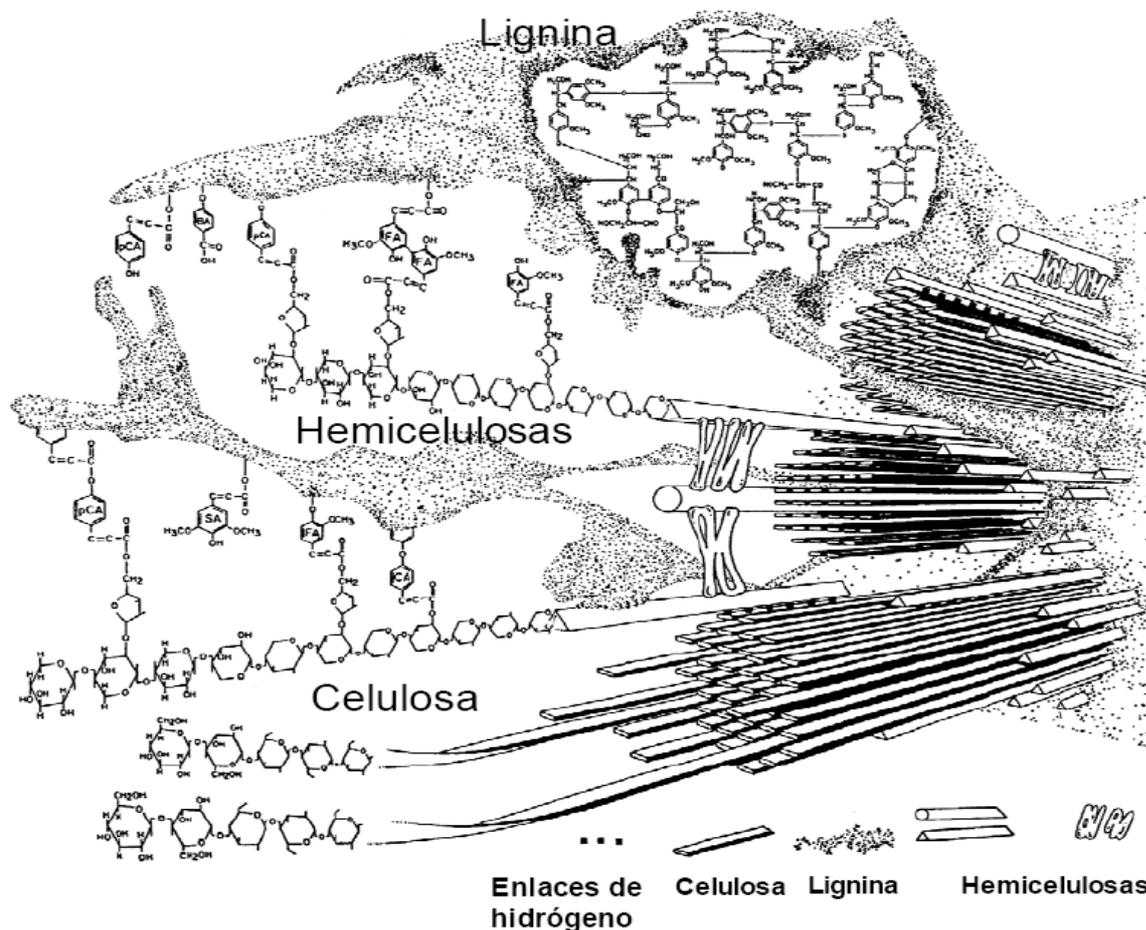


Figura 13: Representación esquemática de la organización estructural de los diferentes biopolímeros de la pared celular de una angiosperma no leñosa (adaptado de Bidlack *et al.*, 1992).

Dehidrodiferulatos y ferulatos en el entrecruzamiento entre polisacáridos

En los entrecruzamientos entre polisacáridos se encuentran sobretodo puentes de dehidrodiferulatos. Se observó que la acilación de residuos de arabinofuranosil ocurre frecuentemente en la posición C-5 (Figura 14a) y que la formación de un dehidrodiferulato (Figura 14b) se establece en la posición C-5 de la unidad aromática de ácido ferulico (enlace 5-5') (Ishii, 1997; Quideau y Ralph, 1997). (Ishii, 1997) da un resumen de todas las diferentes ferulatos y p-cumaratos de oligosacáridos encontrados en los hidrolizados de la pared celular de diferentes fibras de especies mono- y dicotiledonas de interés agro-industrial. En dicotiledones (espinaca, remolacha, etc.) los (di)ferulatos están presentes en pectinas, también sobre unidades de arabinosa. Puede implicar una diferencia importante en la capacidad de entre-cruzamiento en la pared celular entre dicotiledones y plantas herbáceas que contienen respectivamente $\pm 25\%$ y 5% de xiloglucanos. Numerosas investigaciones indican que la formación de estos dehidrodiferulatos ocurre por acoplamiento oxidativo de radicales generados por H_2O_2 y peroxidasas (Ralph *et al.*, 1994; Wallace y Fry, 1995; Hatfield *et al.*, 1995; Sanchez *et al.*, 1996; Ralph *et al.*, 1998) y/o por ciclo-adición foto-química de radicales (Ford y Hatfield, 1989; Hatfield *et al.*, 1999).

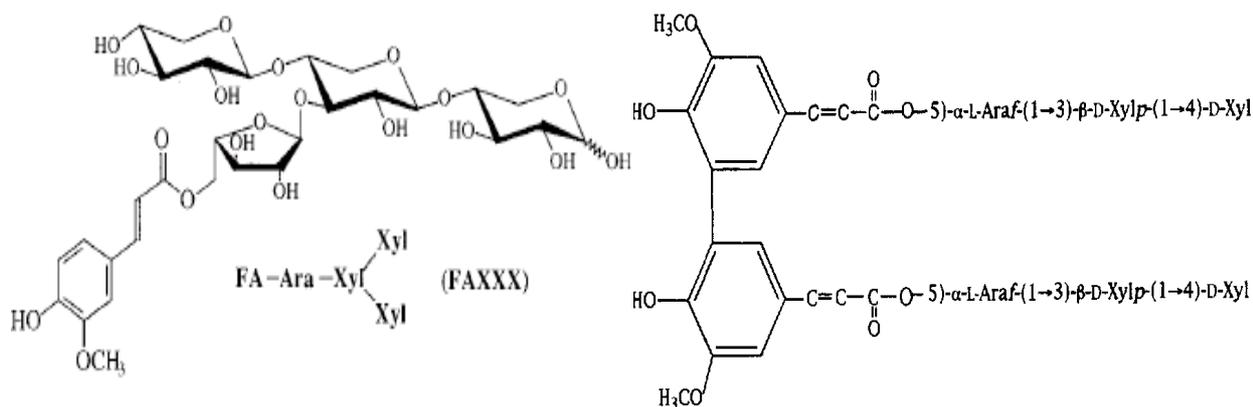


Figura 14a (izquierda): Acoplamiento por un enlace éster entre el grupo carboxilo de ácido ferulico y el átomo C-5 de α -L-arabinofuranosil de la cadena lateral de arabinoxilanos de plantas herbáceas (Hatfield *et al.*, 1999). Figura 14b (derecha): Formación de enlace 5-5' en la unidad aromática de dehidrodiferulatos (Ishii, 1997).

Ningún método de extracción convencional es capaz de separar los ferulatos por completo (Ishii, 1997, Hatfield *et al.*, 1999 y Ralph *et al.*, 1995) debido al comportamiento de los ferulatos como monolignoles en la biosíntesis de lignina. Es decir, (di)ferulatos que se han incorporado en la lignina sólo se pueden liberar parcialmente. Por eso mucho de los contenidos de ácido ferulico publicados están infravalorados. Además en muchas publicaciones consideraron sólo el diferulato 5-5'. Sin embargo en plantas herbáceas el contenido total de dehidrodiferulatos es más grande, hasta ± 20 veces más que el contenido de estructuras 5-5' (también dehidrodiferulatos 8-5', 8-8', 8-O-4') (Hatfield *et al.*, 1999).

P-cumaratos, ferulatos y ácido ferulico en el entrecruzamientos entre lignina y polisacáridos

Los ferulatos y p-cumaratos pueden acoplar polisacáridos con lignina (Scalbert *et al.*, 1985; Iiyama *et al.*, 1990; Ralph *et al.*, 1992; Quideau y Ralph, 1997). Un estudio con isótopos (Ralph *et al.*, 1995) fue capaz demostrar la existencia de enlaces covalentes entre ferulatos y sinapil- y coniferil alcoholes de lignina de ballico (*Lolium perenne*) cultivado en un atmósfero con 15 % del CO_2 marcado con ^{13}C . Los enlaces éter entre lignina y ferulatos se pueden formar por ataque nucleofílico al carbono C_α de un intermedio de metiluro de quinona de lignina en crecimiento dando lugar a estructuras de 8-O-4' (mecanismo pasivo). Sin embargo estudios de ^{13}C NMR (Ralph *et al.*, 1995) demostró que ferulatos se incorporan en la estructura de lignina en crecimiento preferiblemente por acoplamiento radicalario (mecanismo activo). Eso explica la variedad de enlaces encontradas (8-O-4', 8-8', 8-5' y 8-β') de ácido ferulico y ferulatos por 2D-NMR y por tioacidolisis (Ralph *et al.*, 2008). Las posiciones 7, 8 y 9 se refieren a las posiciones alifáticas α , β y γ de ácidos hidroxicinámicos, que se consideran aromáticas en el caso de hidroxicinamatos y hidroxicinamaldehydas. Detectaron el compuesto 1,2,2-tritioetilguaiacol (Figura 15), un producto de tioacidolisis típicamente en fibras herbáceas donde ácido ferulico está incorporado en la lignina via el acoplamiento 8-O-4'. (Ralph *et al.*, 1995) y (Ralph *et al.*, 2008) indican fuertemente que ácido ferulico y ferulatos se comportan como otros monolignoles. Además sugirieron que el compuesto podría servir como indicador de deficiencia en actividad de CCR en cultivos transgénicos. Esto es el caso sobretodo en frondosas como álamo, pero en herbáceas es menos evidente porque el compuesto puede existir de forma natural (no transgénicas).

Se sugirió que los ferulatos son puntos de nucleación para la biosíntesis de lignina (Hatfield *et al.*, 1999). Los niveles de dehidrodiferulatos y su organización espacial determinan el grado de entrecruzamiento entre polisacáridos de la pared celular. La fracción de lignina presentes en complejos de lignina-carbohidratos y el nivel de entrecruzamiento dependen de los niveles y organización espacial de ácido ferulico, ferulatos y dehidrodiferulatos.

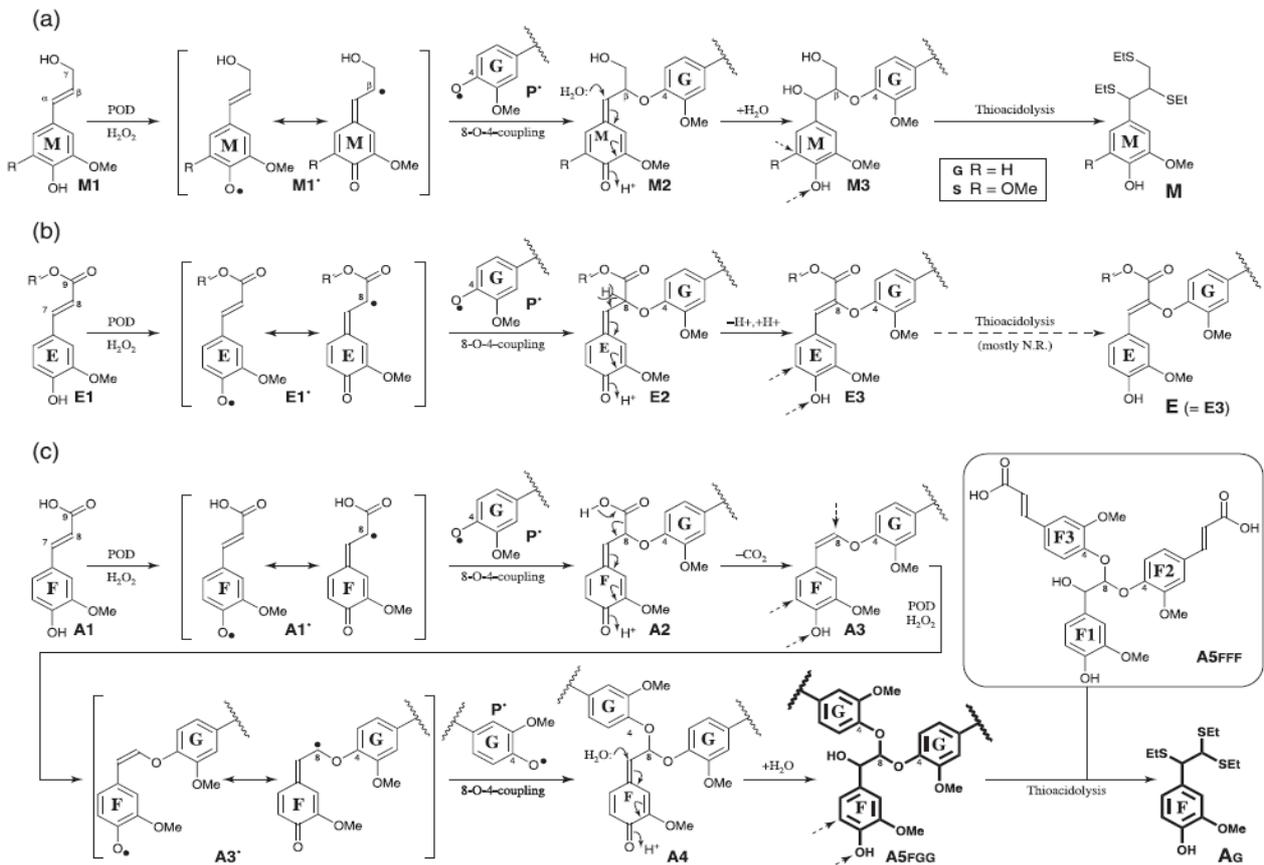


Figura 15: Incorporación en lignina de monolignoles (a), ferulatos (b) y ácido ferulico (c) por acoplamiento radicalario 8-O-4', la aromatización posterior del intermedio de quinona por ataque nucleofílico de agua (a), eliminación de un protón ácido en posición 8 (b) y decarboxilación (c), y sus productos de tioacidolisis correspondientes. Se produce 1,2,2-tritioetil etilgliacol (c) a partir de una unidad de ácido ferulico (Ralph *et al.*, 2008)

1.3.1. Complejos de lignina-carbohidratos (LCC)

El entrecruzamiento hace que no se puede tratar las fibras lignocelulósicas como fracciones separadas de celulosa, hemicelulosa y lignina. Estas fracciones se encuentran en complejos presentes en la pared primaria y secundaria (Ishii, 1997). Parte de la lignina está presente en complejos con carbohidratos, los denominados LCC ('lignin-carbohydrate complexes'). Ligninas extraídas, por ejemplo con dioxano:agua según (Björkman, 1956), no son puras. Contienen inevitablemente una fracción residual de carbohidratos. La presencia de los biopolímeros de la pared celular en dichos complejos limita el aprovechamiento de celulosa como en la producción de papel y en hidrólisis (enzimática) y fermentaciones para convertir la celulosa. El fraccionamiento

eficiente es un reto en los procesos de refinera, no sólo en cuanto a rendimiento de producto pero también en cuanto a pureza para optimizar la conversión en productos.

Para fraccionar estos complejos se usan técnicas específicas dependiendo de la estructura de la lignina según el tipo de especie, la parte anatómica y la madurez de la planta (Himmelsbach, 1993). Entre ellos se usan en general métodos de solvolisis. Son extracciones con agua caliente y alcali seguido por precipitación en etanol, extracciones con disolventes como dioxano:agua (80:20), DMSO y DMSO con compuestos N alcali (por ejemplo tetrabutilamoniumhidróxido) y con vapor de agua a presión seguido por digestión alcalina.

Los enlaces que se encuentran en los complejos de coníferas y frondosas son de tipo (Watanabe, 2003) éter- y éster bencílico, éter glicosídico y acetal (Figura 16). Las proporciones de estos enlaces se puede estimar con 2,3-dicloro-5,6-diciano-1,4-benzoquineno (Koshijima *et al.*, 1984; Watanabe *et al.*, 1986).

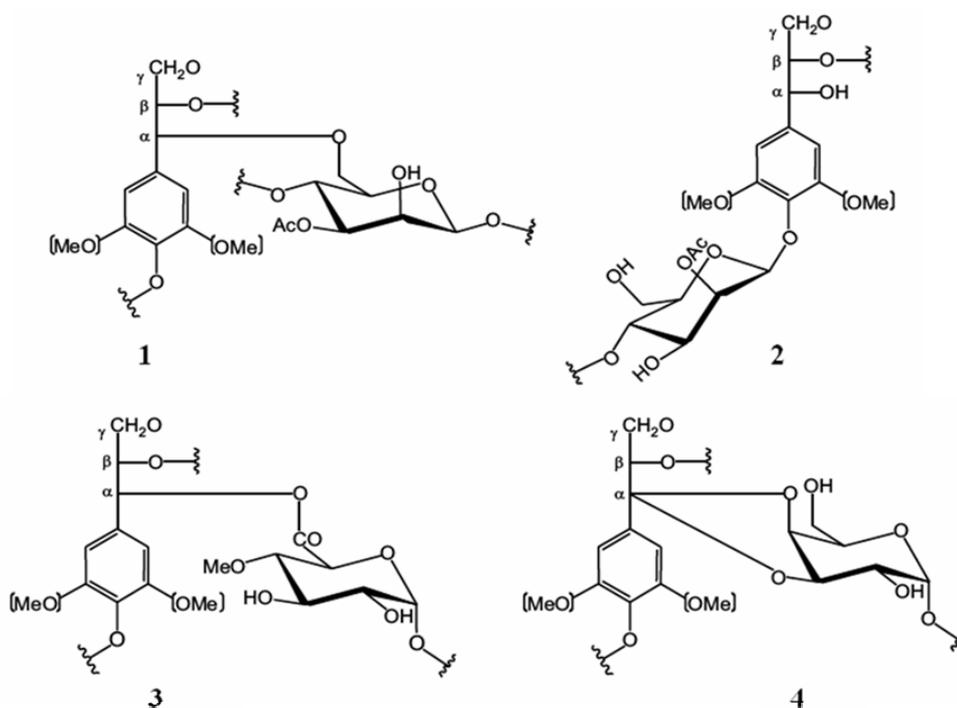


Figura 16: Enlaces encontrados en complejos de lignina-carbohidratos: éter-bencílico (1), éter glicosídico entre el grupo p-hidroxilo aromático y el carbono anomérico (2), éster-bencílico (3) y acetal

El rendimiento del fraccionamiento industrial es importante para obtener lignina comercial con un bajo contenido en carbohidratos residuales, porque influye en la reactividad y las propiedades del polímero (Singh *et al.*, 2005).

1.3.2. LCC de plantas herbáceas

Los complejos LCC de plantas herbáceas diferencian estructuralmente de plantas madereras. A parte del contenido de unidades H, la lignina de especies herbáceas también se caracterizan por su nivel de acilación de la lignina de forma natural en la posición γ de cadenas laterales de unidades S (Crestini, 1997, Ralph *et al.*, 1999; del Río *et al.*, 2008). Los grupos de acilación encontrados son

acetato, ácido p-cumarílico y/o derivados p-hidroxibenzoilados. Además las plantas herbáceas se caracterizan por su contenido en ácido ferulico y ácido p-cumárico que forman 'puentes' entre carbohidratos-carbohidratos y lignina-carbohidratos (Buranov, 2008). Los enlaces de estos puentes con lignina y con carbohidrato (sobretudo arabinosilanos) consisten en ésteres y éteres (Himmelsbach, 1993; Lapierre y Monties, 1989) que se pueden caracterizar cuantitativamente respectivamente por rotura en medio alcalino o por metilación (Wallace *et al.*, 1995). (Higuchi *et al.*, 1967b) estimó que 3-10 % de la masa de lignina de especies herbáceas está representado por ácido p-cumárico unido por enlaces de ésteres. Los enlaces éster se encuentran sobre el carbono C₇ de sobretudo unidades S. También está presente ácido ferulico en proporciones más pequeñas, que está unido por enlaces éster y/o éter. Los enlaces éter consiste sobretudo en el acoplamiento 8-O-4' (ver apartado 1.3.).

El tratamiento alcalino (Figura 17) libera parcialmente ácido ferulico y ácido p-cumárico de los carbohidratos. La fracción de estos ácidos hidroxinámicos que está unida a la lignina por enlaces éster se separan, mientras las que están enlazados por enlaces éter se mantienen en la lignina. Después el tratamiento con alcali, una fracción residual de lignina permanece unida a los carbohidratos. En las gramíneas los enlaces éster con arabinosa predominan sobre enlaces éter bencílico y -fenil glicosídicos. Por eso más o menos la mitad de los compuestos fenólicos se pueden eliminar con alcali a temperatura ambiente (Chesson, 1981; Hartley y Morrison, 1991).

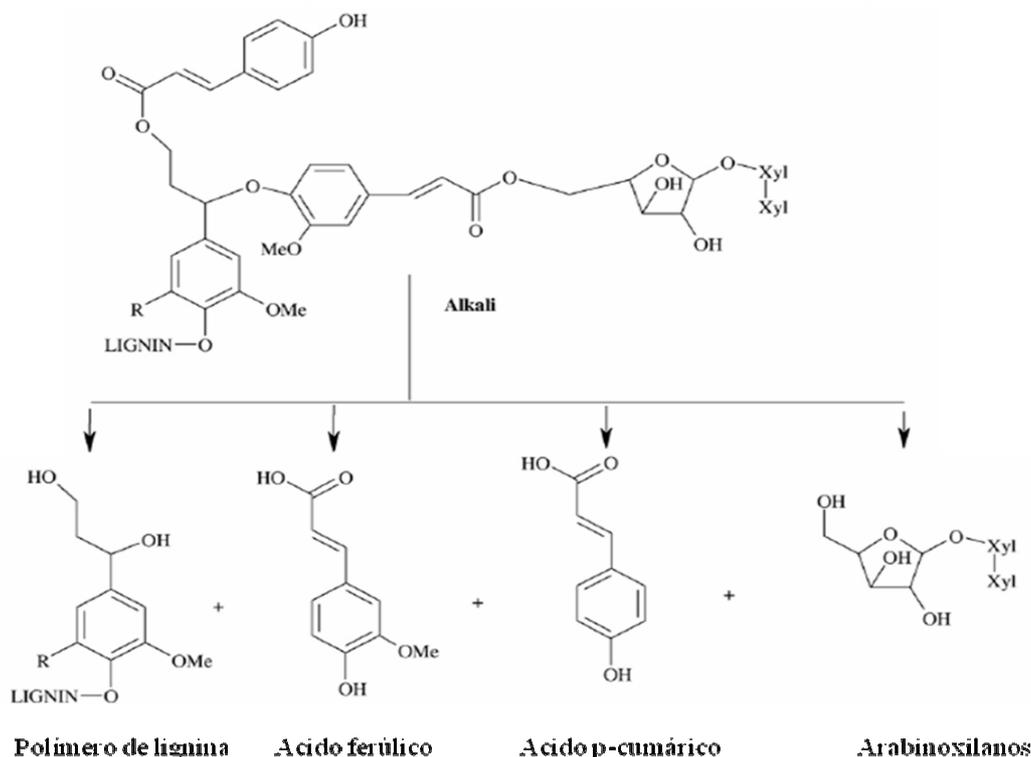


Figura 17: Separación parcial de lignina, ácido ferulico, ácido p-cumárico y arabinosilanos en maíz después de tratamiento en medio alcalino (adaptado de (Kato y Nevins, 1985)).

Las pajas suelen contener hasta 5 % de ácido ferulico (Buranov, 2008). La fracción de ácido ferulico separada suele variar entre 1 y 4.3 % en plantas herbáceas según (Sun *et al.*, 2002). Se liberaron respectivamente 20 % de p-ácido cumárico y 60 % de ácido ferulico de 2,13 mg/g y 1,35 mg/g presentes en la fibra de paja de trigo (Benoit *et al.*, 2006). Los enlaces éter entre ácido ferulico y lignina se pueden romper por ácidos como ácido oxálico. Simultáneamente se rompe

parcialmente el enlace entre la cadena lateral con arabinosa y xilano manteniendo intacto el enlace éster entre arabinosa y ácido ferulico, es decir, se producen oligosacáridos feruloilados y en menor proporción p-cumarilados (Figura 18).

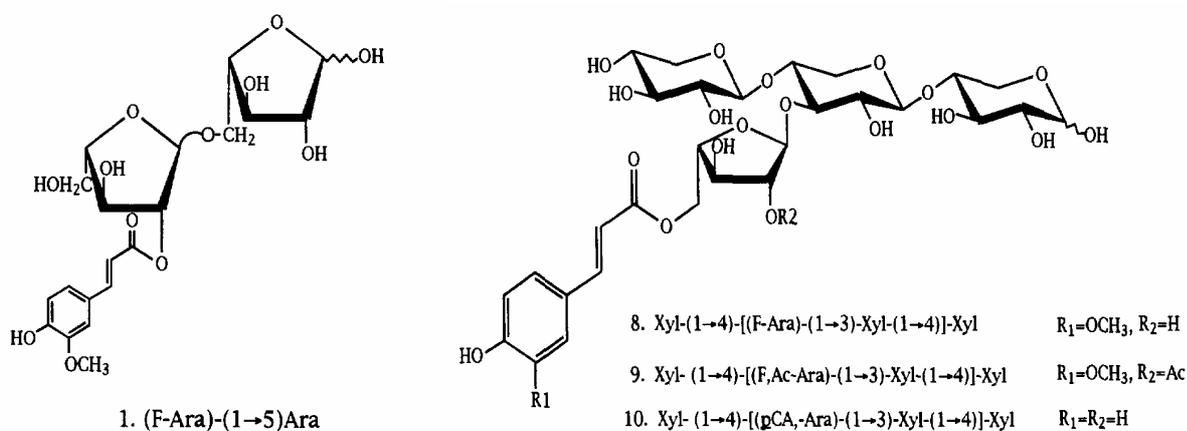


Figura 18: Estructura de feruloil arabinobiosa (1) y de tetrasacáridos de arabinoxilano feruloilado (8 y 9) y p-cumarilado (10) aislada en el hidrolizado con Driselase de respectivamente espinaca (1) y , bambú (8 , 9 y 10), caña de azúcar (8) y paja de cebada (10)

2. Lignina como factor limitante en procesos industriales

A continuación se describe brevemente la producción de pasta de papel y la problemática en el sector asociado a la lignina. El estudio exhaustivo del comportamiento de lignina y carbohidratos durante la producción de papel sirve como base de conocimientos para desarrollar técnicas analíticas optimizadas en procesos de biorrefinería de materiales lignocelulósicos.

2.1. Producción de papel

Previo a la producción misma de papel está la producción de pasta de papel (pasteado) y su posterior blanqueo. El pasteado se basa en la separación de celulosa de los otros componentes de fibras madereras y no-madereras. El blanqueo trata de disolver y/o degradar lignina residual después del pasteado y mejorar ciertas propiedades. Según datos de FAO de 2004 sigue aumentando la producción de pasta de papel. La Unión Europea es el segundo productor mundial de pasta de papel. La industria de papel, incluyendo la producción hasta producto final (impreso), representa aproximadamente 10 % de la actividad industrial europea (Confederation of European Paper Industries, 2001).

2.1.1. Pasta de papel

El pasteado trata de maximizar rendimiento, mejorar calidad de la pasta de papel y dar ciertas propiedades al papel. Se emplean procesos mecánicos y químicos. Procesos mecánicos dan un alto rendimiento y son adecuados para ciertos tipos de papel. Sin embargo el alto contenido en lignina se

mantiene produciendo fibras rígidas, poco flexibles, con poca rehidratación y agregación entre sí resultando en papel con baja resistencia y sensibles al envejecimiento óptico. En el proceso químico se elimina lignina tras cocción con ácidos o alcali en digestores de temperatura y presión elevadas dejando pasta de celulosa con lignina residual y la denominada lejía negra. Su rendimiento es más bajo (entre 35-65 % (Sjöstrom, 1993)) que con procesos mecánicos, pero da papel más resistente y más fácil de blanquear. Se dividen principalmente tratamientos alcalinos como el proceso kraft y en tratamientos con ácidos como el pasteado al sulfito. Otro proceso emplea solventes orgánicos (organsolv) (Gilarranz *et al.*, 1999). El proceso de organsolv también ha sido usado para desarrollar pretratamientos de biomasa.

El proceso a la sosa (con alcali) es el más convencional. Se elimina la lignina con un alto rendimiento, frecuentemente asistido por antraquinona como catalizador y estabilizador de los carbohidratos. El proceso kraft emplea a parte de NaOH también H_2SO_4 , a elevada presión y temperatura (150-170 °C). El proceso kraft requiere periodos cortos de cocción debido a una deslignificación catalizada por H_2SO_4 disminuyendo la despolimerización y degradación de la celulosa. El rendimiento de pasta varía entre 40 y 60 % parcialmente debido a la eliminación de más lignina. El proceso al sulfito separa la celulosa eficazmente. Está restringido a fibras no coníferas, porque se presentan manchas coloradas en el papel debido a la formación de complejos entre lignina y ácidos resínicos a baja pH. Los reactivos empleados son H_2SO_3 y $Ca(HSO_3)_2$ producidos a partir de SO_2 y $CaCO_3$. Da rendimientos similares al proceso kraft dependiendo de la temperatura (125-180 °C). Se obtiene una pasta de celulosa con menos grado de polimerización y menos resistente, pero más fácil de blanquear. El proceso de organsolv emplea disolventes orgánicos como metanol, etanol, butanol, alcohol bencílico, glicero, glicol y derivados, fenol, acetona, ácido fórmico y acético, dioxanos, DMSO, hexametildiamina, etc. El proceso admite usar todas tipas de fibras y ofrece un alto rendimiento con un bajo contenido de lignina residual. Sin embargo está sujeto al coste del disolvente, de su recuperación y de su impacto medioambiental. Por eso metanol y etanol resultan los más atractivos.

2.1.2. Blanqueo de pasta de papel

El blanqueo trata de eliminar la lignina residual que se mantiene unido a la celulosa después el pasteado. La cantidad de secuencias determina el grado de blancura deseado en función del tipo y aplicación del papel producido. Para ello se emplean reactivos como Cl_2 , NaOCl, H_2O_2 , ClO_2 y NaOH. Frecuentemente se usan xilanasas en el blanqueo para hidrolizar xilanos con lignina acoplada teniendo en cuenta que xilanos se asocian con la celulosa. Así se logra reducir el gasto de reactivos clorados. Actualmente la legislación europea está evolucionando y los niveles de productos clorados en efluentes estarán cada vez más restrictos. En la última década se introdujeron secuencias de blanqueo parcialmente (ECF) y completamente libres de cloro (TCF). Procesos de ECF no usan Cl_2 y procesos de TCF emplean H_2O_2 , O_2 y/o O_3 . Sin embargo para obtener pasta de una calidad parecida, surgieron problemas debido a la lignina y los lípidos.

2.1.3. Degradación enzimática de lignina

La problemática de la presencia de lignina en la producción de papel está relacionada con el rendimiento, la calidad y propiedades del papel (color, resistencia, etc.) y costes (reactivos, energía, etc.). Para reducir el contenido de lignina se usaron varios tipos de hongos como por ejemplo

especies de *Aspergillus* y *Neurospora*, *Pycnoporus cinnabarinus*, *Myceliophthora thermophila*, pero también enzimas ligninolíticas aisladas hongos. Estas enzimas pertenecen al amplio grupo de lacasas, peroxidadas lignolíticas (LiP), peroxidadas de manganesio (MnP) y peróxidasas versátiles (VP). La actuación de las enzimas aisladas es más directa y selectiva que la de los hongos. Con los hongos existe el riesgo de hidrolizar la celulosa demasiado debido a la presencia de celulasas y tiempos de residencia más largos. La efectividad de muchas lacasas aumenta (en presencia de mediadores sintéticos como HBT y mediadores naturales como ácido sinapílico y metilsiringato presentes en las leñas negras del pasteado. En hongos como *Clostridium thermocellum* y *Aspergillus niger* (Faulds *et al.*, 2010) que producen lacasas, también se encontraron feruloil esterases que hidrolizan ácido ferulico esterificado sobre unidades de lignina. Se observó que ácido ferulico y p-cumárico se hidrolizaron antes de que lignina degradado. Su actuación sinérgica puede acelerar la biodegradación de lignina. Estos compuestos actúan como mediadores para la oxidación de lignina.

En muchos estudios sobre producción de pasta de papel se compara la estructura de lignina nativa y de la lignina residual, por ejemplo en el proceso kraft. (Ibarra *et al.*, 2007a) lograron aislar las ligninas residuales de pastas de madera de eucalipto tratados con el proceso kraft. Tenían una estructura bastante similar a la de la lignina nativa (MWL) con un predominio de unidades S y enlaces β -O-4' ($\pm 80\%$) y un predominio ($\pm 15\%$) de subestructuras tipo siringaresinol (compuesto B en Figura). La lignina kraft que termina en la fracción de leña negra tiene un alto contenido fenólico y está enriquecida en estructuras tipo resinol. Después el blanqueo con peróxido en medio alcalino el contenido de subestructuras tipo resinol bajó hasta 6%. Sin embargo según (Sipila, 2002) la lignina residual está enriquecida en subestructuras condensadas como estructuras tipo bifenil como 5-5' y tipo β -5. Subestructuras tipo bifenil pueden representar hasta 30% de la lignina residual de pasta no blanqueadas. Gran parte de compuestos modelos de la lignina residual del proceso kraft se degradaron con varios tipos de lacasas (*C. subvermispora*, *T. hirsuta*, etc.) en presencia de ABTS o HBT (Elegir *et al.*, 2005) en medio acuoso. Subestructuras que no tienen grupos de hidroxilo libre (solo grupos de metóxido) como β -5'-dehidrodiferulato no degradaron. En presencia de surfactantes como Tween 80, ciertos lípidos y Mn^{2+} se degradaron más de 50% de los compuestos modelos indicando la acción de MnP y lacasas. Sin embargo con otras lacasas solo se observó la rotura de enlaces β -O-4' y β -5' (la acción de lípidos como n-dodecil- β -maltosida y ácido linoleico se basa en la formación de peroxiradicales (ROO \cdot) que podría abstraer el hidrógeno bencílico (en la posición C_{α}) para romper el enlace β -O-4' en presencia de MnP (Kapich *et al.*, 1999).

2.2. Biorrefinería

CO₂ representa una gran parte de las emisiones de los gases 'greenhouse' que aportan al cambio global climático. Gran parte de las emisiones de CO₂ vienen de combustibles fósiles que suministran el 85% de la energía que se consume globalmente (Lewis, 2006). Un sistema sostenible y eficaz para afrontar los problemas del cambio global climático es una combinación de varias tecnologías que convierten la energía de los fotones emitidos por el sol en energía final a consumir de forma eficaz (energía eólica, energía solar, biomasa y producción fotoeléctrica de H₂). Tecnologías que usan biomasa lignocelulósica resultan atractivas, porque pueden ayudar a la decarbonización de nuestro suministro energético, incluso a la disminución de emisiones de otros gases de efecto invernadero (NO_x, SO_x, CH₄, etc.). Actualmente los biocombustibles líquidos

proviene de azúcares, almidón, aceites y grasas principalmente de los granos de cereales. Sin embargo compiten en el mercado con el suministro de materias primas comestibles. Por este motivo se investigan sobretodo plantas lignocelulósicas no comestibles (de segunda generación), pero también lípidos de algas y terpenos para la producción de biocombustibles líquidos.

Actualmente se emplean cada vez más tecnologías que convierten biomasa en biocombustibles y bio-energía por conversión térmica como en plantas para la generación de electricidad a través de combustión controlada de carbón con sustitución parcial por biomasa, en la conversión a syngas, en la conversión 'gas water shift', pirólisis y variantes, etc. Syngas es una mezcla de CO₂, CO, CH₄, N₂ y H₂ que se genera a partir de biomasa a 800-900 °C. El syngas se puede convertir con catalizadores específicos a metanol, etanol, dimetileter, hidrocarburos y otros productos relacionados que se pueden usar para la producción de diesel y gasolina y otros combustibles. Estas tecnologías son más sensibles al coste de transporte, porque estas plantas requieren operar a gran escala para garantizar la viabilidad económica debido a costes de inversión más altos. Tecnologías de bioconversión para la producción de biocombustibles necesitan menos escala y por eso son menos sensibles al coste de transporte de biomasa. Sin embargo la presencia de lignina limita el aprovechamiento celulósico mientras que lignina no influye en la conversión térmica.

En la bioconversión de materias lignocelulósicas se diferencian 4 pasos principales: reducción de tamaño de la biomasa, pretratamiento, hidrólisis y conversión a productos finales como biocombustibles (Carroll, 2009).

2.2.1. Pretratamiento

El pretratamiento se divide en procesos mecánicos (reducción de tamaño de fibras y partículas) y en procesos (bio)químicos. La reducción del tamaño de las fibras es un proceso esencial para reducir los gastos energéticos y aumentar la accesibilidad de reactivos y enzimas. El objetivo principal de pretratamientos para la producción de biocombustibles es aumentar la porosidad de las partículas de biomasa y facilitar la accesibilidad de enzimas hidrolíticas a la celulosa tras desacoplamiento de lignina y hemicelulosa de las microfibras de celulosa. (Carroll, 2009) indica que el tamaño molecular de muchas enzimas hidrolíticas que se sitúa alrededor 20 kDa (2,5 nm radius stokes), es crítico en comparación con el radius del espacio entre las paredes celulares, p.e. 3 nm en células del entrenudo de trigo (Chesson, 1997). Se conoce sobretodo el mecanismo de conversión de oligosacáridos con celulasas, pero estructuras más grandes de celulosa presentes en láminas son más recalcitrantes (Arantes y Saddler, 2010). Se conoce relativamente poco sobre los mecanismos de delaminación, dispersión y hinchamiento de celulosa que está empaquetado muy densamente. Gran parte está presente como microfibrillas, subestructuras de 30-36 cadenas lineales de glucanos con regiones cristalinas agregadas por puentes de hidrógeno y fuerzas van der Waal. Emplearon ciertas proteínas con determinados grupos enlazantes de carbohidratos para hinchar las láminas de celulosa. Resultó en una accesibilidad mayor de celulasas, aunque su mecanismo de acción todavía se desconoce. También se describieron expansinas que pueden aumentar la acción de celulasas (Cosgrove *et al.*, 1998). Son enzimas de alrededor 27 kDa que actúan sobre celulosa sin hidrolizarla, aunque gran parte de su centro catalítico es común con endoglucanasas.

El tipo y las condiciones de pretratamiento dependen principalmente del tipo del material lignocelulósico. Para ello se debe identificar y cuantificar los constituyentes de la pared celular.

Resulta interesante cuantificar la proporción de enlaces éster y éter que unen ácido p-cumárico y ácido ferulico a la lignina. Por ejemplo ligninas de maíz y paja de trigo contienen respectivamente (Sun *et al.*, 2002):

- 6.7 y 3.8 % de ácido p-cumárico unidos por enlaces éster y 1.3 y 1.7 % por enlaces éter
- 1.4 y 1.0 % de ácido ferulico unidos por enlaces éster y 2.4 y 2.2 % por enlaces éter

Un pretratamiento típico consiste en añadir 0,9 % H_2SO_4 (ácido diluido) a 180 °C durante alrededor de 1 minuto (Carroll, 2009). Se hidroliza gran parte de los xilanos presentes. Los xilanos se disuelven en oligosacáridos y azúcares libres. Los que están asociados con lignina y con otros xilanos por enlaces ésteres dificulta este proceso. Lignina se asocia indirectamente a celulosa a través de xilano. Otro pretratamiento con resultados parecidos es la expansión de fibras por amonio (Wyman *et al.*, 2005; Lau *et al.*, 2009). Figura 19 muestra imágenes de alta definición que ilustran los cambios superficiales de la pared celular de paja de trigo durante variantes de pretratamientos.

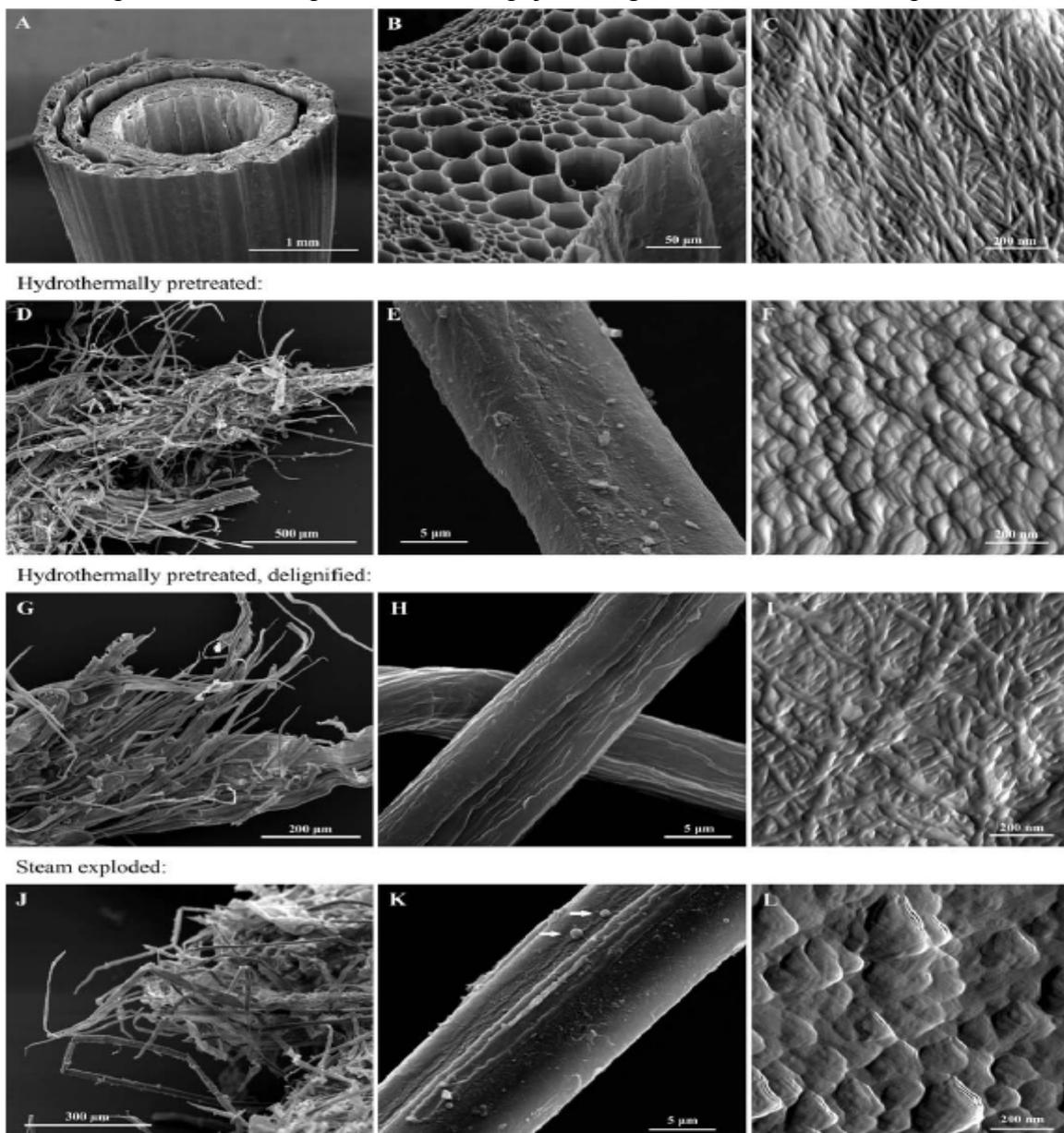


Figura 19: Imágenes de SEM y AFM de paja de trigo, sin pretratamiento (A-C), con pretratamiento hidrotérmico sin (D-F) y con delignificación (G-I) y con pretratamiento por 'steam explosion' (J-L). (Kristensen *et al.*, 2008).

Imagen C ilustra las microfibrillas de celulosa presente en un matriz de lignina y hemicelulosas. El tratamiento hidrotérmico separa las fibras (D) y hace que la lignina vuelve a depositar en la pared celular en forma globular (E). Las microfibrillas de celulosa ya no están visibles. Con un pretratamiento adicional de delignificación de la pared celular, desaparecen los depósitos de lignina y aparecen visibles las lámelas de microfibrillas de celulosa (H y I). El tratamiento por vapor tiene efectos similares dejando depósitos globulares de lignina (J-L).

2.2.2. Hidrólisis

Enzimas hidrolíticas depolimerizan celulosa en glucosa y xilosa (sacarificación). Una vez reducido el tamaño de la materia lignocelulósica, parte de la celulosa se mantiene recalcitrante frente a las enzimas hidrolíticas (Himmel *et al.*, 2007). Los sólidos recuperados tras filtración se someten a una segunda hidrólisis. Se puede llevar a cabo con levaduras que metabolizan hexosas y pentosas simultáneamente (respectivamente en mayor proporción glucosa y xilosa) a la vez o con mezclas de enzimas. La digestibilidad de la pared celular depende principalmente del contenido total de lignina (Adler, 1977; Liu y Wyman, 2003). Diferencias pequeñas en el contenido de lignina influye mucho en la velocidad de la hidrólisis a azúcares solubles (Chen F., 2007).

Tras modificación genética y nuevas mezclas de enzimas se intenta aumentar el aprovechamiento celulósico. Según (Carroll, 2009) se requieren alrededor de 25 kg de enzima por tonelada de celulosa para alcanzar una velocidad de conversión a nivel industrial. El coste de las enzimas hidrolíticas representa el mayor coste y por eso crece también interés en catalizadores químicos. Sin embargo con catalizadores químicos surgen problemas de desactivación por ciertas sustancias en la biomasa. Importante es un pretratamiento adecuado para aumentar la accesibilidad de las enzimas a la celulosa y hemicelulosa (Chen y Dixon, 2007). Ciertos compuestos como furfural producido por pretratamiento con ácido diluido de hemicelulosas, pueden inhibir a las levaduras usadas debido a la alta concentración de sólidos usada para no diluir el producto (Haemelinck *et al.*, 2005).

2.2.3. Conversión a productos

La conversión a productos es de vital importancia para la rentabilidad y viabilidad de una biorrefinería. Cuanto más integrado la refinería del material lignocelulósico, es decir, cuanto más biomasa se convierte en producto final y cuanto más alto su pureza, más rentable y viable sea una planta de biomasa. En el futuro la extracción industrial de lignina puede dar lugar a productos como vanilina, ácido ferulico, vinilo guaiacol y lignanos. Resulta interesante un estudio sobre la adsorción de ácido p-cumárico sobre las paredes de levaduras de *Brettanomyces sp.* y *Saccharomyces sp.* y sobre polivinilpolipirrolidona (Salameh *et al.*, 2008) para evitar la formación de 4-vinilfenol que se transforma en 4-etilfenol por levaduras que da un mal gusto y olor a vinos. En vino ácido p-cumárico forma un complejo con ácido tartárico y glucosa. La enzima cinamato descarboxilasa convierte ácido p-cumárico en 4-vinilfenol. Para transformar ácido p-cumárico en productos, conviene primero separarlo del medio. La adsorción sobre superficies de levaduras resulta interesante para más investigación, aunque sus enzimas lo convertirán en 4-vinilfenol.

2.2.4. Ingeniería genética

Durante los últimos años ha crecido mucho el interés en cultivos transgénicos como álamo (Hu *et al.*, 1999; Morreel *et al.*, 2004; Vanholme *et al.*, 2008) y alfalfa (Chen F. *et al.*, 2006) con un contenido reducido de lignina. La ingeniería genética pretende estudiar el efecto sobre el contenido

total de lignina y la proporción de unidades G/H/S tras alterar la expresión de estos genes. El control de la biosíntesis en ciertos cultivos permite obtener fibras con lignina de mayor digestibilidad con fines de producir biomásas más aptas para la producción de papel y para biorefinería. (Chen y Dixon, 2007) compararon el contenido de lignina y el rendimiento de sacarificación de cultivos transgénicos de alfalfa. Alteraron la regulación de los genes C4H, HCT, C3H, CCoAOMT, F5H y COMT que intervienen en la biosíntesis de lignina. Produjeron menos lignina y más carbohidratos y se aumentó el rendimiento de sacarificación, sobretodo en C3H y HCT transgénicos. En los hidrolizados de los cultivos transgénicos se aumentó la proporción de xilosa frente a glucosa, indicando que la alteración en contenido y composición de la lignina puede aumentar la accesibilidad de enzimas a las hemicelulosas. En la lignina de los cultivos transgénicos de C3H y HCT no se observó una correlación directa entre la proporción S/G y el rendimiento de sacarificación. Puede ser una consecuencia del enriquecimiento en unidades H en la lignina. Para la producción de papel se lograron aumentar genéticamente el contenido en unidades S en la lignina de álamos para aumentar la degradabilidad de la lignina (Huntley *et al.*, 2003) resultando en un tiempo de residencia más corto en los reactores de pasta de papel, un gasto energético reducido y menos compuestos potencialmente tóxicos para el medioambiente. También se podría reducir el grado de entrecruzamiento por ácidos ferulicos entre arabinoxilanos y lignina y entre si mismo.

La ingeniería genética también tiene como objetivo encontrar rutas de biosíntesis de otros monolignoles más fáciles de degradar una vez polimerizados. También se busca reducir el nivel de acetilación de los polisacáridos genéticamente y también de lignina, porque durante el pretratamiento ácido se hidrolizan los enlaces éster con acetato. Ácido acético puede inhibir a los micro-organismos en el paso de la fermentación a azúcares libres. No se conoce por completo la función de la acetilación, probablemente reduce la solubilidad de la pared celular (Carroll, 2009).

CAPÍTULO II:

OBJETIVOS

Este proyecto tiene 2 objetivos principales:

- Determinación y análisis de la composición química de diferentes fibras de interés industrial: sisal, abacá, paja y salvado de trigo, 'brewers spent grain' (BSG) y hierba elefante
- Aislamiento y purificación de lignina nativa de las diferentes fibras estudiadas (preparación de MWL). Análisis de MWL mediante diferentes técnicas analíticas.

Este proyecto fin de master pretende establecer los fundamentos de mi investigación doctoral sobre diferentes técnicas analíticas usadas para caracterizar químicamente y estructuralmente los constituyentes de diferentes fibras y sus cambios durante la producción de pasta de papel y de varios tipos de pretratamientos usados en biorrefinería. Como fibra de interés industrial recibe mucho interés en particular la hierba elefante, porque es una fibra de interés industrial que el proyecto europeo 'LIGNODECO' (Seventh Framework Programme) trata de analizar y evaluar como material lignocelulósico. LIGNODECO, 'Optimised pre-treatment of fast growing woody and nonwoody Brazilian crops by detailed characterization of chemical changes produced in the lignin-carbohydrate matrix', tiene los siguientes objetivos:

- Evaluación del rendimiento de biomasa de la cultivación (*Eucalyptus* y *Pennisetum*)
- Composición y estructura química de la materia lignocelulósica
- Evaluación de métodos analíticos de para constituyentes de biomasa lignocelulósica
- Desarrollo de nuevos pretratamientos basado en (bio)tecnologías de la industria papelera

Un objetivo importante es analizar y evaluar un pretratamiento adecuado (mecánico, químico y enzimático) para aumentar el rendimiento de sacarificación y fermentación para la producción de bioetanol. Se pretende adquirir una mejor comprensión de la función y comportamiento durante los tratamientos de las constituyentes de la pared celular (lignina, hemicelulosa y celulosa).

CAPÍTULO III:

MATERIALES

Y MÉTODOS

1 Materiales

1.1. Reactivos

Acetona: $(\text{CH}_3)_2\text{CO}$, 99.5 % pureza (GC), Panreac, (RFE, USP, BP, Ph. Eur.) PRS-CODEX.
 Acido acético (glacial 100 %): CH_3COOH , 99.8-100.5 % (acidimétrico), Merck.
 Acido propiónico: $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_2$, ≥ 99.0 % (GC), purum, Fluka.
 Acido sulfúrico: H_2SO_4 , 96 % (≥ 95 % acidimétrico), PA-ISO.
 Amonio cloruro: NH_4Cl , 99.5 %, Panreac (PA-ACS-ISO).
 Anhídrido acético: $(\text{CH}_3\text{CO})_2\text{O}$, > 99.0 %, Panreac (Reag.Ph.Eur, PA-ACS-ISO).
 Anhídrido propiónico: $\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_3$, ≥ 96 % (NT), purum, Fluka.
 Bromuro de acetilo: $\text{C}_2\text{H}_3\text{BrO}$, ≥ 97 % (método morfolina), para síntesis, Merck
 Cloroformo: CHCl_3 , ≥ 99.8 % (GC), SupraSolv®, Merck.
 Clorito sódico: NaClO_2 , 25 % (m/m) en agua para síntesis.
 Diclorometano: CH_2Cl_2 estabilizado con amileno, ≥ 99.5 % (GC), Panreac (PA-ACS-ISO).
 1,2-dicloro-etano: $\text{C}_2\text{H}_4\text{Cl}_2$, ≥ 99.5 % (GC), puriss., Merck.
 Dimetilsulfóxido: $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$, ≥ 99.9 % (GC), $\text{H}_2\text{O} \leq 0.1$ %, puriss., Fluka.
 Dimetilsulfóxido-d6: $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, ≥ 99.8 % grado de deuterización (RMN), Panreac.
 1,4-dioxano: $\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$, ≥ 99.0 % (GC), puriss., Merck.
 Etanol: $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$, Merck (Reag.Ph.Eur, ACS-ISO).
 Eter de petróleo: 35–60 °C, Pestipur, Carlo Erba Reactifs-SDS.
 iridina: $\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$, ≥ 99.5 % (GC), SeccoSolv®, Merck.
 Piridina-d5: $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, ≥ 99.95 % grado de deuteración, Panreac.
 Propionil bromida: $\text{C}_3\text{H}_5\text{BrO}$, 98 %, Sigma Aldrich.
 Sodio sulfato anhidro: Na_2SO_4 , 99.0 %, Panreac (PA-ACS-ISO).
 Tetrabutilamoniohidróxido: $\text{C}_{16}\text{H}_{37}\text{NO}$, ± 40 % (m/m) in H_2O (± 1.5 M). Halides (Br) < 0.1 % y sulfatos ≤ 3000 mg/kg.
 Tetrametilamoniohidróxido: $(\text{CH}_3)_4\text{NOH}$, 25 % (m/m) en metanol, Sigma Aldrich.
 Tolueno: $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_3$, ≥ 99.5 % (GC), Panreac (Reag.Ph.Eur,PA-ACS-ISO).
 Zinc: Zn, en polvo, ≥ 99 %, Riedel-de Haën.

1.2. Materiales lignocelulósicos

1.2.1. Sisal

El sisal (*Agave sisalana*) es una planta que pertenece a la familia de las *Agaváceas*, orden *Asparagales*, clase *Liliopsida* dentro de la división *Magnoliophyta*. Son plantas monocotiledones. Las plantas de sisal son originalmente de México y suelen crecer en climas tropicales, pero se adaptan bien a diferentes condiciones medioambientales y climatológicas. Están siendo cultivados principalmente en Brasil (> 50 % de la producción mundial en 2005). Otros países productores (3-10 %) son México, Colombia, Cuba, Kenia, Tanzania, Madagascar y China.



Figura 20: Ilustración de cultivos de sisal (*Agave sisalana*) y procesado de sus fibras

Tienen una vida productiva entre 18 y 20 años y producen aproximadamente 30 hojas al año (Figura 20). Crecen hasta 2 m de altura y hasta 15-23 cm diámetro del tronco que es relativamente corto. En las plantas de descorticación se separan las fibras que posteriormente pasan por secado, cepillado, embalado y distribución. Características de la fibra como longitud, espesor y resistencia dependen principalmente de la madurez de la hoja y de su orientación en la hoja. Las hojas maduras contienen fibras más largas y bastas. En los extremos de las hojas se encuentran fibras más gruesas. Una hoja madura de sisal suele medir entre 1-2 m de longitud, 10-15 cm de anchura y 6 mm de espesor (en el centro). Los haces de fibras suelen crecer hasta 60-150 cm y la fibra elemental entre 1-8 mm de longitud y 8-40 μm de anchura (McDougall *et al.*, 1993; García Hortal, 2007).

Gracias a su rigidez actualmente todavía se usan las fibras en la industria de textil y la fabricación de cuerdas. También se usa como materia prima para la producción de pasta de papel, sobretodo para papel con propiedades específicas como su porosidad (papel de filtro, bolsas de té, etc.) y papeles dieléctricos. También se usan para reforzar papeles delgados.

1.2.2. Abacá

El abacá (*Musa textilis*) es una planta perenne que pertenece a la familia de las *Musáceas* (bananas), orden *Zingiberales*. Son plantas monocotiledones. Tiene su origen nativo en las Filipinas y actualmente se cultiva en Indonesia y en muchos países tropicales de América Central (Figura 21).

Se implantan trozos de raíces maduros al inicio de la temporada lluviosa. Después 18-25 meses, se recogen las hojas cada 3-8 meses durante una vida productiva de ± 10 años. Suelen crecer hasta 25 tallos que pueden alcanzar una altura entre 3 y 7.5 m y un diámetro entre 12-30 cm. Contiene un corazón central envuelto por vainas foliares que forman un pseudo-tronco de 30-40 cm. Las vainas externas del tallo se separan de forma mecánica para uso comercial. La longitud de los haces fibrosos pueden llegar a medir entre 1.5 y 3.5 m y la fibra elemental entre 2.5 y 12 mm según el

espesor y la posición en el tallo de la vaina madre. Las fibras de las vainas externas son más cortas y gruesas. Suelen tener un color más oscuro y una calidad inferior.



Figura 21: Ilustración de la planta de abacá y sus fibras

La fibra de abacá está clasificada como dura. Se caracteriza por una alta porosidad y son aptos para papel de filtro, envolturas de embutidos, bolsitas de té, papel de moneda, servilletas, pañales, etc. También tiene aplicaciones en textil, bolsas, muebles, etc. Las fibras de alta calidad se pueden mezclar con fibras de algodón y maderas para la producción de papeles ultrafinos, papel de imprimir de bajo gramaje, papel de registro, etc. La fibra de abacá es una fibra duradera, flexible y resistente a agua salada (uso en redes de pesca, cuerdas de barcos, etc.).

1.2.3. Hierba elefante

A veces se confunde la hierba elefante (*Miscanthus*) con el 'pasto africano' (*Pennisetum purpureum*) a lo que también se llama 'pasto elefante'. En este proyecto se analizaron las fibras de *Pennisetum* spp. *Pennisetum* también es una planta herbácea perenne de la misma taxonomía como *Miscanthus* hasta la subfamilia (*Panicoideae*) que tiene su origen en África. Se encuentran en todas las regiones templadas de ambos hemisferios, sobretodo en África, Australia y Sur-América. El género consta de 80 especies con una amplia diversidad de alturas (entre 15-800 cm, típicamente 250-300 cm) y hojas de 30-120 cm de longitud y anchuras de 1-5 cm (max. 35 cm). Entre ellos se cultivan sobretodo *Pennisetum purpureum* (Schumacher), *P. setaceum*, *P. spp.*, *P. alepocroides*, etc. (Figura 22). Sin embargo existen muchas otras especies salvajes y cultivadas para fines ornamentales.

Los especies de *Pennisetum* son veraniegos. En algunas zonas realmente forma infestaciones. Su alto contenido calorífico hace que zonas densas de *Pennisetum* son zonas de riesgo para incendios. Su corteza se hace más dura y rígida con los años y sus raíces crecen profundamente ayudando a la conservación de suelo. Resiste muy bien en zonas secas, aunque necesita un suelo húmedo para crecer bien. Frecuentemente se usa fertilizantes (necesita entre 150 y 300 kg N/ha/año). Su

rendimiento suele variar entre 2-10 toneladas /ha/año de materia seca en suelos no fertilizados y hasta 85 toneladas /ha/año de materia seca en suelos fertilizados. En este tesis los trozos de *Pennisetum spp.* se separaron mecánicamente en 2 fracciones, una de la corteza y otra de la médula. Además se separaron 500 g de trozos de hierba elefante cuantitativamente. La fracción obtenida de corteza representó 84 % del peso inicial (médula 16 %).



Figura 22: Ilustración de cultivación de varias especies de *Pennisetum*

1.2.4. Paja de trigo

El trigo (Figura 23) ha formado parte del desarrollo económico y cultural del hombre, siendo el cereal más cultivado. El trigo pertenece a las familias de las gramíneas, orden *Poales*, clase *Monocotyledoneae* dentro de la división de *Angiospermae*. Actualmente se producen aproximadamente 530 millones de toneladas/año a nivel mundial (Buranov, 2008). Tiene una disponibilidad continua y podría resultar más interesante para la producción de biocombustibles que maíz debido a su contenido más bajo en lignina. Las especies que más están siendo cultivadas son *Triticum aestivum*, *T.durum* y *T. compactum*. Existen muchas variedades como trigos con paja corta y de alto rendimiento. Entre ellos principalmente se diferencian variedades de otoño/verano (de ciclo largo), variedades de primavera/invierno (de ciclo corto) y variedades alternativas. La duración del periodo vegetativo marca su diferencia. Las variedades de invierno suelen cultivarse en zonas templadas, y las de verano predominan en zonas con inviernos fríos (a altas latitudes) o demasiado suaves (latitudes bajas).

Es una materia prima importante para el alimento de consumo humano, aunque gran parte se destina a la alimentación animal, así como a subproductos de la transformación industrial destinado para piensos. La propiedad más importante del trigo es la capacidad de cocción de la harina debida a la

elasticidad del gluten que contiene. Esta característica permite la panificación, constituyendo un alimento básico para el hombre.



Figura 23: Ilustración de cultivos de trigo

1.2.4. Salvado de trigo

El salvado de trigo (‘wheat bran’) es la membrana exterior que envuelve el endosperma del trigo (Figura 24). El salvado se diferencia en aleuron y pericarp. Es dura y protege la semilla (endosperma y brote), de ahí el nombre de ‘salvado’. Es un material lignocelulósico rico en minerales, vitaminas B, proteínas, fécula y lípidos. Es un subproducto de la producción de trigo refinado (molienda). En principio el salvado se puede separar de cualquier cereal (arroz, maíz, avena, cebada, mijo, etc.).

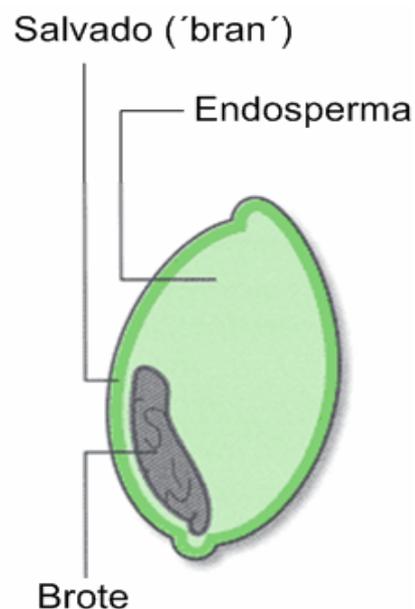


Figura 24: Ilustración de salvado de trigo (residuo agro-industrial)

1.2.5. BSG

‘Brewers spent grain’ (BSG) es un residuo agro-industrial de la industria cervecera. Es el material que queda después de machacar los granos (restos de cascabillo, pericarpo y endosperma), normalmente de cebada (Figura 25). Su composición consiste en aproximadamente 50 % carbohidratos (celulosa, fécula, arabinosilanos y β -glucanos) y el resto en principalmente proteínas y lignina. Es una buena fuente de proteínas no degradables y vitaminas solubles en agua. Se aprovecha sobretodo en comida para animales, pero también como fertilizante y en la producción de biogas. En particular sirve bien como medio para cultivar champiñones.



Figura 25: ‘Brewers spent grain’ (BSG), residuo lignocelulósico en la preparación de malta en la elaboración de cerveza

2 Métodos analíticos para materiales lignocelulósicos

Inicialmente se molieron las diferentes fibras dos veces con un molino de cuchillas (Ika, modelo MF10), primero por un tamiz de 2 mm y posteriormente por uno de 1 mm. Estas fibras se usaron para los análisis de la composición química. Para los análisis de la estructura de lignina *in situ*, se usaron las fibras cortadas por el molino de cuchillas que posteriormente se molieron con un molino de bolas (Retsch, modelo S100) en seco durante 6-12 horas efectivas. Las horas de molienda en total se calculan por multiplicación con 1.8, debido a un programa de molienda con intervalos de reposo para enfriar (ciclos de 25 minutos de molienda y 20 de reposo). Después se sometió la fibra molida a las extracciones de compuestos lipofílicos y hidrosolubles. Para el aislamiento de la lignina, se les extrajeron de fibras molidas por el molino de cuchillas y posteriormente se molieron en el molino de bolas en dispersión con tolueno (ver apartado 2.5.3.).

2.1. Análisis de metales y otros elementos

Una vez molidas y secadas, se sometieron 0.5 g de fibra a una hidrólisis ácida con 4 ml de ácido nítrico concentrado (HNO₃) durante 15 min. en un aparato de microondas (Jones y Case, 1990). Se filtraron los hidrolizados con un filtro de Whatman n° 2 y se diluyeron hasta 50 ml de volumen final. Se determinaron las concentraciones de metales por ICP-OES por un espectrómetro (Termo Jarrel Ash, modelo IRIS Advantages).

2.2. Determinación del contenido en cenizas

El contenido en cenizas se determinó según la norma Tappi 211 om-85. Para ello, se tararon cresoles de porcelana previamente limpiados con HCl concentrado y calentados durante 1 h a 575 °C en una mufla. Se pesaron 200 mg de fibra seca en cresoles que se calentaron durante 6 h a 575 °C en la mufla. Se determinaron las cenizas restantes por gravimetría y se calculó el contenido en % sobre fibra seca.

2.3. Determinación del contenido en extraíbles lipofílicos

Se sometió aproximadamente 2 gramos de fibra a una extracción continua durante 8 horas con acetona en extractores de tipo Soxhlet. Seguido se eliminó el disolvente por rotavaporación y posteriormente por un flujo de N₂ hasta peso constante. El extracto lipofílico se redisolvió en cloroformo. La fracción soluble se secó otra vez con un flujo de N₂ para su determinación gravimétrica. La fracción insoluble también se determinó por gravimetría. El extracto seco se resuspendió en cloroformo en una concentración apta para su análisis por cromatografía de gases (GC). El extracto se diluyó o se concentró apropiadamente para su posterior análisis por cromatografía de gases/espectrometría de masas (GC/MS). Dado que este proyecto se centra en el análisis de lignina, no se describe la composición de los lípidos.

2.4. Determinación del contenido en compuestos hidrosolubles

Para determinar el contenido en compuestos hidrosolubles, se sometieron las fibras libres de compuestos lipofílicos a una extracción con agua destilada a 100 °C (conforme la norma Tappi T 207 om-88) durante 3 horas. El extracto se rotavaporó y se secó en cresoles de porcelana hasta peso constante para determinación gravimétrica. Durante estas 3 horas se extrajeron la mayor parte de los hidrosolubles y permite comparar entre varias fibras de forma bastante exacta. Se expresa el contenido en % sobre fibra seca inicial, por lo cual se recalcula el peso de la fibra extraída con agua al peso inicial una vez conocido con exactitud el contenido de extraíbles lipofílicos.

2.5. Análisis de lignina

El contenido de lignina de una fibra es la suma de los contenidos ácido-solubles y no ácido-soluble (lignina Klason), expresados en % (m/m) de lignina sobre fibra seca inicial.

2.5.1. Lignina Klason

La lignina Klason se determinó conforme la norma Tappi T222 om-88 (Tappi, 2004) con algunas modificaciones. Para ello se eliminaron los extraíbles de la fibra y se determinó la humedad residual

de la fibra que se sometió a un hidrólisis ácido con 3 ml de 72 % H₂SO₄ (m/m) por cada 300 mg de fibra a 30 °C durante 1 hora. Después se diluyó la suspensión con agua destilada hasta obtener una concentración de 4 % H₂SO₄ y se autoclavó durante 1 hora a 110 °C. Tras enfriar y dejar reposar se filtró la suspensión en un filtro de kitasato n° 3 previamente tarado. El hidrolizado se guardó para su posterior análisis de la lignina ácido-soluble. Se lavó el filtro que contiene la lignina no ácido-soluble con agua destilada hasta pH neutro y se secó durante 4 horas a 100 °C para su determinación gravimétrica. Se recalculó el peso de la fibra al peso de fibra inicial con los datos de la humedad y el contenido en extraíbles previamente determinado.

Puede que durante el hidrólisis ácido algunos metales y otras sustancias de las cenizas de la fibra no lleguen a disolverse y terminan con la lignina no ácido-soluble en el filtro de kitasato. Incluso proteínas y polipéptidos pueden mantenerse enlazados a la lignina no ácido-soluble. Para ello, se puede introducir un factor de corrección para estas cenizas y proteínas aplicando el protocolo de cenizas a la lignina Klason seca. El contenido peptídico se estimó por el contenido en nitrógeno según la aproximación: contenido peptídico ~ 6,25 × contenido N_{Kjeldal}.

2.5.2. Lignina ácido-soluble

Para la determinación del contenido en lignina ácido-soluble se midió la absorbancia en cuvetas de cuarzo a 205 nm del hidrolizado (filtrado) obtenido después la hidrólisis durante el análisis de la lignina Klason. Para la disolución del blanco se preparó una solución de 4 % (m/m) H₂SO₄. En caso de absorbancias mayor que 1.2 AU, se diluyeron los hidrolizados apropiadamente. La disolución del blanco se diluyó de forma idéntica. Se determinó la media de varias mediciones de la absorbancia y se calculó la lignina ácido-soluble (LAS) según:

$$\text{LAS (\% sobre fibra seca)} = (A \times V) / (\xi \times m)$$

A = absorbancia a 205 nm (AU)

V = volumen final del filtrado (hidrolizado) (ml)

ξ = coeficiente de extinción (1100 ml.AU/g)

m = peso de la fibra seca inicial (g)

2.5.3. Aislamiento de lignina: preparación de MWL

Con este método se puede aislar una fracción de lignina poco alterada en estructura y representativa para el contenido total de lignina. Para aislar la lignina de fibra molida (MWL) según el protocolo de (Björkman, 1956), previamente las fibras se extrajeron con acetona durante 9 horas para eliminar los extraíbles lipofílicos. Se secaron las fibras y se eliminaron los extraíbles hidrosolubles en agua hirviendo. Se extrajeron en varios pasos consecutivos cambiando el agua hasta que se eliminó el color de los hidrosolubles. Se secaron y se molieron las fibras en un molino de bolas. Se empleó un molino de bolas centrífugo de marca Retsch, modelo S100 y de material ágato con un programa de 25 min. de molienda y 20 min. de reposo para evitar temperaturas altas que provocan alteraciones en la estructura nativa de la lignina. Además la molienda no se llevó a cabo en seco; se añadió tolueno para reducir estas alteraciones. Entre 25 y 30 g de fibra, libre de extraíbles, se molió con 20-25 bolas durante ± 84 horas que corresponde con 47 horas efectivas de molienda. El rendimiento de la lignina extraída depende del grado de molienda. Las fibras molidas se secaron inicialmente debajo un flujo de aire y después durante mínimo 3 días al aire libre para eliminar el tolueno. La lignina se extrajo con 250 ml de una mezcla dioxanos:agua (9:1) por cada 10 g de fibra molida durante 15 horas. Las fibras se recuperaron por centrifugación (25 min., 4 °C, 11000 rpm) que se

sometieron a dos extracciones consecutivas durante 13 horas. La lignina extraída se concentró y se secó por rotavaporación a 40 °C. El residuo (lignina cruda) se resuspendió en 20 ml de una mezcla de ácido acético:agua (9:1) por cada gramo de lignina cruda seca obtenido. La disolución de lignina se precipitó, gota a gota, en 225 ml de agua destilada fría por cada gramo de lignina cruda en agitación continua. Se recogió la lignina precipitada tras centrifugación. Una vez seco (facilitado por el uso de sílica), se trituró en un mortero de ágata para facilitar su disolución en 20-25 ml de una mezcla de 1,2-dicloroetano:etanol (2:1). El sobrenadante se recuperó tras centrifugación (5 min., 4 °C, 5000 rpm). La lignina en disolución se precipitó, gota a gota, en 225 ml de éter dietílico por cada gramo de lignina cruda, se recuperó por centrifugación y se resuspendió en \pm 25 ml de éter dietílico fresco. Después \pm 12 horas la lignina se recuperó por centrifugación y se resuspendió en éter de petróleo durante \pm 12 horas. La lignina se aisló por centrifugación y se secó con un flujo de N₂. Una vez seco, se conservó en ausencia de luz y tapado del aire para evitar su oxidación.

2.5.4. Análisis de MWL mediante pirólisis (Py-GC/MS)

Sólo se requiere entre \pm 0.1 y 0.5 mg de MWL y entre \pm 0.5 y 1 mg de fibra (con o sin extraíbles). Las MWL y fibras se introdujeron manualmente en la cámara del pirolizador (micro-furnace pyrolyzer de Frontier Laboratories Ltd.) que operó a 500 °C durante 10 s. El programa de temperatura del horno del GC empezó a 50 °C y aumentó hasta 100 °C (30 °C/min) y luego hasta 290 °C (6 °C:min.). Un GC (Agilent 6890) con una columna capilar de silicio (fused silica DB-1701, 30 m \times 0.25 mm diámetro interno \times 0.25 μ m de espesor de película) está acoplado al pirolizador. La columna capilar está conectado con un MS (Agilent 5973 N). El flujo del gas portador (He) fue 1 ml/min. La energía de ionización del detector fue programado a 70 eV.

También se prepararon muestras derivadas (metiladas). Para ello basta con añadir \pm 1 gota de 25 % TMAH por mg de lignina (2-3 gotas por mg de fibra) para esterificar los grupos hidroxilos con un grupo de metilo tras añadir TMAH.

2.5.5. Análisis de MWL mediante 2D-NMR

En general esta técnica espectroscópica es la técnica más poderosa para el análisis de materia lignocelulósica y en particular para lignina. Con el análisis mediante 2D-NMR se puede estimar la relación entre las unidades S y G de la lignina. Además se puede observar y estimar la proporción de los diferentes enlaces alifáticos y aromáticos presentes en cierta proporción de la lignina. Con 2D-NMR se descubrieron nuevos tipos de enlaces en subestructuras menos abundantes como dibenzodioxocinas (Karhunen *et al.*, 1995) y las espirodienonas (Zhang y Gellerstedt, 2001; Zhang *et al.*, 2006).

Los espectros de NMR de ligninas se registraron en un espectrómetro Bruker Avance II 600-MHz equipado con una criosonda TXI ¹H-¹³C/¹⁵N/²H con gradientes en el eje z, a una temperatura de 298K. Se disolvieron \pm 40 mg de MWL en 0.750 mL de disolvente deuterado (DMSO-d₆ o DMSO-d₆ : piridina-d₅ (4:1)) en tubos de NMR. Los geles se prepararon con 100/120 mg de fibra molida sin extraíbles en 0.720/0.900 ml de disolvente. Importante en la preparación de geles es el grado de homogenización para medir en un campo homogéneo. Eso depende principalmente del tamaño del

sólido, el tipo de disolvente y la agitación. Las muestras de geles se agitaron manualmente en los tubos facilitado por ultrasonidos. No se trataron con ultrasonidos durante más de 2 horas, en un baño a 30 °C.

Se llevaron a cabo los experimentos ^1H - ^{13}C HSQC y HMBC con secuencias de pulsos estándar de BRUKER. En el espectro de protón el número de puntos adquiridos fue 16k. Los experimentos ^1H - ^{13}C HSQC se realizaron empleando una matriz de datos de 256 incrementos en la dimensión indirecta, y adquiriendo 1024 puntos en la dimensión de adquisición (respectivamente 512 y 2048 en el caso de HMBC). Las ventanas espectrales en el HSQC fueron 8000 y 21800 Hz para las dimensiones de ^1H y ^{13}C respectivamente. En el caso de HMBC, la dimensión del ^{13}C se incrementó hasta 33000 Hz. El número de acumulaciones para el espectro de HSQC fue 8 (96 para HMBC). La constante de acoplamiento $^1J_{\text{CH}}$ utilizada fue 140 Hz. En el HMBC, se usó una constante de acoplamiento a larga distancia de 7.5 Hz. La señal residual de DMSO- d_6 se usó como referencia interna. La intensidad de las señales en los espectros HSQC depende del valor de esta constante así como del tiempo de relajación T_2 (Zhang y Gellerstedt, 2007). Por ello, la integración de las áreas de las señales se realizó por separado en cada una de las regiones del espectro, utilizando las señales correspondientes a correlaciones de C-H químicamente análogas, con constantes de acoplamiento $^1J_{\text{CH}}$ similares. En la región alifática oxigenada, las abundancias relativas de las diferentes subestructuras de la lignina se estimaron mediante la integración de las correlaciones $\text{C}_\alpha\text{-H}_\alpha$. En la región aromática, las correlaciones ^1H - ^{13}C de las unidades S y G se usaron para estimar las relaciones S/G.

2.5.6. Análisis de MWL mediante DFRC

El método de DFRC ('Derivatization Followed by Reductive Cleavage'), desarrollado por el Dairy Forage Research Center en los EEUU, es un método degradativo que rompe selectivamente los enlaces éter $\beta\text{-O-4'}$ y $\alpha\text{-O-4'}$ (eliminación reductiva) con un alto rendimiento produciendo monómeros y dímeros (Figura 10). El análisis por GC/MS de estos productos puede dar información cualitativo y cuantitativo de las subunidades eterificadas y sobre los enlaces C-C presentes en los dímeros formados (Lu y Ralph, 1997a; 1997b). Durante la reacción el sustituyente sobre el carbono C_7 de la cadena alifática permanece intacto (Ralph y Lu, 1998). Eso hace posible estudiar las acilaciones presentes en esta posición (con acetatos, p-cumaratos o p-hidroxibenzoatos). Con el método no es posible detectar y cuantificar las acetilaciones presentes de forma natural en la lignina, porque no se puede distinguir si el grupo acetilo tiene un origen natural o si se formó durante el paso de la acetilación en el análisis. Por eso se desarrolló un método modificado (DFRC'). El método DFRC' es idéntico al DFRC, salvo que se emplean reactivos propionilados en vez de acetilados.

Primero se disuelve la lignina (10 mg) y se rompe los enlaces éter en una mezcla de bromuro de acetilo y ácido acético (8:92 v/v) durante 2 horas a 50 °C. Se eliminó el disolvente tras rotavaporación debajo de 50 °C. Se resuspendió el residuo en una mezcla de dioxano: ácido acético : agua (5:4:1) con polvo de zinc. La suspensión se agitó adecuadamente durante 40 min. a temperatura ambiente para reducir los enlaces $\text{Br-C}_\alpha\text{-C}_\beta\text{-O-}$ (en caso de enlace éter $\beta\text{-O-4'}$). Tras dejar depositar el zinc, se traspasó la muestra cuantitativamente a un embudo de extracción añadiendo 10 ml de una solución saturada de NH_4Cl . Se agitó la mezcla y se ajustó el pH de la fase

acuosa a $\text{pH} < 3$ con HCl al 3%. Se añadió 10 ml de diclorometano para la extracción de los compuestos de la fase acuosa a la fase orgánica de diclorometano. Se agitó adecuadamente y se extrajo 2 veces más con 5 ml de diclorometano. La adición de sulfato de sodio anhidro a la fase orgánica aseguró la ausencia de humedad. Se decantó la disolución a un matraz para su posterior rotavaporación hasta obtener un residuo seco. Los grupos hidroxilo de los monómeros y dímeros se acetilaron con 0.2 ml de anhídrido acético y 0.2 ml de piridina en 1.1 ml de diclorometano durante 1 hora a temperatura ambiente. Se eliminó el disolvente y la piridina tras co-evaporación con 10 ml etanol (4 veces consecutivas). El residuo seco se redisolvió en diclorometano y se secó por un flujo de N_2 . Se preparó una concentración adecuada del residuo seco en diclorometano para su análisis con un GC/MS de Varian Star 3400 acoplado a un detector de trampa de iones (ITD, Varian Saturn 2000). La columna capilar es de sílice fundida (DB-5HT, J&W, 12 m de longitud \times 0,25 mm de diámetro interno \times 0,1 μm de espesor de película). El programa de temperatura empezó a 50 °C incrementado con 30 °C/min. hasta 100 °C y después se elevó hasta 300 °C a 5 °C/min. El gas portador fue He. Los monómeros se pudieron cuantificar usando tetracosano como patrón interno. En el cálculo con las áreas de los picos cromatográficos se asumieron factores de respuesta similares a los obtenidos en (Lu y Ralph, 1997).

Los métodos DFRC y DFRC' también se pueden aplicar a fibras para estudiar la lignina in situ. Para ello se suele usar fibras molidas sin extraíbles. Los espectros son menos 'limpios' que los de lignina, debido a los productos de los carbohidratos y sus complejos con lignina. Sin embargo comparando el método entre lignina aislada y lignina in situ se puede obtener información valiosa. A continuación Tabla 3 muestra los variables experimentales de los dos pasos principales en el método DFRC y DFRC'. Para estimar la relación S/G y el grado de acetilación en la posición γ , no hace falta recuperar los productos de forma cuantitativa y usar un patrón interno para cuantificar los monómeros de forma absoluta. Se calculan proporciones relativas de los superficies integrados de los picos en el espectro de GC/MS de las unidades S y G del análisis DFRC y se multiplican por un factor de respuesta específico para cada producto de DFRC deducido experimentalmente (bibliografía). Los picos correspondiente a unidades S y G representan ambos tanto unidades acetilados como no-acetilados ($\text{S}+\text{S}_{\text{ac}}$ y $\text{G}+\text{G}_{\text{ac}}$). Para estimar el grado de acetilación se calcula $\text{S}_{\text{ac}}/(\text{S}+\text{S}_{\text{ac}})$ y $\text{G}_{\text{ac}}/(\text{G}+\text{G}_{\text{ac}})$ con los superficies integrados de los picos del análisis modificado (DFRC').

Tabla 3: Variables experimentales en los métodos de DFRC y DFRC'

Método	Formación de β -bromo ésteres				Ruptura reductiva enlaces éter β -O-4'/ α -O-4'		
	Muestra (mg)	Reactivo	Vol. (ml)	Condiciones	Disolvente	Vol. (ml)	Zn (mg)
DFRC MWL	10	CH_3COBr :	2.5	2 horas 50 °C /	Dioxano :	2.5	50
DFRC fibra	50	CH_3COOH (8:92 v/v)	5	16 horas T_{amb} 3 horas 50 °C	ácido acético : agua (5 : 4 : 1)	5	100
DFRC' MWL	5	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COBr}$:	3	12 h	Dioxano :	8	100
DFRC' fibra	30	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COOH}$ (1:2 v/v)	5	16 horas 50 °C	ácido propiónico : agua (1:1:0.1)	8	100

2.6. Determinación del contenido en celulosa

Primero se determinó el contenido en holocelulosa. Para ello se añadió 1.5 g de clorito sódico (NaClO_2) y 10 gotas de ácido acético glacial a 5 g de fibra (sin extraíbles con humedad conocida) en suspensión en 160 ml de agua destilada en un baño de 75-80 °C en constante agitación. Cada hora se añadió otra dosis de clorito sódico y ácido acético. Se añadieron 3 dosis para fibras madereras ('hardwoods') y 4 dosis para fibras no madereras (método según (Wise *et al.*, 1946). Se filtró la suspensión y se lavó la holocelulosa con acetona y con agua. Se determinó el contenido en holocelulosa por gravimetría y se expresó en % sobre fibra seca inicial una vez conocido los contenidos en extracto lipofílico y hidrosolubles.

Para determinar la fracción de α -celulosa en la holocelulosa, se añadió 75 ml de solución alcali (17.5 % m/m NaOH) a 3 g de holocelulosa con humedad previamente conocida en un baño a 20 °C en agitación. El método se basa en la norma Tappi T 203 OS-61 para determinar α -, β - y γ -celulosa de pulpas. La α -celulosa es la fracción insoluble en las condiciones de alcali del ensayo. En general indica la fracción de celulosa no degradada, es decir, de alto peso molecular. La β -celulosa indica celulosa hidrolizada (con NaOH) y γ -celulosa representa hemicelulosas. Se añadió el NaOH en varios pasos: 15 ml 1 minuto de agitación + 10 ml 0,75 minutos de agitación + 10 ml 0,25 minutos de agitación. Después añadir estos primeros 35 ml se dejó reposar la suspensión durante 1 min. Enseguida se añadieron 10 ml con 2.5 minutos de agitación y se repitió la misma dosis 3 veces más. Se cubrieron las suspensiones al aire y se dejaron reposar durante 30 minutos. Se añadieron 100 ml de agua destilada a las suspensiones y se agitó vigorosamente. Se dejó reposar de nuevo las suspensiones durante 30 min. para filtrarlas posteriormente sobre filtro de poro n° 2. Se lavaron los filtros con 25 ml de 8,3 % NaOH y enseguida se lavaron 5 veces con 50 ml agua destilada. El material insoluble se lavó más con unos 400 ml de agua destilada y después con 2 N ácido acético durante 5 min. antes de emplear el filtrado por vacío. Se lavaron los filtros con agua destilada hasta pH neutro. Se secaron los filtros y se determinó la fracción de α -celulosa por gravimetría. Se expresaron en % de holocelulosa y en % de α -celulosa de la fibra seca inicial.

CAPÍTULO IV:

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1 Composición química

Tabla 4 muestra el análisis de los metales y algunos elementos calculados a partir de su concentración en el extracto ácido con HNO₃ determinado por ICP-OES de sisal, abacá, paja y salvado de trigo, corteza y médula de hierba elefante y BSG.

Tabla 4: Contenido en metales y otros elementos expresadas en mg/kg (A) y % (B) de fibra seca

		Sisal	Abacá	Paja de trigo	Hierba elefante		Salvado de trigo	Bsg
					Médula	Corteza		
A (mg/kg fibra seca)	As	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01
	Ba	36,163	2,373	5,552	5,692	1,532	8,253	8,162
	Cd	<0.5	0,559	<0.5	0,973	<0.5	<0.5	0,603
	Co	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
	Cu	<1	<1	1,91	7,78	3,44	13,296	5,42
	Cr	<1	<1	1,851	1,041	<1	<1	<1
	Fe	50,1	14	112,907	41,507	10,807	100,7	75,607
	Li	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
	Mn	1,782	8,242	23,8	23,6	11,6	52,932	36,3
	Ni	1,004	<1	1,02	<1	<1	<1	<1
	Pb	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
Zn	4,59	<1	5,51	36,8	12,4	70,2	55,9	
B (% de fibra seca)	S	0,0135	0,0066	0,2458	0,1458	0,0623	0,1068	0,2226
	Ca	0,177	0,093	0,211	0,072	0,011	0,063	0,785
	P	<0.01	<0.01	0,022	0,18	0,292	0,091	0,631
	Mg	0,032	0,013	0,074	0,071	0,025	0,076	0,06
	K	0,056	0,214	1,2	3,5	1,82	<0.05	<0.05
	Na	0,021	0,001	0,182	0,012	0,01	0,075	0,023

Resta por analizar el contenido en silicio que no se puede analizar por este método. De los resultados cabe sacar las siguientes conclusiones:

- La médula de la hierba elefante contiene aproximadamente entre 2 y 4 veces más metales y otros elementos que la corteza en todos los tipos de metales y elementos, excepto en el caso de fósforo. La hierba elefante contiene bastante más K⁺ que las otras fibras. En general el contenido de metales de la corteza de la hierba elefante es más parecido a lo de sisal y abacá. Paja de trigo, salvado de trigo, BSG y sobretodo la médula de la hierba elefante tienen contenidos relativamente altos.
- BSG contiene en todos los casos menos metales que salvado de trigo excepto Ca, pero contiene más S y P (elementos vitales).
- Paja de trigo tiene un contenido relativamente muy alto en Fe, Ca y S.
- Abacá y sisal contienen poco metales, excepto para Ba y Ca (sisal). Sisal contiene más metales que abacá.

A continuación se muestran los resultados de diferentes análisis químicos de diferentes materiales lignocelulósicos de interés industrial (Tabla 5). De cada análisis se hizo un triplicado, salvo en el caso de la lignina Klason (4 replicados) y solo una muestra en el caso de las correcciones de la lignina Klason. Se observó que existe un cierto margen de error experimental en el análisis de la lignina Klason. En el caso de algunas fibras (sobretudo con BSG) se observó restos insolubles depositados después de dejar reposar el hidrolizado durante varios días. La cantidad de esta fracción depende principalmente del tamaño de poros de los filtrados usados en el análisis de la lignina Klason. Se realizaron experimentos que demuestran que usando filtros de n° 4 en vez de n° 3, el contenido de la lignina Klason no varía mucho ($< 2\%$). También se encontró que estos restos de la lignina Klason en el hidrolizado no influyen mucho en el valor de la lignina ácido soluble ($< 0,5\%$).

Tabla 5: Composición química de sisal, abacá, paja y salvado de trigo, corteza y médula de hierba elefante y BSG (expresados en % sobre fibra seca inicial)

	Sisal	Abacá	Paja de trigo	Hierba elefante		Salvado de trigo	BSG
				Médula	Corteza		
Cenizas	1.1 ± 0.1	1.1 ± 0.0	6.6 ± 0.1	11.3 ± 0.1	5.6 ± 0.2	1.1 ± 0.2	4.9 ± 0.0
Extracto lipofílico en acetona	0.7 ± 0.1	0.4 ± 0.0	2.7 ± 0.2	2.5 ± 0.2	1.9 ± 0.5	1.9 ± 0.0	9,2 ± 0.2
Extracto lipofílico en cloroformo	0.5 ± 0.1	0.3 ± 0.0	2.0 ± 0.2	1.3 ± 0.4	0.9 ± 0.3	1.9 ± 0.0	9.1 ± 0.2
Compuestos hidrosolubles	1.6 ± 0.6	1.2 ± 0.2	9.6 ± 1.3	11.1 ± 1.5	9.1 ± 0.4	2.4 ± 0.1	8.3 ± 1.0
Lignina Klason (con corrección de cenizas y proteínas)	8.5 ± 0.7	9.4 ± 1.4	16.2 ± 2.1	16.5 ± 1.0	19.3 ± 0.6	12.1 ± 0.8	8.8 ± 0.9
Lignina ácido-soluble	6.0 ± 0.9	5.4 ± 0.9	1.5 ± 0.0	1.7 ± 0.1	1.6 ± 0.1	8.6 ± 3.0	4.9 ± 0.3
Holocelulosa	89.2 ± 0.3	87.6 ± 0.4	67.2 ± 0.4	63.6 ± 0.5	66.9 ± 1.7	64.0 ± 0.4	49.4
α -celulosa	55.6 ± 0.6	65.5 ± 0.3	36.5 ± 0.4	49.7 ± 3.4	41.8 ± 1.4	31.4 ± 9.1	16.7
Total	107.1 ± 1.3	105.1 ± 1.7	103.8 ± 2.5	106.7 ± 1.9	104.4 ± 1.9	90.1 ± 3.1	85.5 ± 1.4

En primer lugar se observa que el total de los contenidos están un poco de encima de 100 %. No son análisis independientes. Ciertos componentes interfieren en los análisis. Los totales de los contenidos de salvado de trigo y BSG son respectivamente 90 y 85 %, debido al contenido proteolítico elevado de ambos. No son realmente fibras, son residuos industriales no puramente lignocelulósicos. Las proteínas pueden influir significativamente en los diferentes tipos de análisis (Hatfield, 2005).

Se puede observar que hierba elefante y paja de trigo contienen entre 5 y 6 veces más cenizas que sisal, abacá y salvado de trigo. La médula de la hierba elefante contiene el doble de cenizas que la corteza.

En cuanto a los compuestos lipofílicos se puede distinguir 3 grupos según el contenido:

- Abacá y sisal (bajo)
- Hierba elefante, paja y salado de trigo (moderado)
- BSG (elevado)

BSG tiene un contenido lipofílico ± 10 veces mayor que abacá y sisal. La composición de los lípidos se está investigando actualmente, pero este proyecto se centra en lignina y no enfocará en la estructura química de los lípidos.

En cuanto a los compuestos hidrosolubles se diferencian en:

- Abacá, sisal y salvado de trigo (bajo contenido)
- Paja de trigo, hierba elefante y BSG tienen (contenido bastante elevado)

Paja de trigo y hierba elefante contienen dos veces más lignina no ácido-soluble (lignina Klason) que abacá, sisal y BSG. El salvado de trigo tiene un contenido entremedio. Los valores de lignina Klason con sus respectivos rangos de incertidumbre de abacá, sisal, paja de trigo y hierba elefante están conformes con los pocos datos encontrados en la literatura (datos no mostrados). Sin embargo los valores de salvado de trigo y BSG están bastante por debajo de los valores publicados, por ejemplo % para salvado de trigo () y % para BSG (). Se podría comparar los contenidos con el método de extracción con detergente ácido según (Goering y Van Soest, 1975). El método minimiza restos de xilanos y pectinas dejando solo celulosa y lignina. La interferencia de cutina y suberina se puede eliminar por oxidación con permanganato, pero no tienen un alto contenido (1 %). Curiosamente en el análisis de la lignina in situ en la fibra por pirólisis, 2D-NMR y DFRC (ver apartado 2.) se observan pocas unidades G, H y S. Además no se pudo aislar lignina según el procedimiento de (Björkman, 1956), por falta de cristalización durante la precipitación. Estas observaciones se discutirán más adelante en apartado 2.

En cuanto a la lignina ácido soluble, abacá y sisal dieron valores altos de lignina ácido-soluble en comparación con paja de trigo y hierba elefante. Podría resultar interesante investigar la composición (unidades G/H/S) de lignina ácido- y no ácido-soluble. También falta por investigar la aptitud del coeficiente de extinción usada en el cálculo, porque en realidad depende de la composición de la lignina. Normalmente se suele usar un valor de 110 L/(g.cm) en la ecuación de Beer (Dence, 1992), pero en realidad se debería determinar para cada fibra. Las máximas de absorción de las unidades de lignina se sitúan alrededor de 280 nm, pero no se usan debido a la interferencia con furfural y hidroximetilfurfural, productos de carbohidratos (xilanos) formados después del hidrólisis ácido. Según (Fergus y Goering, 1970) las máximas de absorción de unidades G y S son respectivamente 280 y 270 nm. La interferencia no es significativa a 205 nm, pero pueden absorber en cierta proporción monosacáridos de los carbohidratos (Hatfield, 2005). Por ejemplo el contenido relativamente alto en salvado de trigo y BSG podría explicarse por el contenido más alto en unidades H según el análisis por 2D-NMR (ver apartado 2.2.), pero también puede estar influido por sus carbohidratos que son estructuralmente distintas de las otras fibras. Sin embargo contiene menos carbohidratos que las otras fibras, pero influyen más en muestras con poca lignina. También hay que considerar su contenido peptídico que podría interferir en la absorbancia. Para eliminar la interferencia, antes de someter la fibra al hidrólisis ácido para medir la lignina Klason se podría

extraer con una mezcla de etanol-benceno seguido por un tratamiento proteolítico enzimático (Ellis, 1949).

Un contenido más bajo en lignina implica un contenido más alto en holocelulosa como se puede observar en sisal y el abacá. Contienen ± 20 % más holocelulosa que las otras fibras analizadas. La holocelulosa de la médula y corteza contienen respectivamente 78 y 62 % α -celulosa, muy parecido a la de sisal (62 %) y abacá (75 %). La holocelulosa de la paja y salvado de trigo contiene menos α -celulosa (respectivamente 54 y 49 %). El valor bajo de BSG falta por confirmar (se perdieron 2 muestras en el triplicado).

2 Análisis de MWL

Durante la extracción de lignina a partir de fibras vegetales se puede alterar la estructura nativa de la lignina en la materia. Sobretudo existe riesgo de alteración durante la molienda debido a las condiciones de estrés mecánico y térmico. Por eso la molienda no se lleva a cabo en seco pero con tolueno, un disolvente que dispersa bien la fibra y disipa bien el calor. Además los intervalos en la molienda evitan sobrecalentamiento. MWL ('milled wood lignin'), la lignina aislada conforme al protocolo de (Björkmann, 1956)), está considerada como representativa para la lignina nativa. Sin embargo el rendimiento de extracción es bajo en comparación con el contenido total de lignina. Eso hacen atractivas las técnicas *in situ*, es decir, técnicas que se aplican directamente sobre la fibra sin extraer la lignina. Cuando se obtenga una resolución y sensibilidad satisfactoria, realmente se puede estudiar los compuestos de forma muy directa en la pared celular todavía integra.

2.1. Pirólisis (Py-GC/MS)

Se analizaron los productos de pirólisis tanto de MWL como de fibra para identificar de que unidades se derivan (G/H/S). Falta por cuantificar las proporciones relativas de las unidades para estimar la relación S/G y H/G. A continuación se muestra los espectros obtenidos con la fibra de la médula y corteza de hierba elefante (Figura 26). Los otros espectros no están mostrados, pero se implicarán más adelante en la discusión. Se observan productos de pirólisis de las diferentes unidades de lignina partir de ± 5.5 minutos de elución. Los compuestos que eluyen antes son productos de pirólisis de carbohidratos. Cuando se piroliza la lignina o la fibra en presencia de TMAH, se puede diferenciar ácido ferulico y ácido p-cumárico debido a la metilación de sus grupos hidroxilos. Hierba elefante contiene niveles de p-ácido cumárico bastante mayores que ácido ferulico. Comparando los espectros de MWL y de la fibra *in situ*, se puede deducir que el ácido p-cumárico está presente sobretudo en la lignina mientras la distribución de ácido ferulico en lignina y carbohidratos no queda claro. Se observan señales de intensidad parecidas de ácido ferulico en MWL y fibra, mientras la intensidad de ácido p-cumárico aumentó mucho en la MWL. Sólo una fracción del ácido ferulico se encuentra en la lignina. En MWL y fibra de abacá se detectaron niveles mucho más moderados de p-ácido cumárico y de ácido ferulico en comparación con la hierba elefante.

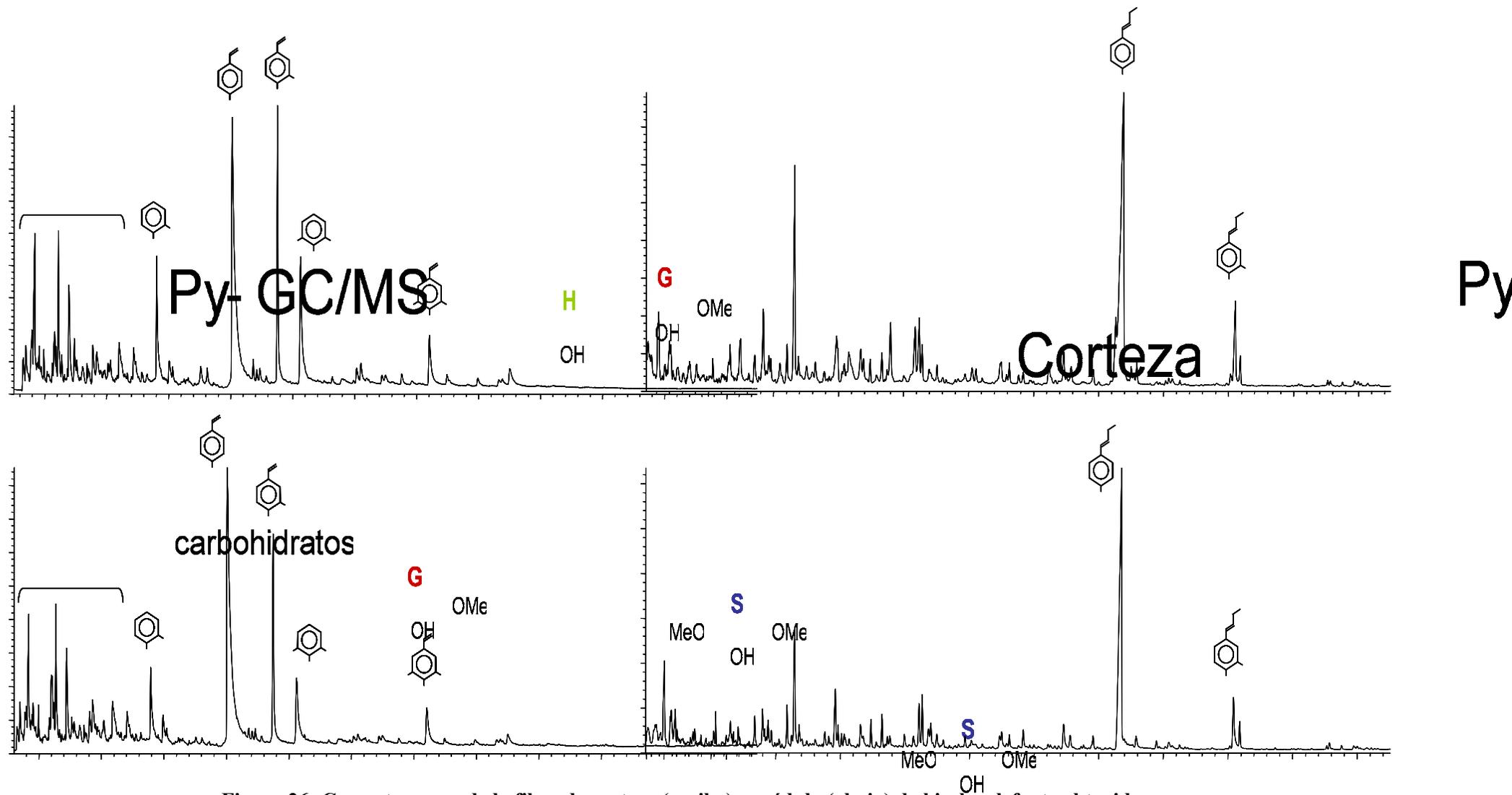


Figura 26: Cromatograma de la fibra de corteza (arriba) y médula (abajo) de hierba elefante obtenido con Py-GC/MS (izquierda) y Py-TMAH-GC/MS (derecha)

En la fibra de paja de trigo ambos ácidos p-hidroxicinámicos están presentes en niveles muy parecidos mientras en la MWL baja mucho el señal de ácido ferulico en comparación con el señal de ácido p-cumárico. Ambos no se detectaron en sisal. En BSG y salvado de trigo hay poco p-ácido cumárico presente y mucho más ácido ferulico. También se observaron señales intensas de ácidos grasos en los espectros de Py-TMAH-GC/MS, incluso en la MWL aislada de salvado de trigo. Se observó que el precipitado obtenido con el extracto en dioxano:agua (9:1) según el procedimiento de (Björkman, 1956) no se cristalizó. Se mantuvo liquido con una alta viscosidad, quizás debido a la presencia de estos ácidos grasos en el extracto (aunque se sometieron a las extracciones de extraíbles).

2.2. 2D-NMR

Se prepararon de cada tipo de fibra muestras para su análisis de HSQC y de algunas para un análisis HMBC. Las muestras de MWL se disolvieron en DMSO-d₆, cuyo señal residual se usa como referencia interna. Las muestras de fibra (sin extraíbles) se encuentran en un estado de gel facilitado por la interacción de los polisacáridos con el DMSO. Se prepararon en DMSO-d₆ y en DMSO-d₆: piridina-d₅ (4:1). Tabla 6 da un resumen de las señales cruzadas observadas por (del Río *et al.*, 2008) en el espectro de HSQC de sisal, kenaf, abacá y curaua en DMSO-d₆. Sirve como base para asignar la mayoría de los acoplamientos observados en lignina. Sin embargo en DMSO-d₆: piridina-d₅ (4:1) los señales se desplazan muy ligeramente.

Tabla 6: Desplazamientos químicos de las señales cruzadas de diferentes acoplamientos observadas en sisal, kenaf, abacá y curaua según (del Río, 2008).

δ_C/δ_H (ppm)	Assignment
53.7/3.12	C _β -H _β in β-β' (resinol) substructures (C)
56.1/3.09	C _β -H _β in β-1' (spirodienone) substructures (D)
60.0/3.38-3.71	C _γ H _γ in β-O-4' substructures (A)
63.8/3.83-4.30	C _γ H _γ in γ-acylated β-O-4' substructures (A' and A'')
71.7/3.81 and 4.17	C _γ -H _γ in β-β' (resinol) substructures (C)
72.3/4.86	C _α -H _α in β-O-4' substructures (A, A' and A'')
82.1/5.12	C _α -H _α in β-1' (spirodienone) substructures (D)
83.6/4.32	C _β -H _β in γ-acylated β-O-4' substructures (A' and A'')
85.4/4.64	C _α -H _α in β-β' (resinol) substructures (C)
85.4/4.80	C _α -H _α in β-1' (spirodienone) substructures (D)
86.5/4.10	C _β -H _β in γ-OH β-O-4' substructures (A)
87.7/5.45	C _α -H _α in phenylcoumaran substructures (B)
103.8/6.68	C ₂ -H ₂ and C ₆ -H ₆ in syringyl units
106.7/7.36 and 7.21	C ₂ -H ₂ and C ₆ -H ₆ in oxidized (C _α =O) syringyl units
111.5/6.99	C ₂ -H ₂ in guaiacyl units
111.6/6.23	C ₂ -H ₂ in β-1' (spirodienone) substructures (D)
114.3/6.24	C _β -H _β in p-coumaroylated substructures (A'')
115.2/6.71 and 6.94	C ₅ -H ₅ in guaiacyl units
116.2/6.77	C ₃ -H ₃ and C ₅ -H ₅ in p-coumaroylated substructures (A'')
118.3/6.19	C ₆ -H ₆ in β-1 (spirodienone) substructures (D)
119.5/6.83	C ₆ -H ₆ in guaiacyl units
130.5/7.4	C ₂ -H ₂ and C ₆ -H ₆ in p-coumaroylated substructures (A'')
145.1/7.39	C _α -H _α in p-coumaroylated substructures (A'')

En general los señales en la mezcla de DMSO y piridina no ganaron en resolución, probablemente debido al uso de parámetros de 'shimming' del gradiente de campo usados para muestras en DMSO sólo (guardado en método del equipo de NMR) o optimizados en el momento y debido a la falta de homogenización de los dos disolventes en el tubo (se debe mezclar antes). Sin embargo la piridina facilitó mucho la movilidad de las muestras para homogenizar más fácilmente.

Espectros ^1H - ^{13}C HSQC

A continuación se ilustran los espectros de 2D-NMR de MWL de la médula y corteza de hierba elefante en DMSO- d_6 (Figura 27) y de MWL y gel de fibra de paja de trigo, abacá y de la corteza de hierba elefante en DMSO- d_6 : piridina- d_5 (4:1) (Figura 28a). Figura 28b ilustra las subestructuras identificadas en los espectros de Figura 28a. Las señales están marcadas con letras (A, B, C, etc.) que refieren a diferentes tipos de subestructuras encontradas en la lignina. Las letras α , β y γ se refieren al átomo de carbono o hidrógeno de la cadena alifática. G, H y S son las señales aromáticas de las respectivas unidades de la lignina. Se analizaron ambas fracciones de hierba elefante, pero se muestran sobretodo los análisis de la corteza teniendo en cuenta que es la mayor fracción (84 %).

Las señales cruzadas principales (δ_C/δ_H) están asignadas a grupos metoxilos (MeO) y a la estructura más abundante (A) con enlaces β -O-4' y sus respectivos derivados acilados A' (acetilado) y A'' (p-cumarilado). En la zona aromática de todos los espectros están las señales de unidades G y S, menos en salvado de trigo y BSG. En los geles de fibra faltan a veces señales. En la MWL de paja de trigo y en el gel de salvado de trigo y BSG se encontraron unidades H, y quizás también en MWL de abacá y hierba elefante (baja intensidad). Se identificaron señales de estructuras menos abundantes como resinoles en abacá, paja de trigo y hierba elefante (C_α/C_β en Figura 27 y $B_\alpha/B_\beta/B_\gamma$ en Figura 28a) formando enlaces β - β' / α -O- γ' / γ -O- α' , fenilcumaranos en paja de trigo y hierba elefante ($B_\alpha/B_\beta/B_\gamma$ en Figura 27 y C_α/C_β en Figura 28a) formando enlaces β -5'/ α -O-4' y espirodienonas en abacá ($D_\alpha/D_\alpha'/D_\beta/D_2/D_6$ en Figura 28a) formando enlaces β -1'/ α -O- α' . En general estas estructuras no se llegan a detectar en espectros de geles de fibra. En el espectro de los geles se observan casi todos los señales de lignina en el caso de la corteza (Figura 28b). En la médula faltan señales tanto en la zona alifática como aromática (no mostrado), sobretodo de PCA. En la corteza se observan señales de xilanos (X_1) y xilanos acetilados (X_1' , X_2' y X_3'). Estos señales no se observaron en la médula.

Las señales cruzadas del acoplamiento entre H_γ y C_γ de las MWL están suficientemente resueltos (Figura 27) para diferenciar los señales entre 63.5/3.83 - 63.5/4.30 ppm y 60.2/3.30 - 60.2/3.70 ppm, correspondiendo respectivamente a C_γ con un grupo de acilación y sin acilación (grupo hidroxilo). El grado de acilación en la MWL de la corteza y médula se estimó respectivamente 32 y 48 % a partir de los áreas integrados. El grado de acetilación y p-cumarilación no se puede estimar en el espectro HSQC. Señales de p-cumarato (PCA) se observaron en la región aromática. Otro método apto para cuantificar los diferentes grupos de acilación es DFRC y DFRC' (ver apartado 2.3.). Ácido ferulico (Fer) sólo se identificó en el gel de la corteza de hierba elefante (Figura 28a), en la MWL de la médula (Figura 29) y corteza (no mostrado) y en el gel de salvado de trigo (no mostrado). En las fibras que contienen PCA, los señales de Fer β y Fer5 (C_β y C_5 de ácido ferulico) no se pueden observar debido al solapamiento con el señal de PCA3,5 (C_3 y C_5 de p-ácido cumárico) igual que Fer α con PCA α . Las señales de ácido ferulico son menos abundantes y mucho menos intensas que los de p-ácido cumárico.

En el gel de paja de trigo faltan algunos señales de lignina. Se encuentra poco señal de PCA. En el espectro de MWL están casi todas las señales de lignina. Se detecta poco acoplamiento con el carbono anomérico de carbohidratos presentes en los complejos con lignina indicando una pureza alta de la MWL. Se debe tener en cuenta que en la preparación de MWL parte de lignina se extrae como complejos con carbohidratos. En el gel de fibra de corteza de hierba elefante están presentes

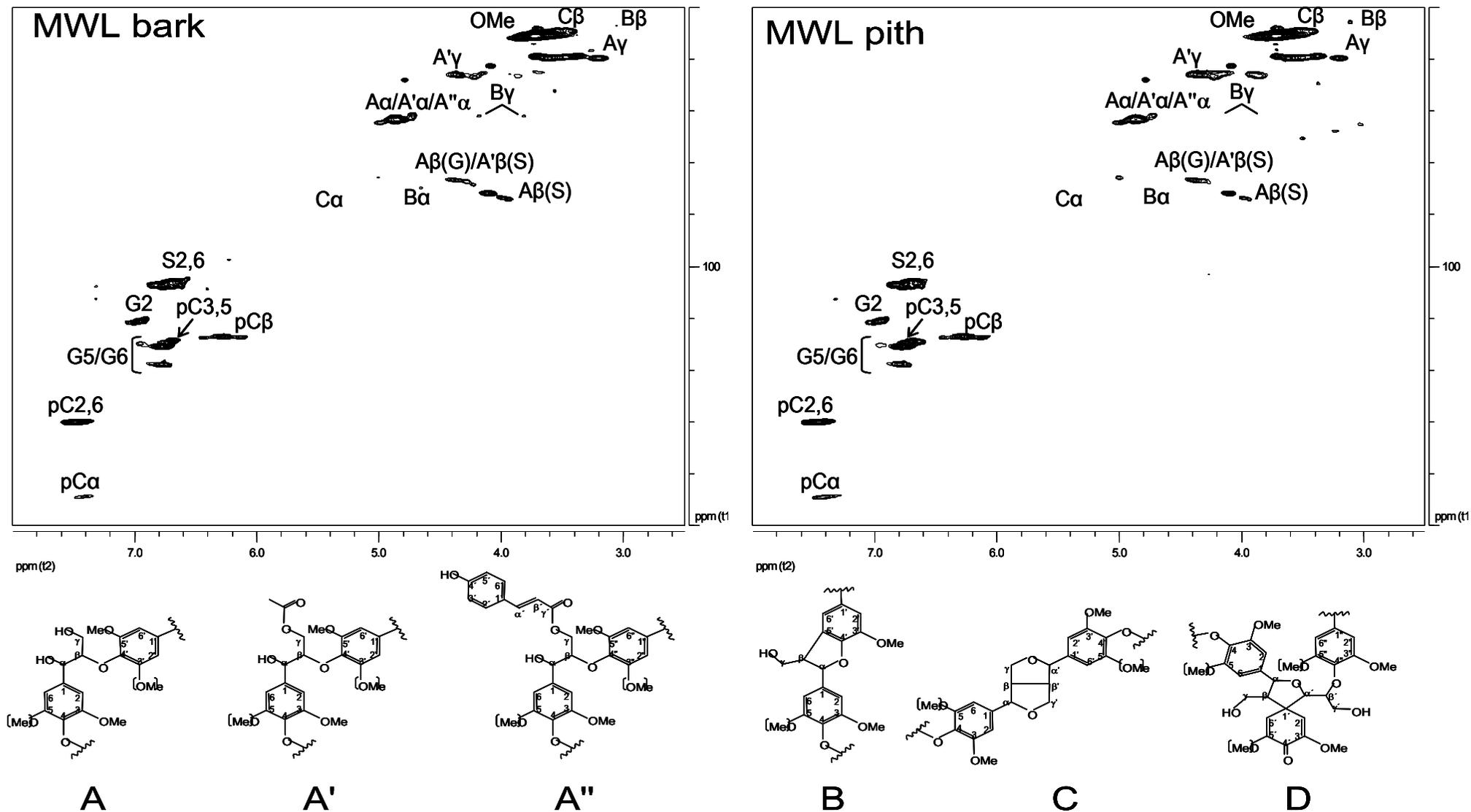


Figura 27: Espectro de HSQC de MWL de médula (izquierda) y corteza (derecha) de hierba elefante en DMSO- d_6 con ilustración de los señales cruzadas de las diferentes subestructuras presentes

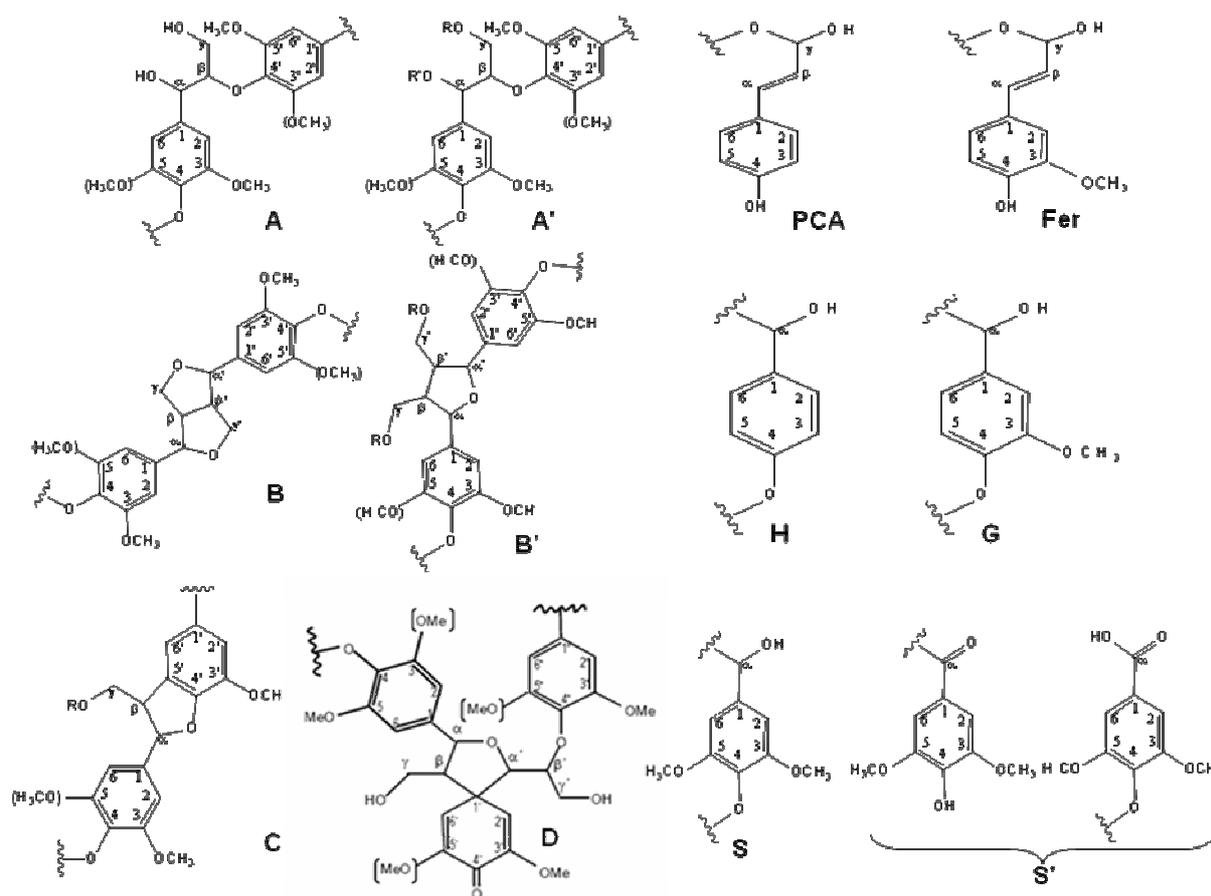


Figura 28b: Subestructuras asignadas a las señales cruzadas identificadas en los espectros HSQC de abacá, paja de trigo y corteza de hierba elefante en Figura 28a. Subestructuras de unidades de lignina unidas por enlaces β -O-4' (A y A'), β - β' / α -O- γ' / γ -O- α' (resinolos B y B'), β -5'/ α -O-4' (fenilcumarano C y C') y β -1'/ α -O- α' (espirodienona D y D') (PCA: p-ácido cumárico y Fer: ácido ferulico)

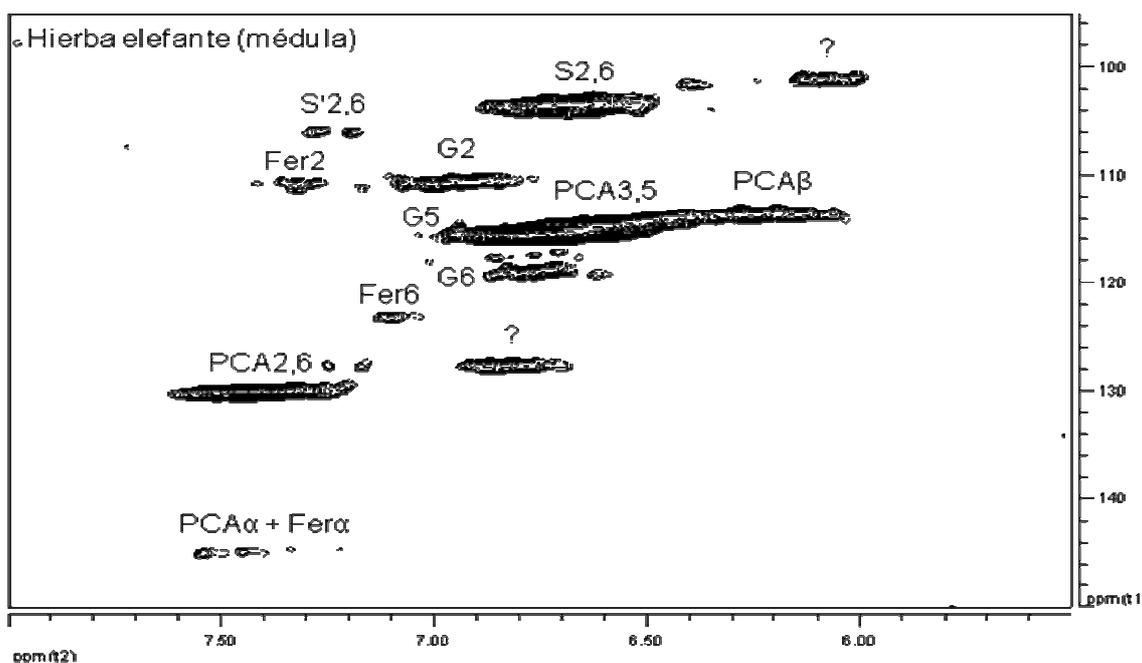


Figura 29: Expansión de la zona aromática del espectro HSQC de MWL de la médula de hierba elefante en DMSO-d₆

señales cruzadas del acoplamiento entre C_α/C_β y un átomo de un carbohidrato unido por un enlace éter ($\alpha(R)$ y $\beta(R)$ en Figura 28a). La estructura principal de la lignina de paja de trigo es β -O-4' de cual también una proporción está acilada en el carbono γ . El señal de acetato (MeCOO) es moderado, igual que en el gel. El señal a 7.3/130 ppm corresponde a unidades H. En plantas herbáceas el contenido de unidades H es más elevado y es muy variable entre las especies, pero en general suele variar debajo de 20 %. Por eso es difícil detectarlas y cuantificarlas. Los señales a 6.2/92 y 6.7/97 ppm están desconocidos.

En los espectros de los geles de salvado de trigo y BSG (no mostrados) se observan señales de H. No se llegaron a detectar unidades de S y G, sólo se observó señales de $H_{3,5}$ (6.9/115 ppm) y $H_{2,6}$ (7.4/125 ppm), ambos más intensas en BSG que en salvado de trigo. También ácido oleico y linoleico han sido identificados (respectivamente a 5.38/125 y 5.4/128 ppm). Ambas materiales se trataran más profundamente en apartado 3.3.

Espectros 1H - ^{13}C HMBC

De las muestras de MWL se pueden comparar los espectros de HSQC con los de HMBC. Sin embargo el acoplamiento a larga distancia en muestras de geles de fibra se atenúa demasiado rápido para registrar suficiente acoplamiento y obtener un señal intenso y bien resuelto. Con geles de fibra sólo se registran espectros HSQC. Los grupos de acilación en la posición γ , acetato y p-cumarato, en el espectro HMBC sí se pueden cuantificar. Con el equipo de NMR usado se llega a registrar suficientes acoplamientos a larga distancia; las acumulaciones registradas durante ± 15 horas son suficientes para establecer una buena correlación con los carbonilos de acetato y p-cumarato (carbonilos carboxílicos de ésteres). Figura 30 muestra los espectros HMBC de abacá y hierba elefante con el espectro de HSQC de sus respectivos MWL superpuestos (en color). Figura 31 ilustra las cuantificaciones de los acoplamientos con los grupos carbonilo observados en sisal, abaca y la corteza de hierba elefante.

- En sisal sólo se encontraron unidades acetilados. La correlación con el protón a 2 ppm confirma el acetato. El acoplamiento del carbonilo acético a 170.5 ppm con H_γ fue estimado en 81 %.
- En abacá predominaron las acilaciones con acetato (MeCOO, 85%). Mucho menos acoplamiento se observó con el carbonilo de p-ácido cumárico (PCA, 13 %) a 166.7 ppm (correlación con H_α a 7.5 ppm y con H_β a 6.3 ppm). La acilación fue principalmente con el H_γ (78 %) entre 3.9 y 4.6 ppm. El resto del acoplamiento se cuantificó entre el carbonilo acético y el protón no identificado a 4.8 ppm (11 %) y entre el carbonilo de PCA y el protón no identificado a 4.9 ppm (11%). Sólo 2 % del carbono en posición γ está acilado con cumaratos. El resto del cumarato (11 % de los carbonilos) está acilado en otra posición. Un pequeño señal de acilación en C_α es observable, pero no es suficiente intenso para diferenciar de que grupo se trata en el HMBC.
- Pocas unidades de MWL de la corteza de hierba elefante están acetilados. El mayor grupo de acilación es PCA. Sorprendentemente de los 32 % de acilación en posición γ (calculado en HSQC), sólo 7 % fue estimado estar acilado en γ con PCA. El señal con que correlaciona el acoplamiento está desconocido actualmente (a 4.9 ppm). Igual que observada en abacá hay un señal debil de acilación en la posición α . Las correlaciones con los señales a 4.8 ppm y 4.9 ppm también se encontraron en poca intensidad en sisal y kenaf (del Río *et al.*, 2008). En sisal analizado en (del Río *et al.*, 2008) no se detectó, en este proyecto sí. La cuestión es la naturaleza de la estructura no identificado (lignina?).

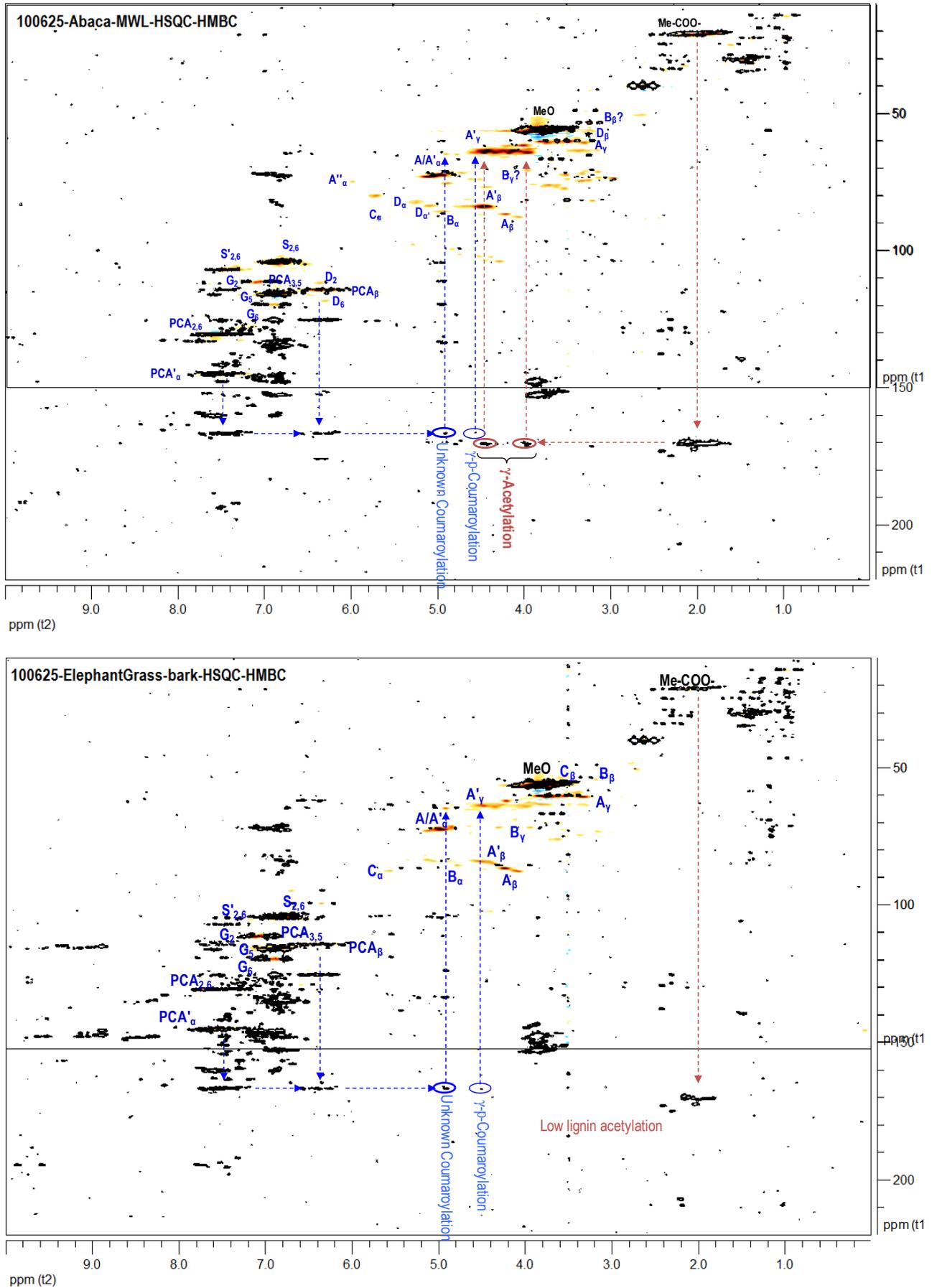


Figura 30: Espectros de HMBC de MWL de abacá (arriba) y la corteza de hierba elefante (abajo) en DMSO- d_6 : piridina- d_5 (4:1) con los respectivos espectros superpuestos (en color)

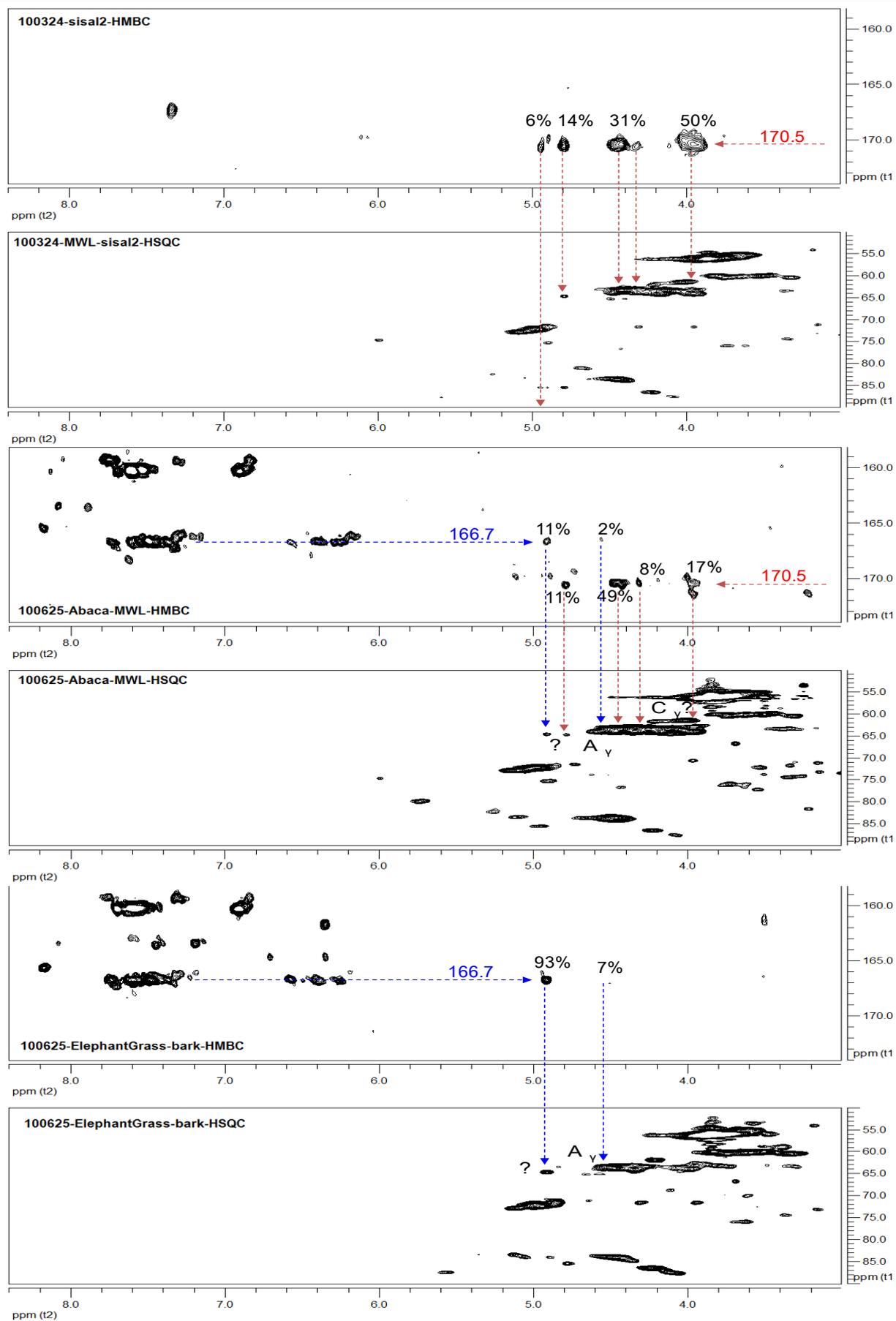


Figura 31: Espectros de HMBC y HSQC en DMSO-d₆ : piridina-d₅ (4:1) de sisal (arriba, en DMSO-d₆), abacá (medio) y corteza de hierba elefante (abajo) y cuantificación de la correlación del acoplamiento del carbonilo de PCA (azul) y MeCOO (acetato, rojo) con la cadena alifática de sus MWL

La diferencia en la estructura de lignina se pudo observar de forma macroscópica. La lignina aislada (MWL) de hierba elefante y abacá, al tener una estructura respectivamente más condensada y más lineal, es respectivamente menos soluble y más soluble en ácido acético:agua. Respectivamente 100 % y ± 40 % de sus ligninas extraídas se recuperaron después precipitación en agua fría y centrifugación durante respectivamente 25 y 200 minutos. La solubilidad en ácido acético:agua de lignina de paja de trigo y sisal fueron entremedios de abacá y hierba elefante. Los últimos experimentos con lignina de abacá indican que la lignina en ácido acético:agua se puede recuperar por rotavaporación a 40 °C en vez de por centrifugación, recuperando 100 % de la lignina aislada. Los análisis de Py-GC/MS (datos no mostrados) no indican ninguna diferencia entre ambas fracciones preparadas de forma distinta. Falta por comparar sus espectros de NMR y análisis de DFRC para controlar efectos secundarios y nivel de contaminación.

2.3. DFRC

En este método de derivatización los enlaces éter en la posición α y β de la cadena alifática se rompen por eliminación reductiva de los derivados bromurados separando monómeros. Así se puede estimar la relación entre unidades G y S y el grado de acetilación tras comparar las intensidades de unidades G, G_{ac} , S y S_{ac} . En algunos casos se puede detectar di- y trimeros que puede dar información adicional sobre las enlaces entre unidades. En los análisis de lignina en situ se obtienen cromatogramas más complejas debido a las señales de los productos de carbohidratos. Eluyen principalmente al principio de la columna, pero pueden bajar mucho la sensibilidad para detectar los señales correspondiendo a los fragmentos de GC/MS producidos de unidades de lignina. De las unidades G y S el conformero cis se produce en menos proporción que el trans y suele eluir antes. Las intensidades de las diferentes unidades identificadas se deben adaptar con un factor de sensibilidad obtenido experimentalmente (bibliografía) para cuantificar las proporciones relativas presentes en la muestra. En este proyecto las proporciones no están calculadas todavía por motivos que se discutirán a continuación. Sin embargo las intensidades relativas de los picos observados permiten un análisis semi-cuantitativo.

Se realizó el análisis de DFRC y de DFRC' de las diferentes fibras y sus respectivas MWL. Figuras 32a, 32b, 32c, 32d, 32e y 32f muestran los cromatogramas de los productos obtenidos por DFRC y DFRC' y identificados por GC/MS de MWL y de lignina en situ (directamente sobre la fibra) y Figura 32g enseña la estructura de estos mismos.

En las MWL de todas las fibras se identificaron las unidades G y S, incluso en la mayoría de los análisis de lignina en situ. Sin embargo en algunos casos en el tiempo de elución correspondiente a una cierta unidad sólo se observó el señal del valor de m/z principal debido a su intensidad baja con respecto a señales de carbohidratos. Por tanto no se pudo identificar con seguridad aquellas señales cuales sus valores de m/z secundarios no se detectaron. La presencia de carbohidratos también hace dificultar identificar el tiempo de elución correcto, mientras en las muestras de MWL los tiempos de elución mostraron muy poca desviación.

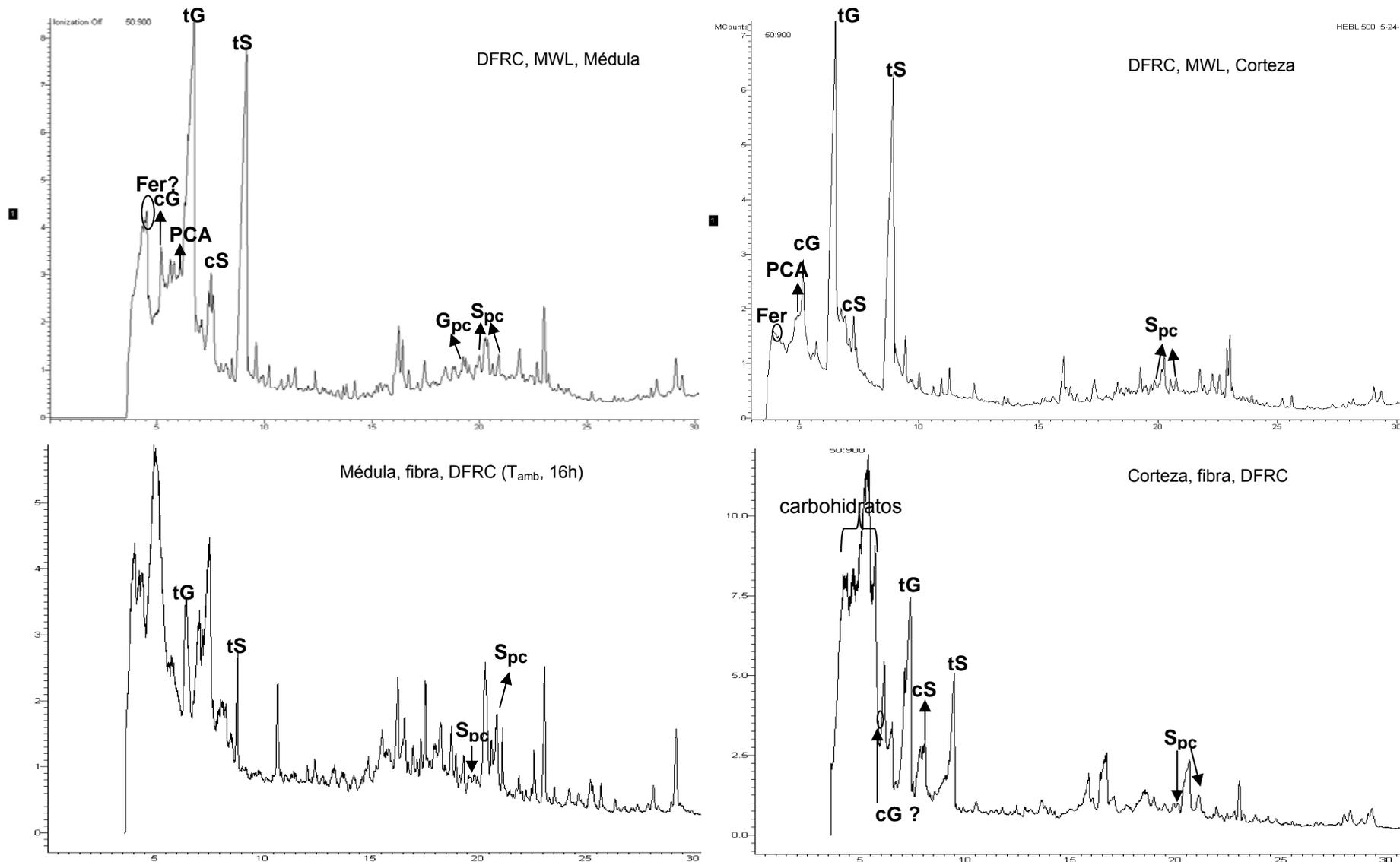


Figura 32a: Productos de DFRC de MWL (arriba) y fibra (abajo) de la médula (izquierda) y corteza (derecha) de hierba elefante

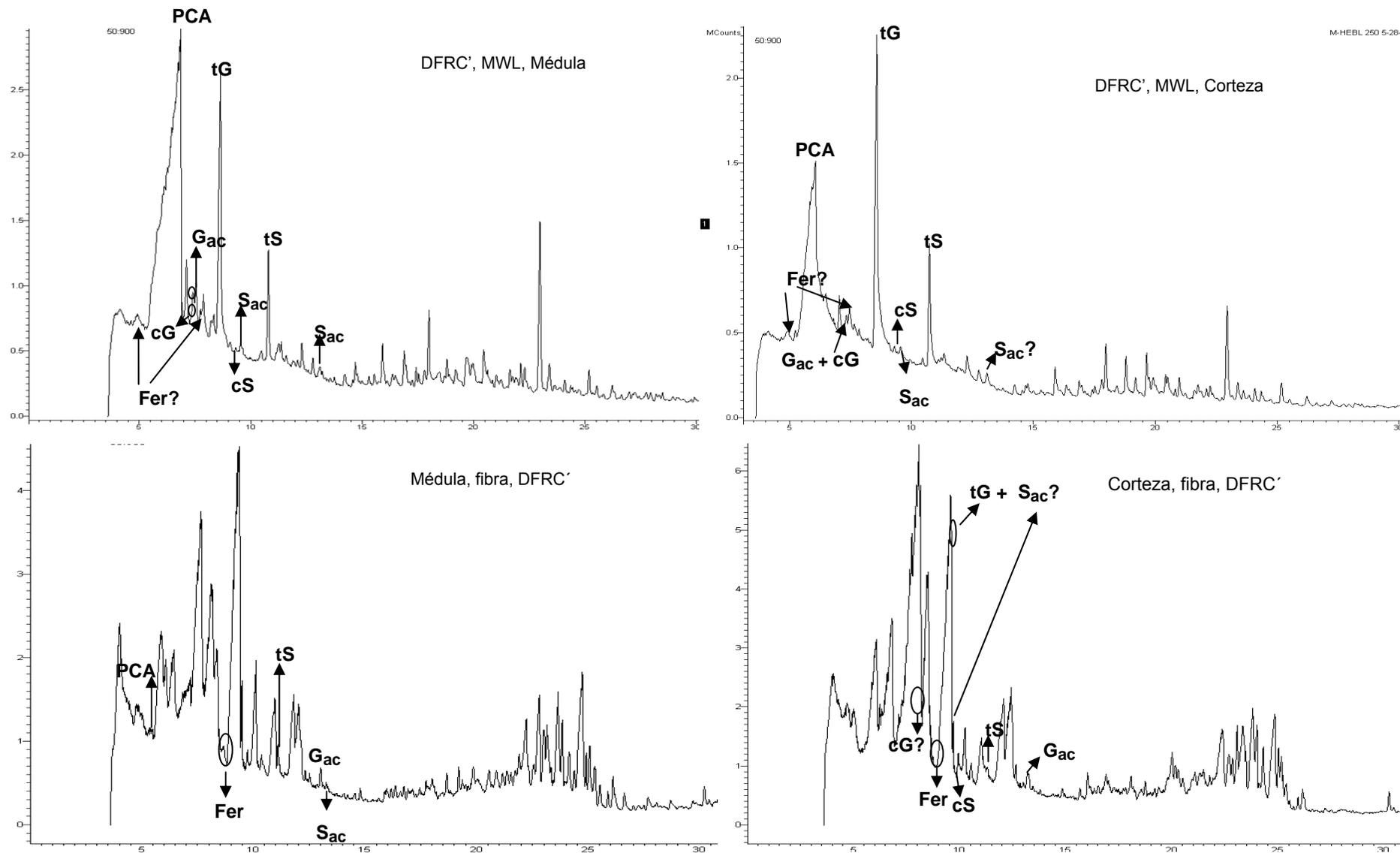


Figura 32b: Productos de DFRC' de MWL (arriba) y fibra (abajo) de la médula (izquierda) y corteza (derecha) de hierba elefante

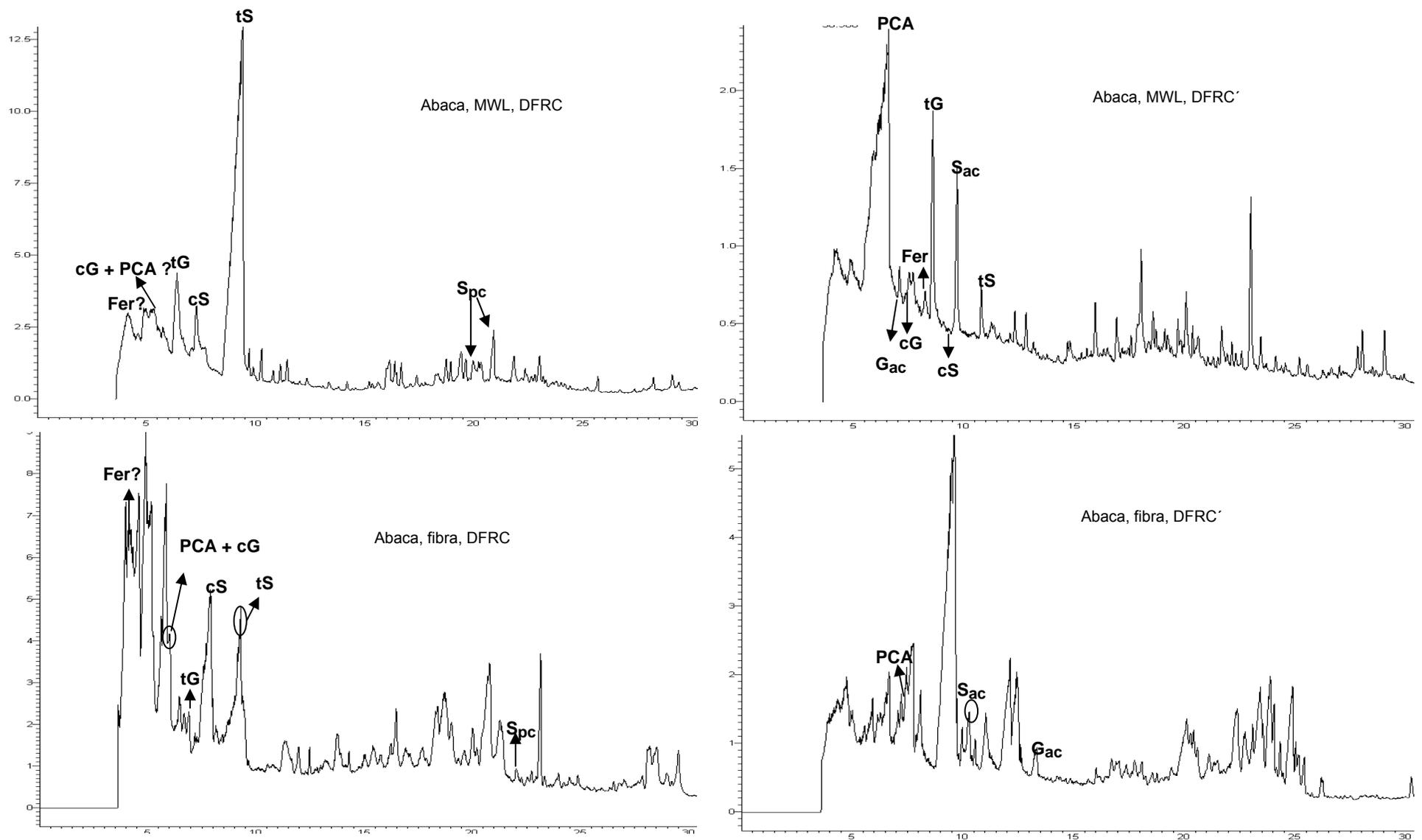


Figura 32c: Productos de DFRC (izquierda) y DFRC' (derecha) de MWL (arriba) y fibra (abajo) de abacá

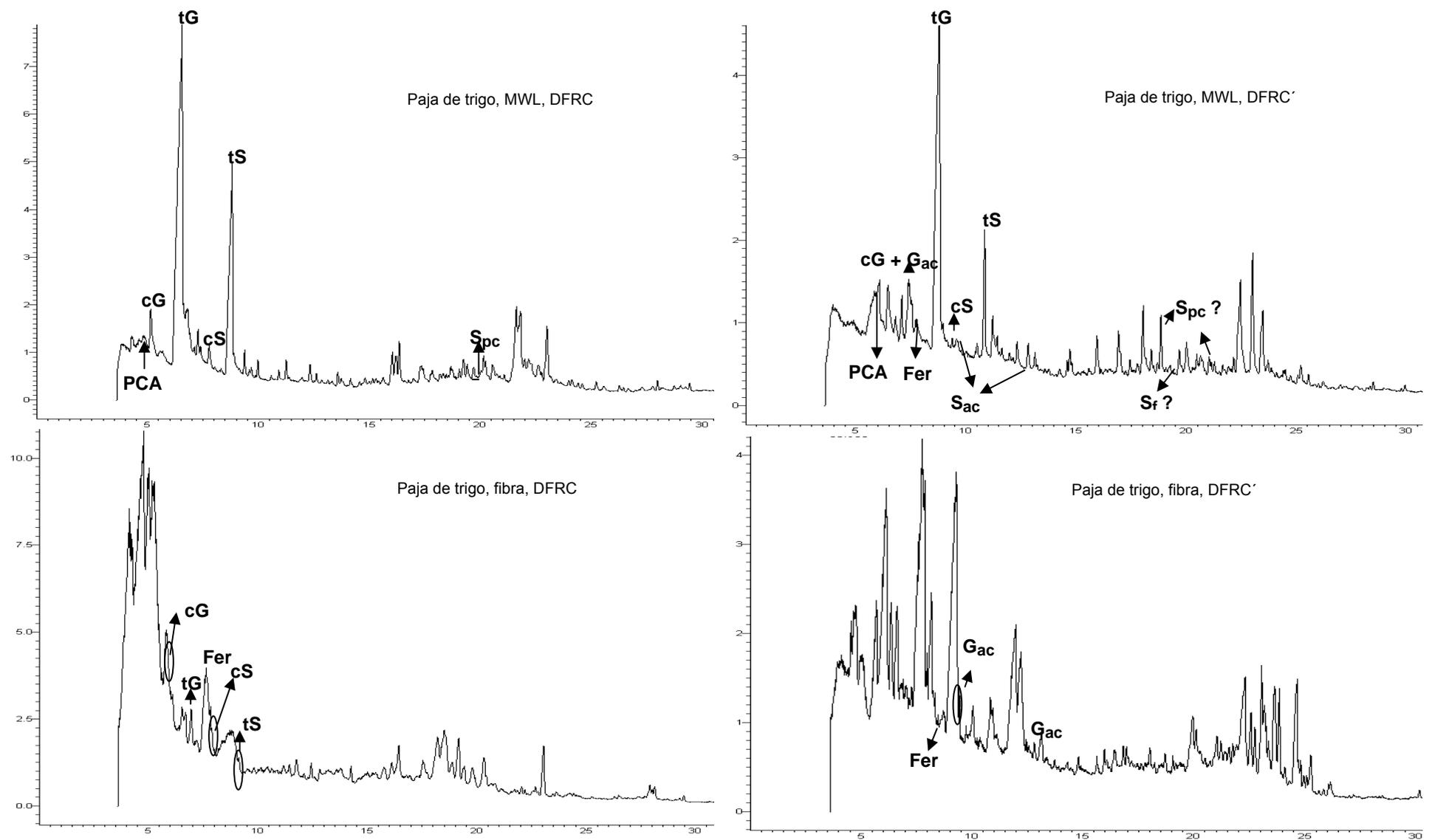


Figura 32d: Productos de DFRC (izquierda) y DFRC' (derecha) de MWL (arriba) y fibra (abajo) de paja de trigo

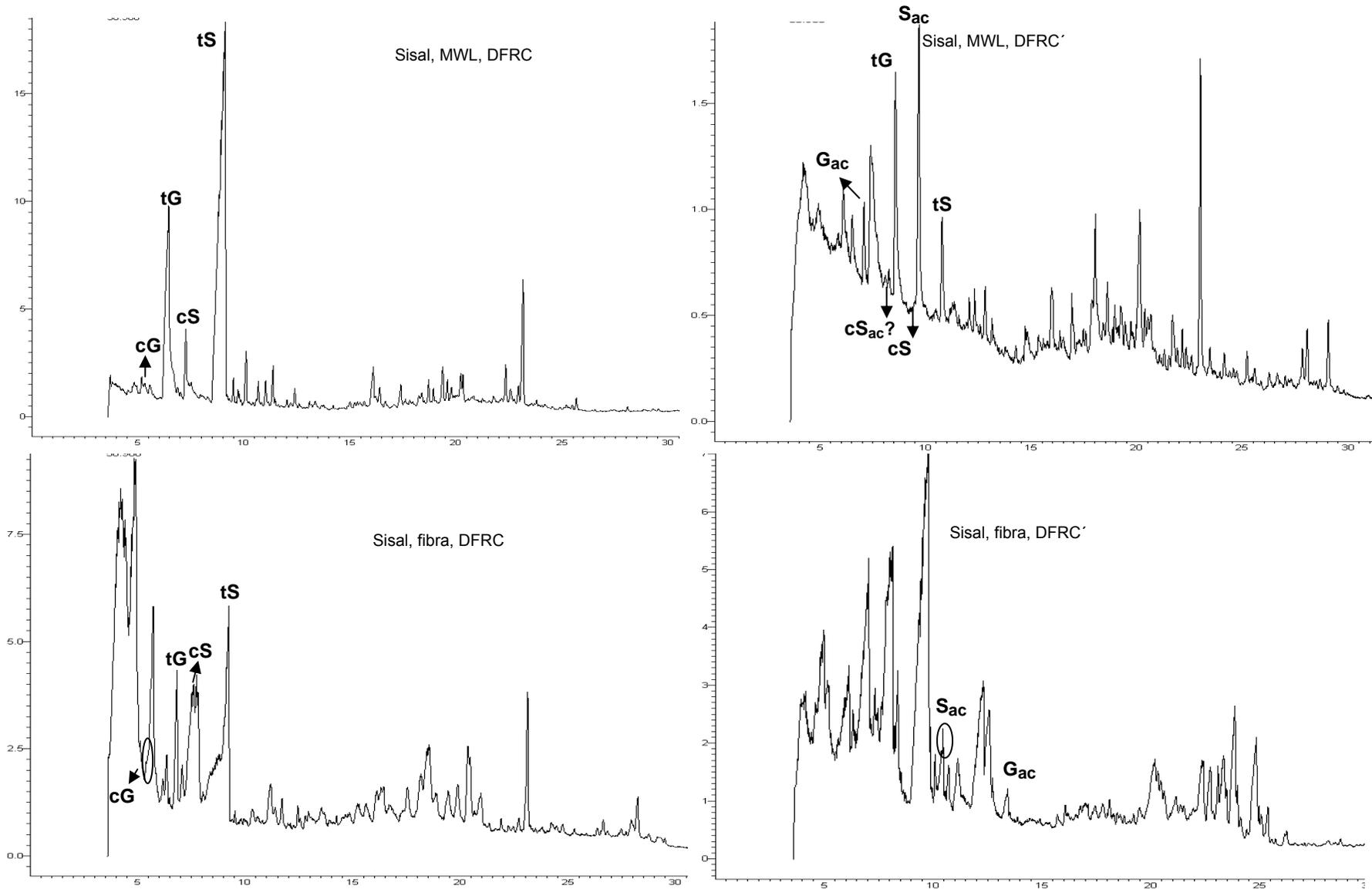


Figura 32e: Productos de DFRC (izquierda) y DFRC' (derecha) de MWL (arriba) y fibra (abajo) de sisal

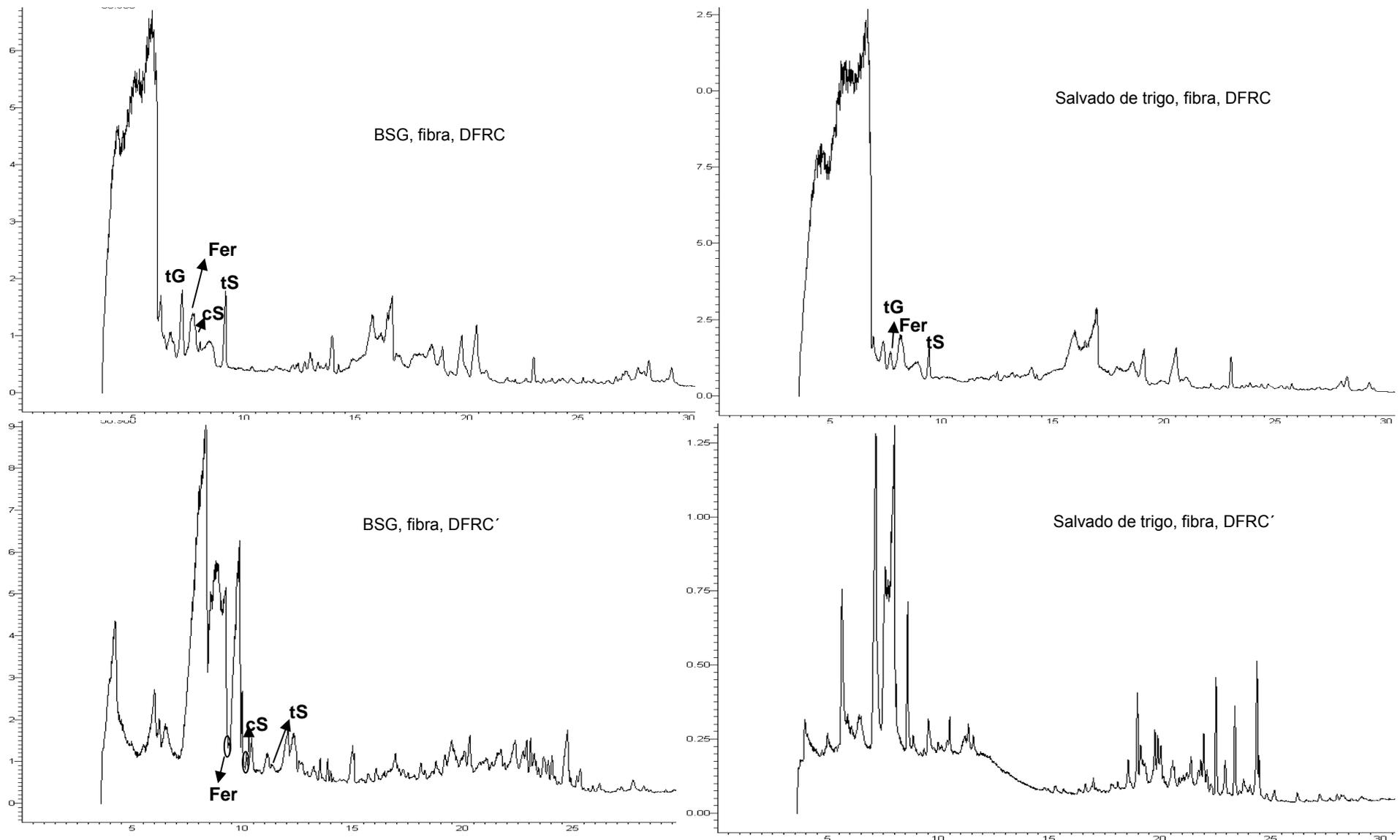


Figura 32f: Productos de DFRC (arriba) y DFRC' (abajo) de MWL de BSG (izquierda) y salvado de trigo (derecha)

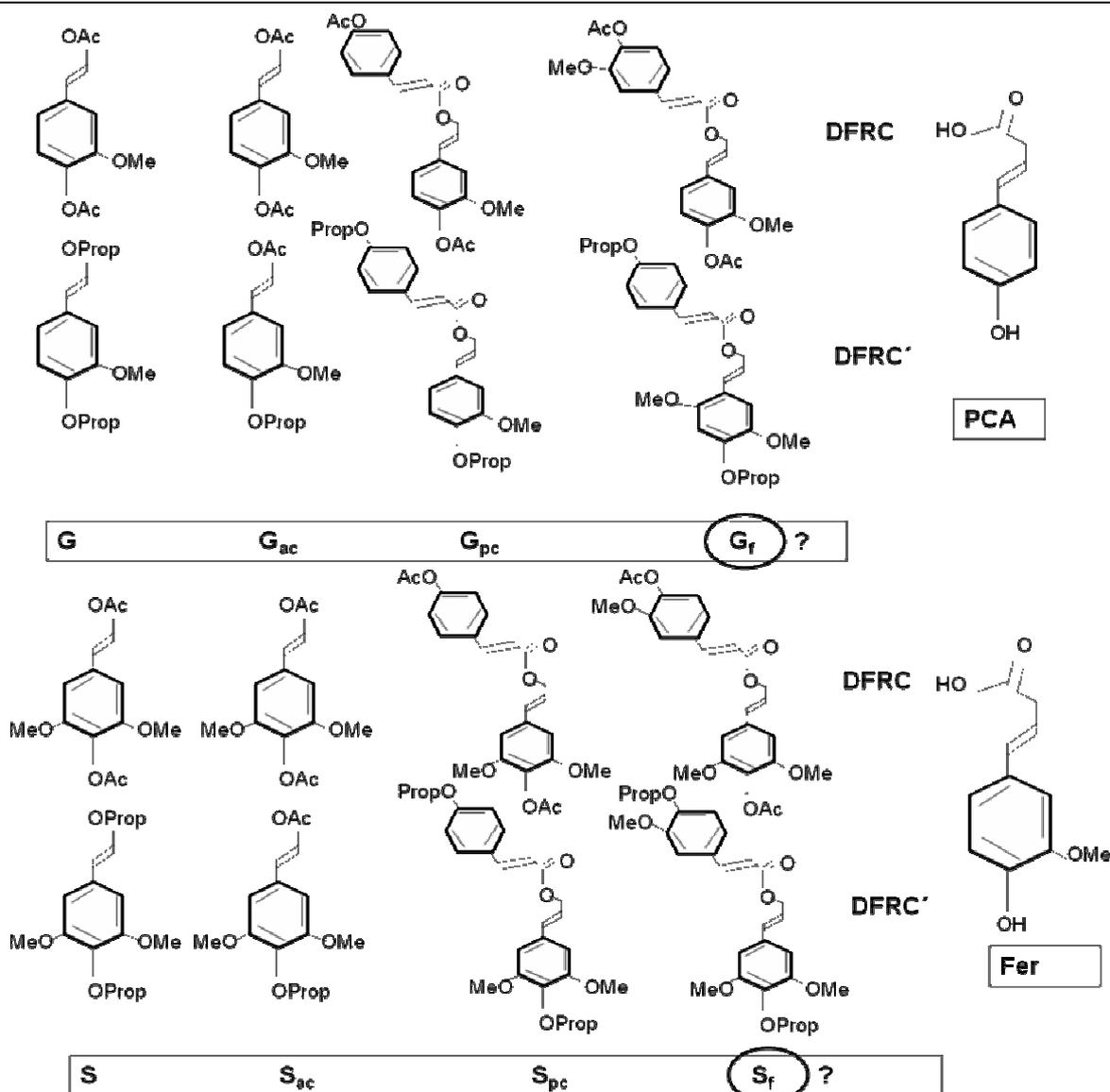


Figura 32g: Estructura de los productos G, G_{ac}, G_{pc}, G_f, S, S_{ac}, S_{pc}, S_f, PCA (ácido p-cumarílico) y Fer (ácido ferulico) de DFRC y DFRC'. G y S indican el tipo de unidad mientras ac, pc y f se refiere respectivamente a la acetilación, p-cumarilación y feruloilación de las unidades. C y t se refiere a los conformeros cis y trans (cS, tS, etc.).

Para identificar unidades acetiladas (G_{ac} y S_{ac}) se considera las cromatogramas de DFRC'. En abacá y sisal (Figura 32c y 32e) se observa una presencia elevada de unidades acetiladas, sobretodo de unidades S (S_{ac}), muy parecido a los resultados en (del Río *et al.*, 2007). Hierba elefante y paja de trigo también contienen unidades acetiladas, pero mucho menos que abacá y sisal. Tabla 7 muestra los grados de acetilación de sisal, abacá y hierba elefante estimados a partir de las áreas integradas de los picos.

Tabla 7: Grados de acetilación en MWL de sisal, abacá y en médula y corteza de hierba elefante estimado a partir de las intensidades relativas de S, S_{ac}, G y G_{ac} por DFRC'.

MWL		% G _{ac} /G	% S _{ac} /S
Sisal		45	80
Abacá		4	82
Hierba elefante	Corteza	3	4
	Médula	10	3

En la hierba elefante, abacá y paja de trigo se observaron unidades de sinapil p-cumarato (ácido p-cumarílico esterificado sobre el C_γ del alcohol sinapílico (S_{pc})). En algunos casos también se les encontraron en el análisis en situ, sobretodo en hierba elefante donde se espera un nivel de p-cumarilación más elevado según los resultados de Py-TMAH-GC/MS. En MWL de la médula de hierba elefante también se detectó unidades de coniferil p-cumarato (G_{pc}). No fue posible evaluar el grado de p-cumarilación, porque en abacá se detectaron intensidades mucho más bajas que obtenidas anteriormente (del Río *et al.*, 2007). Tras analizar de nuevo dos muestras obtenidas por (del Río *et al.*, 2007), se obtuvieron los mismos resultados con excepción de los picos que pertenecen a unidades S_{pc} (también eluyeron con baja intensidad). Eso indica que las condiciones de la columna o de otros parámetros del equipo GC/MS posiblemente no fueron idénticos como en (del Río *et al.*, 2007). Por tanto es posible que las proporciones relativas de las intensidades observadas de las diferentes unidades no son representativas para las proporciones presentes en las muestras. Habrá que investigar los parámetros actuales del equipo GC/MS (condición y longitud de la columna, inyector, detector, programa de temperatura, etc.) para cuantificar las proporciones relativas exactas. Sin embargo los análisis por HMBC de MWL de corteza de hierba elefante y abacá indican sólo 7 y 11 % de p-cumarilación en la posición γ. Eso explica las bajas intensidades de G_{pc} y S_{pc} en el análisis de DFRC. También se nota el aumento de la relación de las señales del acoplamiento de H_β en las estructuras β-O-4' con un grupo de hidroxilo y con un grupo de acilación en posición γ (A_β/A'β en Figura 28a) según abacá < paja de trigo < hierba elefante. Inevitablemente surgen las siguientes preguntas, por ejemplo para la corteza de la hierba elefante:

- Qué grupos están acilados sobre la posición γ de la corteza de hierba elefante, aparte de acetato y p-ácido cumárico (PCA) ---> 32 % de acilación de cuales 7 % de PCA y 4 % de acetato ---> grupo de acilación de los 21 % restantes ?
- Abundancia de estructuras de fenilcumarano con acilación en γ?
- Otras unidades que G y S con acilación? (señal a 4,9/66 ppm)
- Otra posición de unión de PCA a la lignina, α y β ? (DFRC)

En los análisis DFRC' de MWL y de hierba elefante (médula y corteza) y de abacá se observaron señales relativamente muy intensas de PCA y en menos proporción también en paja de trigo. Curiosamente en los análisis DFRC los correspondientes señales de PCA se detectaron en intensidad más baja. Puede que tenga que ver con una diferencia de reactividad entre los reactivos respectivamente acetilados y propionilados o en el factor de sensibilidad usando en el cálculo cuantitativo. Según (del Río *et al.*, 2007) el señal corresponde a PCA esterificado en la posición β o α. En el HSQC las señales de acilación en α son relativamente bajas. La diferencia de PCA con unidades H en la lignina está en la posición γ (COOH de p-ácido cumárico y OH en el caso de unidades H). En general pocas veces se detectan unidades H, debido a su bajo contenido comparado con G y S.

En algunos casos de las fibras de hierba elefante, paja de trigo, BSG y salvado de trigo se observaron ácido ferulico libre en una proporción mucha más baja que p-ácido cumárico. La identificación de ácido ferulico no es tan obvia como p-ácido cumárico, porque sus señales de m/z secundarios son de intensidad más baja (comparación espectros en librería de NIST).

En los análisis en situ de salvado de trigo y BSG no se detectaron unidades acetiladas. Tampoco se observaron unidades G y S en el análisis DFRC' mientras ambas unidades se observaron en el análisis DFRC. Por eso no queda claro si BSG y salvado de trigo contiene unidades acetiladas, ni si quiera si tiene unidades G y S. Las intensidades de los señales de unidades S y G en el DFRC son parecidas a las observadas por Py-GC/MS. Sin embargo en el espectro de 2D-NMR no se detectaron señales de ambas unidades.

Teniendo en cuenta el contenido en lignina Klason (alrededor de 10 %), se puede concluir que BSG y salvado de trigo tiene un contenido moderado de lignina en contraste con los datos encontrados en la bibliografía. Su elevado contenido de proteínas, minerales y otros compuestos orgánicos no presentes en materiales 'puramente' lignocelulósicos disminuye la exactitud de los análisis. Existen adaptaciones y otros métodos para reducir las interferencias en el análisis. También podría influir el grado de polimerización de la lignina. Los procesos industriales de cuales provienen (cocción (BSG) y proceso mecánico (salvado de trigo)) podrían contribuir a la degradación de lignina. Los extractos en dioxano:agua obtenidos en la preparación de MWL de BSG y salvado de trigo tuvieron un color oscuro, típico para materiales con alto contenido de lignina. Sin embargo no se precipitó en la mezcla de ácido acético:agua. Se recuperó una materia de alta viscosidad parecida a un sirope. De salvado de trigo se consiguió 30 mg de MWL. Los resultados de Py-GC/MS muestran un alto contenido en los ácidos grasos palmítico, oleico y linoleico igual que observados in situ. Eso podría explicar el carácter de 'sirope' del extracto en dioxano:agua. Surge la cuestión si se debe a una extracción incompleta de lípidos o a la presencia de enlaces covalente entre estos ácidos grasos y la lignina. En los espectros de 2D-NMR de los geles de BSG se observó ácido oleico y linoleico, aunque ambos se extrajeron con acetona para eliminar lípidos. Incluso se extrajeron después la molienda y durante 1.5 hora más que previsto en el protocolo para asegurar su eliminación. Esto indica más a la presencia de enlaces covalentes con el material lignocelulósico. Al otro lado hay que tener en cuenta que durante la preparación de MWL se molieron los materiales después la extracción y que BSG tiene un contenido lipofílico muy elevado. Por eso el señal de ácido linoleico fue mucho más intenso en el gel (2D-NMR) de BSG (9.2 % lípidos) que en salvado de trigo (1.9 %). Las técnicas analíticas usadas para caracterización de materiales lignocelulósicos usados para la fabricación de papel ofrecen una alta sensibilidad, resolución y exactitud. Existen métodos adaptados y posibilidades de adaptación de los métodos existentes para caracterizar materiales no 'puramente' lignocelulósicos como los de residuos agrícolas, industriales y urbanos.

3 Conclusiones

Composición química

En general se puede dividir los materiales lignocelulósicos analizados en 3 'grupos' según el contenido de compuestos en que constituye :

- abacá y sisal
- paja de trigo y hierba elefante
- salvado de trigo y BSG (en realidad no consiste en fibras).
- > clasificación:
- Cenizas: hierba elefante / paja de trigo > BSG > abacá / sisal / salvado de trigo
- Lípidos: BSG >> salvado de trigo / paja de trigo > hierba elefante > abacá / sisal
- Hidrosolubles: hierba elefante / paja de trigo > BSG >> salvado de trigo > abacá / sisal
- Lignina: salvado de trigo / hierba elefante > paja de trigo > abacá / sisal / BSG
- > Lignina Klason:
- hierba elefante > paja de trigo > salvado de trigo > abacá / sisal / BSG
- > Lignina ácido-soluble:
- salvado de trigo > abacá / sisal / BSG > paja de trigo / hierba elefante
- Holocelulosa: abacá / sisal > paja de trigo / hierba elefante / salvado de trigo > BSG
- α - celulosa: abacá > sisal > hierba elefante > paja de trigo > salvado de trigo > BSG

En cuanto a los metales, en general están muy ricos en minerales la médula de hierba elefante, salvado de trigo, BSG y paja de trigo. Contienen relativamente pocos minerales sisal y abacá y la corteza de hierba elefante. Falta por determinar el contenido en sílice.

Características estructurales de lignina

Todas las fibras contienen unidades S y G. Sus contenidos en salvado de trigo y BSG no quedan claros. Sólo en paja y salvado de trigo se identificaron unidades H (señales en abacá y hierba elefante?). Falta por cuantificar la relación S/G y la proporción de diferentes enlaces de todas las ligninas y el grado de acilación en la posición γ de algunas.

Las características estructurales de sisal son parecidas a los resultados en la bibliografía. Tiene un alto de grado de acetilación, mayoritariamente en la posición γ . Abacá, hierba elefante y paja de trigo contiene enlaces de fenilcumarano y resinoles. Enlaces de espirodienonas sólo se detectaron en abacá. El nivel de acetilación en abacá es mucho mayor que en hierba elefante y paja de trigo. En abacá la acetilación se produce sobretodo en unidades S, menos en sisal y parecido en unidades G en hierba elefante. El grado de p-cumarilación aumenta según abacá < paja de trigo < hierba elefante. La p-cumarilación en abacá y hierba elefante se produce mucho menos en la posición γ que esperado. La posición de unión está desconocido (señal a 4.9/66 ppm). La cuestión es si está acilado sobre unidades G y S o sobre otras estructuras. Los señales muy intensas de p-ácido cumárico libre en el análisis de DFRC' indican acilación en posición α y β , pero no fue observado en HSQC en tal proporción. También se observó ácido ferulico libre en el análisis de DFRC en abacá, paja de trigo y hierba elefante, tanto en MWL como en la fibra. Ambos ácidos p-hidroxicinámicos también se encontraron en alta proporción en el análisis de Py-TMAH-GC/MS de paja de trigo y hierba elefante. Abacá contiene menos ácido ferulico.

Acido ferulico también se observó en salvado de trigo y BSG por DFRC y Py-GC/MS. Ambas técnicas detectaron unidades G y S, pero en baja proporción. Por 2D-NMR no se encontraron unidades G y S en ambos materiales. Estos resultados contrastan con el contenido de lignina de los análisis de lignina Klason y ácido-soluble. No se sabe la influencia de su contenido de proteínas sobre los diferentes análisis.

La combinación de las técnicas analíticas Py-(TMAH)-GC/MS, 2D-NMR y DFRC/DFRC' resulta ser muy útil para resolver la estructura de ligninas. En principio espectros intensos y bien resueltos de HSQC y HMBC (2D-NMR) dan suficiente información. Sin embargo es preferiblemente con MWL, porque por ejemplo con geles de fibra (análisis en situ) no se puede obtener un buen espectro de HMBC. La presencia de los carbohidratos disminuyen la sensibilidad en las 3 técnicas. El análisis de Py-(TMAH)-GC/MS ofrece más ventajas en el aspecto que es rápido y más apto para análisis en situ, pero es un método semi-cuantitativo. Los análisis de DFRC y DFRC' se aplica preferiblemente con MWL.

3.1. Investigación próxima

Actualmente se está analizando las ligninas (tipo de unidades, enlaces y grado de acilación) presentes en fracciones de hemicelulosas y celulosa de las diferentes fibras con un método universal recién desarrollado. El fraccionamiento se hace mediante solvólisis en una mezcla de disolventes orgánicos. También se está analizando la composición química de los lípidos.

Habrá que identificar los restantes señales desconocidos y cuantificar todos los señales de DFRC y 2D-NMR para estimar la relación G/H/S, el grado de acetilación y p-cumarilación y las proporciones relativas de enlaces en la MWL de los materiales lignocelulósicos. También se investigará más para resolver la duda si el ácido p-cumárico está acilado sólo en la posición gama o también en otra posición.

El análisis por tioácidolisis puede dar información valiosa sobre la presencia de enlaces condensados entre las unidades y probablemente se aplicará con todos los materiales analizados.

Se aplicarán más técnicas dependiendo de los objetivos finales de la investigación, pero a largo plazo se intentará optimizar métodos y evaluar su aptitud en diferentes procesos fundamentales y industriales. Las muestras de los buenos resultados obtenidos por (Faulds, 2010) por tratamiento enzimático con feruloil esterases podrían servir para analizar con que tipo de residuos de carbohidratos se forma uniones con la lignina.

CAPÍTULO V:

REFERENCIAS

- Adler E. (1977). Lignin chemistry – past, present and future. *Wood Science Technology*, 11, 169-218.
- Aitken I., Cadel F. y Voillot C. (1988). Constituants fibreux des pates papiers et cartons pratique de l'analyse, 1st edition. Pratique de l'analyse, Centre Technique du Papier, Grenoble.
- Arantes V. y Saddler J. N. (2010). Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis. *Biotechnology for biofuels*, 3 (4), <http://www.biotechnologyforbiofuels.com/content/3/1/4>.
- Barrière Y., Ralph J., Méchin V., Guillaumie S., Grabber J.H. (2004). Genetic and molecular basis of grass cell wall biosynthesis and degradability. II. Lessons from brown-midrib mutants. *Critical Review in Biology*, 327, 847–860.
- Benoit I., Navarro D., Marnet N., Rakotomanomana N., Lesage-Meessen L., Sigoillot J., Asther M. y Asther M. (2006). Feruloyl esterases as a tool for the release of phenolic compounds from agro-industrial by-products. *Carbohydrate Research*, 341, 1820-1827.
- Bidlack J., Malonge M. y Benson R. (1992). Molecular structure and component integration of secondary cell walls in plants. *Proceedings of the Oklahoma Academy of Science*, 72, 51-56.
- Billa E., Koukios E.G. y Monties B. (1998). Investigation of lignins structure in cereal crops by chemical degradation methods. *Polymer Degradation and Stability*, 59, 71-75.
- Björkman A. (1956). Studies on finely divided wood. Part I. Extraction of lignin with neutral solvents. *Svensk Papperstidning*, 13, 477-485.
- Boerjan W., Ralph J., Baucher M. (2003). Lignin biosynthesis. *Annual Review Plant Biology*, 54, 519-546.
- Buranov A.U. y Mazza G. (2008). Lignin in straw of herbaceous crops. *Industrial crops and products*, 28, 237-259.
- Carroll A. y Somerville C. (2009). Cellulosic biofuels. *Annual Review of Plant Biology*, 60, 165-182.
- Chanliaud E., Saulnier L. y Thibault J.F. (1995). Alkaline extraction and characterization of heteroxylans from maize bran. *Journal of Cereal Science*, 21, 195-203.
- Chen F., Srinivasa Reddy M.S., Temple S., Jackson L., Shadle G. y Dixon R.A. (2006). Multi-site genetic modulation of monolignol biosynthesis suggests new routes for formation of syringyl lignin and wall-bound ferulic acid in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *The Plant Journal*, 48, 113–124.
- Chen F. y Dixon R.A. (2007). Lignin modification improves fermentable sugar yields for biofuel production. *Nature Biotechnology*, 25, 759–761.
- Chesson A. (1981). Effects of sodium hydroxide on cereal straws in relation to the enhanced degradation of structural polysaccharides by rumen microorganisms. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 32, 745-758.
- Chesson A. y Gardner P.T. (1997). Wood T.J. 1997. Cell wall porosity and available surface area of wheat straw and wheat grain fractions. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 75, 289–295.
- Clay S.S., Idouraine A. y Weber C.W. (1993). Extraction and fraction of insoluble fiber from five fiber source. *Food Chemistry*, 57, 305-310.
- Cosgrove D.J., Durachko D.M., y Li L.C. (1998). Expansins may have cryptic endoglucanase activity and can synergize the breakdown of cellulose by fungal cellulases. Annual Meeting of the American Society of Plant Physiology, Abstract 171.

- Crestini C. y Argyropoulos D.S. (1997). Structural analysis of wheat straw lignin by quantitative ^{31}P and 2D NMR spectroscopy. The occurrence of ester bonds and $\alpha\text{-O-4}$ substructures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 1212-1219.
- del Río J. C., Gutiérrez A. y Martínez A. T. (2004). Identifying acetylated lignin units in non-wood fibers using pyrolysis-gas chromatography/mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 18, 1181-1185.
- del Río J.C., Marques G., Rencoret J., Martínez A.T. y Gutiérrez A. (2007). Occurrence of natural acetylated lignin units. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 5461-5468.
- del Río J. C., Rencoret J., Marques G., Gutiérrez A., Ibarra D., Santos J. I., Jiménez-Barbero J., Zhang L. y Martínez A.T. (2008). Highly acylated (acetylated and/or *p*-coumaroylated) native lignins from diverse herbaceous plants. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 56, 9525-9534.
- Dence, C.W. (1992). The determination of lignin, pp. 33–61. In S.Y. Lin and C.W. Dence (ed.) *Methods in Lignin Chemistry*. Springer-Verlag, Heidelberg, Germany.
- Elegir G., Daina S., Zoia L., Bestetti G. y Orlandi M. (2005). Laccase mediator system: Oxidation of recalcitrant lignin model structures present in residual kraft lignin. *Enzyme and Microbial Technology*, 37, 340-346.
- Ellis G.H. (1949). Report on lignin and cellulose in plants. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists on Agriculture and Chemistry*, 32, 287–291.
- Fang J.M., Sun R.C., Tomkinson J. y Fowler P. (2000b). Acetylation of wheat straw hemicellulose B in a new non-aqueous swelling system. *Carbohydrate Polymers*, 41, 379-387.
- Faulds C., Camarero S., Ruíz-Dueñas G., Nieto L., Prinsen P., Gutiérrez A., del Río J.C., Martínez M.J., Jiménez-Barbero J. y Martínez A. T. Interactions between Feruloyl Esterases and Oxidative Enzymes for Improved Deconstruction of Plant Biomass. Workshop, Oxidative Enzymes as Sustainable Industrial Biocatalysts, Santiago de Compostela, 14 y 15 de Septiembre 2010, España.
- Fengel D. y Wegener G. (1984). *Wood: Chemistry, ultrastructure, reactions*. De Gruyter, Berlin.
- Fergus B.J. y Goring D.A.I. (1970). The distribution of lignin in birchwood as determined by ultraviolet microscopy. *Holzforschung*, 24, 118–124.
- Ford C.W. y Hartley R.D. GC/MS characterization of cyclodimers from *p*-coumaric and ferulic acids by photodimerization, a possible factor influencing cell wall biodegradability. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 46, 301-310.
- Freire C.S.R., Silvestre A.J.D., Neto C.P., Gandini A., Fardim P. y Holmbom B. (2006). Surface characterization by XPS, contact angle measurements and ToF-SIMS of cellulose fibers partially esterified with fatty acids. *Journal of Colloid and Interface Science*, 301, 205-209.
- Fry S.C. (1986). Cross-linking of matrix polysaccharides in the growing cell walls of angiosperms. *Annual Review of Plant Physiology*, 37, 165-186.
- Fry S.C. y Miller J.C. (1989). Toward a working model of the growing plant cell wall. Phenolic cross-linking reactions in the primary cell walls of dicotyledons, en *Plant Cell Wall Polymers, Biogenesis and Biodegradation*, Ed by Lewis N.G.
- Fullerton T.J. y Franich R.A. (1983). Lignin analysis by pyrolysis-GC-MS. *Holzforschung*, 37, 267-269.
- García Hortal. (2007). *Fibras Papeleras*. Ediciones UPC (Universitat Politècnica de Catalunya), Terrassa, España.

- Gilarranz M. A., Oliet M., Rodríguez F. y Tijero, J. (1999). Methanol-based pulping of *Eucalyptus globulus*. *Canadian Journal of Chemical Engineering*, 77, 515-521.
- Goering H.K. y Van Soest P.J. (1975). Forage fiber analysis. (Approaches, reagents, procedures, and some applications.) Agriculture Handbook No. 379 379. USDA-ARS, U.S. Gov. Print. Office, Washington, DC.
- González-Vila F. J., Almendros G., del Río J. C., Martín F., Gutiérrez A. y Romero J. (1999). Ease of delignification assessment of different *Eucalyptus* wood species by pyrolysis (TMAH)-GC/MS and CP/MAS 13C-NMR spectrometry. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 49, 295-305.
- Grabber J. H., Quideau S. y Ralph J. (1996). *p*-Coumaroylated syringyl units in maize lignin: Implications for β -ether cleavage by thioacidolysis. *Phytochemistry*, 43, 1189-1194.
- Grabber J.H., Ralph J., Lapiere C., Barriere Y. (2004). Genetic and molecular basis of grass cell-wall degradability. I. Lignin-cell wall matrix interactions. *Critical Review in Biology*, 327,455–465.
- Haemelinck, C.N., von Hooijdonk, G. y Faaij, A.P.C. (2005). Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle- and long term. *Biomass Bioenergy*, 28, 384–410.
- Hatfield R.D., Jones B.A., Grabber J.H. y Ralph J (1995). Formation of dehydrodiferulates by peroxidases. *Plant Physiology (Supplement)*, 108, 641.
- Hatfield R.D., Ralph J. y Grabber J.H. (1999). Review Cell wall cross-linking by ferulates and diferulates in grasses. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79, 403-407.
- Hatfield R.D. y Fukushima R.S. (2005). Can lignin be accurately measured? *Crop Science*, 45, 832 – 839.
- Hartley R.D. y Morrison W.H. (1991). Monomeric and dimeric phenolic acids released from cell walls of grasses by sequential treatment with sodium hydroxide. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 55, 265-375.
- Higuchi T., Ito Y. y Kawamura I. (1967b). *p*-Hydroxyphenylpropane component of grass lignin and role of tyrosine ammonia lyase in its formation. *Phytochemistry*, 6, 875-881.
- Higuchi T. (1997). *Biochemistry and Molecular Biology of Wood*, Springer-Verlag, Londres.
- Hillis W.E. (1962). *Wood extractives*. Academic Press, London.
- Himmel M.E., Ding S.Y., Johnson D.K., Adney W.S. y Nimlos M.R.(2007). Biomass recalcitrance: engineering plants and enzymes for biofuels production. *Science*, 315,804–807.
- Himmelsbach D.S. (1993). Structure of forage cell walls (session synopsis). In: Jung H.G., Buxton D.R., Hatfield R.D., Ralph J. (Eds.), *Forage Cell Wall Structure and Digestibility*. American Society of Agronomy Inc., Madison, WI, 271-283.
- Hu W.J., Harding S.A., Lung J., Popko J.L. y Ralph J. (1999). Repression of lignin biosynthesis promotes cellulose accumulation and growth in transgenic trees. *Nature Biotechnology*, 17, 808–812.
- Hückelhoven R. (2007). Cell Wall–Associated Mechanisms of Disease Resistance and Susceptibility. *Annual Review Phytopathology*, 45, 101-127.
- Huntley S.K., Ellis D., Gilbert M., Chapple C. y Mansfield S.D. (2003). Significant increases in pulping efficiency in C4H-F5H-transformed poplars: improved chemical savings and reduced environmental toxins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 6178-6183.

- Ibarra D., Chávez M.I., Rencoret J., del Río J.C., Gutiérrez A., Romero J., Camarero S., Martínez M.J., Jiménez-Barbero J., Martínez, A.T. (2007a). Lignin modification during *Eucalyptus globulus* kraft pulping followed by totally chlorine free bleaching: a two-dimensional nuclear magnetic resonance Fourier transform infrared, and pyrolysis-gas chromatography/mass spectrometry study. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 55, 3477–3499.
- Iiyama K., Lam T.B.T. y Stone B.A. Phenolic acid bridges between polysaccharides and lignin in wheat internodes. *Phytochemistry*, 29, 733-737.
- Ishii T. y Hiroi T. (1990). Isolation and characterization of feruloylated arabinoxylan oligosaccharides from bamboo shoot cell walls. *Carbohydrate Research*, 196, 175-183.
- Ishii T. y Nishijima T. (1995). Inhibition of gibberellin-induced elongation growth of rice by feruloyl oligosaccharides. *Plant Cell Physiology*, 38, 1447-1451.
- Ishii T. (1997). Structure and functions of feruloylated polysaccharides. *Plant Science*, 127, 111-127.
- Izydorczyk M.S. y Biliaderis C.G. (1995). Cereal arabinoxylans: advances in structure and physicochemical properties. *Carbohydrate Polymers*, 28, 33-48.
- Jones, J. B. y Case, V. W. (1990). Sampling, handling, and analyzing plant tissue samples. *Soil Testing and Plant Analysis*, 389-427.
- Kapich A.N., Jensen A. y Hammel K.E. (1999). Peroxyl radical are potential agents of lignin biodegradation. *Federation of European Biochemical Societies Letters*, 461, 109-115.
- Karhunen, P., Rummakko, P., Sipila, J., Brunow, G. y Kilpeläinen, I. (1995) Dibenzodioxocins - A novel type of linkage in softwood lignins. *Tetrahedron Letters*, 36, 169-170.
- Kato, Y., y Nevins, D.J. (1985). Isolation and identification of *O*-(5-*O*-feruloyl- β -L-arabinofuranosyl)-(1 \rightarrow 3)-*O*- β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow)-D-xylose as a component of Zea shoot cell walls. *Carbohydrate Research*, 137, 139–150.
- Kim H. y Ralph J. (2010). Solution-state 2D NMR of ball-milled plant cell wall gels in DMSO-*d*₆/pyridine-*d*₅. *Organic and Biomolecular Chemistry*, 8, 576-591.
- Kim S. y Dale B.E. (2004). Global potential bioethanol production from wasted crops and crop residues. *Biomass Bioenergy*, 26, 361-375-
- Klinke H.B., Ahring B.K., Schmidt A.S. y Thomsen A.B. (2002). Characterization of degradation products from alkaline wet oxidation of. *Bioresource Technology*, 82, 15-26.
- Koshijima T., Watanabe T. y Azuma, J. (1984). Existence of benzylated carbohydrate moiety in lignin-carbohydrate complex from pine wood. *Chemical Letters*, 1737-1740.
- Kristensen J.B., Thygesen L.G., Felby C., Jørgensen H. y Elder T. (2008). Cell-wall structural changes in wheat straw pretreated for bioethanol production. *Biotechnology for Biofuels*, <http://www.biotechnologyforbiofuels.com/1754-6834/1/5>.
- Lau M. W., Gunawan C. y Dale B. E. (2009). The impacts of pretreatment on the fermentability of pretreated ignocellulosic biomass: a comparative evaluation between ammonia fiber expansion and dilute acid pretreatment. *Biotechnology for Biofuels*, 2 (30), <http://www.biotechnologyforbiofuels.com/content/2/1/30>.
- Landucci L.L., Deka G.C. y Roy D.N. (1992). A ¹³C NMR study of milled wood lignins from hybrid *Salix* clones. *Holzforschung*, 46, 505-511.

- Lapierre C., Monties B. y Rolando C. (1985). Thioacidolysis of lignin: Comparison with acidolysis. *Journal of Wood Chemistry and Technology*, 5, 277-292.
- Lapierre C. y Monties B. (1989). Structural informationas gained from the thioacidolysis of grass lignins and their relation with alkali solubility. In: *Wood and Pulping Chemistry 6. TAPPI Proceedings Annexe 3-2*, 615-621.
- Lapierre C., Pollet B. y Rolando C. (1995). New insights into the molecular architecture of hardwood lignins by chemical degradative methods. *Research on Chemical Intermediates*, 21 (3-5), 397-412.
- Lep le J.-C., Dauwe R., Morreel K., Storme V., Lapierre C., Pollet B., Naumann A., Kang K.-Y., Kim H. y Ruel K. (2007). Downregulation of cinnamoyl-coenzyme A reductase in poplar: multiple-level phenotyping reveals effects on cell wall polymer metabolism and structure. *Plant Cell*, 19, 3669-3691.
- Lewis N.S. y Nocera D.G. (2006). Powering the planet: chemical challenges in solar energy utilization. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 103, 15729–15735
- Lin S. Y. y Dence C. W. (1992). *Methods in lignin chemistry*. Springer-Verlag, Berlin.
- Liu C. y Wyman C.E. (2003). The effect of flow rate of compressed hot water on xylan, lignin, and total mass removal from corn stover. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 42, 5409 – 5416.
- Lu F. y Ralph J. (1997a). Derivatization followed by reductive cleavage (DFRC method), a new method for lignin analysis: protocol for analysis of DFRC monomers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 2590-2592.
- Lu F. y Ralph J. (1997b). The DFRC method for lignin analysis. Part 1. A new method for β -aryl ether cleavage: lignin model studies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 4655-4660.
- Lu F. y Ralph J. (1998). The DFRC method for lignin analysis. Part 2. Monomers from isolated lignin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 547-552.
- Lu F.C. y Ralph J. (1999). Detection and determination of p-coumaroylated units in lignins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 1988-1992.
- Lu F.C. y Ralph J. (2002). Preliminary evidence for synapyl acetate as a lignin monomer in kenaf. *Chemical Communications*, 90-91.
- Lu F.C. y Ralph J. (2003). Non-degradative dissolution and acetylation of ball-milled plant cell walls: high-resolution solution-state NMR. *The Plant Journal*, 35, 535-544.
- Lu F.C., Ralph J., Morreel K., Messens E. y Boerjan W. (2004). Preparation and relevance of a cross-coupling product between synapyl alcohol and synapyl p-hydroxy-benzoate. *Organic Biomolecular Chemistry*, 2, 2888-2890.
- Marita J.M., Ralph J., Lapierre C., Jouanin L. y Boerjan W. (2001). NMR characterization of lignins from transgenic poplars with suppressed caffeic acid O-methyltransferase activity. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions, 1*, 2939-2945.
- Martínez A.T., Rencoret J., Marques G., Gutiérrez A., Ibarra D., Jiménez-Barbero J. y del Río J. C. (2008). Monolignol acylation and lignin structure in some nonwoody plants: A 2D-NMR study. *Phytochemistry*, 69, 2831-2843.
- McDougall G.J., Morrison I.M., Stewart D., Weyers J.D.B. y Hillman J.R. (1993). Plant fibres: Botany, chemistry and processing for industrial use. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 62, 1-20.

- Meier D. y Faix O. (1992). Pyrolysis-gas chromatography-mass spectrometry. In Lin, S.Y. y Dence C.W. (Eds.), *Methods in lignin chemistry*. Springer-Verlag, Berlin, 177-199.
- Miguez F.E., Villamil M.B., Long S.P., Bollero G.A. (2008). Meta-analysis of the effects of management factors on *Miscanthus × giganteus* growth and biomass production. *Agricultural and Forest Meteorology*, 148, 1280–1292.
- Morreel K., Ralph J., Lu F., Goeminne G., Busson R., Herdewijn P., Goeman J.L., Van der Eycken J., Boerjan W. y Messens E. (2004). Phenolic profiling of caffeic acid O-methyltransferase-deficient poplars reveals novel benzodioxane oligolignols. *Plant Physiology*, 136, 4023-4036.
- Ohta T., Yamasaki S., Egashira Y. y Sanada H. (1994). Antioxidative activity of corn bran hemicellulose fragments. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42, 653-656.
- Pena M.J., Zhong R., Zhou G.-K., Richardson E.A., O'Neill M.A., Darvill A.G., York W.S. y Ye Z.-H. (2007). Arabidopsis irregular xylem8 and irregular xylem9: Implications for the complexity of glucuronoxylan biosynthesis. *The Plant cell*, 19 (2), 549-563.
- Persson S., Caffall C.H., Freshour G., Hilley M.T., Bauer S., Poindexter P., *et al.* (2007). The *Arabidopsis irregular xylem8* mutant is deficient in glucuronoxylan and homogalacturonan which are essential for secondary cell wall integrity. *Plant Cell*, 19, 237-255.
- Quideau S. y Ralph J. (1997). Lignin-ferulate cross-links in grasses. Part 4. Incorporation of 5-5-coupled diferulate into lignin. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions, 1*, 2351-2358.
- Ralph J., Helm R.F., Quideau S. y Hatfield R.D. (1992). Lignin-feruloyl ester cross-links in grasses. Part 1. Incorporation of feruloyl esters into coniferyl alcohol dehydrogenation polymers. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions, 1*, 2961-2969.
- Ralph J., Quideau S., Grabber J.H. y Hatfield R.D. (1994). Identification and synthesis of new ferulic acid dehydrodimers present in grass cell walls. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions, 1*, 3485-3498.
- Ralph J., Hatfield R.D., Quideau S., Helm R.F., Grabber J.H., Jung H.-J.G. (1994). Pathway of p-coumaric acid incorporation into maize lignin as revealed by NMR. *Journal of the American Chemical Society*, 116, 9448-9456.
- Ralph J., Grabber J.H. y Hatfield R.D. (1995). Lignin-ferulate crosslinks in grasses : active incorporation of ferulate polysaccharide esters into ryegrass lignins. *Carbohydrate Research*, 275, 167-178.
- Ralph J., Hatfield R.D., Grabber J.H., Jung H.G., Quideau S. y Helm R.F. (1998a). Cell wall cross-linking in grasses by ferulates and diferulates. En *Lignin and Lignan Biosynthesis*, Ed by Lewis N.G. and Sarkanen S. American Chemical Society, Washington DC, pp 209-236.
- Ralph J. (1999). Lignin structure: recent developments. In: *Proceedings of the 6th Brazilian Symposium Chemistry of Lignins and Other Wood Components*, Guaratingueta, Brazil, October, 97-112.
- Ralph J. y Lu F. (1999). The DFRC Method for Lignin Analysis. 6. A Simple Modification for Identifying Natural Acetates on Lignins. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 46, 4616-4619.
- Ralph J., Marita J.M., Ralph S.A., Hatfield R.D., Jung H.G., Quideau S., Helm R.F., Grabber J.H., Kim H., MacKay J.J., Sederoff R.R., Chapple C. y Boudet A.M. (1999a). Solution-state NMR of lignins. In: *Argyropoulos D.S. y Rials T. (Eds.), Progress in Lignocellulosics Characterization*. Tappi press, Atlanta, GA, 55-108.
- Ralph J., Peng J., Lu F. y Hatfield R.D. (1999b). Are lignins optically active? *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 47, 2991-2996.

- Ralph J. y Lu F. (2003). Non-degradative dissolution and acetylation of ball-milled plant cell walls : high-resolution solution-state NMR. *The plant journal*, 35, 535-544.
- Ralph J., Lundquist K., Brunow G. et al. (2004b). Lignins: natural polymers from oxidative coupling of 4-hydroxyphenylpropanoids. *Phytochemistry Review*, 3, 29–60.
- Ralph J. (2006). What makes a good monolignol substitute? In *The Science and Lore of the Plant Cell Wall*, ed. T Hayashi, 285–293. Boca Raton, FL: BrownWalker Press
- Ralph J. (2007). Perturbing lignification. En: Entwistle K. Harris P.J., Walker J. (Eds.). *The compromised Wood Workshop*, University of Canterbury, Christchurch, NZ, 85-112.
- Ralph J., Brunow G., Harris P.J., Dixon R.A. y Boerjan, W. (2007). Lignification: are lignins biosynthesized via simple combinatorial chemistry or via proteinaceous control and template replication? In *Advances in Polyphenols Research* (Daayf F., El Hadrami A., Adam L. y Ballance G.M., eds). Oxford, UK: Blackwell Publishing (in press).
- Ralph J., Hoon K., Fachuang L., Grabber J.H., Leplé J.-C., Berrio-Sierra J., Derikvand M.M., Jouanin L., Boerjan W. y Lapiere C. (2008). Identification of the structure and origin of a thioacidolysis marker compound for ferulic acid incorporation into angiosperm lignins (and an indicator for cinnamoyl CoA reductase deficiency). *The Plant Journal*, 53, 368–379
- Ralph J. y Kim H. (2010). Solution-state 2D NMR of ball-milled plant cell wall gels in DMSO-*d*₆/pyridine-*d*₅. *Organic and Biomolecular Chemistry*, 8, 576-591.
- Rolando C., Monties B. y Lapiere C. (1992). Thioacidolysis. En Lin S. Y. y Dence C. W.(eds), *Methods in lignin chemistry*. Springer-Verlag, Berlin, pp. 334-349.
- Rowe J.W. (1989). Natural products of woody plants. I and II. Chemicals extraneous to the lignocellulosic cell wall. *Springer-Verlag*, Berlin, 250-273.
- Salameh D., Brandam C., Lteif R. y Strehaiano P. (2008). Adsorción del ácido p-cumárico del vino para evitar la formación de etilfenoles por *Brettanomyces*. Coloquio internacional sobre moléculas activas del vino (WAC2008), Beaune, Borgoña, Francia, 27-29 de Marzo 2008.
- Samson R. y Mehdi B. Strategies to reduce the ash content in perennial grasses. R.E.A.P. Canada Research Reports, BioEnergy '98: Expanding BioEnergy Interships.
- Sánchez M., Peña M.J. , Revilla G. y Zarra I. (1996). Changes in dehydrodiferulic acids and peroxidase activity against ferulic acid associated with cell walls during growth of *Pinus pinaster* hypocotyl. *Plant Physiology*, 111,941-946.
- Sarkanen K. V. y Hergert H. L. (1971). Classification and distribution. In Sarkanen, K. V. and Ludwig, C. H. (eds), *Lignins - Occurrence, Formation, Structure and Reactions*. Wiley-Interscience, New York, pp. 43-94.
- Sarkanen K. V. y Ludwig C. H. (1971). *Lignins. Occurrence, formation, structure and reactions*, Wiley-Interscience, New York.
- Saulnier L., Vigouroux J. y Thibault J.F. (1995). Isolation and partial characterization of feruloylated oligosaccharides from maize. *Carbohydrate Research*, 272, 241-253.
- Sederoff R.R., MacKay J. J., Ralph J. y Hatfield R. D. (1999). Unexpected variation in lignin. *Current Opinion in Plant Biology*, 2, 145-152.

- Scalbert A., Monties B., Lallemand J.Y., Guittet E. y Rolando C. Ether linkage between phenolic acids and lignin fractions from wheat straw. *Phytochemistry*, 24, 1359-1362.
- Scheller H.V. y Ulvskov P. (2010). Hemicelluloses. *Annual Review Plant Biology*, 61, 263-289.
- Shibuya N. (1984). Phenolic acids and their carbohydrate esters in rice endosperm cell walls. *Phytochemistry*, 23, 2233-2237.
- Singh R., Singh S., Trimukhe K.D., Pandare K.V., Bastawade K.B., Gokhale D.V. y Varma A.J. (2005). Lignin-carbohydrate complexes from sugarcane baggase: preparation, purification and characterization. *Carbohydrate Polymers*, 62(1), 57-66.
- Smeds A.I., Eklund P.C., Sjöholm R.E., Willför S.M., Nishibe S., Deyama T. y Holmborn B.R. (2007). Quantification of a broad spectrum of lignans in cereals, oilseeds, and nuts. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 55, 1337-1346
- Sjöström E. (1981). Wood chemistry: Fundamentals and Applications. *Academic Press*, Orlando, 68-82.
- Sjöström, E. (1993) Wood chemistry. Fundamentals and Applications. *Academic Press*, San Diego.
- Sperry J.S. (2003). Evolution of water transport and xylem structure. *International Journal of Plant Science*, 164, 115-127.
- Sticklen M.B. (2008). Plant genetic engineering for biofuel production: towards affordable cellulosic ethanol. *Nat. Rev. Genet.*, 9, 433-443.
- Sun R., Fang J.M., Tomkinson J. y Bolton J. (1999). Physicochemical and structural characterization of alkali soluble lignins from oil palm trunk an empty fruit-bunch fibers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 2930-2936.
- Sun R.C., Tomkinson J., Wang Y.X. y Xiao B. (2000a). Physico-chemical and structural characterization of hemicelluloses from wheat straw by alkaline peroxide extraction. *Carbohydrate Polymers*, 41, 2647-2656.
- Sun R.C., Tomkinson J., Ma P.J., Liang S.F. (2000b). Comparative study of hemicelluloses from rice straw by alkali and hydrogen peroxide treatments. *Carbohydrate Polymers*, 42, 111-122.
- Sun R.C. y Sun X.F. (2001). Identificación and quantitation of lipophilic extractives from wheat straw. *Industrial Crops and Production*, 14, 51-64.
- Sun R. y Tomkinson J. (2002). Comparative study of lignins isolated by alkali and ultrasound –assisted alkali extractions from wheat straw. *Ultrasonics Sonochemistry*, 9 (2), 85-93.
- Sun R.C. y Sun X. F. (2002a). Fractional and structural characterization of hemicelluloses isolated by alkali and alkaline peroxide from barley straw. *Carbohydrate Polymers*, 49, 415-423.
- Sun R.C. y Tomkinson J. (2003). Characterization of hemicelluloses isolated with tetraacetylenediamine activated peroxide from ultrasound irradiated and alkali pre-treated wheat straw. *European Polymer Journal*, 39, 751-759.
- Tappi (2004). 2004-2005 TAPPI Test Methods. TAPPI Press, Norcross, GA 30092, USA.
- Vanholme R., Kris Morreel K., Ralph J. y Boerjan W. (2008). Lignin engineering. *Current Opinion in Plant Biology*, 11, 278-285.
- Wallace G. y Fry S.C. (1995). *In vitro* peroxidase-catalyzed oxidation of ferulic acid esters. *Phytochemistry*, 39, 1293-1299.

- Wallace G., Russell W.R., Lomax J.A., Jarvis M.C., Lapierre C. y Chesson A. (1995). Extraction of phenolic-carbohydrate complexes from graminaceous cell walls. *Carbohydrate Research*, 272, 41-53.
- Watanabe T., Kaizu S. y Koshijima, T. (1986). Binding sites of carbohydrate moieties toward lignin in "lignin carbohydrate complex from *Pinus densiflora* wood. *Chemical Letters.*, 1871-1874.
- Watanabe T. (2003). Analysis of native bonds between lignin and carbohydrate by specific chemical reactions. In Springer-Verlag, B. H. (ed), Timell, T.E. (Ed.). Springer series in wood science, Association between lignin and carbohydrates in wood and other plant tissues. pp. 91-130.
- Wende G. y Fry S.C. (1997). 2-O- β -D-xylopyranosyl-(5-O-feruloyl)-L-arabinose, a widespread component of grass cell walls. *Phytochemistry*, 44, 1019-1030.
- Wise L.E., Murphy M. y D'Addieco A.A. (1946). Chlorite holocellulose, its fractionation and bearing on summative wood analysis and on studies on the hemicelluloses.
- Wyman C.E., Dale B.E., Elander R.T., Holtzapple M., Ladisch M.R. y Lee Y.Y. (2005). Comparative sugar recovery data from laboratory scale application of leading pretreatment technologies to corn stover. *Bioresource Technology*, 96, 2026-2032.
- Xiao B., Sun X.F. y Sun R.C. (2001). Chemical, structural and thermal characterizations of alkali-soluble lignins and hemicelluloses, and cellulose from maize stems, rye straw and rice straw. *Polymer Degradation and Stability*, 74, 307-319.
- Zhang, L.M. y Gellerstedt, G. (2001) NMR observation of a new lignin structure, a spiro-dienone. *Chemical Communications*, 2744-2745.
- Zhang, L. M., Gellerstedt, G., Ralph, J. y Lu, F. C. (2006). NMR studies on the occurrence of spirodienone structures in lignins. *Journal of Wood Chemistry and Technology*, 26, 65-79.
- Zhang, L. M. y Gellerstedt, G. (2007). Quantitative 2D HSQC NMR determination of polymer structures by selecting suitable internal standard references. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 45, 37-45.