



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Facultade de Ciencias

Grao en Química

Memoria do Traballo de Fin de Grao

Seguimiento espectroscópico de la
despolimerización (ruptura de enlaces) durante la deslignificación de materiales
vegetales

Seguemento espectroscópico da
despolimerización (ruptura de enlaces) durante a deslignificación de materiais vexetais

Spectroscopic monitoring of depolymerization (bond breakdown) during
delignification of plant materials

Christian Sanluis Fariña

Curso: 2020 - 2021. Convocatoria: Julio

Alberto de Vega Martín

Pablo Ligeró Martínez-Risco

Índice

Resumen	3
Resumo	4
Abstract	5
Abreviaturas	6
Cronograma	7
1. Introducción	8
1.1 Sauce (<i>Salix</i>)	8
1.1.1 Descripción general	8
1.1.2 Biología reproductiva	8
1.1.3 Distribución y ecología	8
1.2 Materiales lignocelulósicos	9
1.2.1 Compuestos no estructurales de los MLCs	9
1.2.2 Composición y estructura de la pared celular de los MLCs	10
1.2.2.1 Celulosa	10
1.2.2.2 Hemicelulosas	11
1.2.3 Función y estructura de la pared celular	11
1.2.4 Lignina	13
1.2.5 Procesos de deslignificación	17
1.3 Procesos Organosolv	18
1.3.1 Proceso Acetosolv	19
1.4 Mecanismos de deslignificación.	20
2. Objetivos	21
3. Experimental.	21
3.1. Seguimiento de la deslignificación mediante determinación de la lignina de Klason	21
3.2. Seguimiento cinético de la deslignificación.	22
3.3. Seguimiento de la deslignificación por ¹³C RMN	24
3.4. Seguimiento de la deslignificación por HSQC	27
Conclusiones	36
Anexos	37
Cocciones Acetosolv	37
Determinación de la lignina de Klason	39
Precipitación de la lignina	39
Cromatografía de exclusión por tamaño	40
Bibliografía	40

Resumen

Se ha investigado la deslignificación ácida de la madera de *Salix* mediante el método Acetosolv. Con ayuda de un procedimiento Simplex se ha llegado a fijar los valores de las variables que producían la mayor tasa de deslignificación o menor contenido en lignina de los sólidos resultantes (pastas). Con estas variables mantenidas constantes se realizó un seguimiento cinético del proceso, de las ligninas precipitadas del licor de cocción, examinando los espectros RMN de ^{13}C y HSQC.

La deslignificación se produce durante los primeros 90 minutos aproximadamente, aunque con diferentes velocidades: al principio de forma lenta y después más rápidamente. A partir de los 90-105 min aparecen fenómenos de recondensación de la lignina disuelta que hacen disminuir las tasas de deslignificación.

Los espectros de RMN muestran una buena parte de los cambios producidos durante la reacción y han permitido establecer qué tipo de unidades de la lignina son más reactivas en las condiciones utilizadas.

Los datos de cromatografía de exclusión molecular de las ligninas obtenidas muestran como la reacción modifica la distribución de tiempos de retención para las fracciones de lignina. Las medias de estas distribuciones coinciden con las variaciones observadas por RMN.

Palabras clave: Salix, Lignina, Acetosolv, Simplex, RMN, HSQC

Resumo

Investigouse a deslignificación ácida da madeira de *Salix* mediante o método Acetosolv. Coa axuda dun procedemento Simplex fixéronse os valores das variables que producían a maior taxa de deslignificación, ou menor contido en lignina dos sólidos resultantes (pastas). Con estas variables mantidas constantes realizouse un seguimento cinético do proceso, das ligninas precipitadas do licor de cocción, examinando os espectros RMN de ^{13}C e HSQC.

A deslignificación prodúcese durante os primeiros 90 minutos aproximadamente, aunque con diferentes velocidades: ao principio de forma lenta e despois máis rápidamente. A partir dos 90-105 min aparecen fenómenos de recondensación da lignina disolta que fan diminuír as taxas de deslignificación.

Os espectros de RMN amosan unha buena parte dos cambios producidos durante a reacción e permitiron establecer qué tipo de unidades da lignina son máis reactivas nas condicións utilizadas.

Os datos de cromatografía de exclusión molecular das ligninas obtidas amosan cómo a reacción modifica a distribución de tempos de retención para as fraccións de lignina. As medias destas distribucións coinciden coas variacións observadas por RMN.

Palabras chave: Salix, Lignina, Acetosolv, Simplex, RMN, HSQC

Abstract

The acid delignification of Salix wood has been investigated using the Acetosolv method. With the help of a Simplex procedure, the values of the variables that produced the highest delignification rate or the lowest lignin content of the resulting solids (pulp) have been set. With these variables kept constant, a kinetic monitoring of the process was carried out, of the lignins precipitated from the cooking liquor, examining the NMR spectra of ^{13}C and HSQC.

Delignification occurred during the first 90 minutes, although at different rate: initially slowly and then more rapidly. After 90-105 min, recondensation phenomena of the dissolved lignin appeared, reducing the delignification rates.

The NMR spectra showed a good part of the changes produced during the reaction and have made it possible to establish which type of lignin units are more reactive under the conditions used.

The size exclusion chromatography data of the lignins obtained show how the reaction modifies the distribution of retention times for the lignin fractions. The means of these distributions coincide with the variations observed by NMR.

Key words: Salix, Lignin, Acetosolv, Simplex, NMR, HSQC

Abreviaturas

MLC: Material lignocelulósico

HMC: Hemicelulosa

H: Unidad tipo cumarilo

G: Unidad tipo coniferilo

S: Unidad tipo sinapilo

MWL: Lignina de madera molida

CEL: Lignina enzimática celulasa

ASAM: Alkali-Sulfite-Anthraquinone-Methanol

HCl: Ácido clorhídrico

¹H-RMN: Resonancia magnética de protón

¹³C-RMN: Resonancia magnética de carbono

HSQC: Heteronuclear single quantum coherence

°C: Grado Celsius

mL: Mililitros

nm: Nanómetros

C9: Fenilpropano

ppm: parte por millón

min: minutos

g: gramos

SEC: Size exclusion chromatography

Cronograma

	Febrero	Marzo	Abril	Mayo	Junio	Julio
Revisión bibliográfica						
Experimental en el laboratorio						
Análisis de los resultados						
Redacción de la memoria						

1. Introducción

1.1 Sauce (*Salix*)

1.1.1 Descripción general

Las especies de árboles *Salix* se encuentran en las orillas de ríos, lagos, o en suelos encharcados, aunque unos pocos de ellos pueden llegar a vivir en bosques o incluso en grietas.

Los sauces pueden ser árboles o arbustos, los cuales tienen unas ramas flexibles. Sus hojas son normalmente de tipo caduca, con un pecíolo corto y firme y unas estípulas desarrolladas. Además, es complicado decidir a qué taxón pertenece un ejemplar debido a posibles variaciones morfológicas intraespecíficas (Prada Saez et al., 2002).

1.1.2 Biología reproductiva

Casi la totalidad de los sauces son especies dioicas, ya que casi ninguno presenta flores bisexuales o inflorescencias con flores de ambos sexos al mismo tiempo. Sus flores se acumulan en amentos, que no son más que las inflorescencias colgantes características de los sauces. La cantidad de estambres que se encuentran presentes en la flor es diferente según la especie. Por otra parte, las flores femeninas presentan un pistilo con un pedúnculo, con dos estigmas que pueden ser enteros o bífidos, y un estilo. La floración depende de la especie de sauce de la que se trate, pudiendo ser antes, durante, o después de que haya ocurrido la foliación, ocurriendo esto entre los meses de enero y mayo en las especies que se encuentran junto a los ríos. La reproducción se produce tanto a través de insectos, como a través del viento. En este último caso, la efectividad varía considerablemente según la especie, provocado probablemente por diferencias morfológicas en las flores femeninas (Prada Saez et al., 2002).

Los frutos se tratan de pequeñas capsulas con aún más pequeñas semillas con una diminuta cresta de pelo para favorecer su dispersión. Dichas cápsulas se abren alrededor de 2 meses tras la floración (Prada Saez et al., 2002).

1.1.3 Distribución y ecología

El término *Salix* abarca 450 especies distintas, encontrándose en casi todo el mundo. A pesar de estar presente en buena parte del mundo, se encuentran más numerosas en la zona de China y la antigua Unión Soviética, aunque también se encuentran de forma abundante en Estados Unidos y Europa (Prada Saez et al., 2002).

En concreto en España, nos encontramos que la especie de sauce más distribuida de sauce es la *S. atrocinerea*, el sauce cenizo, el cual también se encuentra presenta en Galicia.

Nuestra madera de sauce ha sido suministrada por el grupo Boibel Forestal S.L, desde su vivero de Frades (Concello de Ordes).

Los sauces se encuentran presentes en tantos lugares debido a sus características pioneras. Dichas características son:

- Su condición como heliófilo, que le permite colonizar zonas abiertas
- Su capacidad reproductora, ya que produce un gran número de semillas que son diseminadas por acción del viento.
- La habilidad de enraizar a partir de segmentos de plantas.

1.2 Materiales lignocelulósicos

Los materiales lignocelulósicos (MLC) son aquellos tejidos vegetales cuyas células presentan pared celular constituida por un entramado de microfibrillas de celulosa formando capas recubiertas de hemicelulosas y sobre las que se deposita lignina. La composición de la pared celular de estos tejidos está constituida principalmente por celulosa (40–80%), lignina (5–25%) y hemicelulosa (10%), variando sensiblemente según las diferentes especies. Además de estos compuestos estructurales los MLC están constituidos, en menor proporción, por otros componentes.

1.2.1 Compuestos no estructurales de los MLCs

Comprenden una amplia variedad de compuestos químicos, pero se pueden clasificar en:

Cenizas

Se engloba en esta categoría la proporción de materiales inorgánicos presentes en los MLC. Su nomenclatura deriva del procedimiento más habitual para su determinación: incineración a 550°C y determinación gravimétrica de las cenizas formadas.

La composición de estas cenizas es muy variada, pero mayoritariamente son sales de potasio, calcio, magnesio; sílice, etc.

Extractos

El resto de los componentes orgánicos presentes en los tejidos vegetales puede determinarse en conjunto mediante las diferentes técnicas de extracción sólido-líquido, de ahí su nombre genérico.

Se trata de compuestos orgánicos con un peso molecular relativamente bajo: proteínas, ácidos grasos, esteroides, taninos, etc.

Agua

Los MLC contienen diferentes proporciones de agua formando parte de sus fluidos biológicos o retenida en su estructura.

1.2.2 Composición y estructura de la pared celular de los MLCs

1.2.2.1 Celulosa

Es un homopolisacárido de glucosa que constituye el componente más importante de la pared celular.

La celulosa está formada por moléculas de β -glucopiranosas unidas por un enlace β -1-4-O-glucosídico que forma largas cadenas con grados de polimerización del orden de 10^3 .

La particular estructura de sus cadenas hace que se puedan establecer un número elevado de puentes de hidrógeno, tanto intra como intercatenarios, que proporciona a la ordenación rigidez y, en algunas zonas, estructuras intrincadas de carácter cristalino.

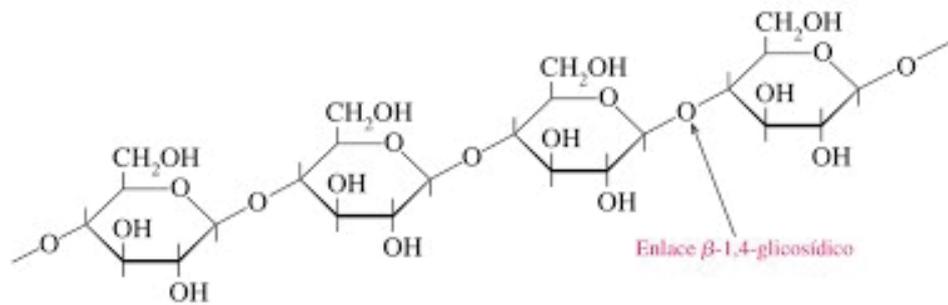


Figura 1. Estructura de una cadena de celulosa

1.2.2.2 Hemicelulosas

Las hemicelulosas (HMC) son heteropolisacáridos complejos que conforman adicionalmente la pared celular. Poseen características diferentes, muy relacionadas con el tipo de especie y se pueden clasificar en distintos grupos de acuerdo con el monosacárido mayoritario de su cadena principal. Así existen glucanos, xilanos, mananos, etc.

La presencia en la cadena de monómeros diferentes, así como ramificaciones, hace que no presenten ordenaciones espaciales como las de la celulosa y que sean solubles, según los casos, en agua o disoluciones alcalinas.

1.2.3 Función y estructura de la pared celular

La principal función de la pared celular es dar soporte estructural. De esta forma, confiere a la célula de forma y también la protege contra tracciones mecánicas. Cada una de las paredes celulares se encuentran unidas entre sí de forma que constituyen una red que le da consistencia a los órganos de las plantas.

La pared celular presenta diferentes capas que se van desarrollando a medida que la célula madura. Si las ordenamos desde la parte más exterior de la pared, a la más interna, se verían ordenadas de la siguiente manera: Lamina media, pared primaria y pared secundaria.

- Lamina media

Se trata de la capa más externa, que en muchas ocasiones es compartida por más de una célula. Tiene un aspecto homogéneo y como habíamos dicho antes, en ella se

encuentran pectinas y proteínas. Esta lamina media sirve de unión entre las células adyacentes y cuando se disuelve, a través de enzimas, permite la separación celular.

- Pared primaria

La pared primaria mide entre 100 y 200 nm de espesor y está formada por entre 3 y 4 capas de microfibrillas de celulosa. Las microfibrillas de la celulosa están unidas por puentes de hidrógeno, mientras que las hemicelulosas y las pectinas forman una matriz. Debido a la naturaleza de las microfibrillas, la pared primaria es algo extensible y birrefringente.

- Pared secundaria

Esta pared solo se encuentra en ciertos tipos celulares y se encuentra entre la pared primaria y la membrana plasmática. La pared secundaria comienza a formarse cuando la pared primaria ya se ha terminado de producir y la célula ha acabado su crecimiento.

Ésta es mucho más gruesa que la primaria y está formada principalmente por celulosa y lignina, otras moléculas se encuentran o no según la célula de la que se trate, como la cutina y la suberina. Al igual que la pared primaria, la pared secundaria también es birrefringente, debido a la disposición ordenada de las microfibrillas de la celulosa en varios planos, en los cuales las microfibrillas se encuentran dispuestas de forma paralela en cada plano. En cada uno de esos planos, las microfibrillas se encuentran con una orientación diferente.

Al mismo tiempo, la pared secundaria está formada por otras 3 subcapas, que de fuera al interior se verían ordenadas como S1, S2 y S3.

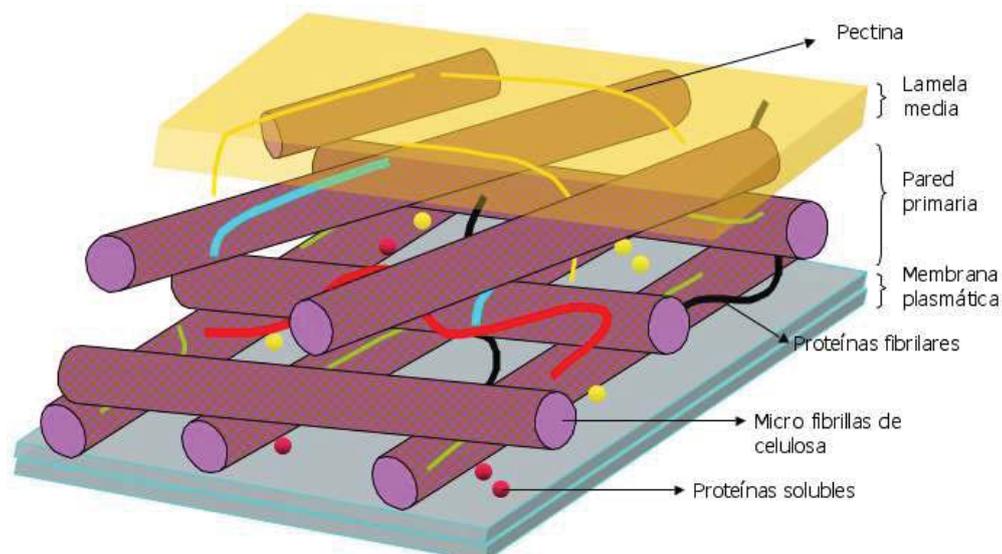


Figura 2. Estructura de una pared celular vegetal.

1.2.4 Lignina

Cuando se habla de la lignina, se habla de uno de los polímeros más abundantes en las plantas, junto a la celulosa y la hemicelulosa, formando con ellas la pared celular vegetal de dichas plantas Chávez Sifontes, M., & Domine, M. E. (2010).

Al encontrarse de forma natural en las plantas, se la considera un recurso renovable, y por lo tanto es interesante buscarle usos a nivel industrial, llegando a producirse entre 5 y 36 x 10⁸ toneladas de lignina al año.

La lignina es difícil de aislar, lo que provoca que su estructura no esté tan clara en comparación con otros polímeros como la celulosa. Además, su composición también puede variar según el método de extracción empleado, el método empleado para aislarla, o el material de origen.

La lignina está formada muy mayoritariamente por tres monómeros, unidades fenilpropano (monolignoles) distintas, que son el alcohol p-cumarílico (unidad tipo H), el alcohol coniferílico (unidad tipo G) y el alcohol sinapílico (unidad tipo S)

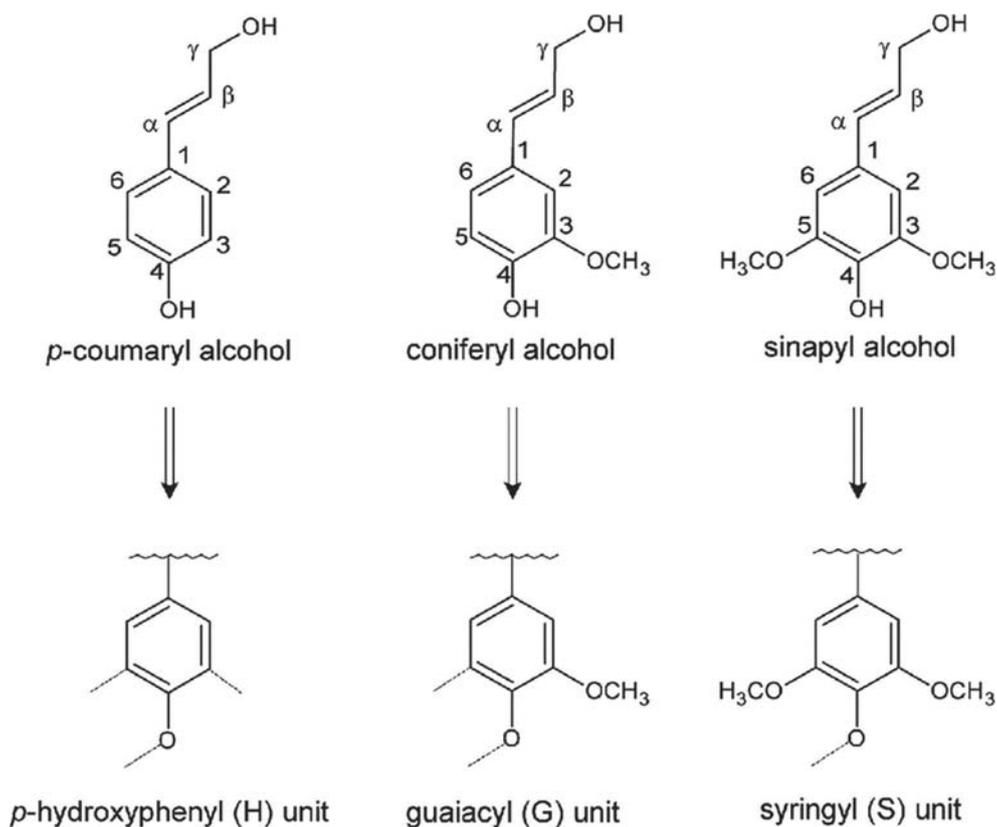


Figura 3. Estructura de las unidades H, G y S

El porcentaje de cada monolignol presente en la pared celular vegetal dependen del tipo de planta en cuestión. Las conocidas como maderas blandas presentan una lignina tipo G. Se denomina así debido a que se encuentra casi exclusivamente el alcohol coniferílico llegando a superar en ocasiones el 95% de la proporción entre monolignoles. Por otra parte, las llamadas maderas duras, presentan una lignina tipo G/S, ya que en estas se encuentran principalmente los alcoholes coniferílico y sinapílico.

Dichos monolignoles tienen un gran valor para la industria química, ya que son buenos reactivos de partida para obtener compuestos aromáticos más complejos, pudiendo sustituir así las materias fósiles que se utilizan, y como éstos son cada vez más escasos, siempre es interesante buscarle sustitutos en todos los ámbitos posibles, como ejemplo se podría comentar el uso de la biomasa como sustituyente de los combustibles fósiles.

En la literatura científica especializada se considera a la lignina como un polímero de unidades C₉ (fenilpropano) funcionalizada de diversas maneras. Una forma de expresar parcialmente esta funcionalización es la proporción H:G:S, pero existe otro importante aspecto estructural y en la reactividad de la lignina que está relacionado con

la manera en que esas unidades C9 se combinan entre sí. Estas estructuras se mencionan a continuación de forma breve.

- Estructuras tipo β -aril éter (uniones tipo β -O-4'). Son aquellas uniones en las que el carbono b de una unidad arílica se enlaza a través de una función éter al carbono 4 de la contigua. Suelen ser las uniones mayoritarias en muchos tipos de lignina. En ocasiones están aciladas (grupos acetilo o cumaroilo) en la posición γ . Para abreviar se les llamará uniones tipo A.

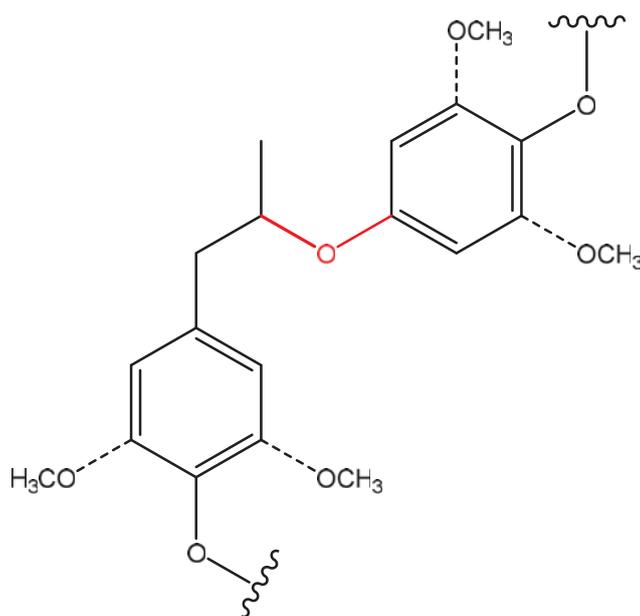


Figura 4. Estructura β -aril éter

- Estructuras tipo resinol (uniones β - β'). Las unidades C9 se unen a través de enlaces β - β' (también α -O- γ' y γ -O- α') formando una estructura bicíclica constituida por dos unidades de tetrahidrofurano. Se les llamará uniones tipo B.

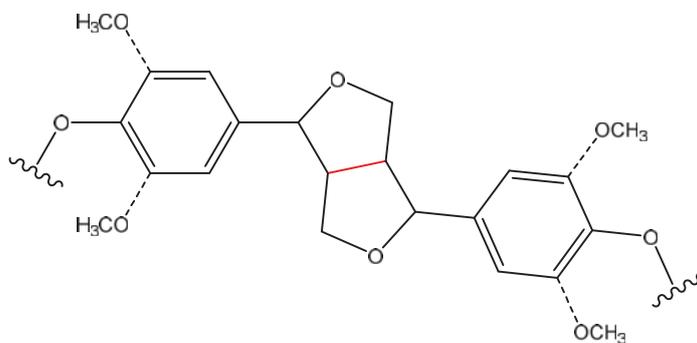


Figura 5. Estructura tipo resinol

- Estructuras tipo fenilcumarano (uniones tipo β -5' y α -O-4'). Estas uniones producen estructuras de 2,3-benzofurano sustituidas con grupos arilo. Uniones tipo C.

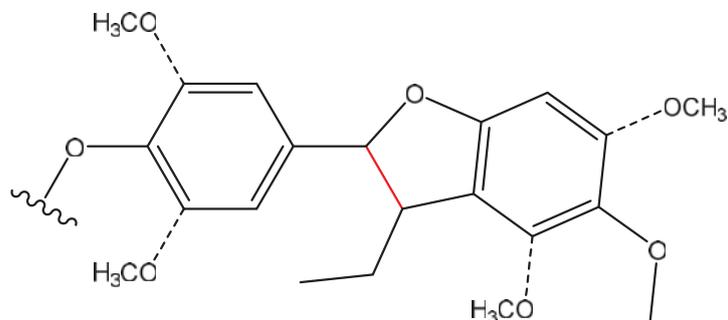


Figura 6. Estructura tipo fenilcumarano

- Uniones tipo dibenzodioxocina entre tres unidades C9 (uniones tipo α -O-4' y β -O-4''). Reveladas no hace mucho tiempo mediante técnicas de resonancia magnética nuclear, constituyen puentes de enlace entre tres unidades C9, a diferencia de las anteriores. Uniones tipo D.

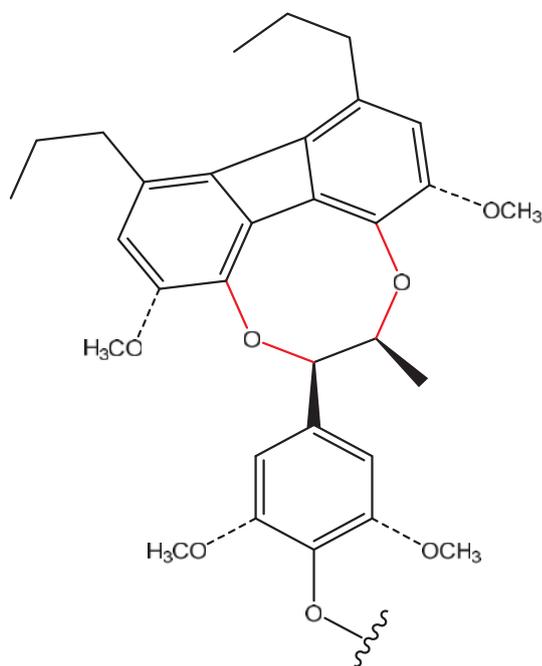
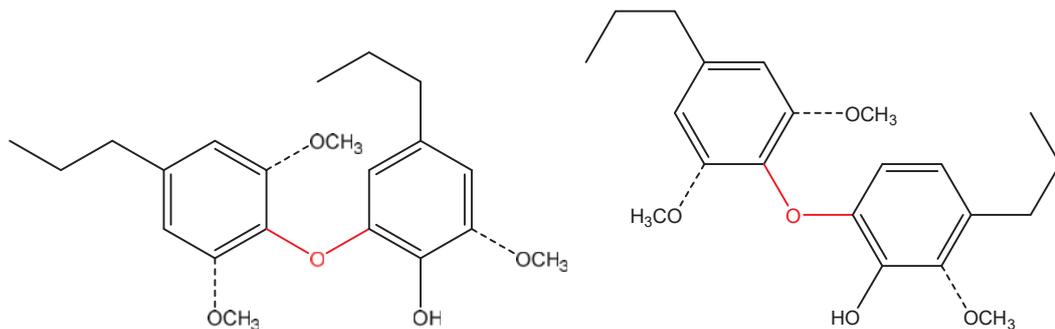


Figura 7. Uniones tipo dibenzodioxocina

- Uniones éter (tipo 4-O-5') y bifenil (5-5').



Figuras 8 y 9. Uniones eter y bifenil

1.2.5 Procesos de deslignificación

Un alto porcentaje de los métodos de aprovechamiento de la lignina conllevan la disolución de la lignina (o del resto de componentes) en disolventes apropiados y su posterior aislamiento. Estos procesos reciben el nombre genérico de deslignificación. Una deslignificación es un procedimiento que debe desenredar las múltiples e intrincadas interacciones existentes en la matriz lignocelulósica. Debido a esto no existe en la actualidad ningún procedimiento que permita obtener la lignina en estado natural, sin modificación alguna.

Para llegar a aislar la lignina de los MLC, se pueden emplear diversos métodos con procesos químicos, biológicos y físicos, o combinaciones de ellos. Estos métodos pueden ser agrupados en los que disuelven la lignina, dejando a la celulosa y a las hemicelulosas como residuo sólido (pudiendo recuperar la lignina a partir de la fase líquida) y los que disuelven la celulosa y hemicelulosas, dejando a la lignina como sólido.

- MWL. La MWL (*Milled Wood Lignin*). Se obtiene tras un largo proceso de eliminación de extractos con disolventes, molienda prolongada en molino de bolas, extracción con dioxano y varias etapas posteriores de purificación. Finalmente se obtiene un material pulverulento después de liofilización. Se considera la lignina que retiene el mayor número de características de la lignina nativa, siendo por tanto la menos atacada.
- CEL. Tras las primeras etapas de tratamiento de la MWL (extracción y molienda), el residuo se trata varias veces con un complejo enzimático de celulasa y hemicelulasas, que hidrolizan la celulosa y las HMC, dejando un residuo sólido enriquecido en lignina.

- Ligninas tipo Kraft y sulfito. Se obtienen de la precipitación de los licores de cocción de los métodos de producción de pasta para papel (al sulfato y al sulfito). Son ligninas muy alteradas químicamente, pero, aun así, poseen propiedades adecuadas para algunas aplicaciones.
- Lignina a la sosa. De modo análogo a las anteriores, se obtienen por precipitación a partir de los licores resultantes en los procedimientos de obtención de pasta de celulosa con hidróxido sódico como agente químico.
- Lignina de Klason. Es la lignina que se obtiene del tratamiento con ácido sulfúrico de los MLC, que hidroliza y disuelve por completo los carbohidratos. Tiene interés a escala de laboratorio ya que existe un método normalizado para la determinación gravimétrica de lignina.
- Lignina organosolv. Es obtenida de nuevo por precipitación a partir de los licores de cocción organosolv.

1.3 Procesos Organosolv

En las últimas décadas se ha incrementado el interés por el tratamiento de MLC, para papel u otras aplicaciones, con tecnologías limpias (procesos de pasteado sin compuestos de azufre y procesos de blanqueo sin compuestos clorados) por lo que se han estudiado y desarrollado una serie de técnicas alternativas. Una categoría importante de estos procesos implica el uso de disolventes orgánicos (en presencia o en ausencia de catalizadores) son los denominados *organosolv* (Rodríguez et al., 2008; Jiménez et al., 2008; Jiménez, 2005; Muurinen 2000) y podrían ayudar a preservar el medio ambiente mediante la reducción de las cargas contaminantes y la necesidad de madera como materia prima.

Los métodos *organosolv* son procedimientos de pasteado químico que producen la hidrólisis parcial de la lignina y hemicelulosas presentes en el MLC utilizando disolventes orgánicos como agentes químicos. Los procesos *organosolv* proporcionan celulosa en fase sólida y una disolución que contiene los productos de degradación de las HMC y la lignina (de la Torre et al., 2013; Rodríguez et al., 2009).

La variedad de las condiciones de operación, especialmente el tipo de disolvente que se emplea, da origen a diferentes procesos de deslignificación de los cuales los más relevantes se describen a continuación:

- Alcell, organocell y ASAM. Emplean alcoholes, principalmente metanol o etanol como disolventes, con o sin catálisis: Alcell (Alcohol Cellulose) mediante etanol-agua o medio alcalino: Organocell, proceso en dos etapas, la primera con metanol-agua y la segunda con metanol-agua-NaOH (Lindner y Wegener, 1988); y ASAM (Alkali-Sulfite-Antraquinone-Methanol): emplea mezclas de álcali (normalmente NaOH), Na₂SO₃, antraquinona y metanol (Kordsachia y Patt, 1987).
- Acetosolv y Acetocell. Emplean como disolvente mezclas de ácido acético y agua, en medio catalizado, se denomina Acetosolv, normalmente por HCl y menos común por H₂SO₄ (Nimz y Castem, 1986); y en medio no catalizado se denomina Acetocell (Neumann y Balser 1993).
- Milox (MILieu OXidant). Emplea ácido fórmico y peróxido de hidrógeno en disolución acuosa (Poppius-Levlin et al., 1991).
- Formacell. Utiliza mezclas de ácido acético, ácido fórmico y agua, sin adición de catalizador ácido (Nimz y Schöene, 1993).

Las técnicas organosolv son procesos químicos en los que se utilizan disolventes orgánicos para producir la separación de las fibras que forman los MLCs. Para ello, se toma la materia prima y se somete a una cocción con el fin de disolver una buena cantidad de la lignina que contiene, lo que provoca que las fibras se separen, quedándose en suspensión en la disolución. Además, este tipo de procesos tienen poco impacto medioambiental puesto que la recuperación de los disolventes es relativamente sencilla y que no se están utilizando compuestos de azufre.

1.3.1 Proceso Acetosolv

Nimz y Castem (1986) publicaron un trabajo donde la madera se extraía de forma continua durante 2-5 horas a 110°C con ácido acético al 95%, que contenía ácido clorhídrico al 0.1%. De este proceso se obtuvo una pasta de celulosa con una proporción muy baja de lignina (menos del 2%). Por adición de agua, la fracción fenólica se

insolubiliza en el medio. La lignina así aislada, exenta de azufre, es menos condensada y más fácilmente utilizable que la producida por procesos convencionales (Nimz y Casten, 1986).

Para la realización del proceso *Acetosolv* se emplea ácido acético con concentraciones entre el 75 y el 95% en peso, junto a ácido clorhídrico como catalizador, con concentraciones entre el 0,2 y el 0,5% en peso, dependiendo de la especie a tratar. La temperatura es la normal de ebullición de la mezcla, que es próxima a los 109°C, y los tiempos de reacción entre 1 hora y 5 horas.

El proceso acetosolv cuenta con ciertas ventajas frente a otras técnicas empleadas para la deslignificación de los MLCs ya que no son necesarias unas condiciones severas para conseguir altos rendimientos tanto de lignina precipitada, como de oligosacáridos de HMC en disolución. Todo esto, además, se realiza en una sola etapa y deja una pasta con la celulosa poco alterada. Las hemicelulosas se hidrolizan parcialmente y forman oligosacáridos en disolución y pequeñas cantidades de productos de deshidratación, como furfural, cuyas proporciones varían según la intensidad del proceso, ya que a baja intensidad predominan los azúcares, y con condiciones más severas aumenta la proporción de furfural. La adición de proporciones adecuadas de agua al licor mantiene los oligosacáridos en disolución, mientras que la lignina precipita.

Otra ventaja es la posibilidad de utilizar dicho método a una amplia variedad de materias primas, desde maderas de frondosas, caducifolias y materiales no leñosos.

1.4 Mecanismos de deslignificación.

Para que se disuelva la lignina durante los procesos organosolv, deben romperse los enlaces α -O-4' y β -O-4', aunque no está demostrado que el disolvente participe activamente en el mecanismo, pero ayuda a disolver los oligómeros de lignina que se forman. Mientras que en los medios de cocción básicos rompen principalmente los enlaces β -O-4, los medios ácidos destruyen los enlaces de éter tipo α -O-4.²

Como es un proceso con medio ácido, la deslignificación se produce debido a la rotura de enlaces α -O-4, que con la presencia del ácido clorhídrico como catalizador se ve favorecido, al igual que con mayores tiempos de reacción. Por otra parte, si los tiempos

de reacción son demasiado largos, se observa la aparición del fenómeno de recondensación de la lignina y consecuente redeposición en el sólido.

2. Objetivos

El objetivo de este trabajo es el seguimiento del proceso de pérdida de lignina que sufre la madera del *Salix spp* durante el proceso *Acetosolv*, por análisis de los espectros RMN (^{13}C y HSQC) de las ligninas *Acetosolv* precipitadas tras tratamientos a diferentes tiempos.

3. Experimental.

3.1. Seguimiento de la deslignificación mediante determinación de la lignina de Klason

Para evaluar las condiciones en las que se produce una deslignificación extensiva se realizaron una serie de cocciones variando los valores de las variables experimentales de acuerdo a un método Simplex. Se evaluaron tres variables: tiempo de tratamiento y las concentraciones de ácido acético y ácido clorhídrico en el licor. La relación líquido/sólido se mantuvo constante en todos los casos, en el valor de 10 (p/p).

Se realizaron una serie de experimentos, siguiendo el proceso Simplex, hasta alcanzar un máximo de deslignificación de la muestra o, lo que es lo mismo, hasta obtener el menor contenido de lignina en el residuo sólido (pasta). La tabla 1 muestra este proceso con los datos de los variables y los valores rendimiento en pasta y de lignina de Klason residual.

Tabla 1. Variables experimentales y resultados de las cocciones (Simplex) de *Salix*.

No.	Tiempo (min)	Acético (% p/p)	HCl (% p/p)	Rendimiento (% base seca inicial)	Lignina Klason en pasta (% base seca pasta)
1	60	85.0	0.10	88.2	16.2
2	60	86.2	0.20	53.5	(2.6)
3	60	87.5	0.10	90.0	17.2
4	68.7	86.3	0.16	59.7	8.6
5	65.8	84.2	0.21	65.8	14.5
6	69.7	86.1	0.28	59.2	9.5
7	65.2	87.6	0.20	63.4	17.4

El resultado del contenido de lignina en el experimento número 2 es excesivamente bajo, por lo que se considera anómalo y no se ha tenido en cuenta. Por lo tanto, se han adoptado las condiciones derivadas del experimento número 4 para el trabajo siguiente.

3.2. Seguimiento cinético de la deslignificación.

Con las condiciones establecidas en el apartado anterior mantenidas como constantes se procedió a la realización de un seguimiento cinético de la reacción de deslignificación. Este proceso consistió en la realización de varias cocciones a tiempos diferentes, espaciados 15 min, precipitación de la lignina y su estudio por métodos de RMN.

Para cada uno de estos experimentos se determinó el rendimiento y el contenido en lignina de las pastas. Posteriormente los licores fueron diluidos con agua en proporción volumétrica 9:1 (v/v). Este factor de dilución ha sido establecido para una serie de licores procedentes de la cocción de varios tipos de MLC como se detalla en la parte experimental.

La figura 11 presenta los resultados de esta serie de experimentos, que fueron prolongados hasta que se observó una subida en el contenido de lignina en las pastas que podría ser indicativo del comienzo de fenómenos de recondensación. El principal mecanismo de la deslignificación en medio ácido consiste en la formación de un carbocation en la posición a de la cadena propílica que está estabilizado por resonancia (Figura 10). Este intermedio evoluciona hacia la eliminación de un grupo arilo y, por tanto, disminuyendo el tamaño de la molécula, llegando a hacerla soluble en el licor de cocción. Competitivamente, el carbocatión puede sufrir una adición nucleófila de otro grupo aromático presente produciéndose así el efecto contrario: recondensación y aumento del tamaño de la molécula. La existencia de este proceso empeora las tasas de deslignificación y, por tanto, debe evitarse en lo posible.

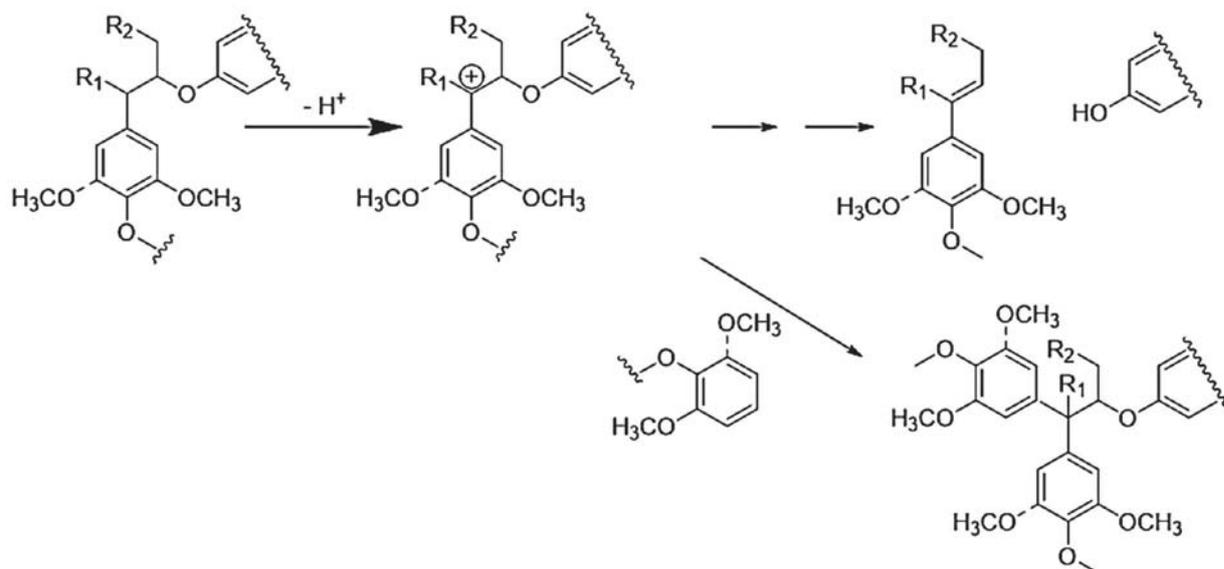


Figura 10. Esquema simplificado de los procesos de deslignificación y recondensación de la lignina

La figura 11 muestra el comportamiento del rendimiento y el contenido residual de lignina en las pastas. Se puede observar que la deslignificación es moderada hasta los 75 minutos de tratamiento, aumentando después de modo importante. El menor contenido en lignina se obtuvo tras 120 minutos, subiendo después posiblemente debido a los fenómenos de recondensación mencionados. La tendencia en los cambios de rendimiento sigue más o menos el mismo comportamiento, aunque en proporciones menores.

Los procesos de deslignificación conllevan rupturas de enlace de diversos tipos que disminuyen producen oligómeros de lignina. Estos fragmentos, en algún momento, tienen tamaños suficientemente pequeños como para volverse solubles en el medio ácido acuoso de tratamiento.

Para tratar de obtener más información sobre los cambios producidos a medida que las reacciones progresan, cada uno de estos licores fue diluido con agua en una proporción suficiente para asegurar la precipitación del máximo posible de lignina (Figura 11). Las ligninas precipitadas fueron lavadas con agua hasta neutralidad y liofilizadas. Posteriormente, se enviaron para obtener sus espectros de RMN ¹³C y HSQC.

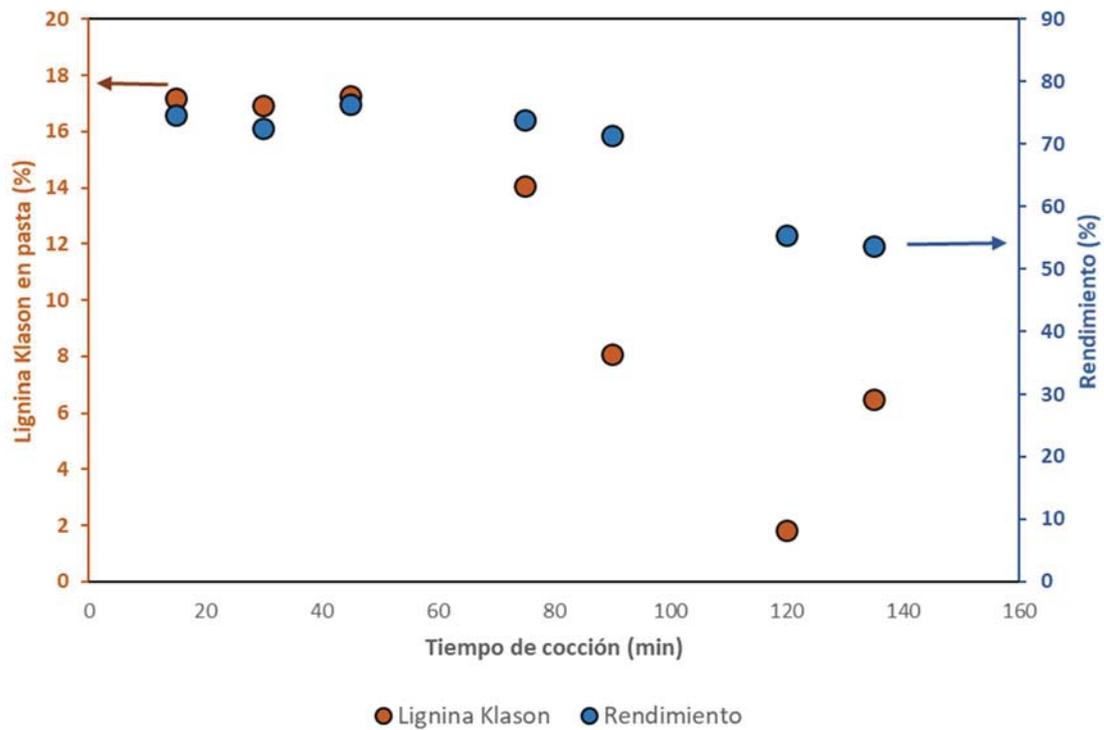


Figura 11. Variaciones del rendimiento y el contenido en lignina en pasta con el tiempo de tratamiento.

3.3. Seguimiento de la deslignificación por ^{13}C RMN

La figura 12 muestra los espectros de ^{13}C RMN de la MWL de Salix y de la lignina recuperada en el tratamiento a 120 min. Los cambios sufridos se pueden observar claramente.

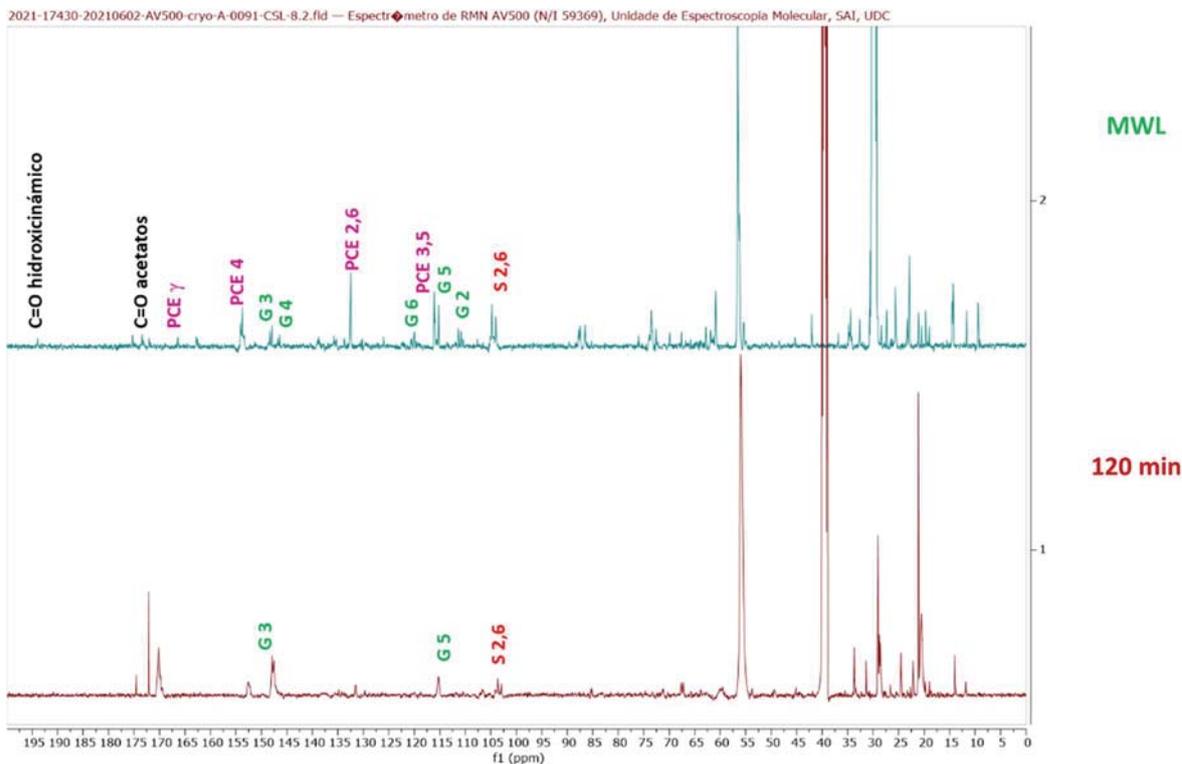
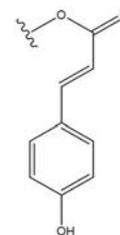
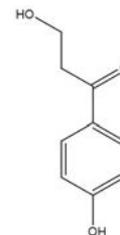


Figura 12. Espectros de RMN ^{13}C de MWL y la lignina recuperada en el experimento de 120 min.

- La pequeña señal a 193.9 ppm presente en la MWL, que es compatible con la del carbono carbonílico de una unidad de 3,4'-dihidroxi-propiofenona [1-(4-hidroxifenil)-1-propanona] no se encuentra en la lignina recuperada.
- El grupo de señales entre 170 y 175 ppm se corresponde con grupos carbonilo de ésteres alifáticos y acetatos. Aumentan de modo importante en la lignina recuperada, probablemente debido a acetilaciones en diversos lugares de la estructura.
- Los desplazamientos químicos de las señales de unidades de tipo H son compatibles con unidades de ésteres de p-cumarilo (PCE). Aparecen a: 162.8 ppm (PCE₄), 132.5 ppm (PCE_{2,6}) y 115.2 ppm (PCE_{3,5}). Todas estas señales no están presentes en la lignina Acetosolv.
- Las unidades de tipo G muestran señales a 149.0 (G₃), 147.1 (G₄), 136.5 y 130.9 (G₃ eterificado y no eterificado), 149.0 (G₃), 120.7 (G₆), 115.9 (G₅) y 112.1 (G₂). Solamente las señales originadas por carbonos ya sustituidos (3 y 4) muestran altas intensidades en el segundo espectro, lo que puede explicarse en función de probables sustituciones en los carbonos libres (2 y 6). Sin embargo, el carbono 5, también libre aún mantiene una alta intensidad. Este resultado puede explicarse en



función de las formas resonantes esperables tras un ataque ácido a la posición a de la cadena lateral, que activaría las posiciones 2 y 6.

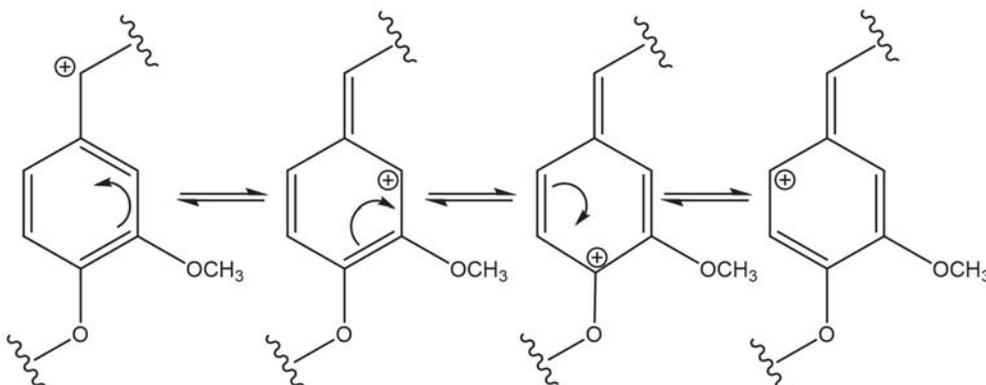


Figura 13. Resonancia de la unidad tipo G.

- La señal de los grupos siringuilo ($S_{2,6}$) a 105 ppm también disminuye en intensidad, pero no tanto como la de G_3 , por lo que el anillo S debe de sufrir asimismo sustituciones en esas posiciones.

Otro aspecto cualitativo de interés que se puede deducir de los espectros de RMN ^{13}C deriva de los desplazamientos químicos que se producen en muestras de lignina. En la zona de resonancia de carbonos aromáticos (160-100 ppm) las señales se pueden agrupar del siguiente modo:

Tipo de señales	Rango aproximado (ppm)
Originadas en enlaces C-O aromáticos	160-140
Originadas en enlaces C-C aromáticos	140-123
Originadas en enlaces C-H aromáticos	123-103

La integración conjunta de las señales en cada una de estas zonas proporciona los datos que se representan en la figura 14. El importante aumento de enlaces C-O va acompañado de una disminución simultánea de los C-H y C-C. Dado que los enlaces entre los distintos tipos de unidades que conforman la lignina se establecen muy mayoritariamente entre los carbonos de la cadena propílica y no entre núcleos aromáticos, la disminución de la proporción de C-C es debida al aumento de los C-O. Este aumento, de nuevo, es compatible con la presencia de nuevas sustituciones en el anillo. Teniendo en cuenta el medio de reacción utilizado, la acetilación de carbonos aromáticos, que también conlleva disminución de enlaces C-H, puede explicar los resultados.

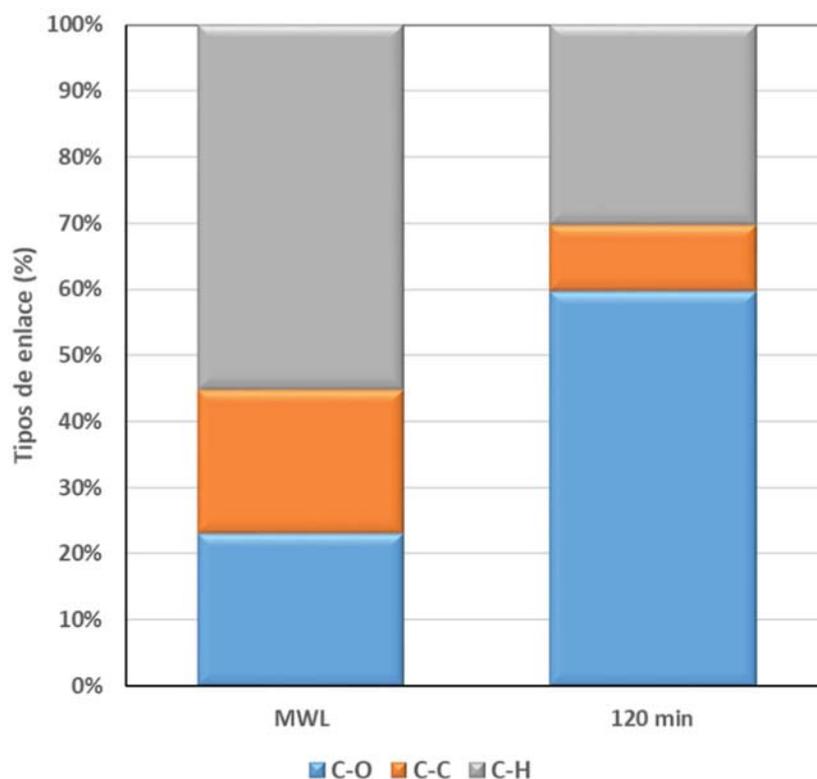


Figura 14. Tipos de enlaces aromáticos de MWL y la lignina recuperada en el experimento de 120 min.

3.4. Seguimiento de la deslignificación por HSQC

La espectroscopía RMN de ^{13}C proporciona, como se ha visto, información sobre los cambios producidos durante la reacción en los distintos carbonos de la lignina. No obstante, la técnica precisa el uso de agentes de relajación y largos tiempos de adquisición para obtener resultados cuantitativos. La técnica HSQC (*Heteronuclear Single-Quantum Correlation*) permite en tiempo más reducidos resolver muchas señales que aparecen solapadas en los espectros de ^1H y ^{13}C , al tiempo que facilita nuevos datos sobre la estructura molecular.

La realización de múltiples experimentos de este tipo con compuestos modelo y con muestras reales ha permitido establecer los valores de desplazamiento químico del carbono (d_{C}) y del hidrógeno (d_{H}) en los que aparecen las correlaciones C-H típicas de diferentes aspectos estructurales de la lignina. En concreto, se pueden identificar las señales de los carbonos aromáticos enlazados a hidrógenos de los tres tipos de unidades C9 (H, G y S), y muchas otras que se identifican con los distintos tipos de uniones entre las unidades C9.

El resultado de un experimento HSQC de lignina se presenta típicamente como se ve en la figura 15. La zona alifática (C-C) aún muestra un alto grado de solapamiento y, sólo en algunos casos, permite extraer información estructural clara. En la zona aromática se pueden identificar las correlaciones aromáticas ya mencionadas, y en la alifática (C-O) es donde se encuentran las correlaciones que permiten calcular proporciones de cómo están enlazadas las unidades C9.

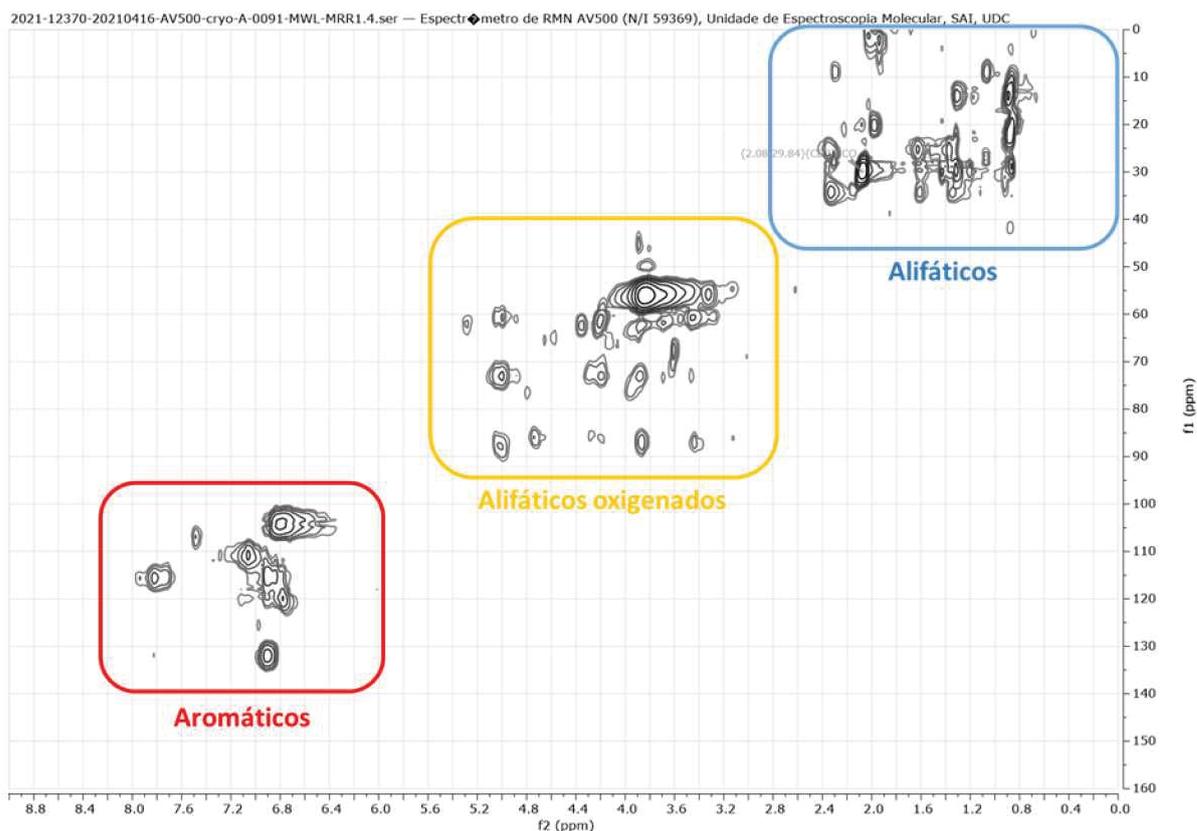


Figura 15. Espectro HSQC típico de una lignina mostrando tres zonas diferenciadas (Marta Río. TFG Univ. A Coruña, Junio 2021).

La lignina MWL, que sirve como una referencia a este trabajo fue aislada y caracterizada recientemente en un trabajo de fin de grado de química (Marta Río. TFG Univ. A Coruña, 2021). Por tanto, la discusión de resultados estará relacionada en muchos aspectos con el mencionado trabajo.

Una primera comparación de los espectros HSQC de la MWL y de la lignina obtenida a 120 min de tratamiento se presenta en la figura 16 (excepto la región alifática). Un primer examen visual permite ver cómo en las otras dos zonas los efectos de la deslignificación son patentes: la mayor parte de los enlaces entre unidades han desaparecido y la zona aromática presenta también modificaciones importantes.

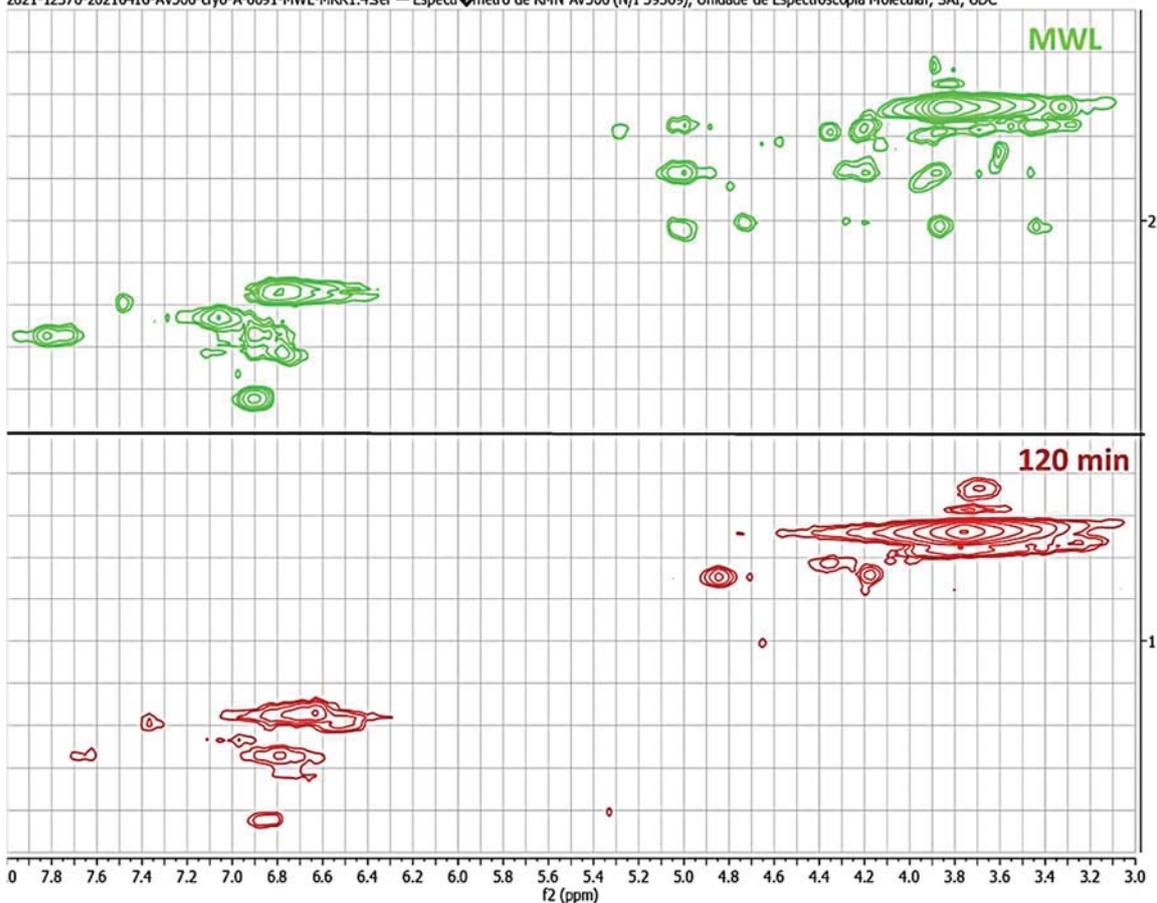
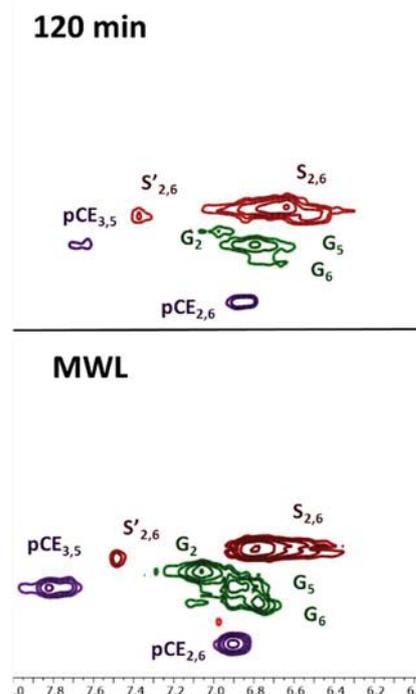


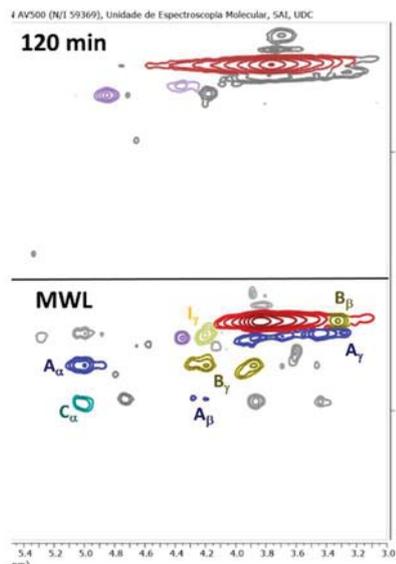
Figura 16. Comparación de los espectros HSQC de madera tras el proceso MWL y tras 120 minutos de tratamiento por acetosolv

Más concretamente, la zona de resonancia de los C-H aromáticos refleja claramente las degradaciones sufridas. Las señales originadas por las unidades de para-cumarato (PCE) han disminuido de forma importante, y lo mismo ocurre con las correspondientes a las posiciones 2 y 6 de los anillos de guayacilo (G_2 y G_6), lo que concuerda con los resultados encontrados en los espectros de ^{13}C .

Las unidades siringuilo resisten mejor el ataque químico, aunque también se ven afectadas, como se deduce de los valores descendientes de las integrales de volumen a medida que aumenta el tiempo de tratamiento. Por el contrario, las unidades S con carbonos a oxidados no ven reducida su intensidad, sino que aumentan ligeramente a medida que el tratamiento se prolonga.



En la zona alifática oxigenada los efectos de la reacción son aún más claros. Prácticamente todas las señales de uniones A, B y C no se observan al mismo nivel de intensidad en el que se distinguen en la MWL; lo que implica una disminución drástica de todos esos enlaces entre unidades C9. Entre las pocas correlaciones que se observan hay que mencionar la situada a $d_C/d_H = 68.0/4.8$ cuyos desplazamientos son compatibles con unidades de tipo A aciladas en su posición g (A'_g). Esta acilación implica la presencia de mayor proporción de grupos carbonilo, lo que concuerda con los resultados observados en RMN de ^{13}C .



La integración de las señales que reflejan las características estructurales y sus variaciones con el tiempo muestran detalles sobre los procesos que ocurren en la reacción. Las figuras 17 y 18 presentan las variaciones con el tiempo de cocción de los valores de las integrales de volumen para diversos enlaces C-H.

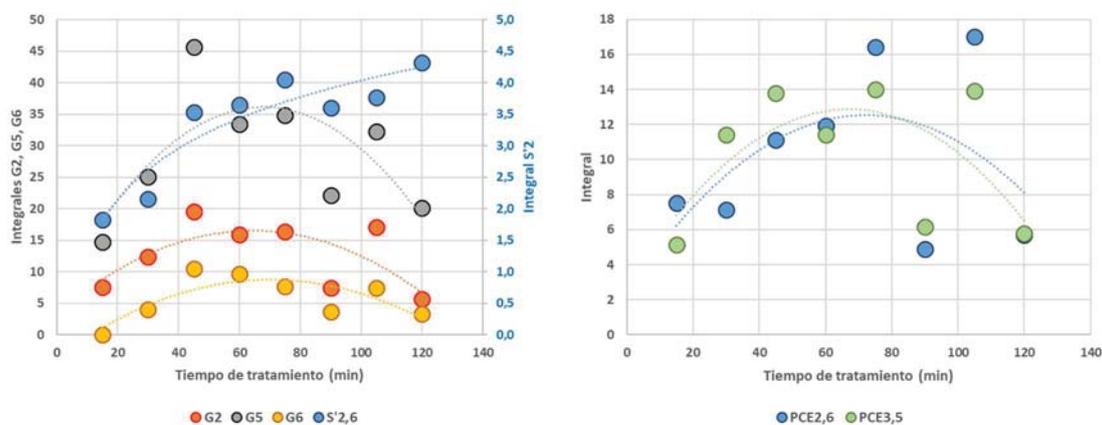


Figura 17. Variaciones temporales de las integrales de volumen de los C-H aromáticos.

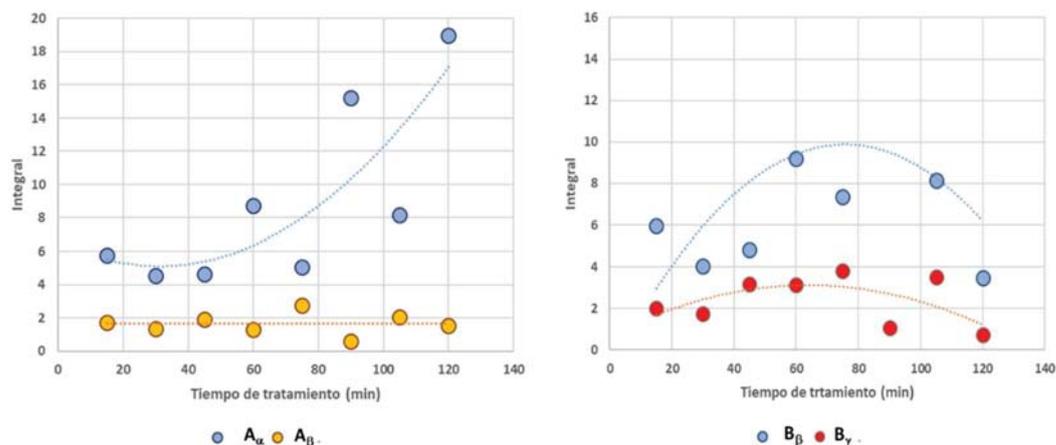


Figura 18. Variaciones con el tiempo integrales de volumen de los C-H en diferentes unidades C9.

A pesar de la dispersión de los datos, especialmente para algunos experimentos, se observa cómo, en todos los casos (Figura 17), aumenta la intensidad de las señales hasta los 60-75 min de tratamiento. Esto expresa que las reacciones de deslignificación son predominantes en este periodo. Después, las intensidades disminuyen debido a degradaciones y las sustituciones ya mencionadas. La misma pauta se observó para las unidades H, de p-cumarato. La excepción la constituye la señal S'_{2,6}, que aumenta de modo continuo durante todo el intervalo de tiempo. Este aumento de intensidad es moderado y es compatible con parte del mecanismo propuesto para la deslignificación en medio ácido, que implica la ruptura del enlace β-O-4' con eliminación de agua en α-β, liberación de un resto arilo y reversión del enol resultante a la forma ceto (Figura 18). Estas estructuras, conocidas como cetonas de Hibbert se encuentran con frecuencia en los licores de deslignificación ácida. En nuestro caso, existe una señal en el espectro HSQC a $\delta_C/\delta_H = 80.6/5.9$ que es compatible con las resonancias de los enlaces C-H en posición α de la cadena.

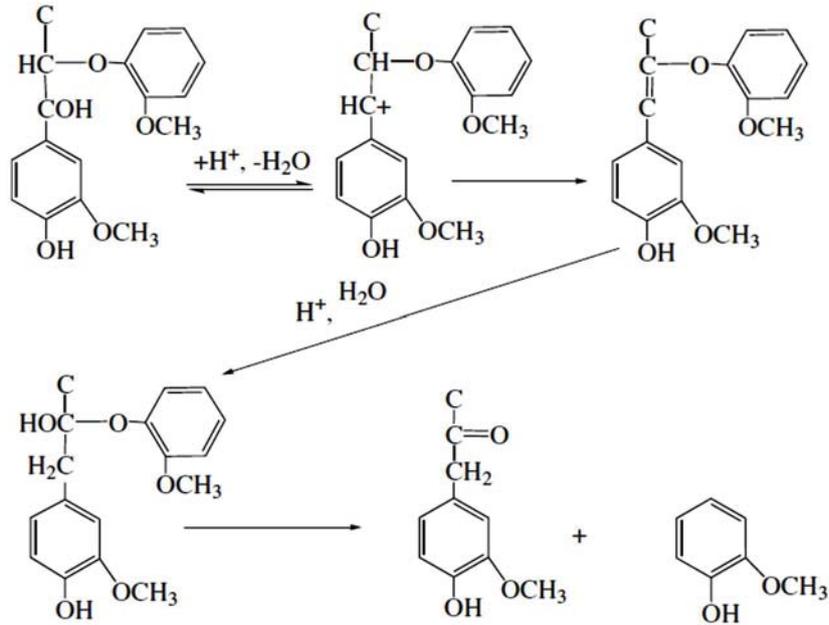


Figura 19. Deslignificación ácida por ruptura de enlaces β -O-4' y formación de cetonas de Hibbert
(Xuebing Zhao et al., 2013)

Además, estas cetonas pueden evolucionar posteriormente (Figura 19) hacia estructuras tipo $S'_{2,6}$ según se ha referenciado (Xuebing Zhao et al., 2013), explicando el aumento correspondiente de estas señales.

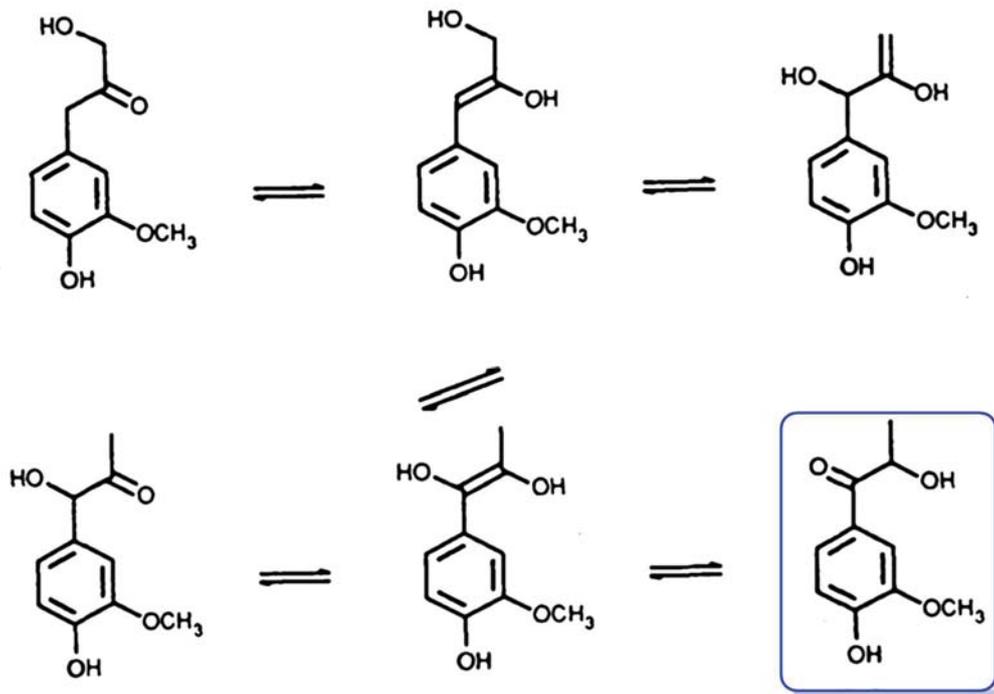


Figura 20. Formación de α cetonas en la deslignificación ácida (T.J. McDonough, 1991)

De la figura 20 se deduce que las uniones de tipo A (β -aril éter) son la que mejor

resisten el ataque ácido: las señales A_{β} aumentan (mayor proporción en el precipitado), mientras que las A_{α} se mantienen aproximadamente constantes. Las estructuras de tipo resinol (β - β' , tipo B) resisten hasta los 60-75 minutos, degradándose a continuación.

Por último, las unidades tipo C (fenilcumarano, α -O-4') son las más reactivas: ninguna señal se ha observado incluso en el experimento a menor duración (15 min). Esto está en concordancia con los datos publicados sobre que el mecanismo de deslignificación predominante en medio ácido es a través de rupturas de α -aril éteres (Figura 21) (McDonough, 1991).

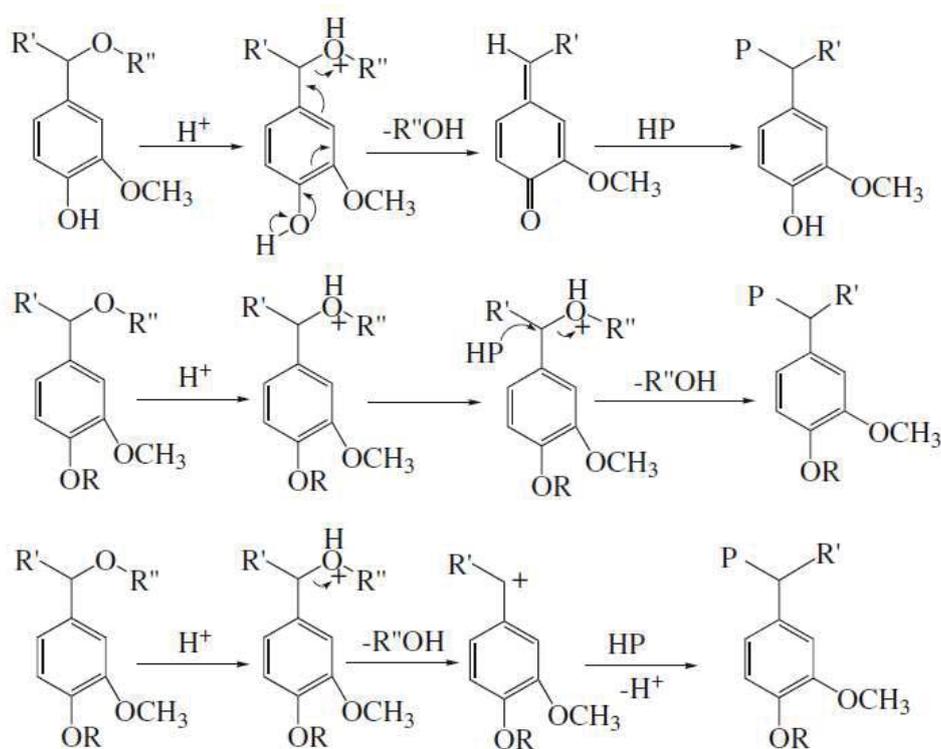


Figura 21. Mecanismo de deslignificación por ruptura de enlaces α -O-4' (T.J. McDonough, 1991)

3.5. Seguimiento de la deslignificación mediante cromatografía de exclusión molecular

Con el objeto de obtener un conocimiento adicional sobre los cambios ocurridos en la reacción de deslignificación, las ligninas obtenidas fueron sometidas a cromatografía de exclusión molecular (SEC, *size exclusion chromatography*) para adquirir más información.

Todas las muestras de lignina fueron solubles en la fase móvil (tetrahidrofurano, THF) por lo que no hubo necesidad de acetilarlas. La acetilación es un procedimiento común en este campo que aumenta la solubilidad en los disolventes comunmente usados en SEC (THF, DMF, acetonitrilo). Se usaron dos columnas en serie y se midió la absorbancia a 254 nm. Los cromatogramas obtenidos se presentan en la figura 22.

El objetivo final de estos experimentos sería la obtención de la distribución de pesos moleculares para cada muestra. No obstante, esto no fue posible al obtenerse valores muy por debajo de los esperados (en torno a 200 Da) que no se corresponden con los reales: son inferiores, incluso, a la masa molecular de una simple unidad C9. Esto es debido a que el comportamiento hidrodinámico de la lignina durante su elución en columna difiere mucho del sufrido por los patrones de masas moleculares disponibles (poliestireno lineal). Además, no existen patrones monodispersos comerciales de lignina, por lo que los resultados, como se ha dicho, son erróneos. Aún así, considerando que las ligninas obtenidas deben de presentar un comportamiento similar en las condiciones SEC, un análisis comparativo sí es posible.

La figura muestra una distribución complicada, con varios máximos y hombros. No obstante, y más a medida que aumenta el tiempo de tratamiento, la distribución va evolucionando hacia una de tipo bimodal, con dos máximos a 18.3 y 19.4 min.

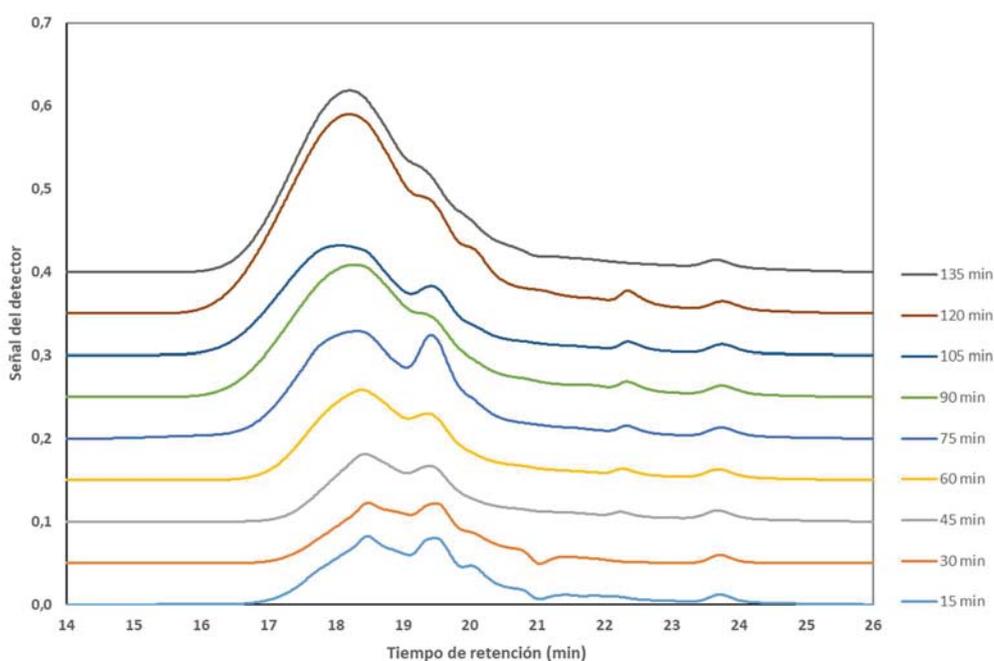


Figura 22. Cromatogramas SEC obtenidos para las ligninas Acetosolv obtenidas a diferentes tiempos de

reacción.

La figura 22 presenta las intensidades en el punto máximo de los picos mencionados. La gráfica muestra como la deslignificación permanece más o menos constante durante los primeros 60 minutos, aumentando después de forma importante (mayor intensidad de los picos). De forma interesante, la pendiente del pico a 18.3 min es superior. Este máximo corresponde a fracciones de lignina de más alto peso molecular, por lo que este aumento estaría reflejando el comienzo de los fenómenos de recondensación, ya mencionados, a partir de los 60 min.

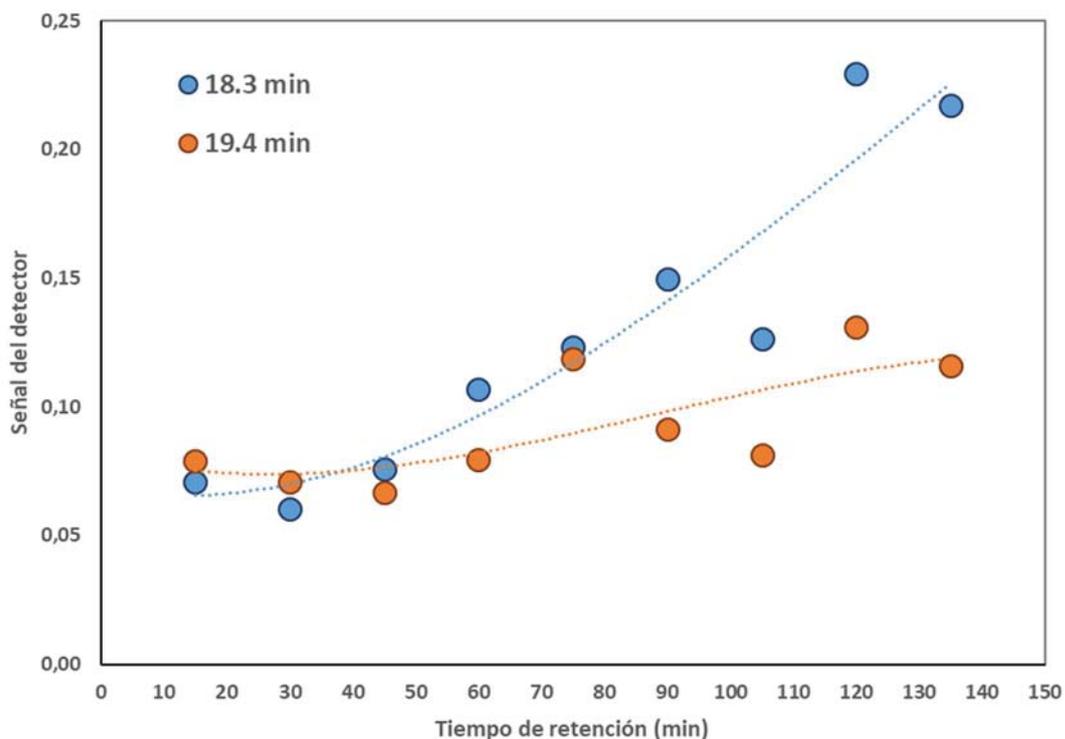


Figura 23. Dependencia de la posición de los máximos de las distribuciones cromatográficas con el tiempo de tratamiento.

El valor de M_n (masa molecular media en número) es el momento de primer orden de la distribución de masas moleculares de una muestra, es decir, la media de la distribución. En nuestro caso no podemos obtener este valor en Dalton, como se ha explicado, pero sí calcular las medias de las distribuciones de cada cromatograma. Estos valores se presentan en la figura 23. En ella, los tiempos de retención medios reflejan de modo indirecto, pero proporcional, los cambios que ocurren en la masa molecular media de la lignina aislada. Se observan en la gráfica tres zonas diferenciadas. La primera, más o menos hasta los 30 min, aproximadamente, muestra una lignina de peso molecular

constante. Después, el tiempo de retención medio disminuye, reflejando la precipitación de fracciones de lignina de mayor tamaño, que coincide, además, con las mayores tasas de deslignificación observadas en la figura 24. Por último, a partir de 105 min, la media aumenta indicando los procesos de recondensación y deposición en el sólido de fragmentos más grandes.

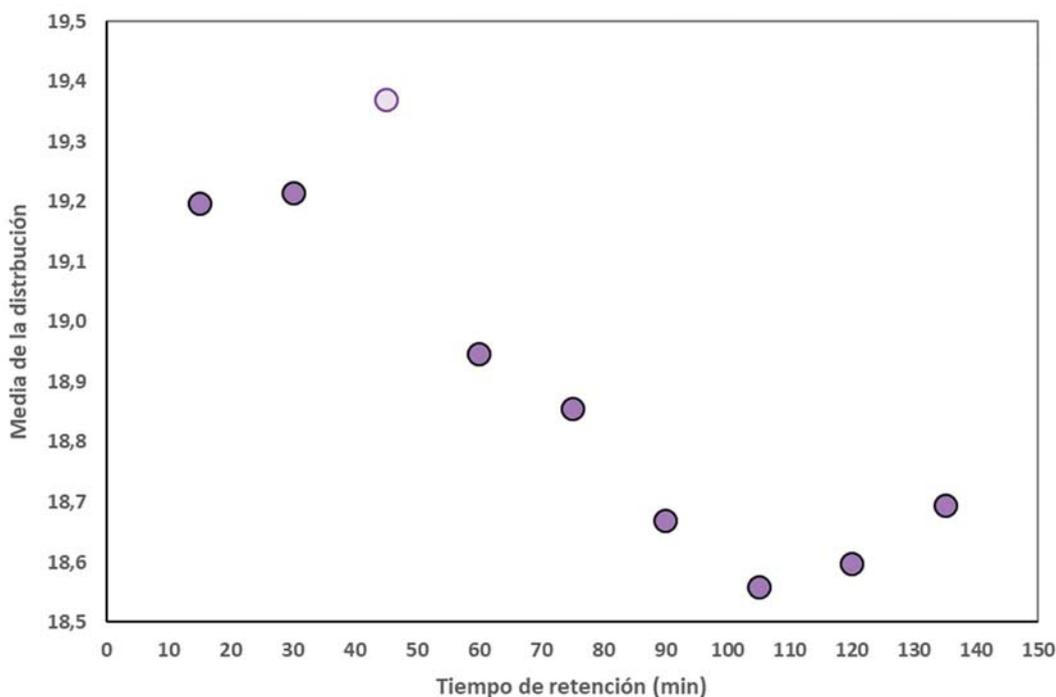


Figura 24. Variación de las medias de las distribuciones cromatográficas con el tiempo de tratamiento.

Conclusiones

La madera de *Salix* puede ser deslignificada de forma efectiva mediante el tratamiento *Acetosolv* con mezclas acuosas de alto contenido en ácido acético y catalizadas por ácido clorhídrico. Esta deslignificación es máxima (contenido de lignina en sólido 8%) con las siguientes condiciones experimentales: tiempo de cocción, 68 min; concentración de ácido acético en el licor, 86% (p/p), concentración de ácido clorhídrico en el licor, 0.16% (p/p).

Los espectros de RMN ^{13}C reflejan que la reacción transcurre con un importante aumento de la proporción de funciones carbonilo debida a la acilación (probablemente acetilación) de diferentes posiciones de la lignina. Los espectros HSQC reflejan esta acilación en el carbono γ .

Los espectros HSQC muestran un aumento de las funcionalidades (uniones entre unidades) de la lignina hasta los 90 min, aproximadamente, con una disminución posterior debida a reacciones de degradación y condensación. La excepción a este comportamiento se observa en las uniones tipo A (β aril éter), cuyos enlaces C_{β} - H_{β} se mantienen, mientras que los C_{α} - H_{α} aumentan. Este tipo de estructuras fueron las que mejor soportaron el ataque químico y las de tipo fenilcumarano fueron las más reactivas, no detectándose ninguna señal a tiempos cortos de tratamiento.

La distribución de pesos moleculares de las ligninas aisladas muestra una primera disminución de sus valores medios (hasta los 105 min) y un aumento posterior debido a recondensaciones.

La formulación de un valor óptimo para la deslignificación de este material precisa más experimentación, aunque los datos obtenidos permiten acotar de manera bastante la zona de estudio y proporcionan datos valiosos para el conocimiento de los procesos que ocurren durante la reacción.

Anexos

Cocciones Acetosolv

Para este estudio se ha utilizado madera de *Salix spp* que hemos recibido de Biobel Forestal S.L que ya estaba triturada de tal forma que no hemos tenido que pretratarla para poder utilizarla. Se tomaron valores de humedad todos los días que se necesitó la muestra de madera con un analizador *Ohaus MB45*.

Se comenzó tomando 4g de madera seca, la cual es añadida junto a una cierta cantidad de ácido acético y agua que varían según se avanza en el método Simplex que se ha utilizado para calcular las proporciones óptimas de ácidos para deslignificar lo máximo posible.

Se realiza un clásico montaje de reflujo (Figura 25) con la diferencia de que en la imagen nos aparece un matraz aforado de fondo redondo de 100ml, pero se ha empleado uno de 50ml de capacidad que es suficiente.



Figura 25. Montaje de reflujo.

Se espera que la mezcla de madera, ácido acético y agua llegue a ebullición, momento en el que se añade el ácido clorhídrico. Entonces se deja agitando y reaccionando durante el tiempo que le corresponda según nos indique el Simplex.

Una vez transcurrido dicho tiempo, se toma rápidamente la disolución y se filtra a vacío mientras sigue caliente. Para el montaje de filtración a vacío se ha empleado un embudo de filtración de vidrio con disco de vidrio sintetizado, sobre un Kitasato de 500ml, con una goma entre ellos para evitar roturas. Una vez se ha filtrado y arrastrado todo con agua destilada, se lleva el sólido a pH neutro y se retira la barra agitadora con un cazamariposas. Tras esto, se lleva el sólido a la mufla para que seque y al líquido se le realiza la precipitación de la lignina, que está explicado en su propio capítulo.

Siguiendo con el sólido que se había llevado a la estufa se pesa y guarda, si la muestra ha quedado como un bloque macizo, se la hace pasar por una trituradora *IKA Tubemill control*. Se procede ahora a realizarle la técnica de lignina de Klason, para lo cual se introduce 1g de muestra en un vaso de precipitados de 50ml y se añaden 15ml de ácido sulfúrico al 72%, tras lo cual se deja con agitación durante 2 horas. Transcurridas esas 2 horas, se lleva la disolución a un frasco, donde se introducen también 560ml de agua, dicho frasco se lleva a un Autoclave *Selecta Med12* que se programa para funcionar durante 1 hora a 121 °C tras la cual se retira el frasco, se deja enfriar para evitar problemas por la presión que contiene, y se pasa a realizar un nuevo filtrado al vacío, de la misma manera que la vez anterior. Se lleva el sólido a la estufa una vez se ha neutralizado y la fase líquida se lleva a 1L del cual tomaremos una alícuota que se guardará en la nevera

para futuros proyectos. Una vez se ha secado el sólido, se deja enfriar en un desecador y se pesa para conocer el peso de crisol + lignina + cenizas, a continuación, se lleva a la mufla durante al menos 1 hora, tras la cual se vuelve a dejar enfriando en el desecador y se pesa, para conocer el peso del crisol + cenizas, lo que permite conocer la cantidad de lignina.

Determinación de la lignina de Klason

Este proceso permite la determinación cuantitativa de la proporción de lignina presente en una muestra. La lignina de Klason es definida como el residuo sólido que se produce tras la hidrólisis cuantitativa de los carbohidratos de una muestra de MLC con ácido sulfúrico en condiciones estandarizadas. El método comprende dos etapas: la primera con H₂SO₄ al 72% y a temperatura ambiente, y la segunda rebajando la concentración del ácido al 3% y tratamiento en autoclave a 121°C. Finalmente, se cuantifica por pesada.

Para la realización de este método se toma una muestra de madera de aproximadamente 1 g, se le añaden 15 mL de ácido sulfúrico (72%) y se deja reaccionando con agitación constante durante 2 horas a temperatura ambiente. Luego, se le añaden 560 mL de agua y se lleva a un autoclave durante una hora a 121°C. Después de esto, se filtra la suspensión resultante, se lava el sólido hasta neutralidad y se lleva a una estufa para secarlo. El peso de este sólido constituye el contenido en lignina de Klason y cenizas de la muestra. Para corregir el valor de las cenizas, el residuo se lleva a calcinación (550°C) y se pesa de nuevo. La sustracción del contenido en cenizas permite calcular el porcentaje de lignina de Klason de la muestra.

Precipitación de la lignina

Para provocar la precipitación de la lignina a partir del líquido, se ha medido en una bureta la cantidad de volumen, y se ha añadido agua destilada hasta tener una proporción 1:9, tras lo cual se deja agitando durante 5 minutos para que precipite completamente. Tras esto, se centrifuga en una centrífuga *Ortoalresa Unicen 21*. La lignina que resulta de esto, se congela y se lleva a un liofilizador *Telstar Lyoquest HT40 Beijer Electronics*. Una vez liofilizado completamente, ya obtenemos una lignina a la que se le pueden realizar técnicas espectro fotométricas.

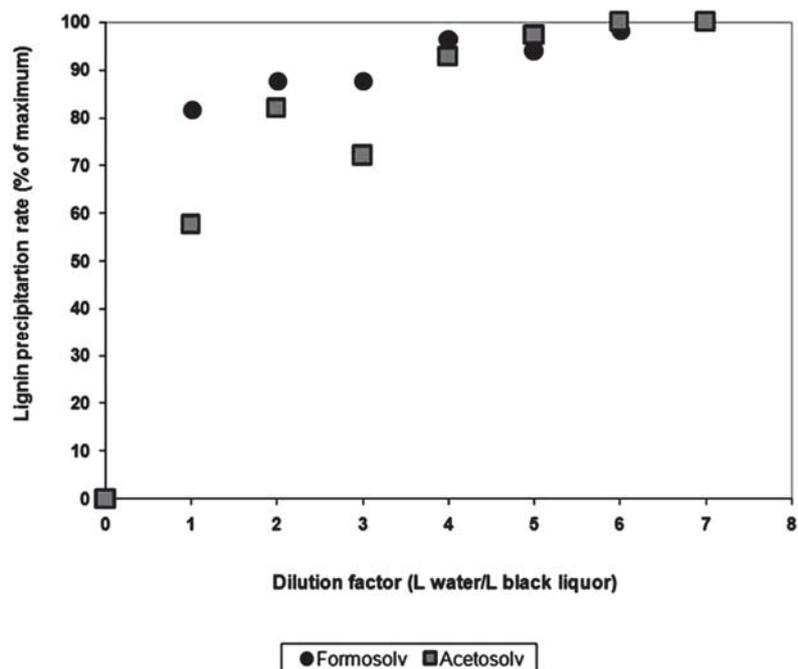


Figura 26. Influencia del factor de dilución sobre el porcentaje de precipitación de lignina en licores organosolv (Villaverde et al., 2010)

Cromatografía de exclusión por tamaño

Para la realización de la cromatografía de exclusión molecular se ha empleado un HPLC, que consta de una bomba *Waters Binary 1525*, un detector UV/Visible *Waters 2489*, una precolumna *Sepax Mono GPC-100, 5 μ m 100 Å 7,8x50mm*, una primera columna *Sepax GPC-100, 5 μ m 100 Å 7,8x300mm*, una segunda columna *Sepax Mono GPC-300, 5 μ m 300 Å 7,8x300 mm* y tetrahidrofurano (1 mL/min) como fase móvil. Se diluyó una pequeña porción de lignina en THF y se inyectó en el HPLC con la orden de funcionar hasta los 30 minutos, repitiéndose esto para cada una de las muestras de lignina obtenidas. Esto nos resulta en los cromatogramas que se han juntado en una misma gráfica que se puede observar en la figura 22.

Bibliografía

- (1) A Lindner, G. Wegener. Characterization of lignins from organosolv pulping according to the organocell process part 1. Elemental analysis, nonlignin portions and functional groups. *Journal of Wood Chemistry & Technology* 1988, 8, 323–40
- (2) A. Rodríguez, L. Serrano, A. Moral, L. Jiménez. Pulping of rice straw with high-

- boiling point organosolv solvents. *Biochemical Engineering Journal* 2008, 42, 243-247.
- (3) Barroso Casillas, M. (2010). Pretratamiento De Biomasa Celulosa Para La Obtención De Etanol En El Marco De Una Biorrefinería. *Universidad Politécnica de Madrid*, 117. http://oa.upm.es/10559/1/MIGUEL_BARROSO_CASILLAS.pdf
- (4) Chávez Sifontes, M., & Domine, M. E. (2010). Lignin, Structure and Applications: Depolymerization Methods for Obtaining Aromatic Derivatives of Industrial Interest / Lignina, Estructura Y Aplicaciones: Métodos De Despolimerización Para La Obtención De Derivados Aromáticos De Interés Industrial. *Avances En Ciencias e Ingeniería, ISSN-e 0718-8706, Vol. 4, Nº. 4, 2013, Págs. 15-46, 4(4), 15-46.*
- (5) Cienfuegos, C., & Qu, I. (2012). “*Deslignificación alcalina de pulpas acetosolv de marabú.*”
- (6) Holz als Roh- und Werkstoff 1986, 44, 207–212
- (7) Investigations on the digestion of beech according to the ASAM method and on the bleaching of the cellulose in different sequences. *Das Papier* 1987, 41, 340–351
- (8) Juan José Villaverde, Pablo Ligeró, Alberto de Vega. *Miscanthus x giganteus* as a source of biobased products through organosolv fractionation: A mini review. *The Open Agriculture Journal*, 2010, 4, 102-110
- (9) K. Poppius-Levlin. Milox pulping with acetic acid/ peroxyacetic acid. *Paperi ja Puu*, 1991, 73, 154-158.
- (10) L. Jiménez, A. Rodríguez, L. Serrano, A. Moral. Organosolv ethanolamine pulping of olive wood: Influence of the process variables on the strength properties. *Biochemical Engineering Journal* 2008, 39, 230-235
- (11) Li, Y.; Yoo, C. G.; Yang, X.; Lin, X.; Ralph, J.; Pan, X. An uncondensed lignin depolymerized in the solid state and isolated from lignocellulosic biomass: A mechanistic study. *Green Chem.* 2018, 20 (18), 4224–4235.
- (12) M^a Jesús de la Torre, Ana Moral, M^a Dolores Hernández, Elena Cabeza, Antonio Tijero. Organosolv lignin for biofuel. *Industrial Crops and Products* 2013, 45, 58-63

- (13) Marta Río. TFG Univ. A Coruña, Junio 2021
- (14) Muurinen, Esa. A review and distillation study related to peroxyacid pulping, Ph.D. Thesis, Oulu Univ., 2000.
- (15) Neumann N, Balser K. Acetocell - An innovative process for pulping, totally free from sulfur and chlorine. *Papier* 1993; 47: 16-24.
- (16) Prada Sáez, M. A., & Rueda Fernández, Jesús; Magdaleno Mas, Fernando; Martínez Romero, R. (2002). *Salix spp.* 58, 391–612.
- (17) Proc. 7th International symposium on wood and pulping chemistry., vol. 1, pag. 258, Pekin, 1993,
- (18) T.J. McDonough, The chemistry of organosolv delignification, IPST Technical Paper Series, 1991
- (19) Xuebing Zhao & Dehua Liu, Kinetic modeling and mechanisms of acid-catalyzed delignification of sugarcane bagasse by aqueous acetic acid, *Bioenerg. Res.* (2013) 6:436–447