



UNIVERSIDAD MICHUACANA
DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO
FACULTAD DE INGENIERÍA
EN TECNOLOGÍA DE LA MADERA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO
MAESTRÍA EN CIENCIAS Y TECNOLOGÍA DE LA MADERA

T E S I S

ADHESIVIDAD DE OLIGOLIGNÓLES SINTÉTICOS Y NATURALES

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE MAESTRO
EN CIENCIAS Y TECNOLOGÍA DE LA MADERA

PRESENTA:
ING. MIRIAM SEDANO MENDOZA

DIRECTOR DE TESIS:
DR. PABLO LÓPEZ ALBARRÁN

CO-DIRECTOR:
DR. RAFAEL HERRERA BUCIO

MORELIA, MICHUACÁN. ABRIL DE 2010.



ÍNDICE GENERAL

Abstract	1
Resumen	2

Capítulo I. Introducción y objetivo de estudio

I.1	Introducción	3
I.2	Objetivo general de trabajo	4
	I.2.1 Objetivos específicos	4
I.3	Hipótesis de trabajo	5
I.4	Justificación	5
I.5	Antecedentes	6
	I.5.1 Composición de las protoligninas	6
	I.5.2 Lignina como adhesivo	10
	I.5.3 Análisis de las ligninas por modelado molecular	12

Capítulo II. Materiales y métodos

II.1	Parte teórica	16
	II.1.1 Simulación molecular	16
II.2	Parte experimental	20
	II.2.1 Lignanos sintéticos	20
	II.2.1.1 Reacción de síntesis	21
	II.2.2 Ligninas naturales	22
	II.2.2.1 Localización por MALDI-TOF	26
	II.2.3 Ensayo de adhesividad	29

Capítulo III. Resultados y Discusión

III.1	Simulación molecular	32
III.2	Síntesis de lignanos	34
III.3	Ligninas naturales	41
III.4	Correlación de resultados	46

Capítulo IV. Conclusiones

IV.1	Conclusiones	51
------	--------------------	----

Capítulo V. Referencias

V.1	Referencias	53
-----	-------------------	----

Índice de tablas

Tabla 1. Abundancia de monolignoles	8
Tabla 2. Abundancia de enlaces en las protoligninas	10
Tabla 3. Resultados de la energía de acoplamiento molecular	32
Tabla 4. Correlación entre los valores de Rf y las energías teóricas	35
Tabla 5. Proporción de lignanos en las ligninas	43
Tabla 6. Módulo de Young a diferente contenido de sólidos	45
Tabla 7. Energías de enlace de los componentes en las ligninas tratadas	46
Tabla 8. Energías de enlace teóricas y experimentales	48

Índice de figuras

Figura 1. Precursores más frecuentes en las ligninas	7
Figura 2. Tipos de enlace más abundantes en las ligninas	8
Figura 3. Diagrama de la metodología	15
Figura 4. Representación del enlace G _β O4-G _{ββ} -G	19
Figura 5. Síntesis de los lignanos	21
Figura 6. Ligninas de origen natural	22
Figura 7. Equipo MALDI-TOF	23
Figura 8. Analizador termomecánico	23
Figura 9. Principio de MALDI-TOF	26
Figura 10. Estructura de dos fragmentos de lignina	27
Figura 11. Estructura de dos dímeros de lignina	28
Figura 12. Preparación de la muestra	29
Figura 13. Esquema del principio del TMA	30
Figura 14. Simulación molecular	33
Figura 15. Acoplamiento de un trímero	33

Figura 16. Productos de polimerización	34
Figura 17. Productos de síntesis (a) y (b)	36
Figura 18. Espectro de RMN- ¹ H de los productos (a) y (b)	37
Figura 19. Espectro de RMN- ¹³ C de los productos (a) y (b)	38
Figura 20. Productos de síntesis (c)	39
Figura 21. Espectro de RMN- ¹ H de los productos (c)	39
Figura 22. Espectro de RMN- ¹³ C de los productos (c)	40
Figura 23. Composición de las ligninas tratadas	42
Figura 24. Gráfica de análisis termomecánico (TMA)	44
Figura 25. Correlación entre resistencia experimental y la simulación molecular .	47
Figura 26. Fuerza en papel de dímeros y trímeros	49

Índice de Anexos

Anexo 1	Lista de todos los dímeros y trímeros posibles	58
Anexo 2	Resultados del espectro MALDI-TOF	59
Anexo 3a	Espectro MALDI-TOF en lignina Inde	61
Anexo 3b	Espectro MALDI-TOF en lignina de miscantus	62
Anexo 3c	Espectro MALDI-TOF en lignina Ln_CO2	63
Anexo 3d	Espectro MALDI-TOF en lignina Inde depolimerizada	64
Anexo 4	Productos obtenidos durante la realización de este trabajo	65

Abreviaciones utilizadas.

RMN- ¹ H	Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno
RMN- ¹³ C	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono
MALDI-TOF	Desorción-Ionisation Láser Asistido por Matriz, en inglés Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation ó MALDI
TMA	Análisis Termomecánico, en inglés Thermo mechanic Analyzer
PF	Fenol Formaldehído, en inglés Phenol Formaldehyde
AMBER	Siglas en inglés para Assisted Model Building with Energy Refinement
TLC	Cromatografía de Capa Fina, en inglés Thin Layer Chromatography
CCF analítica	Cromatografía de Capa Fina analítica
CCF preparativa	Cromatografía de Capa Fina preparativa
Ln_inde	Lignina natural proveniente de la India
Ln_miscantus	Lignina natural miscantus
Ln_CO2	Lignina natural obtenida por tratamiento con CO2
LN-T-CO2-1	Denominación industrial para la lignina obtenida con CO2
Ln_inde_depol	Lignina natural proveniente de la India y depolimerizada
FCBA	Laboratorio de Estudios y de Investigación sobre el Material Madera
H	para-hidroxifenilo, derivada del alcohol para-coumarílico
G	4-hidroxi-3-metoxifenilo, proveniente del alcohol coniferílico
GS	4-hidroxi-3,5 dimetoxifenilo, proveniente del alcohol sinapílico
H _{FRACCIÓN}	Fracción del tipo H
G _{FRACCIÓN}	Fracción del tipo G
GS _{FRACCIÓN}	Fracción del tipo GS
R _f	Retención frontal
R ²	Coefficiente de correlación lineal
GP	Grado de Polimerización
MOE	Módulo de Elasticidad

ABSTRACT

The aim of this project is to compare the interaction energies by theoretical and experimental methods between the most frequent dimers and trimers in lignins. The methodology was divided into two phases.

A theoretical phase where is obtained the interaction energy of the lignans on a substrate of crystalline cellulose composed by 3 superimposed lattices (6x6x3 model). The procedure in this case is to find the interaction energy by docking method. When the lignan is approached to the cellulose surface, its conformation changes to adapt itself on the cellulose surface to minimize the total energy in the system until the position and conformation of minimum energy is reached. In this precise case we found that the trimers present stronger adherence with the substrate than dimers but, this result is always according to the substrate.

In the experimental phase, we followed two strategies to obtain dimers and trimers. The first strategy was the synthesis and analysis of lignans by Nuclear Magnetic Resonance (NMR). The second process was their localization in natural lignins by spectrometry of Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation Time-Of-Flight (MALDI-TOF). Then, their resistances were measured in a cellulose sheet by Thermo-mechanic Analysis (TMA) in the tensile test.

Finally we found a correlation between the energy of lignan-substrate interaction by molecular mechanics and the adhesive strength by experimental test. Thus we can say that lignins with high quantity of trimers inside its structure present a stronger interaction with the substrate. The molecular mechanics calculations indicated that a dimer β O4-linked has stronger attraction for the substrate than β - β or β -5-linked dimers. Consequently the bond energy is given by molecular weight and type of linkage. Hence lignans with higher molecular weight and β O4-links have a better adhesion in the cellulose substrate.

RESUMEN

El objetivo de este proyecto es obtener una comparación de energías de enlace por métodos teóricos y experimentales entre los dímeros y trímeros más frecuentes en las ligninas.

En la fase teórica, se obtuvo la energía de enlace para cada uno de los lignanos sobre un sustrato de celulosa cristalina, compuesto por 3 capas de 6 por 12 glucosas cada una. El procedimiento consistió en determinar la energía de anclaje molecular, donde el lignano interacciona con el bloque de celulosa cambiando su conformación repetidas veces hasta su adaptación con la superficie de ésta y reduciendo al máximo la energía total del sistema. En este caso preciso, se encontraron que los trímeros presentan mayor adherencia al sustrato que los dímeros. Más sin embargo, éste resultado siempre dependerá de la naturaleza del sustrato y de las condiciones de interacción.

En la fase experimental, se siguieron dos estrategias para obtener los dímeros y trímeros. La primera estrategia fue la síntesis y el análisis de los lignanos por resonancia magnética nuclear. La segunda estrategia fue su localización en ligninas naturales por espectrometría de masas. Posteriormente se midió la resistencia adhesiva a tensión en una hoja de celulosa por el análisis termo-mecánico.

Finalmente se encontró una correlación entre los resultados teóricos y experimentales de sus energías de enlace. Con lo cual, se puede decir que ligninas con alta cantidad de trímeros presentan una interacción más fuerte con el sustrato de celulosa. De acuerdo con los resultados se tiene que un dímero con un enlace tipo β -O-4 presentará una atracción mas fuerte al sustrato que los dímeros con enlace tipo β - β o β -5. Por consiguiente la masa molecular y el tipo de enlace son los factores predominantes en el cálculo de la energía de enlace en los lignanos.

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVO DE ESTUDIO

I.1 INTRODUCCIÓN

La función primordial de la lignina es de mantener unidas a las fibras de celulosa y hemicelulosas para conformar el material sólido que denominamos madera [Freudenberg, 1968]. Esta capacidad adhesiva ha dado pie a numerosos estudios sobre su composición y utilización en la innovación de nuevos materiales. Estudios sobre el análisis de las estructuras bases y/o lignanos dan la pauta para conocer el comportamiento adhesivo de la misma lignina [Brown, 1985]. Como es el caso de este trabajo, en el cual se hizo un estudio teórico-computacional y experimental para observar la capacidad adhesiva de lignanos con dos y tres unidades (dímeros y trímeros), a partir de monolignoles como precursores de la lignina. Se hizo la síntesis de los lignanos, así como su localización en ligninas naturales provenientes de residuos industriales. Posteriormente se midió su fuerza adhesiva a tensión sobre probetas de celulosa para llegar a una correlación teórico-experimental de sus energías de enlace y obtener un valor de adhesividad específico, el cual servirá como punto de referencia y/o comparación para este tipo de estructuras.

Este tipo de estudios aportan al conocimiento de las propiedades adhesivas de la misma lignina, como uso específico en adhesivos. Sobre todo que ésta industria ha sido dominada por los adhesivos sintéticos los que generalmente son perjudiciales para la salud humana y que los estándares ambientales están exigiendo su desplazamiento como es el caso de adhesivos base en formaldehído. Esta situación genera una fuerte demanda por adhesivos ecológicamente amigables sin que se arriesgue la calidad del producto, aquí es donde la lignina parece ser un buen candidato con excelentes expectativas de uso.

I.2 OBJETIVO GENERAL DE TRABAJO

El objetivo general de este trabajo es comparar las energías de enlace entre dímeros y trímeros en ligninas, con base a los resultados teórico calculados y los resultados de ensayos experimentales.

I.2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✿ Diseño y construcción químico-computacional de lignanos, considerando los enlaces más abundantes en las ligninas.
- ✿ Anclaje molecular de los lignanos sobre un sustrato de celulosa
- ✿ Obtención de lignanos:
 - ✿ Síntesis y caracterización de los oligómeros bajo la metodología reportada por Landucci, 1995.
 - ✿ Localización de los lignanos más abundantes en tres ligninas industriales de bajo peso molecular por espectrometría de MALDI-TOF.
- ✿ Evaluación de su capacidad adhesiva por el Análisis Termo-Mecánico (TMA).
- ✿ Correlación de la capacidad adhesiva entre la simulación molecular y los resultados de los ensayos experimentales.

I.3 HIPÓTESIS DE TRABAJO

Los resultados de las energías de acoplamiento por simulación molecular de algunos lignanos con dos y tres unidades que más abundan en ligninas, seguirán la misma tendencia con los valores obtenidos por resistencia a tensión en el análisis termomecánico.

I.4 JUSTIFICACIÓN

Debido a la dificultad que se enfrentan los especialistas en lignina para el aislamiento efectivo y completo de la estructura natural, protolignina, ha sido necesario la utilización de herramientas como la simulación molecular para analizar su comportamiento y función en la célula.

Dentro de las principales funciones de la lignina es su capacidad adhesiva, la cual es muy importante en la formación biológica de la madera y la cual ha servido de pauta para el diseño de nuevos adhesivos. Esta propiedad natural de la lignina es objeto de estudio en este trabajo, con la finalidad de conocer su comportamiento por medio de sus estructuras más simples como son los lignanos de dos y tres unidades. Además de generar información básica de constitución, que funcione como punto de partida para las futuras formulaciones de adhesivos naturales a base de lignina. Es muy importante el conocimiento de energías de enlace para este tipo de estructuras por el potencial económico que conlleva el emplear la lignina y sus derivados como productos de más valor agregado.

I.5 ANTECEDENTES

I.5.1 COMPOSICION DE LAS PROTOLIGNINAS

La lignina es considerada como el segundo biopolímero renovable más abundante en la naturaleza después de la celulosa y los aceites esenciales. Es una macromolécula que constituye entre el 15 y 40 % de masa en madera [Sarkanen y Ludwig, 1971]. En combinación con celulosa y hemicelulosas, constituyen el material orgánico más abundante en la superficie de la tierra. La cantidad total de madera en los bosques del mundo se estima que es alrededor de 1.5 billones de toneladas [Barrios y Ventura, 2001]. Los componentes de la madera juegan un papel muy importante en el ciclo de carbono y la ecología global a través de sus efectos en suelos, ecología forestal y clima [Sakakibara, 1983].

Alrededor de un cuarto de biomasa en plantas leñosas es lignina. La biosíntesis de este componente por lo tanto, requiere una fracción mayor de recursos biosintéticos de plantas vivientes. La lignina es altamente reducida, con un contenido de carbono de 50% más alto que los polisacáridos. Esta es por consiguiente relativamente rica en energía potencial; sin embargo esta energía no está lista para ser utilizada en estado natural [Brown, 1985]. Otra característica importante de la lignina es su lenta degradación por lo que persiste largos periodos de tiempo como materia orgánica en suelos y agua [Grisebach, 1981].

Las ligninas son fracciones no carbohidratadas de madera, extremadamente complejas y difíciles de caracterizar. Éstas constituyen un polímero aromático, heterogéneo, ramificado y no presentan alguna unidad repetida. Generalmente todos los métodos utilizados en la obtención de ligninas llevan a la degradación de su estructura [Sjöström, 1998]. Mientras que además, es difícil obtener una lignina idéntica a otra, aún cuando se trate de la misma especie procedente, esto es por las diferentes variables en el proceso y por la naturaleza heterogénea de la lignina, pero su extracción de porcentaje en masa se considera representativo de la lignina total [Carballo, 1990].

La lignina está formada por polimerización deshidrogenativa de alcoholes para-hidroxicinámicos (alcohol para-coumarílico ó p-coumarol, el alcohol coniferílico ó coniferol y el alcohol sinapílico ó sinapol), a partir de una reacción catalizada por radicales libres [Higuchi, 1985]. La figura 1 presenta los precursores más frecuentes en las ligninas y su forma radical. El coniferol, al centro de la misma figura, presenta la numeración más utilizada en el área de química de la madera.

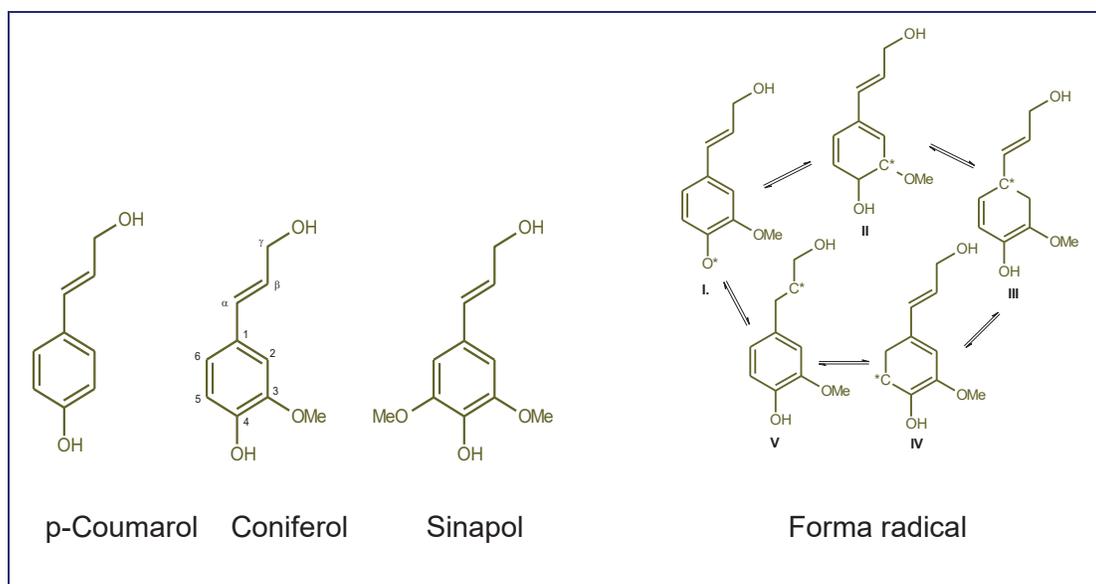


Figura 1. Los precursores más frecuentes en las ligninas y su forma radical.

Algunos estudios afirman que los monolignoles en su forma radical son diferentes de los otros radicales; el acoplamiento no es al azar y opera de acuerdo a reglas bien definidas. Consecuentemente la estructura de la lignina es influenciada por la velocidad de liberación de monolignoles de la zona de lignificación. Si los monolignoles fueran liberados a una velocidad lenta, los monolignoles podrían enlazarse continuamente hasta un polímero donde predominaría el enlace β-O-4. Alternativamente, si los monolignoles fueran liberados rápidamente, éstos se convertirían en dilignoles y oligolignoles donde predominarían enlaces tipo β-5, 5-5 y 5-O-4 [Terashima, 1990].

Entre las funciones principales de la lignina es ser adhesivo de las fibras de madera. Es decir, cuando la lignina se concentra en la lámina media, entre las paredes celulares, funciona como un agente cementante dando rigidez al tejido leñoso. Esta propiedad de cementación es debido a los

diferentes tipos de interacción químicas como los puentes de hidrógeno, las fuerzas de Van der Waals y los enlaces de carbohidratos [Glasser y Sarkanen, 1989]. Tales interacciones generan veinticinco tipos de enlace que han sido propuestos gracias a los resultados de la experimentación [Besombes *et al.*, 2003]. Dichos enlaces se encuentran tanto en gimnospermas como en angiospermas. Los más frecuentes están descritos en la figura 2.

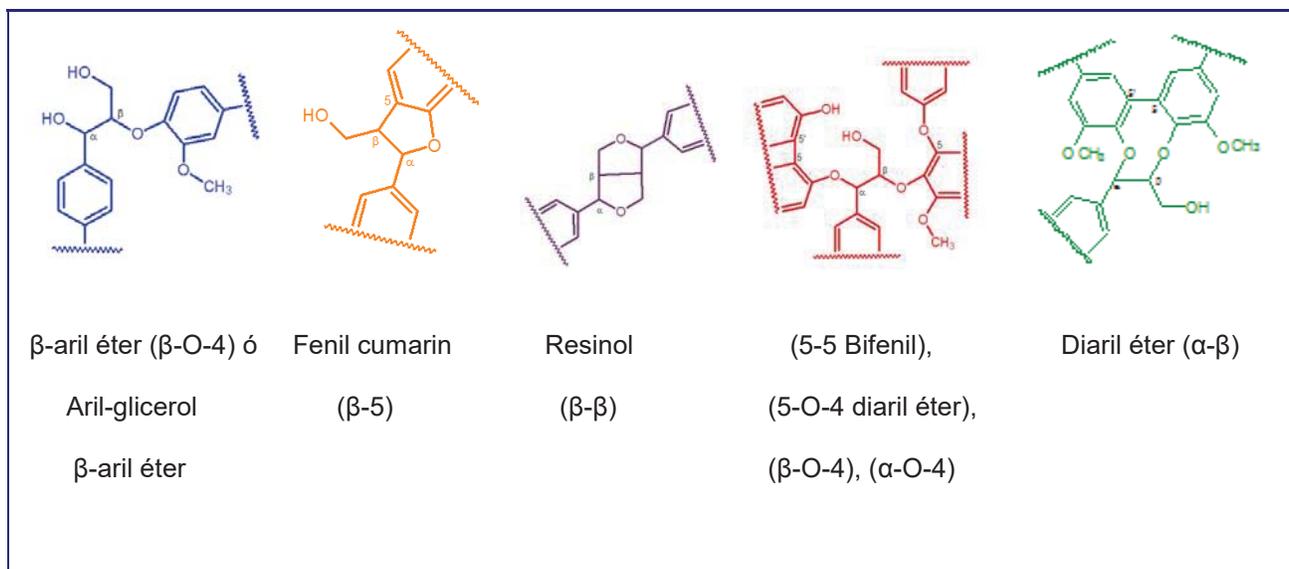


Figura 2. Tipos de enlace más frecuentes en las ligninas.

Los monolignoles no son abundantes en su forma libre en tejidos lignificados, pero se encuentran conformando 4-O- β -D-glucósidos. La cantidad de estas estructuras en las ligninas varía principalmente debido al tratamiento de obtención que se efectuó para su aislamiento. De una manera general se encuentra la siguiente abundancia [Li *et al.*, 2009], presentado en la tabla 1.

Tabla 1. Abundancia de los monolignoles.

p-Coumarol (%)	Coniferol (%)	Sinapol (%)
-----------------------	----------------------	--------------------

Gimnospermas	0.0-10	60-98	30-60
Angiospermas	0.0-15	10-60	35-90
Gramíneas	0.0-13	10-66	21-90

La cantidad de los tipos enlaces en alguna lignina específica y su porcentaje de abundancia es debido a su estructura y a su origen, variando además por el método de obtención utilizado [Rencoret, 2009].

Los troncos maderables de angiospermas y gimnospermas contienen entre el 15-36% de lignina en masa anhidra. La lignina de plantas superiores se encuentran predominadas por dos tipos de estructuras: lignina tipo guayacil o guayacilo, fracción tipo G, (fracción 4-hidroxi-3-metoxifenilo) proveniente del alcohol coniferílico (G) y la lignina tipo siringil-guayacil(G-GS), que es la unión de estructuras tipo guayacilo con estructuras tipo siringilo GS (fracción 4-hidroxi-3,5 dimetoxifenilo) proveniente del alcohol sinapílico [Sjöström, 1998].

La lignina guayacil es el mayor componente de la lignina proveniente de las gimnospermas (coníferas). Las angiospermas contienen la lignina característica de las maderas duras que se produce por la polimerización del alcohol coniferílico y del alcohol sinapílico (lignina guayacil-siringil). La lignina normal contiene pequeñas cantidades de un tercer componente de lignina, es la lignina para-hidroxifenilo (H), derivada del alcohol para-coumarílico, mientras que en gramíneas y en madera de compresión de gimnospermas, el componente más abundante es este tercer tipo de estructura el para-hidroxifenilpropano [Sarkanem, 1971].

Las ligninas nativas o también conocidas como protoligninas, son aquellas que pueden ser encontradas en la madera del árbol en pie y que no se conoce exactamente su estructura, ya que al aplicarles un proceso de obtención sufren una descomposición ó fractura de sus enlaces. Por lo tanto, se conoce sólo hasta el momento la composición aproximada de este tipo de estructuras (Tabla 2).

Tabla 2. Abundancia de enlaces en las protoligninas [Sjöström, 1998].

TIPO DE ENLACE	LIGNINA DE	LIGNINA DE
	GIMNOSPERMAS	ANGIOSPERMAS
	(%)	(%)
β -aril-éter	35	45
β -5	9	4
β - β	3-4	7
β -O4 con α -O4	8	4
β -1	3	5
Arilo carbonilo compuesto	9	5
Gliceraldehido 2-aril éter	1-2	2
Unidades de alcohol cinámico	1-2	1-2
Unidades de aril glicerol	2	3
Grupos carboxilo	4	4
Unidades con la cadena reducida	2	1
Unidades de quinona	3	3
Unidades con el enlace C-6 o C-2	3	3

La mayoría de los datos (tabla 2) son recopilados del estudio en muestras de ligninas aisladas. De una manera general se puede fácilmente observar que las unidades guayacilo predominan fuertemente en las ligninas de gimnospermas. Mientras que en las ligninas que provienen de angiospermas, se encuentran cantidades similares de guayacilo y siringilo. Es muy probable que en los procesos de obtención influyan sobre el contenido en los tipos de enlace, pero en general los enlaces más frecuentes son β -O-4, β -5 y β - β [Sjöström, 1998].

I.5.2 LIGNINA COMO ADHESIVO

Se estima que la biosfera contiene 3×10^{11} toneladas de lignina y produce anualmente 2×10^{10} toneladas [Biermann, 1993]. La producción de lignina disuelta es alrededor de 50 millones de toneladas anuales y proviene de los procesos de fabricación de pasta para papel, esta lignina es utilizada como combustible para generar energía al mismo proceso [Hu, 2002]. Mientras que la lignina ofrece perspectivas más interesantes y de mayor valor agregado por ser un producto natural renovable.

Gracias a sus propiedades, las ligninas son de gran utilidad en aplicaciones funcionales como: adhesivos para madera, estabilizadores UV y agentes colorantes simultáneos, ó también como un agregado en la durabilidad de la madera. Para todas estas aplicaciones, se necesita una modificación química de su estructura [Dam *et al.*, 2000].

Las ligninas se consideran productos de deshecho en la industria de celulosa y papel, sobre todo en los procesos de blanqueo donde la eliminación de la lignina es el principal objetivo [Casey, 1985]. En el caso de las ligninas mecánicas, por ejemplo se presenta una cantidad importante de lignina que se traduce en producto de mala calidad. Estas pastas son solamente utilizadas para la fabricación de papel periódico o directorios telefónicos. El principal uso de la lignina residual o licor negro en la industria de celulosa y papel es como combustible, ya que por su alto poder calorífico se genera la energía necesaria para abastecer el mismo proceso [Clark, 1985], lo cual limita el potencial natural de la lignina como materia prima para producir productos de mayor valor agregado. Actualmente se trabaja en el aislamiento efectivo y en el desarrollo de nuevos usos para tal volumen de deshecho en estas industrias [Summit y Sliker, 1980].

Como se mencionó anteriormente, la extracción y la caracterización de las ligninas son procesos difíciles de obtener [Biermann, 1996]. Pero la lignina es un producto primordial en la industria forestal, con gran capacidad para ser utilizada aumentando su valor agregado [Britt, 1970].

Trabajos recientes han formulado adhesivos a partir de lignina y/o mezclas de la misma con el fin de desplazar los agentes tóxicos del mercado. Por ejemplo se han hecho estudios tratando a la lignina en un medio alcalino y haciéndola reaccionar con un aldehído no tóxico y no volátil como es el

glioxal para remplazar el formaldehído [Mansouri, 2007]. Los tableros fabricados bajo esta metodología cubren perfectamente las normas y estándares internacionales para las especificaciones de paneles exteriores [Mansouri, 2007].

Los más recientes estudios de modificación de la lignina para la producción de nuevos materiales compuestos son los siguientes:

1. La polimerización in-situ de la lignina para producir tableros de partículas. El curado del adhesivo a base de lignina está basado en la polimerización oxidativa de la misma usando fenoloxidasas (lacasa) como activador. Estos bioadhesivos basados en lignina pueden ser aplicados en condiciones normales de presión. Los tableros de partículas resultantes cumplen con las especificaciones de las normas alemanas [Argyropoulos *et al.*, 2002].
2. La reacción entre la lignina y los monómeros de acrilato muestran que la copolimerización químico-enzimática ofrece la posibilidad de producir copolímeros lignino-acrilatos definidos. Este sistema permite controlar el peso molecular de los productos por la catálisis química. Este es un nuevo intento para inducir enzimáticamente cadenas poliméricas en el esqueleto de la lignina, y hacer posible la utilización de la lignina como parte de nuevos materiales ingenieriles [Froass *et al.*, 1996].
3. La lignina nativa o protolignina pudiera ser utilizada como adhesivo por su estructura similar al fenol. Esto sería viable si la lignina no sufriera degradación en su aislamiento, pero por cualquier método utilizado (lignina kraft, lignina organosolv, y otras) se degrada, aún muy ligeramente, por lo cual es necesario darle un tratamiento posterior y poder llegar a su estructura fenólica. Una vez que se tiene este tratamiento, es decir su modificación, ya sea por reacción de condensación en la lignina por calor ó ácidos minerales, la lignina no llega a ser tan eficaz como las resinas sintéticas [Pizzi, 1994]. Existen formulaciones lignina-fenol en la fabricación de tableros de partículas, en tableros de fibras y en tableros de madera contrachapada.

Es conocido que las resinas derivadas de fenol-formaldehído (PF), actúan de manera covalente con la celulosa para formar los enlaces con el tejido leñoso [Drumm y Le Blanc 1972]. Actualmente las resinas de PF son producidas en gran escala como adhesivos y como recubrimientos para madera. Estudios químico-cuánticos y experimentales [Hatfield y Mariel, 1987], muestran la alta

capacidad adhesiva en resinas de PF debido a la facilidad de rotación del grupo metileno y del hidroxilo para la formación de puentes de hidrógeno.

El desarrollo de los adhesivos para madera a base de ligninas modificadas, en sustitución de PF no se ha podido desarrollar completamente en el ámbito industrial y hasta la fecha se siguen haciendo ensayos en laboratorios y plantas piloto.

I.5.3 ANÁLISIS DE LIGNINAS POR MODELADO MOLECULAR

Los estudios de modelado molecular o de simulación molecular de las ligninas y lignanos se realizaron para su elucidación estructural [Hammel y Moen, 1991] y para la determinación de la abundancia en sus diferentes tipos de enlace durante la polimerización [Kirk *et al.*, 1975]. Recientemente, se ha hecho estudios sobre los precursores de la lignina para caracterizar su reactividad intrínseca en el proceso de lignificación [Martinez *et al.*, 2009]. Estos muestran la presencia de los enlaces más favorecidos en la dimerización y muestran la estabilidad como radicales libres en el proceso de lignificación. En general, el diseño y la simulación molecular son necesarios para obtener polímeros y composites con un rendimiento superior al habitual. De hecho, estas herramientas permiten percibir el comportamiento de los elementos a unir y sus efectos en la mezcla, ya que por medio de la simulación se predice el mejoramiento de los productos.

Como un complemento a las técnicas experimentales, los métodos computacionales aparecen como herramientas que ayudan a obtener nuevos datos en la descripción de la estructura tridimensional de la lignina y su asociación con los componentes de la pared celular. Sin embargo, observando la complejidad de la estructura de la lignina, parece ser necesario adoptar paso a paso su modelado molecular.

En el ámbito de la simulación molecular, el « anclaje molecular » es un método que predice la orientación preferente del enlace entre dos moléculas para formar un complejo estable [Wei *et al.*,

2004]. El conocimiento de la orientación preferente puede ser utilizado para predecir la afinidad de asociación o de enlace entre dos moléculas [Kitchen *et al.*, 2004]. El anclaje molecular puede ser abordado como la siguiente analogía de la “cerradura-llave”, donde lo interesante es encontrar la orientación correcta de la llave para poder abrir la cerradura. En esta metáfora, un sustrato de celulosa tendría la función de la cerradura y un lignano sería la llave; el anclaje molecular definirá la optimización del problema, describiendo la mejor orientación del lignano unido al sustrato de celulosa para este caso particular. El objetivo del anclaje molecular es obtener la conformación de un lignano sobre el sustrato de celulosa y su orientación relativa, de forma que la energía libre de todo el sistema sea mínima.

El anclaje molecular permite proponer un esquema de reactividad de una estructura y/o abordar una propiedad que se desee promover. Los polímeros desarrollados por química computacional, en el dominio de la teoría físico-química, mejoran de los procesos de síntesis gracias a la disminución de tiempos de trabajo y de costos en reactivos. Además que la química computacional describe el comportamiento del producto a nivel de estructura electrónica y molecular [Pearson, 1963], necesarios para la determinación e interpretación de las energías de interacción.

CAPÍTULO II. MATERIALES Y MÉTODOS

Para la realización de este trabajo, y conseguir los objetivos especificados, se adoptó una metodología dividida en dos fases. Una parte teórica, en la cual se determinaron las energías de acoplamiento sobre un sustrato de celulosa; una segunda parte que comprende a la fase experimental, en la cual se midió las energías de enlace en el laboratorio por el análisis termomecánico (TMA). Esta metodología se ilustra en la figura 3.

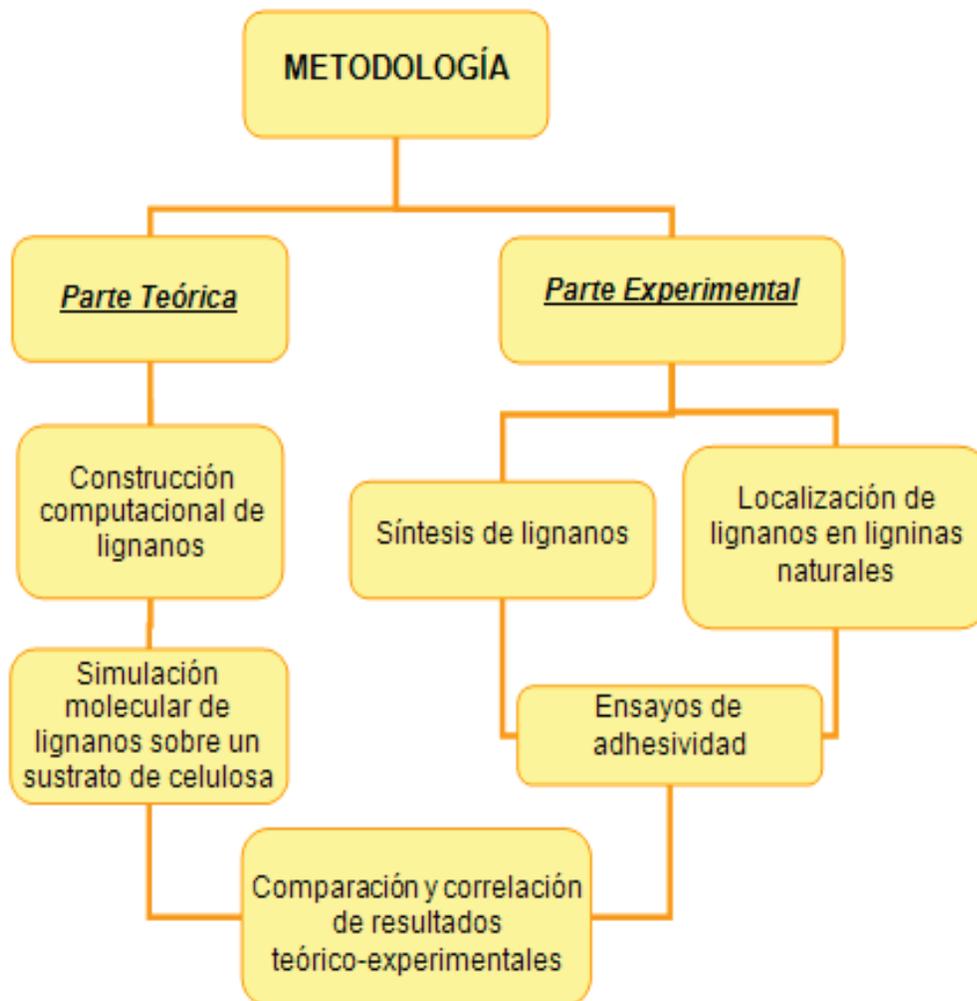


Figura 3. Diagrama de la metodología.

II.1 PARTE TEÓRICA

Autodock [Morris, *et al.* 1998] es una herramienta de modelado molecular que se utilizó en este estudio. Este software predice la interacción entre una molécula pequeña o también conocido como ligando sobre una macromolécula ó receptor. El procedimiento consiste en encontrar la energía de interacción entre los dos y explorar todos los grados de libertad disponibles para el ligando. Para representar este estudio específico, la molécula pequeña está representada por un lignano de dos o tres unidades de acuerdo al caso y la macromolécula por el sustrato de celulosa. Autodock mide la energía libre del sistema (lignano-sustrato) para una función que esta basada en análisis de regresión lineal, con el campo de fuerza AMBER (siglas en inglés de *Assisted Model Building with Energy Refinement*) [Cornell *et al.*, 1995], y una gran base de datos de complejos proteína-ligando con constantes conocidas.

El estudio teórico fue realizado con el software Autodock versión 4.2 de licencia gratuita [Morris *et al.*, 2009] mientras que la visualización fue efectuada con MGL TOOLS, versión 1.5.4 [Sanner, 1999]. La construcción de los lignanos fue realizado con ADC/ChemSketch versión 12.0 en ambiente Linux.

II.1.1 SIMULACIÓN MOLECULAR

La mayoría de los estudios teóricos sufren una comparación crítica y extensiva contra los datos experimentales obtenidos para la caracterización de una estructura [Elder *et al.* 1988].

Generalmente los datos adquiridos experimentalmente corresponden a la conformación congelada de un sólido cristalino o al promedio de la conformación característica de una solución [Faulon y Hatcher, 1994]. Los datos de la difracción de cristales provienen ambiguamente de coordenadas atómicas de una conformación congelada [Houtman y Atalla, 1995].

La interpretación de los datos de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) generalmente es difícil y requiere de ayuda del modelado molecular, ya que la conformación promedio directamente extraída de los datos de RMN pudiera no tener significancia física. Por lo tanto, como complemento a los datos experimentales; el modelado molecular, da una imagen exhaustiva y estadística de las preferencias conformacionales para definir la mejor familia de conformeros de la estructura en consideración [Simon y Eriksson, 1998].

Los cálculos de Autodock comprenden tres etapas:

(1) etapa de preparación para el sustrato y el ligando, donde hay información de átomos de hidrógenos polares, los cuales comprenden cargas parciales atómicas y de tipos de átomos, pero también de grados de libertad en los enlaces de torsión;

(2) cálculo en las propiedades atómicas, la cual es una evaluación de energía rápida que se realiza por el cálculo de las afinidades atómicas para cada átomo del ligando;

(3) el anclaje o acoplamiento molecular, el cual mide la energía libre por métodos semi-empíricos que son técnicas de resolución de sistemas con muchos electrones con la ecuación de Schrödinger [Serway *et al.*, 2004] y que utiliza base de datos que se ajustan sobre los resultados experimentales con el fin de simplificar los cálculos. La dificultad de los cálculos es debido a las integrales bioelectrónicas para la resolución del proceso.

Autodock utiliza los datos de cálculos semi-empíricos para evaluar el campo de fuerza electrostático durante las simulaciones moleculares. El campo de fuerza molecular esta parametrizado utilizando un gran numero de complejo proteína-inhibidor con constantes K_i , conocidas [Morris *et al.*, 2007].

La evaluación del campo de fuerza electrostático se efectúa en dos etapas. El principio, el lignano y el sustrato se encuentran en una posición alejada. En la primera etapa, la energía intermolecular evalúa la transición del estado alejado hasta que llega al estado donde las dos moléculas están unidas. La segunda etapa estima entonces las energías moleculares entre el lignano y el sustrato, por lo tanto también sus conformaciones.

El campo de fuerza electrostático incluye seis evaluaciones (V) que corresponden a la posición relativa del lignano-sustrato; y una estimación de la entropía perdida en el enlace de los conformeros (ΔS_{conf}), como se expresa en la formula (1).

$$\Delta G = (V_{\text{bound}}^{\text{L-L}} - V_{\text{unbound}}^{\text{L-L}}) + (V_{\text{bound}}^{\text{P-P}} - V_{\text{unbound}}^{\text{P-P}}) + (V_{\text{bound}}^{\text{P-L}} - V_{\text{unbound}}^{\text{P-L}} + \Delta S_{\text{conf}}) \quad (1)$$

Donde L es el "lignano" y P es el "sustrato" para el cálculo específico. Cada término de energía incluye las evaluaciones de dispersión/repulsión, el puente de hidrógeno, la energía electrostática y de solvatación:

$$V = W_{\text{vdw}} \sum_{i,j} [(A_{ij}/r_{ij}^{12}) - (B_{ij}/r_{ij}^6)] + W_{\text{hbond}} \sum_{i,j} E(t) [(C_{ij}/r_{ij}^{12}) - (D_{ij}/r_{ij}^{10})] + W_{\text{elec}} \sum_{i,j} [q_i q_j / \epsilon(r_{ij}) r_{ij}] + W_{\text{sol}} \sum_{i,j} (S_i V_j + S_j V_i) e \quad (2)$$

Las constantes W están basadas en un grupo de constantes determinadas experimentalmente. El primer término es un potencial electrostático típico 6/12 para las interacciones de atracción y repulsión. Los parámetros están basados en el campo de fuerza de AMBER.

La segunda expresión es un término direccional de puentes de hidrógeno basado sobre un potencial electrostático 10/12 [Wei *et al.*, 2004]. Los parámetros C y D son asignados para dar una máxima exactitud de cálculo de 5 kcal/mol a 1.9 Å para los puentes de hidrógeno con el oxígeno y el nitrógeno, y también con una exactitud de 1 kcal/mol a 2.5 Å para los puentes de hidrogeno con el azufre. La función E (t) provee la geometría direccional basada sobre el ángulo (t) de un puente de hidrógeno.

El tercer término representa el campo eléctrico para las cargas electrostáticas. Esta expresión es un potencial de solvatación que se basa en el volumen (V), que ocupan los átomos y en el potencial electrostático de un átomo dado, rodeado por el solvente se mide por el parámetro de solvatación (S) y el término del potencial con el factor de la masa molecular, $\sigma=3.5 \text{ \AA}$ [Huey, *et al.* 2004].

Para explicar la nomenclatura empleada en el análisis de las ligninas se utilizó unidades de lignina y/o partes monoméricas de la misma: La fracción tipo H (fracción fenilo); fracción tipo G, (fracción 4-hidroxi-3-metoxifenilo); y fracción tipo GS (fracción 4-hidroxi-3,5 dimetoxifenilo). Por ejemplo, el trímero G $_{\beta}$ O4_G $_{\beta}$ G tiene dos unidades de fracción tipo G que son enlazadas por enlace tipo β -O-4 y el tercer monómero enlazado con enlace tipo β - β . Este enlace está representado en la figura 4.

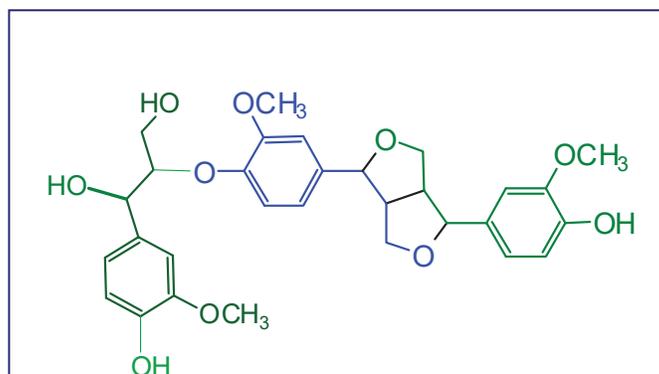


Figura 4. Representación del enlace G $_{\beta}$ O4_G $_{\beta}$ G

II.2 PARTE EXPERIMENTAL

La parte experimental se realizó siguiendo dos estrategias para la obtención de los lignanos. Primeramente, se trabajó en la obtención de los lignanos a partir de dos de los tres precursores más abundantes en la lignina y se procedió a separarlos. Como segunda estrategia se localizaron lignanos de dos y tres unidades en ligninas de diferente procedencia. Posteriormente se midió la resistencia adhesiva de estas estructuras sobre una capa de celulosa.

II.2.1 LIGNANOS SINTÉTICOS

Los reactivos utilizados para la reacción de polimerización son los siguientes: alcohol coniferílico [(4-hidroxi-3-metoxifenilo) sólido incoloro, PM 210.226 gr/mol, punto de fusión 61-65°]; alcohol sinapílico [(4-hidroxi-3,5 dimetoxifenilo), PM 180.20 gr/mol, punto de fusión 74°], acetato de cobre II, monohidratado (98+%), acetato de manganeso III, di-hidratado (97%) y el buffer borax (Na₂B₄O₇·10H₂O) que se obtuvieron de la compañía Aldrich Chemical.

Los espectros de resonancia magnética nuclear de protón (RMN-¹H) fueron analizados a 400.17 MHz con la ayuda de un espectrómetro BRUKER Avance400. La señal se acumuló 32 veces. El ángulo de pulso fue de 90°, mientras que el tiempo de retención fue de 6.4 μs, 4 s y 10 s. El tiempo de retención fue suficientemente largo para atenuar los efectos de relajación del espín buscado de los protones en la molécula. Se utilizó acetona deuterada para disolver la muestra y para calibrar el espectro.

Los espectros de resonancia magnética nuclear de carbono (RMN-¹³C) fueron analizados a 100.6 MHz con la ayuda de un espectrómetro BRUKER Avance400. La señal se acumuló 12000 veces. El ángulo de pulso fue de 90°, mientras que el tiempo de retención fue de 7.3 μs, 1.4 s y 2 s. Se utilizó acetona deuterada para disolver la muestra y para calibrar el espectro.

Para las separaciones cromatográficas se utilizaron cromatofolios de Silicagel 60 F230, utilizando como fase móvil diclorometano-metanol en diferentes proporciones y luz ultravioleta (UV) como revelador.

II.2.1.1 REACCIÓN DE SÍNTESIS

La reacción de polimerización comenzó a partir de monolignoles con cantidades equimolares de dos monolignoles precursores de la lignina (0.14 mmol), con la finalidad de promover la formación igual y combinada de alcohol coniferílico y alcohol sinapílico en dímeros y trímeros. La reacción fue realizada a 100° C con acetato de cobre [Cu(OAc)₂] en un buffer de boro (a pH 9.2) bajo atmósfera de nitrógeno hasta cambio de color (naranja a verde). Posteriormente las sales de cobre fueron eliminadas por filtración. Después, se adicionó ácido acético ó HCl 1M hasta obtener un pH 5, se lavó con acetato de etilo y se obtuvo una suspensión lechosa. Posteriormente el producto se secó con sulfato de magnesio. En seguida, se adicionó metanol para después concentrar hasta obtener una miel amarilla con un rendimiento aproximado del 40% en peso. En la figura 5, se observa el la reacción de síntesis descrita anteriormente así como algunas fotografías de este mismo procedimiento.

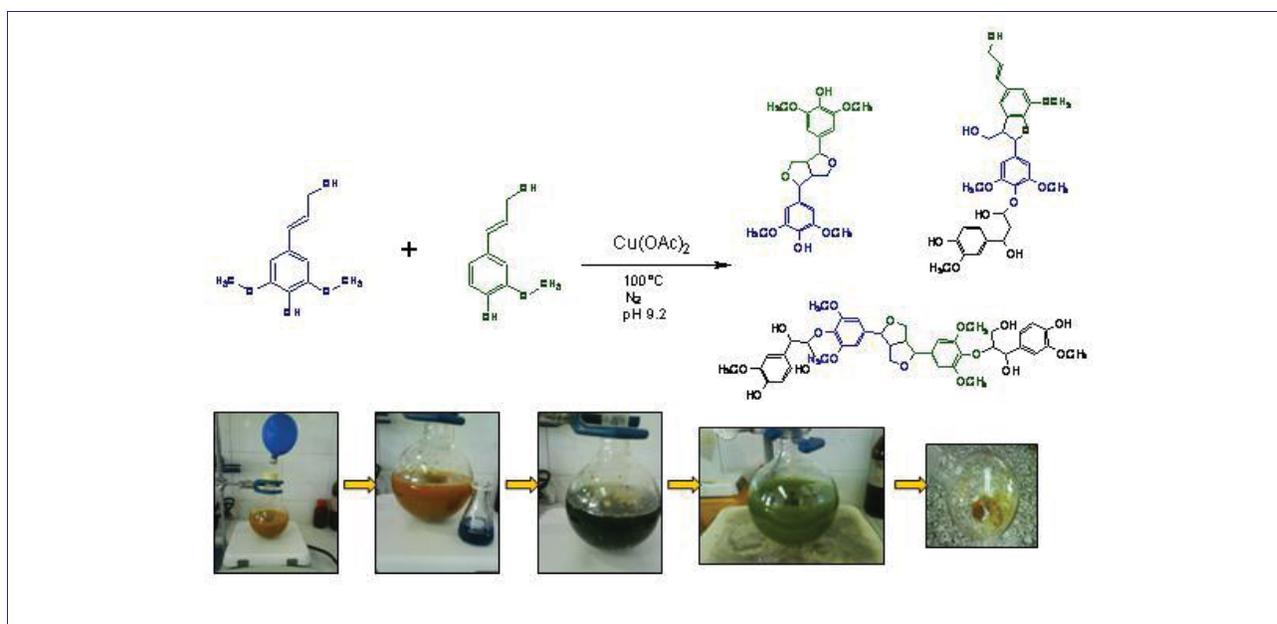


Figura 5. Síntesis de los lignanos.

Esta miel de coloración amarilla ó crudo de reacción, se procesó por la técnica de cromatografía de capa fina (CCF, en ingles TLC para *Thin layer chromatography*) [Landucci, *et al*, 1995], con el fin de separar los componentes (CCF analítica), y purificarlos (CCF preparativa). La cromatografía de capa fina es un método físico de separación de mezclas en sus componentes; el cual está basado en la afinidad a las diferentes sustancias. Este método se define como la separación de una mezcla de dos o más compuestos por distribución entre dos fases, una de las cuales es estacionaria y la otra una fase móvil. Varios tipos de cromatografía son posibles, dependiendo de la naturaleza de las dos fases involucradas: sólido-líquido (capa fina, papel o columna), líquido-líquido y gases-líquido (fase vapor).

Todas las técnicas cromatográficas dependen de la distribución de los componentes de la mezcla entre dos fases inmiscibles: una fase móvil, llamada también activa, que transporta las sustancias que se separan y que progresa en relación con la otra, denominada fase estacionaria. La fase móvil puede ser un líquido o un gas y la estacionaria puede ser un sólido o un líquido. Todos los sólidos finamente pulverizados tienen el poder de adsorber en mayor o menor grado otras sustancias sobre su superficie; y, similarmente, todas las sustancias pueden ser adsorbidas, unas con más facilidad que otras. Este fenómeno de adsorción selectiva es el principio fundamental de la cromatografía [Antonot, 1998].

Cada componente migra a una cierta altura característica de la sustancia buscada, llamada retención frontal (Rf):

$$R_f = \frac{\text{Altura total de la mancha}}{\text{Altura total del solvente}} \quad (3)$$

Donde Rf es un valor adimensional obtenido del cociente de la distancia que recorre la muestra sobre la distancia total que recorre el disolvente. El valor de Rf depende de las condiciones en las cuales se corre la muestra (tipo de adsorbente, disolvente, así como las condiciones de la placa, temperatura y vapor de saturación). Cada mancha corresponde a un componente que se identifica por comparación con su Rf característico de esa sustancia o con estándares. Una sustancia migra a la misma altura en condiciones idénticas de operación por lo tanto mismo valor de Rf.

Después de la identificación y separación de los lignanos se procedió a su análisis y verificación por espectrometría de resonancia magnética nuclear (RMN-¹H y RMN-¹³C). La aplicación de la RMN al análisis estructural se basa principalmente en las correlaciones empíricas de las estructuras con los desplazamientos químicos observados y con las constantes de acoplamiento. Se utilizan tablas para predecir las posiciones de las líneas de resonancia de un compuesto específico por analizar. Tales predicciones se comparan con los resultados obtenidos en el espectro de la muestra. Recíprocamente puede buscarse información o consultar espectros publicados y captar señales correspondientes que coincidan con las posiciones observadas en el espectro.

II.2.2 LIGNINAS NATURALES

El análisis de este estudio se realizó en cuatro ligninas naturales procedentes de diferentes tratamientos con las siguientes especificaciones: (Ln_inde) Protobind 100SA.140 Lignina de la India, donada por Granit ® Lignin; (Ln_miscantus) lignina miscantus, obtenida por el proceso organosolv; (Ln_inde_depo) lignina de la India que fue depolimerizada y (Ln_CO2) LN-T-CO2-1 lignina, donada por el organismo FCBA obtenida del proceso kraft (licor negro), respectivamente como se muestran en la figura 6. En la misma figura, la imagen izquierda muestra las ligninas en polvo tal como se obtienen del proceso, en la imagen derecha se muestra las ligninas disueltas, es decir a pH 12.



Figura 6. Ligninas de origen natural.

Los espectros de MALDI-TOF resultado del análisis en las ligninas naturales fueron realizados en un equipo Kratos Kompact MALDI 4, Shimadzu Corporation, en Alemania. La fuente de irradiación fue un láser de nitrógeno con una longitud de onda de 337 nm. Las medidas fueron llevadas a las siguientes condiciones: una polaridad positiva, un patrón de láser lineal, una aceleración de voltaje de 20 kv y un pulso de 100 a 150 por espectro. La técnica de retención fue con un tiempo de 200-800 ns. Los picos de masa molecular corresponden a la masa molecular más el Na (de abundancia natural). La figura 7 muestra las fotografías del equipo.



Figura 7. Equipo de MALDI-TOF.

Los resultados de Análisis Termo-Mecánico fueron obtenidos por el Analizador Termomecánico. Tipo TC15. METTLER TOLEDO. Con el software de adquisición STAR[®] versión 6.10 1990, presente en la figura 8, el equipo en conexión y una ligera ampliación del analizador de izquierda a derecha respectivamente.

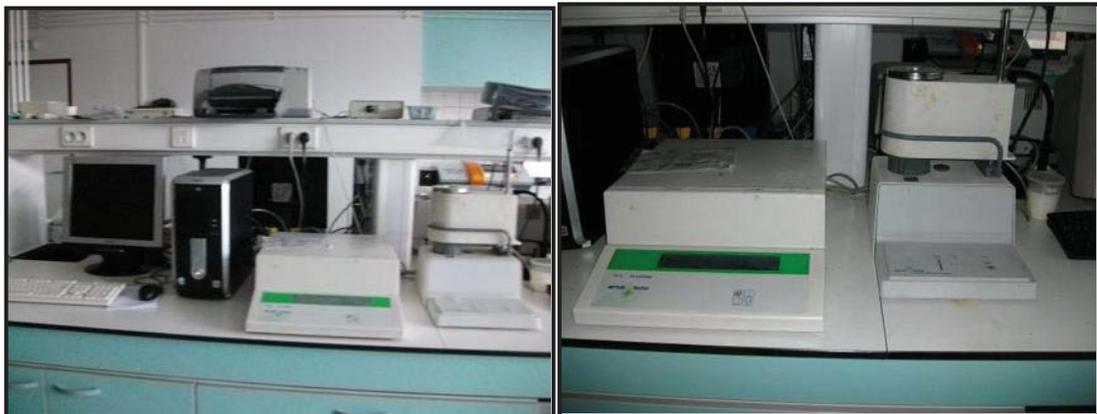


Figura 8. Analizador Termomecánico (TMA)

II.2.2.1 LOCALIZACIÓN DE LIGNANOS POR ESPECTROMETRÍA DE MALDI-TOF

Para la localización de dímeros y trímeros principales de las ligninas naturales, se utilizó la técnica MALDI-TOF. El principio de funcionamiento de esta técnica, se representa en la figura 9.

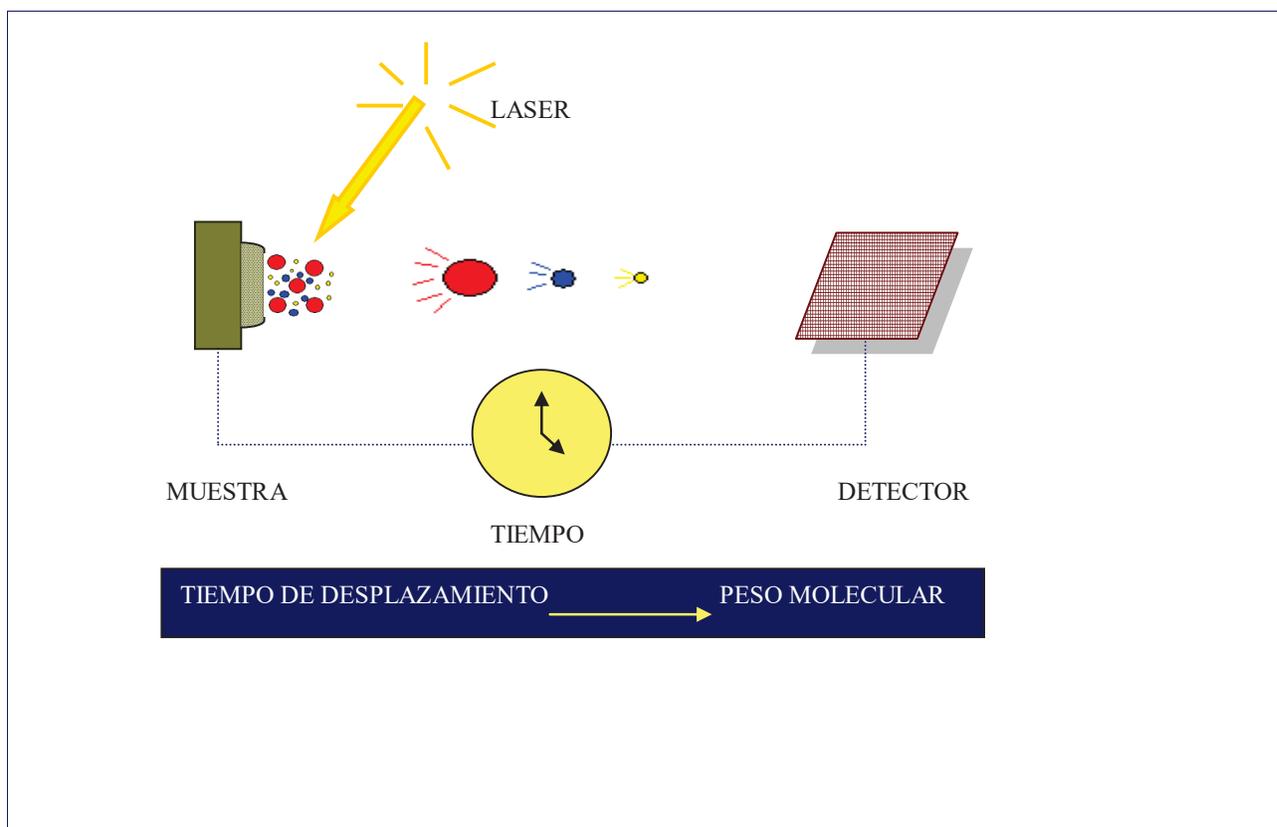


Figura 9. Principio de MALDI-TOF.

Los iones de la estructura problema se separan en el tubo de desplazamiento donde los pequeños iones atravesarán más rápidamente llegando primero al detector y los de gran tamaño llegarán después dado así, a conocer la estructura de la estructura por peso molecular. El láser de desorción-ionización asistido por matriz (en inglés Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation ó MALDI) es una técnica de ionización, donde se utiliza la espectrometría de masas, permitiendo el análisis de biomoléculas (los biopolímeros como las proteínas, los péptidos y los azúcares) y las

macromoléculas orgánicas (como los polímeros, los dendrímeros y otras macromoléculas) que suelen ser frágiles y se fragmentan al ser ionizadas. La ionización es provocada por un as de luz (láser). Se utilizó una matriz para proteger la biomolécula de la destrucción por el as directo y facilitar la vaporización y la ionización.

El tiempo de retención ó la velocidad de desplazamiento de los iones dentro del tubo MALDI permite la determinación de la masa molecular para la cual; el tiempo de desplazamiento es proporcional a la velocidad y aceleración de los iones, el cual es igualmente proporcional a la masa molecular. La medición es calibrada por estándares de masas conocidas [Önnerfjord, 1996].

Para la preparación de la muestra se utilizó el método de gota. Las soluciones acuosas de lignina se prepararon en acetona (4 mg/mL, 50/50 en volumen). Esta solución se mezcló con otra solución de acetona (10 mg/ml en acetona) sobre la matriz. Como la naturaleza de la matriz fue de ácido benzoico 2,5-dihydroxil, se pueden encontrar iones de NaCl dentro de la matriz. Una vez tenidas las soluciones se mezclaron la matriz y la muestra, ambas en solución con las siguientes proporciones: 3 partes de solución matriz, 3 partes de solución del polímero y 1 parte de solución de NaCl. En seguida de 0.5 a 1 μ L de esta solución resultante se colocó sobre la placa en el equipo del MALDI. Después de la evaporación del solvente, la placa del MALDI se introdujo en el espectrómetro.

Para el análisis de MALDI, se utilizó la siguiente simbología: por ejemplo la lignina Ln_CO2 tiene los picos 113 y 181 Da. Las fracciones H_{FRACTION} y GS_{FRACTION} corresponden a los fragmentos de un monómero de tipo H y de un monómero de tipo GS respectivamente, donde los valores calculados de masa molecular son $93+23$ (Na +) Da = 117 Da y $152+23$ (Na +) Da = 181 Da. Estos valores corresponden a los picos 113 y 181 del espectro de MALDI (estructuras I y II de la figura 10).

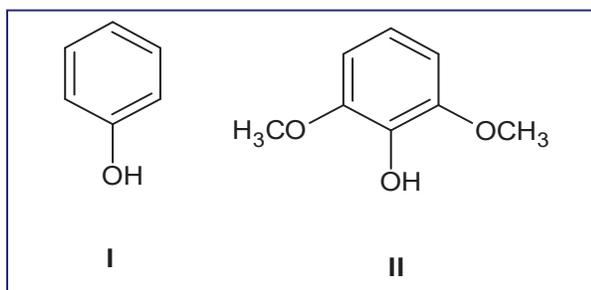


Figura 10. Estructura de dos fragmentos de lignina.

De la misma manera un ejemplo de dímero H+GS (376-378 Da) corresponde a $360+23$ (Na +) Da = 383 Da y a la estructura III en la figura 11. Donde la unidad tipo H y tipo GS puede ser unida con el enlace más común β -O-4 o con otro tipo de enlace [Fengel y Wegener, 1984]. De la misma manera es el caso del dímero indicado como G+GS_{FRACTION} con su pico en 360 Da y su masa molecular calculada de $337 + 23$ (Na +) Da = 356 Da que corresponde a la estructura IV mostrada en la misma figura 11.

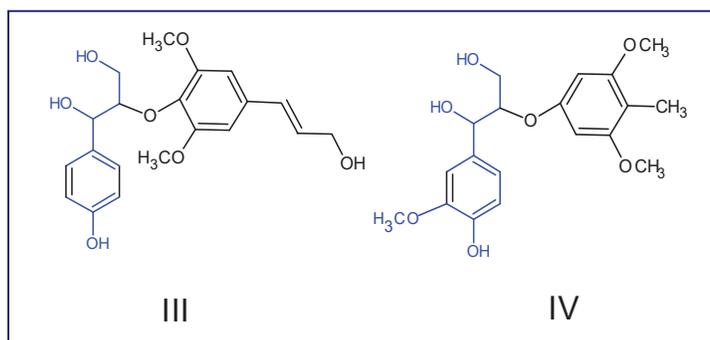


Figura 11. Estructura de dos dímeros en la lignina.

II.2.3 ENSAYO DE ADHESIVIDAD

En la elaboración de las probetas para los ensayos TMA, se utilizó celulosa comercial con un gramaje de 89.62 g/m² a un porcentaje de humedad del 1.53 % determinados por los métodos convencionales. Las dimensiones de las probetas fueron de 14.5 X 5.5 mm, medidas específicas para el equipo y con una variación en el espesor de 0.17 a 0.19 mm.

Las probetas fueron impregnadas por inmersión con lignina en solución a 42 % de sólidos y a un pH de 12. Posteriormente las probetas fueron secadas en estufa a 36°C por 24 horas.

El corte y la colocación de la probeta en el dispositivo de medición a tensión lo muestra la figura 12. La medición de las muestras fue por triplicado en sentido longitudinal sostenida por los dos extremos con dos pequeñas pinzas.

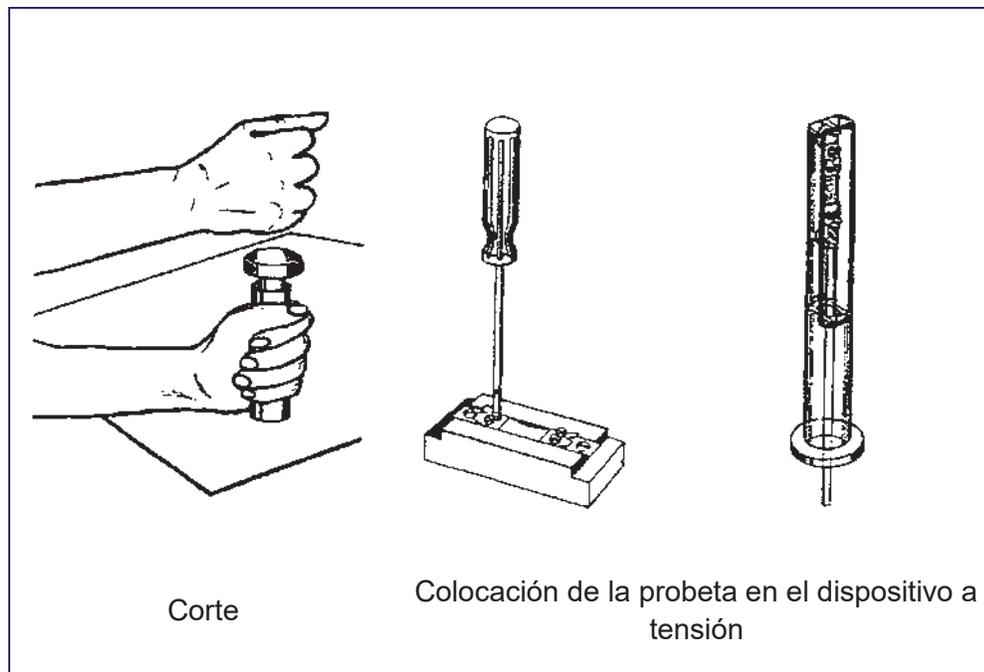


Figura 12. Preparación de la muestra y colocación.

El Análisis Termo-Mecánico (TMA) mide de forma precisa los cambios dimensionales de una muestra en función de la temperatura, del tiempo y de la fuerza constante aplicada [Toledo, 1990], principio de funcionamiento que se representa en la figura 13.

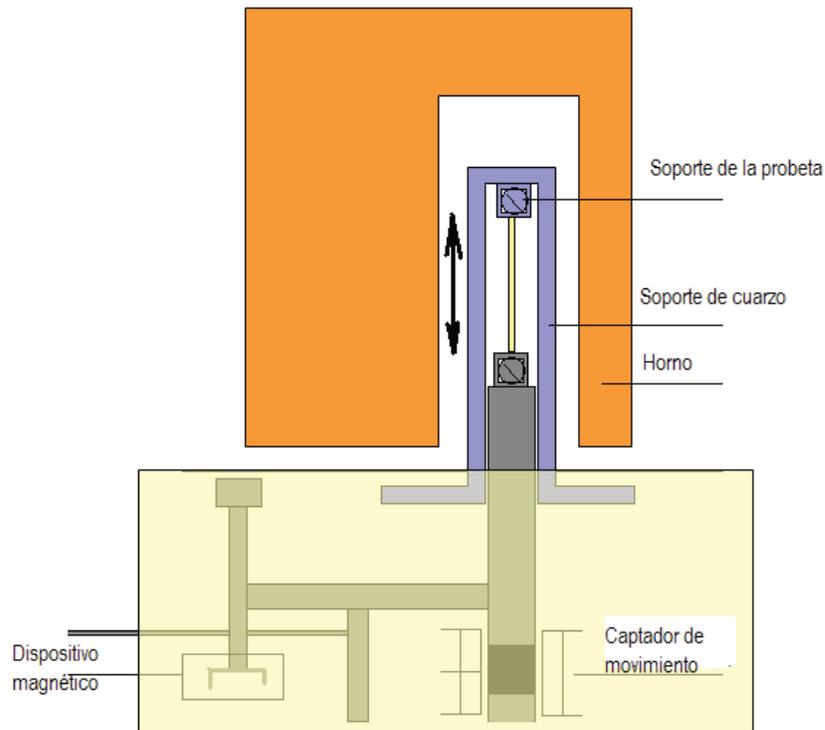


Figura 13. Esquema del principio de funcionamiento del TMA.

En nuestro caso de estudio, se aplicó una fuerza oscilante entre 0,1 y 0,5 N sobre la probeta de celulosa por un periodo de 12 segundos (6s y 6s). La probeta elevó su temperatura gradualmente de 10°C/min comenzando en 25°C hasta llegar a 250 °C.

El método de tensión clásico, utilizado en el análisis de adhesivos para madera, consiste en determinar el módulo de Young (E) de un material a partir de curvas de deflexión que son obtenidas en función de la temperatura. Otro método también muy utilizado es la aplicación de la fórmula directamente en base a los desplazamientos obtenidos en la medición.

El segundo método, antes descrito fue utilizado en este trabajo aplicado la siguiente fórmula en la determinación del módulo de Young:

$$E = \Delta F L_0 / (A \Delta L) \quad (4)$$

Donde:

E: Módulo de Young está expresado en MPa (1MPa = 1N/mm²)

ΔF : Es la diferencia entre las dos fuerzas aplicadas expresadas en N, entonces 0,4 N

L_0 : es la longitud solicitada en tensión longitudinal expresada en mm, es 14,5 mm

A: es la superficie de la probeta, en este caso 5,5 x espesor (mm²)

ΔL : es la deflexión medida (mm)

A partir de esta presentación gráfica del módulo de Young en función de la temperatura, se determinó la fuerza máxima para cada una de las ligninas en comparación a una referencia, para este caso en particular se utilizó papel sin lignina.

CAPITULO III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

III.1 SIMULACIÓN MOLECULAR

En la simulación molecular las energías más negativas significan un mayor acoplamiento en el sistema. Los resultados de las energías de acoplamiento se presentan en la tabla 3. Donde se observa claramente que una molécula con una masa molecular mayor presenta un valor más alto en la energía de acoplamiento. Un trímero, por ejemplo presenta mayor energía de acoplamiento que un dímero.

También se puede observar que el tipo de enlace tiene influencia en el valor de la energía: por ejemplo, el dímero compuesto por dos unidades tipo G, presenta energías de acoplamiento en orden decreciente para los enlaces β O4, α - β , β -5 y $\beta\beta$, respectivamente. Lo mismo sucede para la estructura compuesta por dos unidades tipo GS.

Tabla 3. Resultados de la energía de acoplamiento.

Lignano	ADT 42 (Kcal/mol)
G_βO4_GS_ββ_GS_βO4_G	-10,21
GS_βO4_GS_ββ_GS	-9,67
G_β5_G_γβ_GS	-9,32
G_βO4_GS_ββ_GS	-9,28
G_βO4_GS_β5_G	-9,24
G_β5_G_γβ_G	-8,91
G_βO4_G_β5_G	-8,85
GS_βO4_G	-8,71
GS_βO4_GS	-8,32
G_βO4_G	-8,05
G_ββ_GS	-7,69
G_αβ_G	-7,63
G_βO4_GS	-7,58
GS_β5_G	-7,55
G_γβ_G	-7,50
GS_αβ_GS	-7,30
G_β5_G	-7,10
G_ββ_G	-7,08
GS_ββ_GS	-5,70

La figura 14 muestra las etapas del proceso de acoplamiento de un trímero sobre la superficie de celulosa cristalina. La figura 14 (a) y (b) muestra la posición inicial del lignano con respecto a la celulosa cristalina, donde esta distancia de interacción entre las dos estructuras es muy pequeña y se considera sin importancia, por lo cual se toma como referencia de estado inicial. Después, en el proceso de acoplamiento, el lignano se aproximó a la superficie de celulosa y éste cambió su conformación para adaptarse a la superficie de celulosa y reducir al mínimo la energía total del sistema, mostrada en la figura 14 (c), donde también muestra la posición final del trímero con respecto al bloque de celulosa cristalina y los puentes de hidrogeno que se generan en el enlace, representados por puntos amarillos. Finalmente la figura 14 (d) presenta la vista de perspectiva en sólido de este acoplamiento.

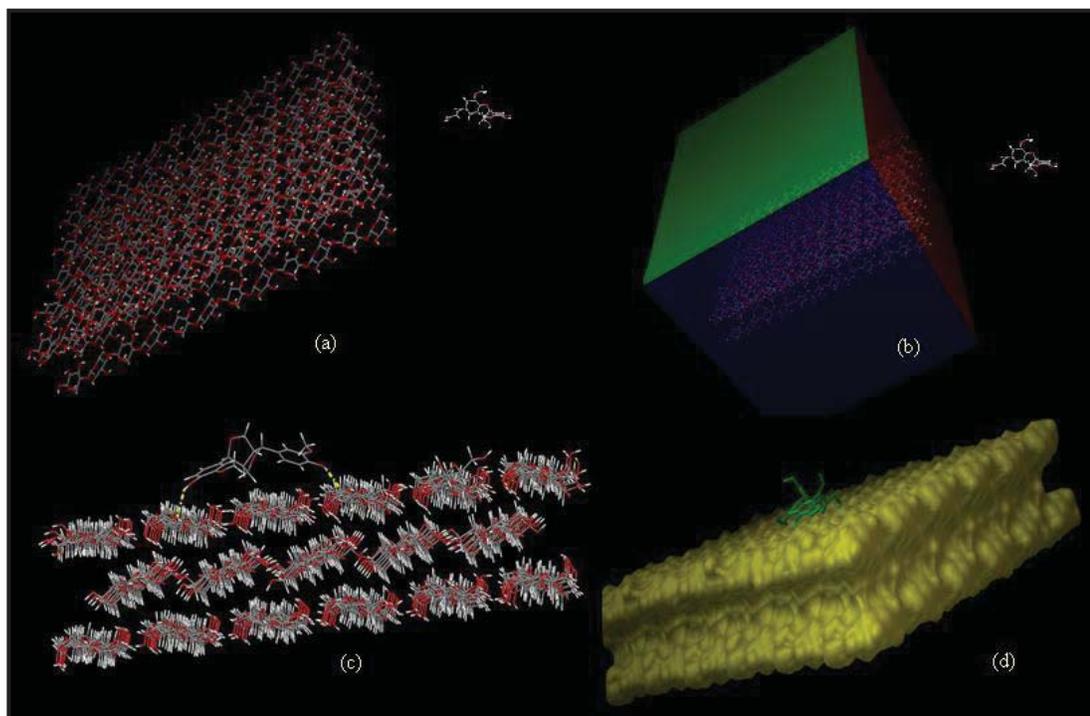


Figura 14. Simulación molecular: (a) Etapa de preparación, (b) Cálculo de las propiedades atómicas, (c) y (d)acoplamiento molecular.

La figura 15 muestra una ampliación del trímero sobre la superficie de celulosa en su posición mas favorable por el acoplamiento estructural y los puentes de hidrogeno que intervienen en el enlace (representado por puntos amarillos).

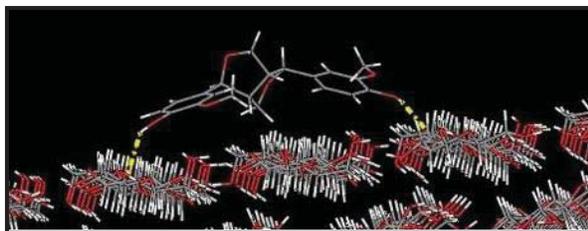


Figura 15. Posición final de acoplamiento de un trímero.

III.2 SÍNTESIS DE LIGNANOS

El resultado de la síntesis fue un crudo de reacción consistencia miel de coloración amarilla, con un rendimiento aproximado del 40% en peso. Esta mezcla de compuestos se hizo correr sobre CCF analítica para elucidar la cantidad de estructuras presentes. Los dímeros y trímeros localizados se muestran en la figura 16, con base a sus Rfs obtenidos por medición y comparación con la referencia publicada por Landucci [Landucci, 1995].

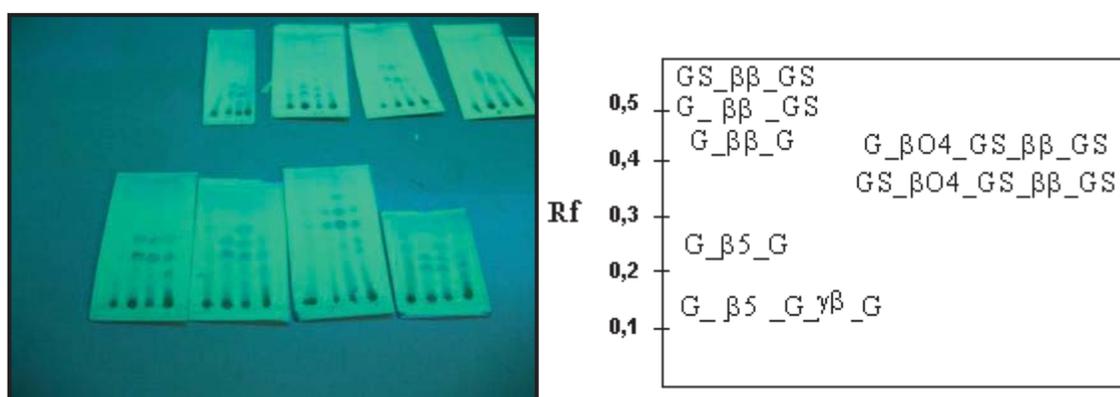


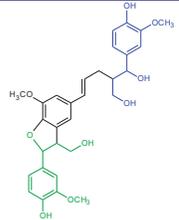
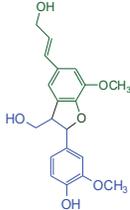
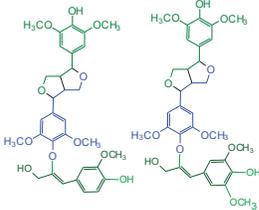
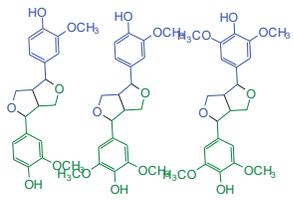
Figura 16. Productos de polimerización.

Posteriormente, se hizo una comparación de estos valores con los resultados del acoplamiento molecular que se obtuvieron para las mismas estructuras. Los lignanos localizados por este método están en la tabla 4, donde se muestra la siguiente relación: Una molécula con un valor mayor de Rf presenta menor fuerza de adhesión a la placa, por consecuencia menor energía de enlace. Esta tendencia que se observa ligeramente con sus valores obtenidos por acoplamiento molecular. Recordando que la afinidad adherente en las moléculas siempre dependerá del sustrato en estudio. Esta misma relación, ya se ha utilizado para estructuras de PF [Freeman, 1954], en las cuales esta tenencia se mantiene.

Para dímeros de PF orto y para, existe una correlación porcentual de los resultados obtenidos por CCF de papel y mecánica molecular [Pizzi y Sousa, 1992]. En nuestro caso, no hay una clara correlación de porcentaje entre las dos técnicas usadas, pero se sigue observando

que entre los dos tipos de enlace predominante (β -5 y β - β), el enlace tipo β -5 presenta mayor energía de adhesión, cuando éste se presenta tanto en dímeros como en trímeros.

Tabla 4. Correlación entre los valores de Rfs y las energías teóricas calculadas.

RFs	ADT 42		LIGNANO	
	(Kcal/mol)	Denominación	Denominación	Estructura
0,1628	-8,91	G_ β 5_G_ γ β _G		
0,2519	-7,10	G_ β 5_G		
0,39	-9,28	G_ β 04_GS_ β β _GS		
	-9,67	GS_ β 04_GS_ β β _GS		
0,59	-7,08	G_ β β _G		
	-7,69	G_ β β _GS		
	-5,70	GS_ β β _GS		

Una vez ubicados por CCF analítica, se prosiguió a separarlos bajo el mismo método cromatográfico y usando CCF preparativa. Se obtuvieron 2 fracciones, las cuales presentaron tener una consistencia de miel, color amarillo en dos diferentes tonalidades. Estas fracciones se enviaron al análisis de resonancia magnética nuclear de hidrógeno y carbono (RMN- ^1H y RMN- ^{13}C).

El espectro de RMN- ^1H a 400.17 (figura 17) mostró la presencia de los siguientes compuestos aromáticos:

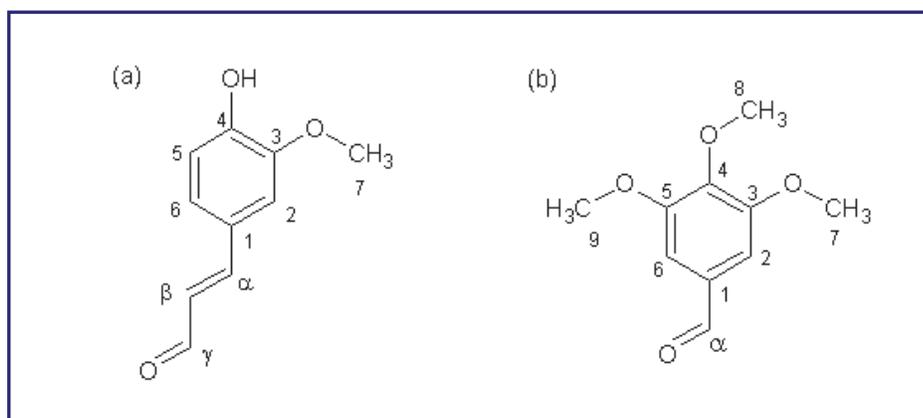


Figura 17. Productos de síntesis (a y b).

Las señales del espectro (figura 18) muestra las señales características del compuesto (a): un tri-sustituido con señal doble en 6.9 ppm $J=8.1\text{Hz}$; doblete en 7.2 ppm $J=1.9\text{ Hz}$ y 8.2 Hz ; doblete en 7.38 ppm $J=1.9\text{ Hz}$. Se observa la presencia de grupos metóxilos (O-CH₃) en 3.9 ppm también como un doble enlace sustituido por un aldehído en 9.6 ppm.

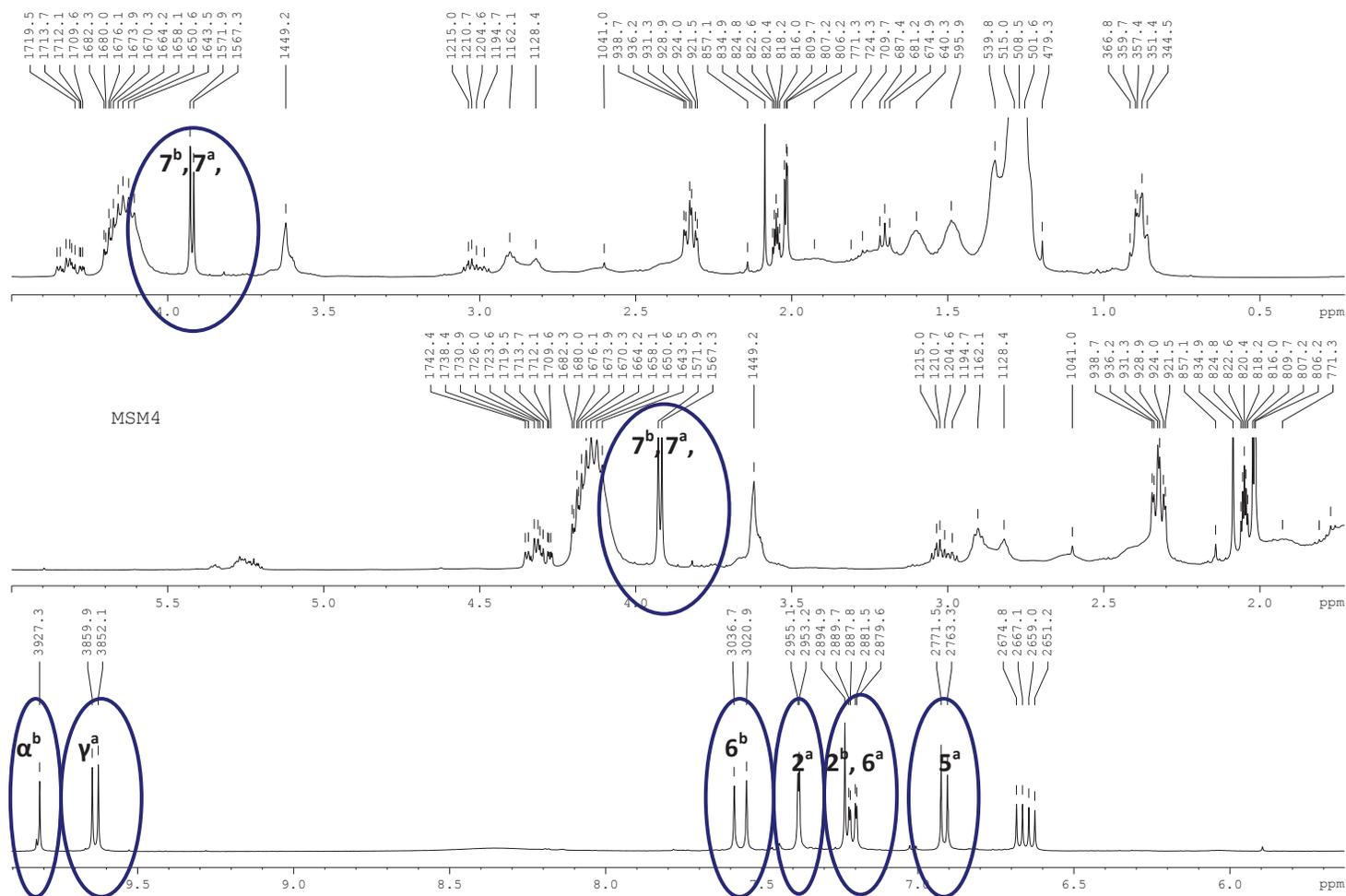


Figura 18. Espectro de RMN-¹H de los productos (a) y (b).

Este mismo espectro (figura 18) muestra la presencia de otro producto aromático (b) que posee un aldehído bajo un singulete (9.8 ppm) así como un protón aromático de integración 2 en 7.23 ppm.

El espectro de RMN-¹³C (figura 19) de las muestras presentan señales de solvente en 216.2 ppm (singulete, CO) y 29.8 ppm (septuplete, CD₃-CO) dos partes distintivas como en los casos de los espectros de los protones. En la parte alifática presentó 4 señales y parte aromática sobre 110-160 ppm se observa ciertas fracciones de protones aromáticos.

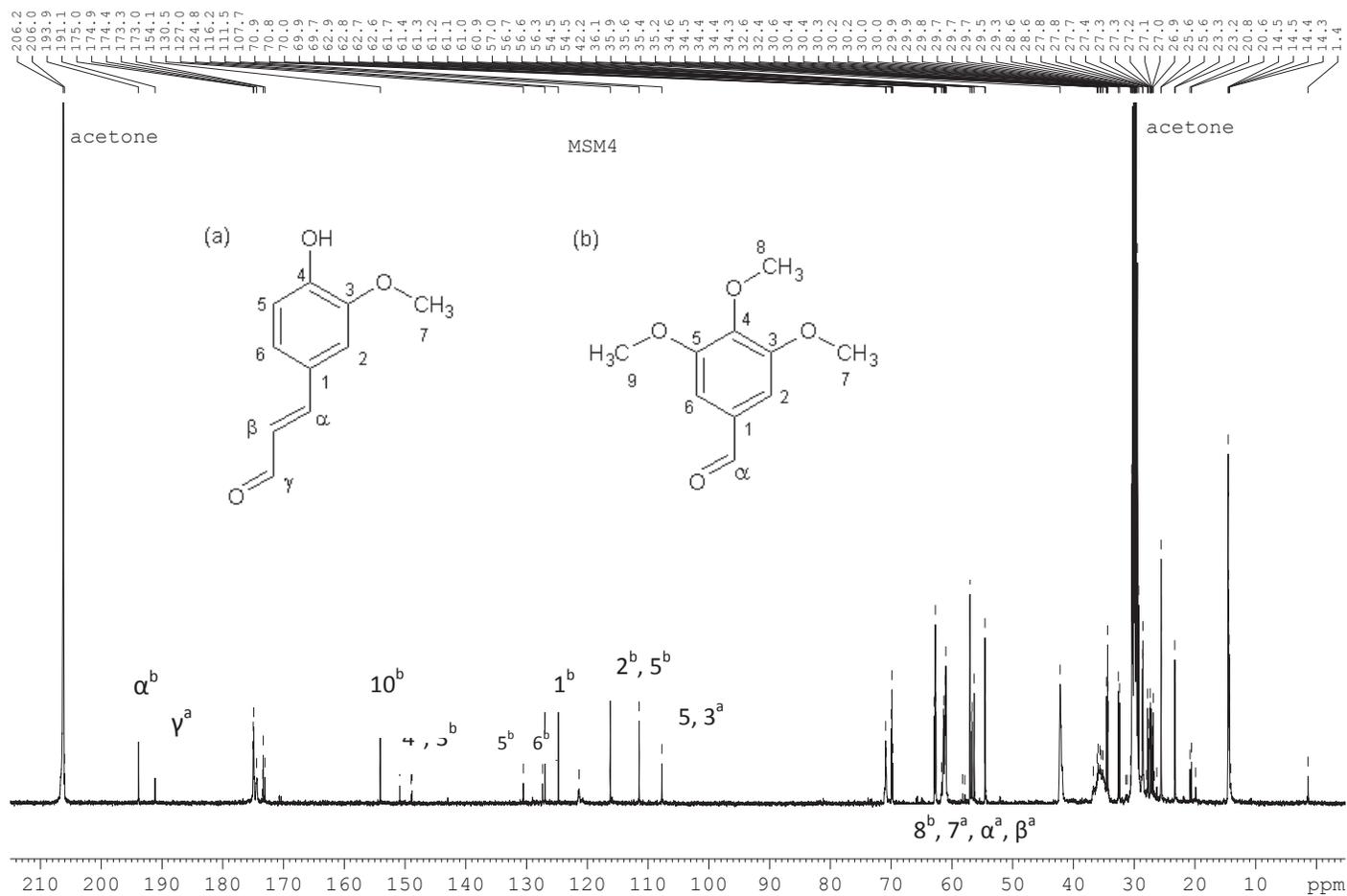


Figura 19. Espectro de RMN-¹³C de los productos (a) y (b).

Un tercer componente (c), representado en la figura 20, se detecto por el espectro de RMN-¹H (figura 21) donde muestra su presencia como un componente aromático trisustituído (protones con doblete en 7 ppm J=8.1Hz; dos protones superpuestos en 7.46 ppm). Uno de los sustituyentes es un aldehído (9.82 ppm), otro es un metóxilo en 3.62 ppm, el último sustituyente es un hidroxilo (señal grande en 8.8 ppm).

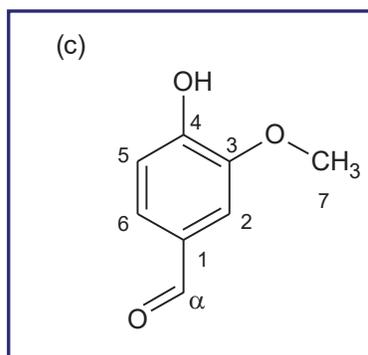


Figura 20. Producto de síntesis (c).

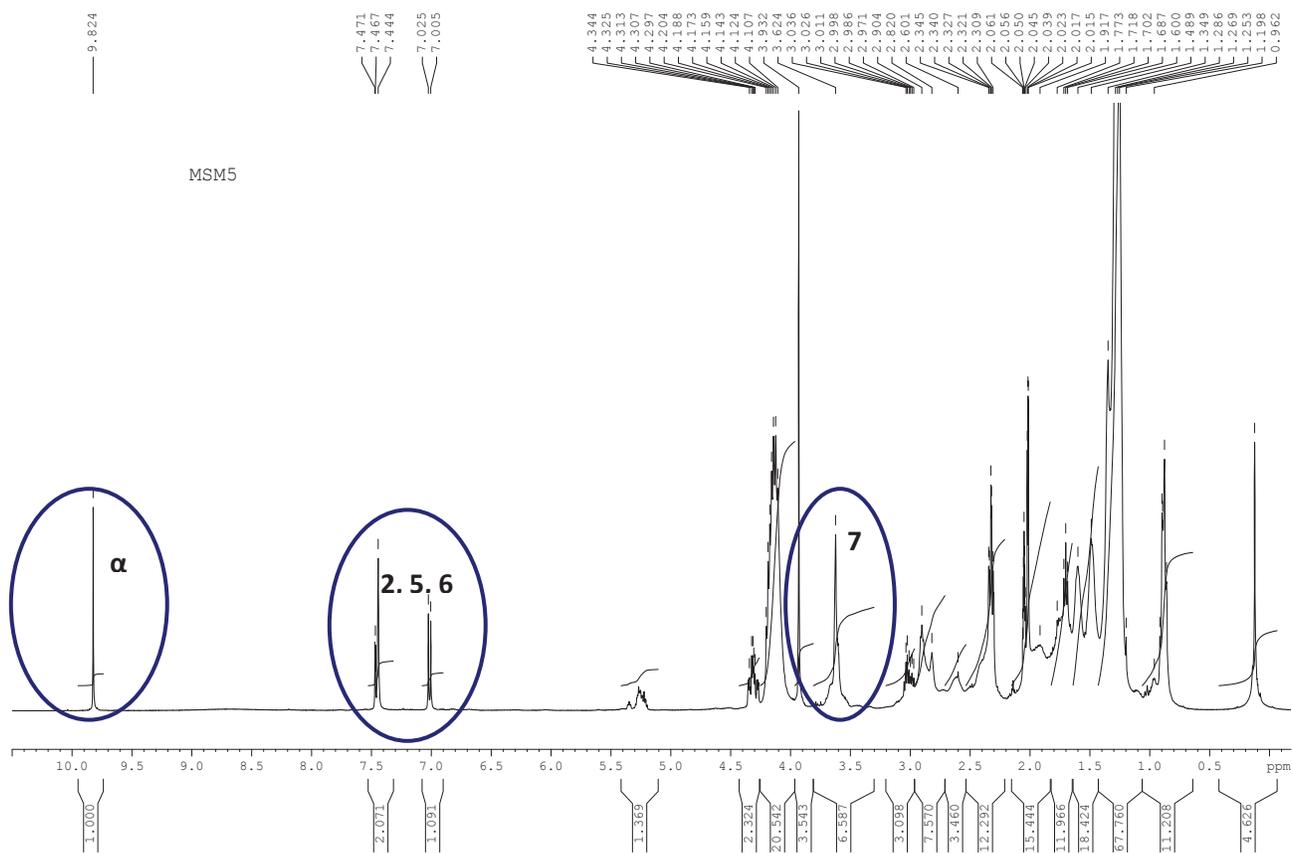


Figura 21. Espectro de RMN-¹H del producto (c).

El espectro de RMN-¹³C (figura 22) presenta señales de solvente en 216.2 ppm (singlete, CO) y 29.8 ppm (multiplete, CD₃-CH₂O) dos partes distintivas como en los casos anteriores. En la parte alifática presentó una señal y parte aromática sobre 100 -160 ppm se observa ciertas fracciones de protones aromáticos.

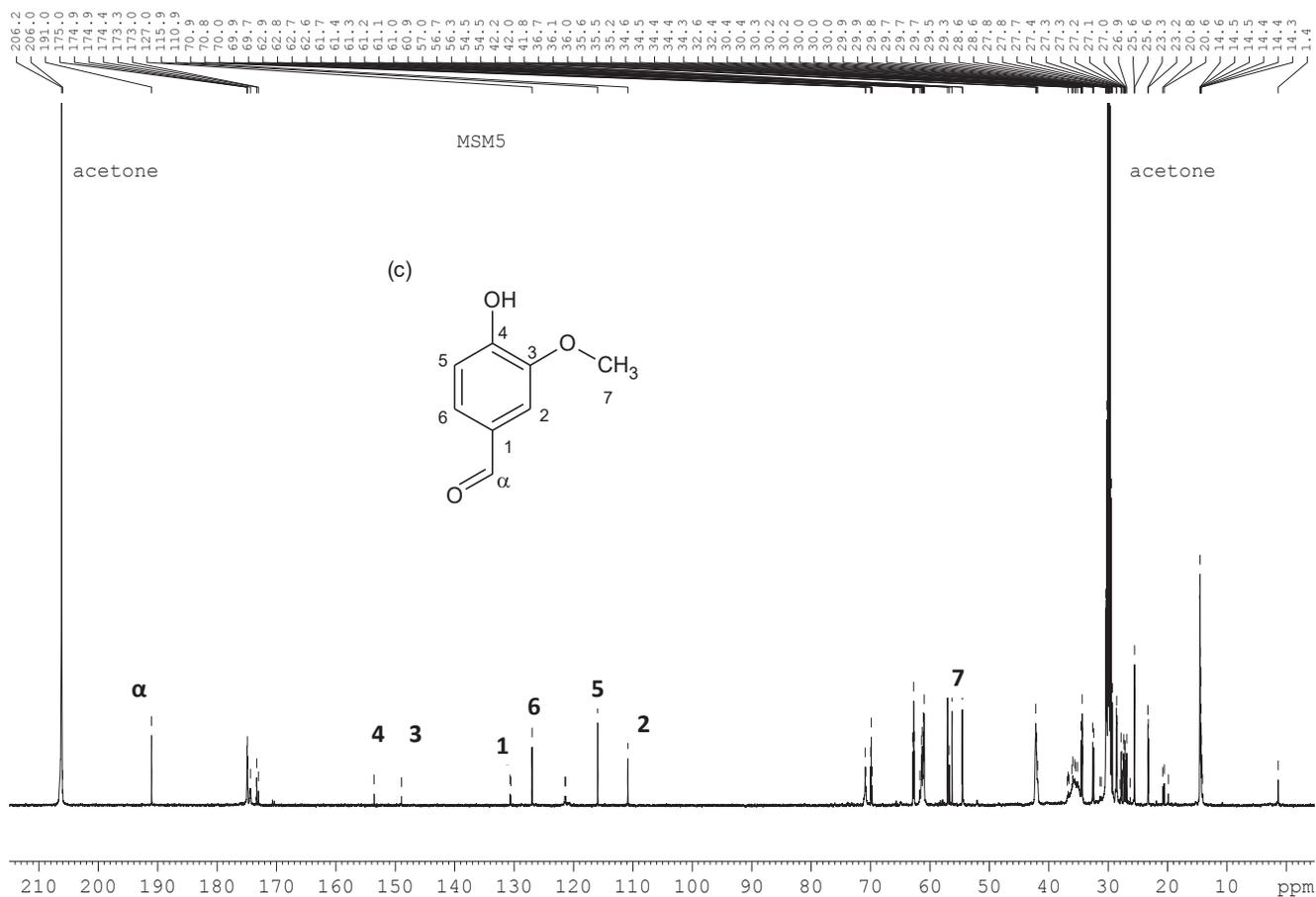


Figura 22. Espectro de RMN-¹³C del producto (c).

De acuerdo con los resultados de RMN-¹H y ¹³C, es evidente que los productos aislados no son los esperados. Se sospecha que los productos obtenidos en el crudo de reacción, no fueron correctamente separados ó sufrieron una degradación durante este proceso.

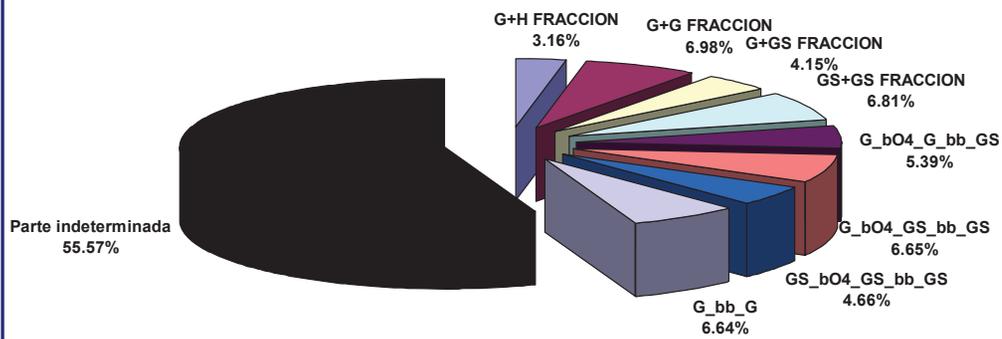
III.3 LIGNINAS NATURALES

La segunda estrategia fue la localización de los lignanos en ligninas naturales por espectrometría de MALDI-TOF. Para su análisis, se hicieron una lista de todos los posibles dímeros y trímeros presentes en las ligninas (Anexo 1), después se localizaron por su masa molecular (Anexo 2), con la interpretación de sus picos y determinando su frecuencia relativa en la mezcla.

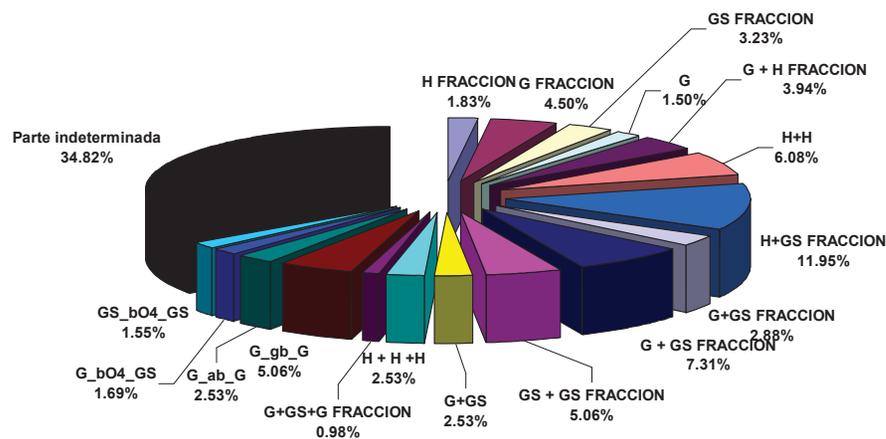
Por espectrometría de MALDI se ubicaron las estructuras en base a su peso molecular, ya que éste es un buen indicador del grado de polimerización (GP). El análisis de la composición de las ligninas por MALDI-TOF (Anexo 3a al 3d) fue hecho en el intervalo 200-750 Da, el cual indica que las ligninas utilizadas tienen una masa molecular baja, por lo que están compuestas casi exclusivamente de dímeros y trímeros. En la figura 23 se muestra la composición de todos los lignanos que están presentes en las ligninas además de la parte que no se pudo determinar ya que no se pudo asociar ningún valor para lignanos.

La lignina con mayor porcentaje de determinación fue Ln_CO2 con un 88.95%, mientras que la lignina con menor porcentaje fue la lignina Ln_inde con 44.43%. La Ln_inde_depol a pesar de sufrir un proceso de depolimerización, para garantizar que su estructura tuviera moléculas de bajo peso molecular, se obtuvo solamente el 65.18% y en el caso de Ln_miscantus se determinó un 66.07%. Es casi imposible determinar la totalidad de estas mezclas ya que son subproductos que contienen gran proporción de otras sustancias ajenas provenientes del proceso de obtención.

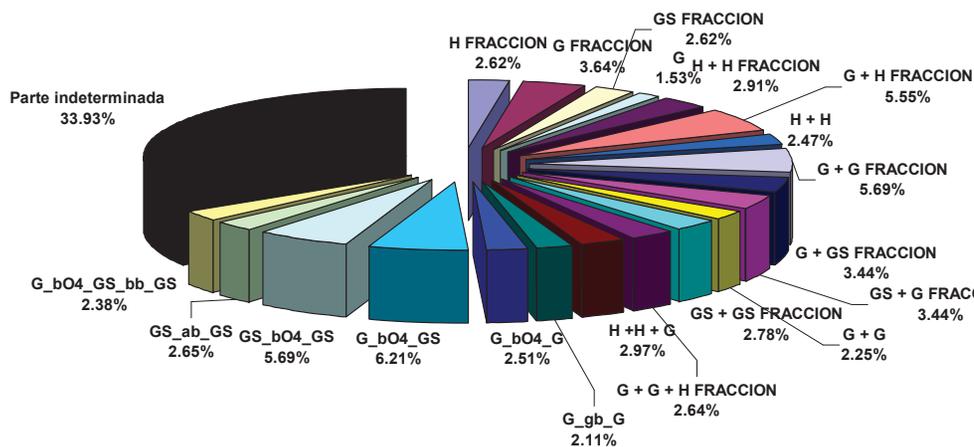
Ln_inde



Ln_inde_dep



Ln_miscantus



Ln_CO2

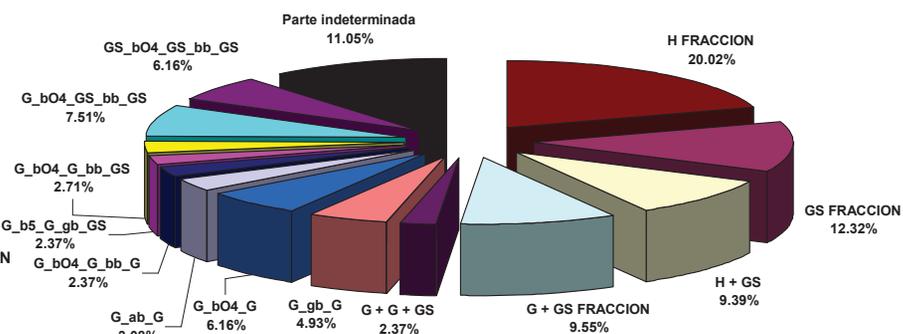


Figura 23. Composición de las ligninas tratadas.

De acuerdo al cálculo de la masa molecular, es claramente posible identificar en las ligninas, cual de los compuestos presentes es un dímero y cual es un trímero o cuales podrían ser fragmentos. Pero no es posible definir cual es el tipo de enlace con el que están enlazadas estas unidades.

La tabla 5 muestra los porcentajes de dímeros y trímeros que fueron identificados por los espectros de MALDI-TOF (Anexo 3a al 3d) y que corresponden a los lignanos estudiados por simulación molecular.

Tabla 5. Proporción de lignanos en cada una de las ligninas.

Dímero/trímero	Ln_inde	Ln_miscantus	Ln_CO2	Ln_inde_depol
G_βO4_GS_ββ_GS	6.65%	-	7.51%	-
G_ββ_G	6.64%	-	-	-
GS_βO4_GS_ββ_GS	4.66%	-	6.16%	-
G_βO4_GS_β5_G	5.39%	-	2.71%	-
G_βO4_GS	-	6.21%	-	1.69%
GS_βO4_GS	-	5.69%	-	1.55%
G_γβ_G	-	2.11%	4.93%	5.06%
GS_αβ_GS	-	2.65%	-	-
G_βO4_G	-	2.51%	6.16%	-
G_βO4_GS_ββ_GS	-	2.38%	-	-
G_αβ_G	-	-	3.08%	2.53%
G_β5_G_γβ_GS	-	-	2.37%	-
G_βO4_G_β5_G	-	-	2.37%	-
	23.34%	21.54%	35.30%	10.83%

Con estos resultados tan variables en porcentaje, pero sobre todo por los diferentes lignanos identificados, es muy difícil llegar a una comparación directa. Como es el caso de Ln_inde y Ln_miscantus, donde se obtuvo aproximadamente el mismo porcentaje de elucidación estructural pero se tienen estructuras diferentes.

Una vez localizadas se prosiguió a medir su capacidad adherente sobre una hoja de celulosa mediante el ensayo a tensión por el Análisis Termo-Mecánico (TMA). La figura 24 muestra las curvas de alargamiento en función de la temperatura obtenida en el ensayo de tensión por TMA. En esta gráfica se puede observar claramente la resistencia que presenta cada lignina cuando se aplica una fuerza constante conforme pasa el tiempo y se incrementa gradualmente la temperatura.

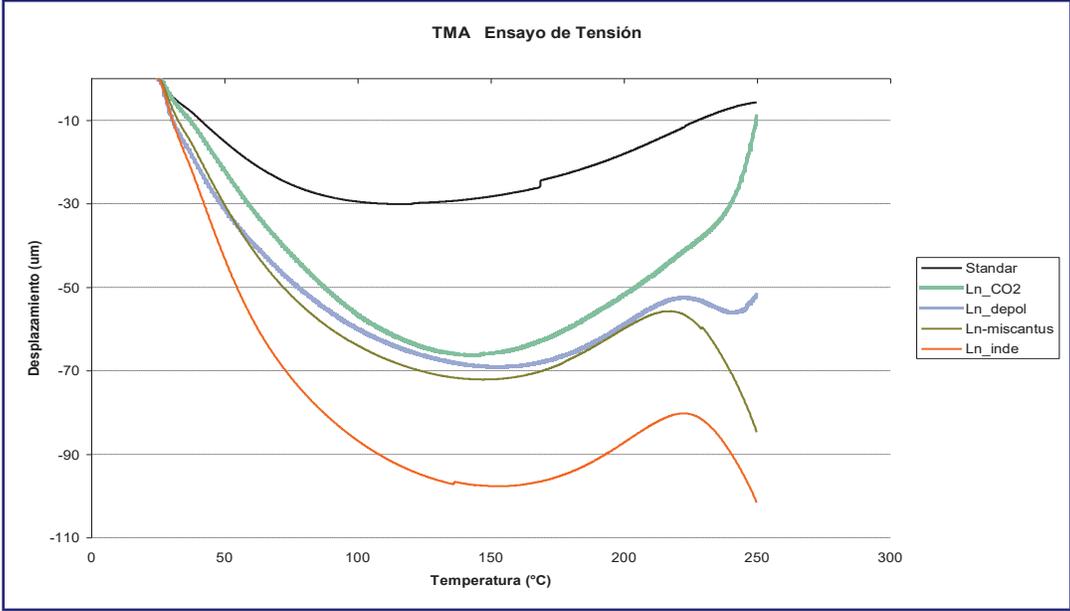


Figura 24. Gráfica de tensión para las diferentes ligninas por TMA.

Para obtener los valores de resistencia a tensión de cada una de las ligninas fue necesario aplicar la fórmula del módulo de Young. Los resultados se presentan en la tabla 6 como valores de Módulo de Elasticidad (MOE) y expresados en MPa.

Los resultados en Módulo de Young de las tres ligninas muestran que la lignina Ln_inde es la más resistente, sin importar el contenido de sólidos al que esté la solución (tabla 6). Esta situación posiblemente se deba a que la Ln_inde es un material ligeramente procesado en comparación con las otras ligninas. Esto favorece que tenga un grado de polimerización alto (GP), es decir cadenas de lignina con alto peso molecular.

Tabla 6. Módulo de Young a diferentes contenido de sólidos.

		Módulo de Young (MPa)	Incremento en el Módulo de Young
estándar		0,8	-
42% sólidos	Ln_CO2	2,01	151%
	Ln_inde_depol	2,63	228%
	Ln-miscantus	3,33	317%
	Ln_inde	4,5	463%
22% sólidos	Ln_CO2	1,22	53%
	Ln_inde_depol	1,71	114%
	Ln-miscantus	1,84	130%
	Ln_inde	3,8	375%
15% sólidos	Ln_CO2	1,76	120%
	Ln_inde_depol	1,84	129%
	Ln-miscantus	1,92	140%
	Ln_inde	2,6	225%
11% sólidos	Ln_CO2	1	25%
	Ln_inde_depol	1,48	85%
	Ln-miscantus	1,73	117%
	Ln_inde	2,48	210%

En el caso de la Ln_miscantus y Ln_inde_dep, se obtuvo un porcentaje aproximadamente igual, es decir 66.075 y 65.18%, respectivamente. Por lo cual, se podría hacer una comparación sobre la resistencia total de la mezcla tomando en cuenta su constitución. En la primera, Ln_miscantus, se identificaron 21 dímeros y 4 trímeros; en la segunda, Ln_inde_dep, 14 dímeros y 5 trímeros, por lo que la resistencia de Ln_miscantus se le asocia a los dímeros; siendo ésta más resistente que la Ln_inde_dep, de acuerdo a los resultados experimentales. La lignina Ln_CO2, muestra ser la menos resistente en este ensayo, probablemente se deba a la abundancia relativa de dímeros con respecto a la de trímeros en esta mezcla.

III.4 CORRELACIÓN DE RESULTADOS

Como sólo se estudiaron ligninas de bajo peso molecular, se encontraron exclusivamente dímeros y trímeros. Mientras que no es necesario calcular la energía teórica adherente para todos los dímeros ni trímeros que se localizaron en los espectros de MALDI-TOF, ya que los resultados de la tabla 7 y de la figura 25 indican que si el cálculo de interacción es de 20% o más de la masa de dímeros y trímeros, entonces estos corresponden bien a las tendencias de la capacidad adhesiva que se obtuvieron por los ensayos experimentales.

Tabla 7. Energía de enlace de los componentes de las ligninas tratadas.

Dímero/Trímero	Ln_inde		Ln_miscantus		Ln_CO2		Ln_inde_depol	
	(Kcal/mol) por composición	MOE (MPA)	(Kcal/mol) por composición	MOE (MPA)	(Kcal/mol) por composición	MOE (MPA)	(Kcal/mol) por composición	MOE (MPA)
G_βO4_GS_ββ_GS	-61.71	0.2993			-69.79	0.1512		
G_ββ_G	-47.01	0.2988						
GS_βO4_GS_ββ_GS	-45.06	0.2097			-59.57	0.1238		
G_βO4_GS_β5_G	-49.80	0.2426			-25.04	0.0545		
G_βO4_GS			-47.07	0.2068			-12.81	0.0444
GS_βO4_GS			-47.26	0.1891			-12.90	0.0408
G_γβ_G			-15.83	0.0703	-36.98	0.0991	-37.95	0.1331
GS_αβ_GS			-19.35	0.0882				
G_βO4_G			-20.21	0.0836	-49.59	0.1238		
G_βO4_GS_ββ_GS			-22.09	0.0793				
G_αβ_G					-23.50	0.0619	-19.30	0.0665
G_β5_G_γβ_GS					-22.09	0.0476		
G_βO4_G_β5_G					-20.97	0.0476		
Energía total	-203.59	1.0503	-171.79	0.7173	-307.52	0.7095	-82.96	0.2848
Porcentaje total	23.34%		21.54%		35.29%		10.83%	

De acuerdo a los resultados de la tabla 7, se puede observar fácilmente en Ln_inde y Ln_miscantus, las cuales tienen aproximadamente el mismo porcentaje caracterizado, que la energía teórica calculada sigue la misma tendencia de aumento ó disminución que los valores de los resultados experimentales. Un caso similar lo presenta Ln_inde_dep, aunque solo tenga un 10% de lignanos caracterizados. Esta tendencia no se presenta en Ln_CO2, la cual resulta ser la más débil de las 4 ligninas estudiadas por ensayos experimentales, algo que no se esperaba por los resultados teóricos. A pesar de ser la lignina que tuvo mayor número de estructuras identificadas, la abundancia relativa es la que característica que predomina en la resistencia adhesiva.

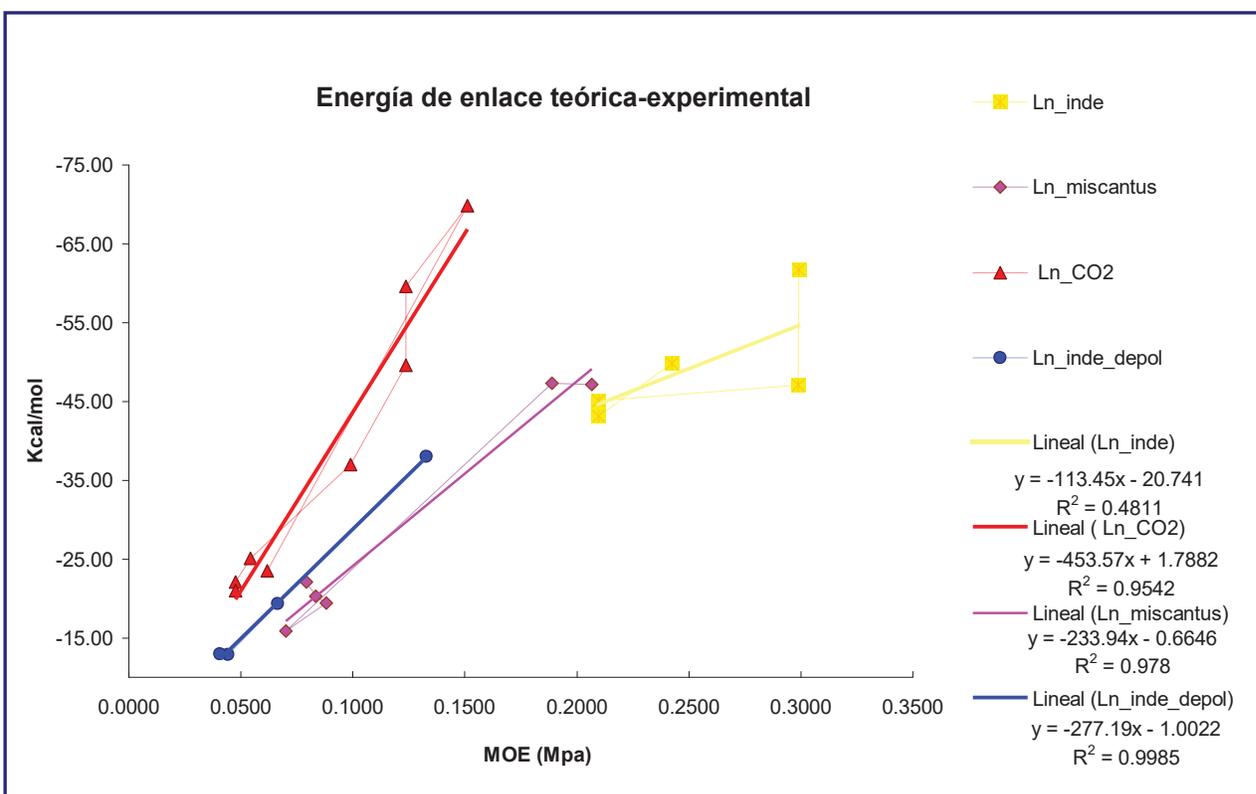


Figura 25. La correlación de la fuerza experimental y de la simulación molecular.

La figura 25 muestra los resultados de la resistencia a tensión (MOE) de las ligninas expresadas en mega pascales (MPa) y los resultados teóricos calculados por simulación molecular expresados en kilocalorías por mol (Kcal/mol).

Los coeficientes de correlación R^2 entre los valores teóricamente calculados y los valores experimentales para los lignanos son excelentes: 0.95, 0.97 y 0.998 para Ln_CO2, Ln_miscantus y Ln_inde_depol, respectivamente. Este coeficiente de correlación indica que la energía de interacción de los lignanos, que no se conocen, debieran presentar la misma tendencia que los que constituyen desde un 10% hasta un 35 % de masa en la muestra, ya que son los que efectivamente se utilizaron en la correlación de los resultados teóricos y experimentales.

En el caso de la lignina Ln_inde, la cual presento la mayor resistencia en la prueba de TMA, presenta el mas alto valor de MOE lo que significa que es la lignina más resistente a la tensión de las cuatro estudiadas y aunque su coeficiente de correlación es muy pobre e insuficiente para explicar el fenómeno de correlación entre los datos teórico-experimental, sus resultados de los lignanos localizados siguen esta tendencia. Este coeficiente de correlación bajo de la lignina Ln_inde, se considera por que éste es un producto industrial sin pretratamiento con una alta variación en la masa molecular.

En general los resultados de la tabla 8 y de la figura 26 a,b muestran que los trímeros dan mayor adhesión que los dímeros, pero este resultado siempre dependerá de la naturaleza del sustrato con el que interacciona. Como es el caso particular de Ln_CO2 de la tabla 7.

Tabla 8. Energía de enlace teórica y experimental.

Denominación	Dímeros		Trímeros	
	Autodock (Kcal/mol)	MOE (Mpa)	Autodock (Kcal/mol)	MOE (Mpa)
Ln_inde	-47,01	0,2988	-134,68	0,6449
Ln_miscantus	-155,06	0,6617	-22,09	0,0793
Ln_CO2	-143,42	0,3721	-197,46	0,4247
Ln_inde_depolim	-82,06	0,2817	-	-

La masa molecular del lignano no parece ser el factor predominante sobre la energía de interacción con el sustrato. Aunque en ciertas ocasiones un lignano con una masa molecular alta (como los trímeros), se enlazan más fuertemente con el sustrato que uno con una masa molecular inferior (como los dímeros) y viceversa. Por lo tanto, el punto importante es la capacidad del lignano para adaptarse a una superficie ó sustrato para mejorar la energía de interacción, lo cual de igual forma puede ser un dímero ó un trímero. Esta tendencia es evidente para los resultados teóricos y experimentales que se muestran en la figura 26.

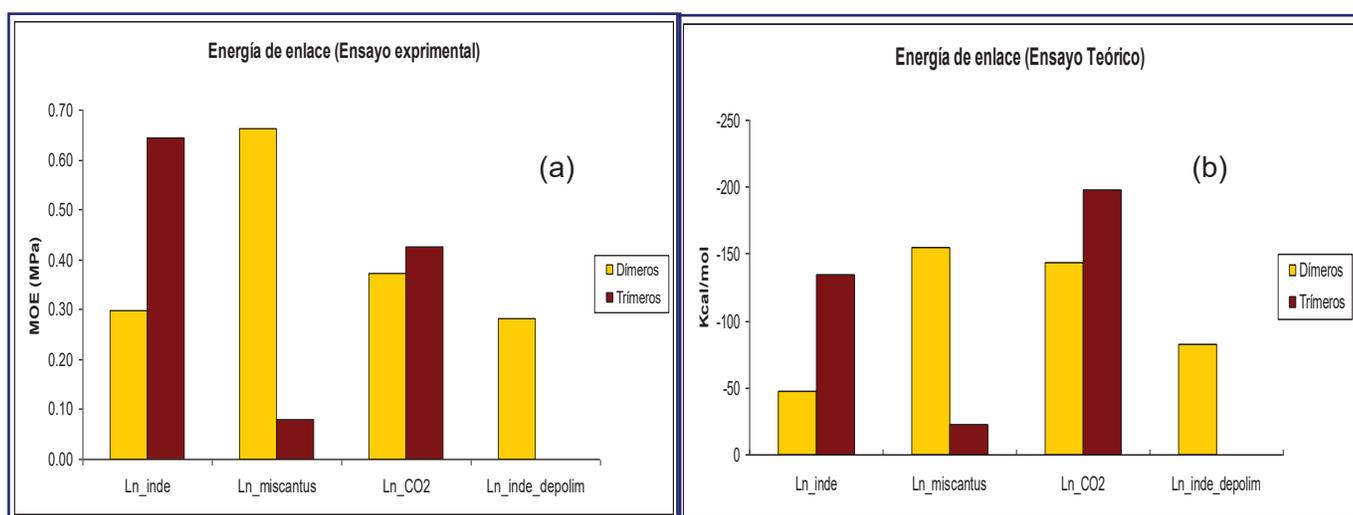


Figura 26. Resistencia de ligninas de acuerdo al componente en su estructura.

Estas gráficas (figura 26 a y b) muestran el valor de la resistencia teórica y experimental que ofrece cada lignina de acuerdo al tipo de estructura presente. Por lo que los valores de resistencia para lignina Ln_inde y Ln_CO2 están dados por trímeros, mientras que la resistencia que ofrece Ln_miscantus y Ln_inde_depol es generada en su mayoría y/o totalidad por dímeros.

Las energías de interacción de dímeros de PF sobre celulosa son: dímero o-o -12.39 kcal/mol, dímero o-p -12.08 kcal/mol y dímero p-p 10.203 kcal/mol [Good, 1967; Fowkes,

1983]. En nuestro caso, los dímeros tienen valores desde -5.70 hasta -8.71 kcal/mol y en trímeros se tienen desde 8.85 hasta 10.21 kcal/mol, lo cual deja situado a los lignanos como moléculas con adhesividad bastante considerable tomado en cuenta que adhesivos de PF son los más demandados en la adhesión de madera.

Lei en 2009, trabajó con lignina glioxilada en mezcla con tanino para la formulación de adhesivos para tableros de partículas, obteniendo valores de resistencia internas desde 0.16 hasta 0.36 MPa. Los estándares marcan como valor de resistencia aceptable de ≥ 0.35 MPa. En nuestro trabajo particular, es otro tipo de ensayo el que se realizó (tensión en papel), aun así, los valores obtenidos fueron positivos como incremento en resistencia tomando en cuenta que se partió de un estándar.

CAPÍTULO IV. CONCLUSIONES

- En éste estudio los trímeros presentaron las energías de interacción más altas en comparación a los dímeros.
- El tipo de enlace entre las unidades de los lignanos es primordial en las energías de enlace.
- Los cálculos moleculares indican que un dímeros con un enlace tipo β -O-4, presenta una atracción más fuerte sobre el sustrato que los dímeros con enlace tipo $\beta\beta$ o β -5.
- Las ligninas de bajo peso molecular que se utilizaron en este estudio están compuestas en su mayoría por dímeros y trímeros.
- Las ligninas con una alta cantidad de trímeros presenta una interacción mucho más fuerte sobre el sustrato.
- Debido a que las ligninas presentan una composición heterogénea de porcentaje en masa, es difícil hacer una comparación entre ellas.
- En las ligninas Ln_inde y Ln_miscantus se determinó un porcentaje similar en sus componentes (tabla 6), con lo que al hacer una comparación de sus energías, éstas presentan una energía de interacción semejante con el sustrato, tanto por la simulación molecular como por los métodos experimentales.
- La lignina Ln_inde mostró una adherencia más alta que la lignina Ln_miscantus, debido posiblemente a que la primera presenta mayor cantidad de trímeros.

- La lignina Ln_indie_depol presentó la energía más baja por el método de simulación molecular y también por la experimentación. Este caso se esperaba por la cantidad de dímeros identificados.
- La lignina Ln_CO2 presentó un comportamiento diferente a lo esperado, ya que se obtuvo resistencia mucho menor en los ensayos experimentales a la esperada por los cálculos teóricos, por lo que ésta lignina no sigue la tendencia obtenida para las otras ligninas estudiadas.
- La masa molecular y el tipo de enlace entre las unidades y/o fracciones de lignina son factores importantes que determinan la energía de enlace en los lignanos. Por lo tanto, un lignano con una alta masa molecular y unidades tipo β -O-4 presentará mayor energía adherente sobre un sustrato de celulosa.

CAPÍTULO V. REFERENCIAS

- Antonot E., Marchal R. (1998). *Chromatographie*. Stage MAFPEN. Metz, France: Lycée Louis Vincent-Metz
- Argyropoulos, D.S., Jurasek, L., Kristofova, L., Xia, Z., Sun, Y., and Palus, E. (2002). Abundance and reactivity of dibenzodioxocins in softwood lignin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50(4), 658-666.
- Barrios U. A, and Ventura M. (2001). Use of “dry ammoniation” to improve the nutritive value of *Brachiaria humidicola*. *Livestock Research for Rural Development* 14(4).
- Becke A. D. (1993). *J. Chem. Phys.*, 98, 5648
- Besombes, S., Robert, D., Utille, J. P., Taravel, F., and Mazeau, K. (2003). Molecular Modeling of Syringyl and p-Hydroxyphenyl β -O-4 Dimers. Comparative Study of the Computed and Experimental Conformational Properties of Lignin β -O-4 Model Compounds. *J. Agric. Food Chem.* 51, 34-42.
- Biermann, Ch. J. (1996). *Handbook of Pulping and Papermaking* (2da ed.). EUA, Academic press.
- Britt, K. W. (1970). *Handbook of pulp and paper technology* (2d ed. revised and enlarged). New York.
- Brown A. (1985). Review of Lignin in Biomasa. *J. Appl. Biochem*, 7, 371-387.
- Carballo, L.R. (1990). The influence of chemical composition and age of caribea pine wood (*Pinus caribea*) on the physical and mechanical properties as well as on the yield of sulfite pulp. Rep. Eslovaca. Faculty of wood Technology, University College of Forestry and wood Technology.
- Casey J. P. (1985). *Pulpa y Papel*. Vol 1. Mexico. Ed Limusa,
- Clark, J. d'A. (1985). *Pulp Technology and Treatment for Paper*. (2nd ed.). San Francisco: Miller Freeman Publications.
- Cornell WD., Cieplak P., Bayly Cl., Gould I.R., Merz K.M. Jr., Ferguson D.M., Spellmeyer D.C., Fox T., Caldwell J.W., Kollman P.A. (1995). A Second Generation Force Field for the Simulation of Proteins, Nucleic Acids, and Organic Molecules. *J. Am. Chem. Soc.* 117, 5179–5197.
- Dam, J., Gosselink, R., Jong, E. (2000). *Lignin Applications*; Wageningen UR; Agrotechnology & Food Innovations.

- Drumm, M., LeBlanc, J. (1972). The reactions of formaldehyde with phenols, melamine, anilina and urea, In Step Growth Polymerizations. Vol. 3. New York. Ed: Solomon D.H., Dekker.
- Elder, T.J., McKee M.L. and Worley S.D.. (1988). The application of molecular orbital calculation to wood chemistry. The formation and reactivity of quinone methide intermediates. *Holzforschung* 42, 233-240.
- Faulon, J.L. y Hatcher P.G. (1994). Is there any order in the structure of lignin? *Energy and Fuels*. 8, 402-407.
- FCBA. Laboratoire d'Etude et de Recherche sur le Matériau Bois, FST, Bld des Aiguillettes, 54500 Vandoeuvre-lès-Nancy, France
- Fowkes, F.M. (1983). Physicochemical Aspects of Polymer Surfaces, Vol. 2 New York, Plenum Press.
- Freeman, J.J. y Lewis, C., (1954). *J. Am. Chem. Soc.*, 76, 2080
- Froass, P. M., Ragauskas, A. J., y Jiang, J. (1996). Chemical structure of residual lignin from kraft pulp. *Journal of Wood Chemistry and Technology*, 16(4), 347-365.
- Glasser, W. G. and Sarkanen, S. (1989). Lignin, properties and materials. Washington, DC: American Chemical Society.
- Good, R.J. (1967). Treatise on Adhesion and Adhesives, Vol1 New York. Marcell Dekker.
- Grisebach H., (1981). Lignins, The Biochemistry of Plants. Vol. 7 New York: Academic Press, 457-478.
- Hammel, K.E., Moen, M.A., (1991). Depolymerization of a synthetic lignin in vitro by lignin peroxidase. *Enzyme Microb. Technol.* 13, 15-18.
- Hatfield, G. R., Maciel, G. E. (1987) *Macromolecules*, 20, 608-615.
- Higuchi, T. (1985). Biosynthesis of lignin. Biosynthesis and Biodegradation of Wood Components. Orlando (Eds). Academic Press.
- Houtma, C.J. y Atalla R.H. (1995). Cellulose-lignin interactions. A computational study. *Plant Physiol.* 107, 977-984.
- Huey, R., Goodsell, D. S., Morris, G. M., y Olso, A. J. (2004). Grid-based hydrogen bond potentials with improved directionality. *Letters in Drug Design and Discovery* 1, 178-183.
- K. Freudenberg y Neish A. C., (1968). Constitution and Biosynthesis of Lignin. New York: Springer-Verlag.

Kirk T. K., Connors, W. J., Bleam, R. D., Hackett, W. F., y Zeikus, J. G., (1975). Preparation and Microbial Decomposition of Synthetic [14C] lignins, *PNAS*. 72, 2515-2519

Kitchen D.B., Decornez H., Furr J.R., Bajorath J. (2004). Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. *Nature reviews. Drug discovery* 3(11) 935–49.

Landucci, L., Luque, S., Ralph, S., (1995). Reaction of p-Hydroxycinnamyl Alcohols with Transition Metal Salts. 2. Preparation of Guaiacyl/Syringyl Di-, Tri-, and Tetralignols. *J. Wood Chem. Tech*, 15, 493-513

Lei, H. Pizzi, A. y Du, G. (2009). Environment-friendly gluten-based mixed resin for particleboards. *Journal of Applied Polymer Science*.

Mansouri, N., (2007). Depolimerización de lignina para su aprovechamiento en adhesivos para producir tableros de partículas, España: Universitat Rovira i Virgili.

Mansouri, N., Pizzi, A., Salvadó, J., (2007). Lignin-based wood panel adhesives without formaldehyde. *J. Holz als Roh- und Werkstoff*.

Martinez, C., Sedano, M., Mendoza, J., Herrera, R., Rutiaga, J.G., Lopez, P. (2009). Effect of aqueous environment in chemical reactivity of monolignols. A New Fukui Function Study. *J. of Molecular Graphics and Modelling*. En impresión.

Morris, G. M., Goodsell, D. S., Halliday, R.S., Huey, R., Hart, W. E., Belew, R. K. and Olson, A. J. (1998), Automated Docking Using a Lamarckian Genetic Algorithm and an Empirical Binding Free Energy Function *J. Computational Chemistry*, 19, 1639-1662.

Morris, G., Goodsell, D., Pique, M., Lindstrom, W., Huey, R., Forly, S., Hart, W., Halliday, S., Belew R., and Olson A. (2009). AutoDock Version 4.2. Automated docking of Flexible Ligands to Flexible Receptors. User Guide, USA, Copyright © 1991-2009.

Önnerfjord, P. (1996) Mass identity of biomolecules by MALDI-TOF MS, *Connective Tissue Biology*, P.O. Box 94, 221 00 Lund, Sweden, Patrik.Onnerfjord@medkem.lu.se

Pearson, R.G. (1963) *J. Am Chem Soc*, 85, 3533-3539

- Pizzi, A. (1994). Lignin-Based Wood Adhesives. In: Advanced Wood Adhesives Technology. (Eds.), New York: Marcel Dekker Inc.
- Pizzi A. y De Sousa, G. (1992). *Chem. Phys.*, 164(203).
- Q. Hu T. (2002). Chemical modification, properties, and usage of lignin. Hardback 302.
- Rencoret J. (2009). *Industrial Crops and Products* 30, 137-143
- Sakakibara, A. (1983). Chemical Structure of Lignin Related Mainly to Degradation products, Tokio Japan: Proc. 2nd Int. Seminar UNI Pun. Co.
- Sanner M. F., (1999). *J. Mol. Graphics Mod.*, 17, 57-61
- Sarkanen, K. V., Ludwig, C. H., (1971). In Lignins: Occurrence, Formation, Structure and Reactions. New York: Wiley-Interscience.
- Serway, M. y Moyn, (2004) Modern Physics, (3ra ed.) Brooks Cole
- Simon, J.P. y K.E.L. Eriksson. (1998). Computational studies for the three-dimensional structure of guaiacyl BO4 lignin models. *Holzforschung*, 52, 287-296.
- Sjöström E. Raimo A. (1998). In Lignin. Analytical Methods in Wood Chemistry, Pulping and Papermaking. New York: Springer.
- Summit, R., Sliker, A., (1980). Handbook of Materials Science. Vol. 4. Florida: CRC Press, Inc.
- Terashima, N. (1990). A new mechanism for formation of a structural ordered protolignin macromolecule in the cell wall of tree xylem. *J. pulp and Paper Sci.* 16 150-155.
- Wei, B.Q., Weaver, L.H., Ferrari, A.M., Matthews, B.W., Shoichet, B.K. (2004). Testing a flexible-receptor docking algorithm in a model binding site. *J. Mol. Biol.* 337(5) 1161–82

ANEXOS

Anexo 1. Lista de todos los posibles lignanos de dos y tres unidades presentes en las ligninas.

Masa Molecular +Na	Denominación	Masa Molecular +Na	Denominación
117	H _{FRACCIÓN}	473	H_H_H
147	G _{FRACCIÓN}	477	G_G_H _{FRACCIÓN}
173	H	477	H_H_GS _{FRACCIÓN}
177	GS _{FRACCIÓN}	477	H_G_G _{FRACCIÓN}
203	G	477	H_GS_H _{FRACCIÓN}
233	GS	477	H_GS_G _{FRACCIÓN}
266	H_H _{FRACCIÓN}	477.5	GS_αβ_GS
296	H_G _{FRACCIÓN}	503	H_H_G
296	G_H _{FRACCIÓN}	507	G_GS_H _{FRACCIÓN}
297	G_H _{FRACCIÓN}	507	G_G_G _{FRACCIÓN}
323	H_H	507	H_G_GS _{FRACCIÓN}
326	H_GS _{FRACCIÓN}	533	H_GS_H
326	G_G _{FRACCIÓN}	533	H_G_G
326	GS_H _{FRACCIÓN}	537	G_GS_G _{FRACCIÓN}
353	H_G	537	G_G_GS _{FRACCIÓN}
356	G_GS _{FRACCIÓN}	537	GS_GS_H _{FRACCIÓN}
356	GS_G _{FRACCIÓN}	537	H_GS_GS _{FRACCIÓN}
383	G_G	563	H_GS_G
383	H_GS	563	G_G_G
383.4	G_γβ_G	567	G_GS_GS _{FRACCIÓN}
386	GS_GS _{FRACCIÓN}	567	GS_GS_G _{FRACCIÓN}
399.4	G_βO4_G	577.6	G_βO4_G_ββ_G
399.4	G_αO4_G	577.6	G_βO4_G_β5_G
413	G_GS	591.6	G_β5_GS_αβ_G
417	H_H_H _{FRACCIÓN}	593	G_G_GS
417.4	G_αβ_G	593	H_GS_GS
429.4	G_βO4_GS	597	GS_GS_GS _{FRACCIÓN}
429.4	G_αO4_GS	607.6	G_βO4_G_ββ_GS
443	GS_GS	607.6	G_βO4_GS_β5_G
447	H_H_G _{FRACCIÓN}	623	G_GS_GS
447	H_G_H _{FRACCIÓN}	637.6	G_βO4_GS_ββ_GS
459.4	GS_βO4_GS	653	GS_GS_GS
459.4	GS_αO4_GS	667.6	GS_βO4_GS_ββ_GS

Masas moleculares de los lignanos + 23 Da (la masa molecular del Na presente en la matriz) para su transmisión apropiada de lignano y su masa porcentual en la muestra.

Anexo 2. Análisis de las ligninas por espectrometría de MALDI-TOF.

Lignina inde original

Dímero/trímero	Masa Molecular +Na	Pico	Intensidad %
G+H _{FRACCION}	297	300	17,3
H+GS _{FRACCION}			
G+G _{FRACCION}	327	326	38,2
GS+H _{FRACCION}			
G+GS _{FRACCION}	356	356	22,7
GS+G _{FRACCION}			
GS+GS _{FRACCION}	386	386	37,3
G _β O4_G _{ββ} _GS	607,6	610	29,5
G _β O4_GS _{β5} _G	607,6		
G _β O4_GS _{ββ} _GS	637,6	639	36,4
GS _β O4_GS _{ββ} _GS	667,6	666	25,5

Lignina Ln_miscantus

Dímero/trímero	Masa Molecular +Na	Pico	Intensidad %
H _{FRACCION}	117	121	18
G _{FRACCION}	147	147	25
GS _{FRACCION}	177	177	18
G	203	198	10,5
H + H _{FRACCION}	266	271	20
H + G _{FRACCION}	296		
G + H _{FRACCION}		297	38
H + H	323	322	17
H + GS _{FRACCION}	326		
G + G _{FRACCION}		327	38
GS + H _{FRACCION}			
G + GS _{FRACCION}	356	352	24,5
GS + G _{FRACCION}			
G + GS _{FRACCION}	356	355	32
GS + G _{FRACCION}			
H + GS	383	383	15,5
G + G			
GS + GS _{FRACCION}	386	385	23,6
H + H + H	473	475	19
G + G + H _{FRACCION}	477		
H + H + G	503	501	21
G _{γβ} _G	383	383	14,5
G _β O4_G	399	400	17,3
G _α O4_G			
G _β O4_GS	429,4	431	43,6

GS_βO4_GS	459,4	461	39,1
GS_αO4_GS			
GS_αβ_GS	477,5	475	18,2
G_βO4_GS_ββ_GS	637,6	639	16,4

Lignine Ln_Co2-1

Dímero/trímero	Masa Molecular +Na	Pico	Intensidad %
H _{FRACTION}	117	113	65
GS _{FRACTION}	177	181	40
H + GS	383	378	30,5
G + GS _{FRACTION}	356	360	30
GS + G _{FRACTION}	593	591	8
G + G + GS			
H + GS + GS			
G_γβ_G	383	378	16
G_βO4_G	399	402	20
G_αO4_G			
G_αβ_G	417	418	10
G_βO4_G_ββ_G	577,6	578	7,7
G_βO4_G_β5_G			
G_β5_G_γβ_GS	591,6	591	7,7
G_βO4_G_ββ_GS	607,6	611	8,8
G_βO4_GS_β5_G			
G_βO4_GS_ββ_GS	637,6	639	24,4
GS_βO4_GS_ββ_GS	667,6	667	20

Dímero/trímero	Masa Molecular +Na	Pico	Intensidad %
H _{FRACTION}	117	117	13
G _{FRACTION}	147	149	32
GS _{FRACTION}	177	177	23
G	203	208	16
G + H _{FRACTION}	296	298	38
H+H	323	322	43,2
H+GS _{FRACTION}	326	326	34,7
G+GS _{FRACTION}	356	352	20,5
GS+G _{FRACTION}			
G + GS _{FRACTION}	357	360	52
GS + G _{FRACTION}			
GS + GS _{FRACTION}	387	386	36
G+GS	413	416	18

H + H + H _{FRACTION}	417		
H + H +H	473	470	10
G+GS+G _{FRACTION}			
GS+GS+H _{FRACTION}	537	536	7
H+GS+GS			
G _{γβ} _G	383	386	36
G _{αβ} _G	417	416	18
G _{β04} _G	429,4	434	12
GS _{β04} _GS			
GS _{α04} _GS	459,4	454	10

Lignine Ln_inde_dep

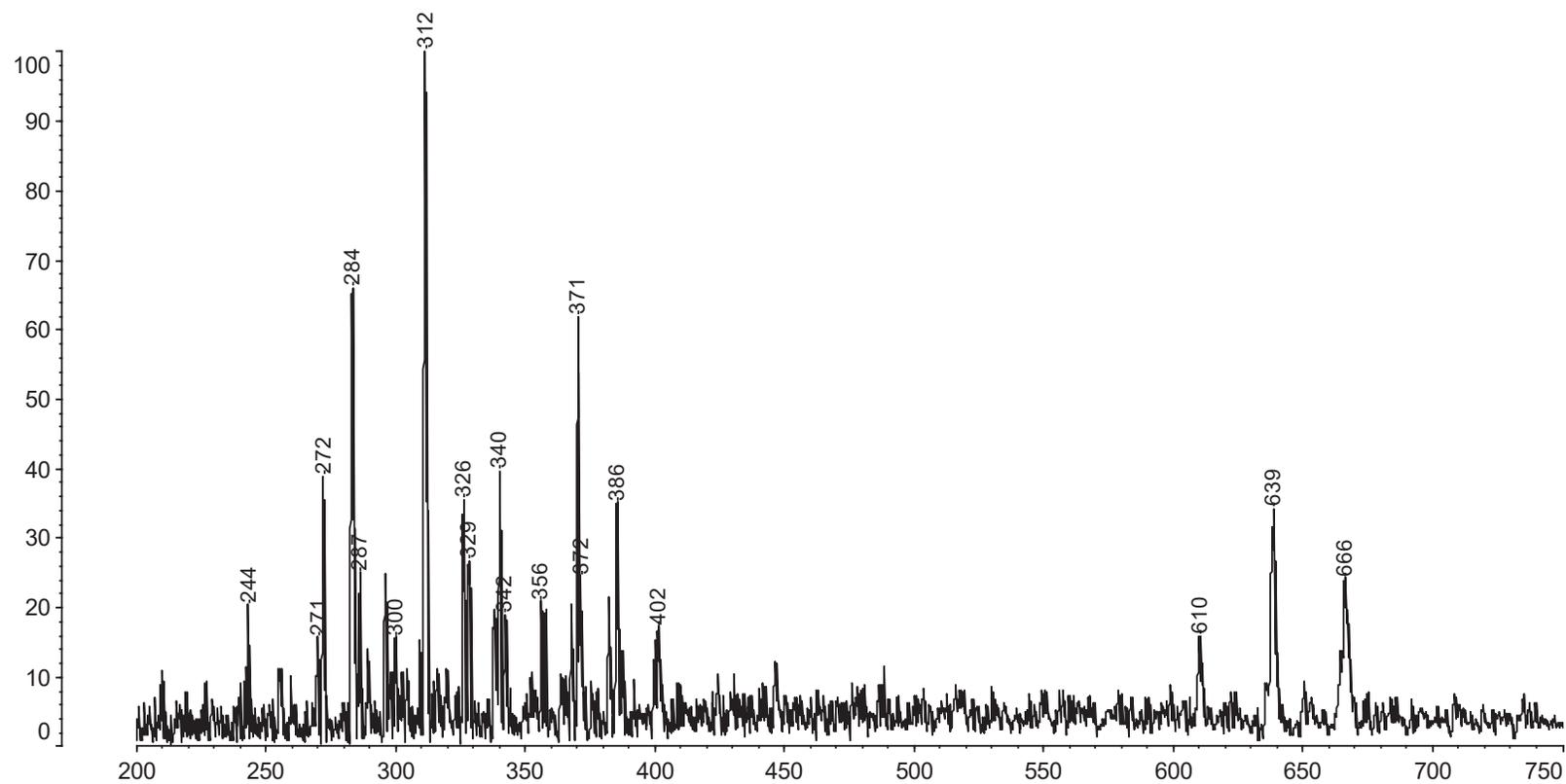
Lignina inde original, Na-Adducts; mass range: 200-750 Da

Lignina inde original - Aceton

Data: Pizzi 09-03_0026.O12[c] 3 Jun 2009 17:09 Cal: tof-PEG1450-10000 3 Jun 2009 17:07

Shimadzu Biotech Axima ToF² 2.7.2.20070105: Mode Linear, Power: 98, P.Ext. @ 10000 (bin 149)

%Int. 42 mV[sum= 4152 mV] Profiles 1-100 Smooth Av 100 -Baseline 50



Anexo 3a. Espectro MALDI-TOF de la lignina Ln_inde.

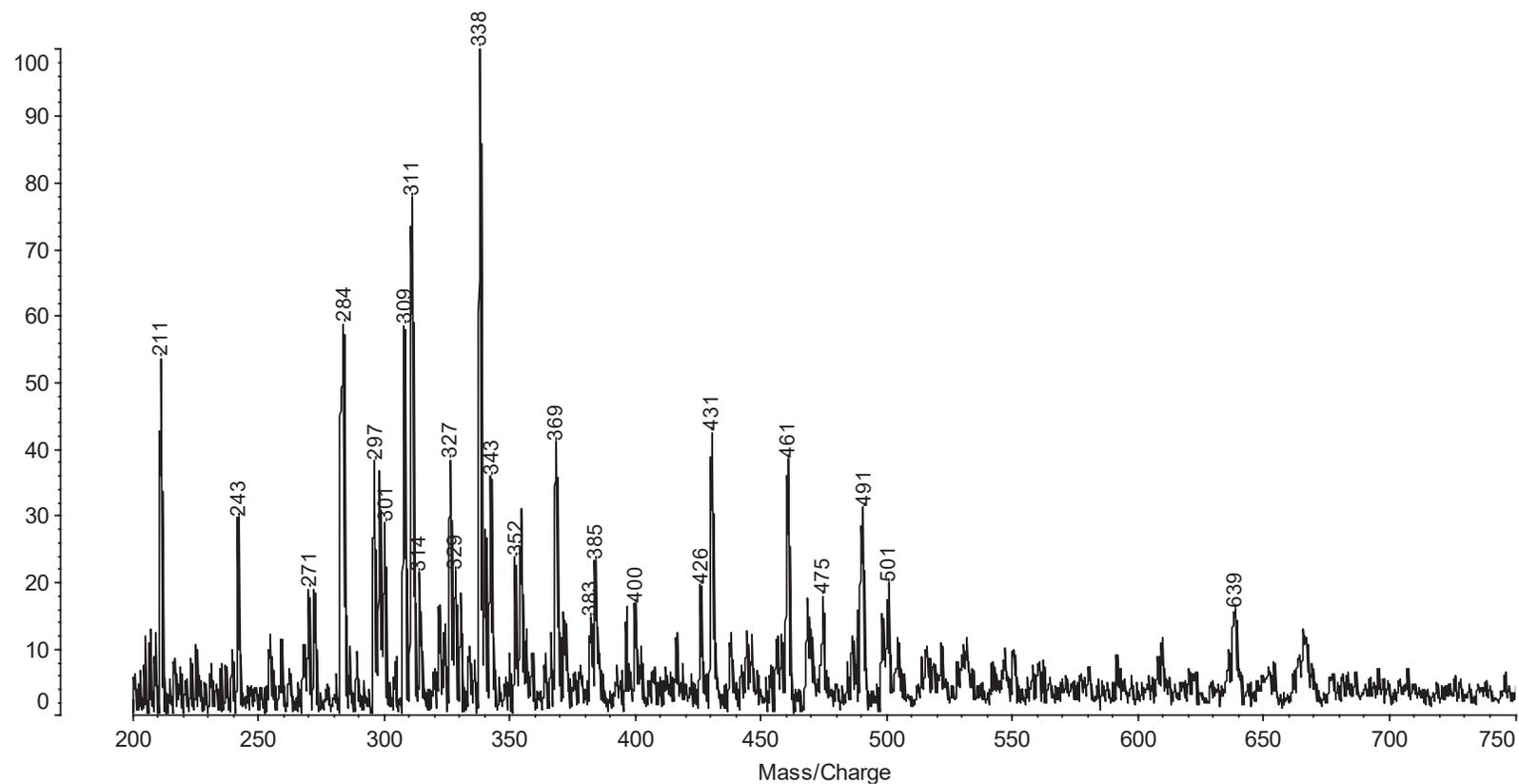
EdB43, Na-Adducts; mass range: 200-750 Da

EdNB43-Aceton

Data: Pizzi 09-03_0025.O11[c] 3 Jun 2009 17:07 Cal: tof-PEG1450-10000 3 Jun 2009 17:07

Shimadzu Biotech Axima ToF² 2.7.2.20070105: Mode Linear, Power: 98, P.Ext. @ 10000 (bin 149)

%Int. 51 mV[sum= 5332 mV] Profiles 1-105 Smooth Av 100 -Baseline 50



Anexo 3b Espectro MALDI-TOF de la lignina Ln_miscantus.

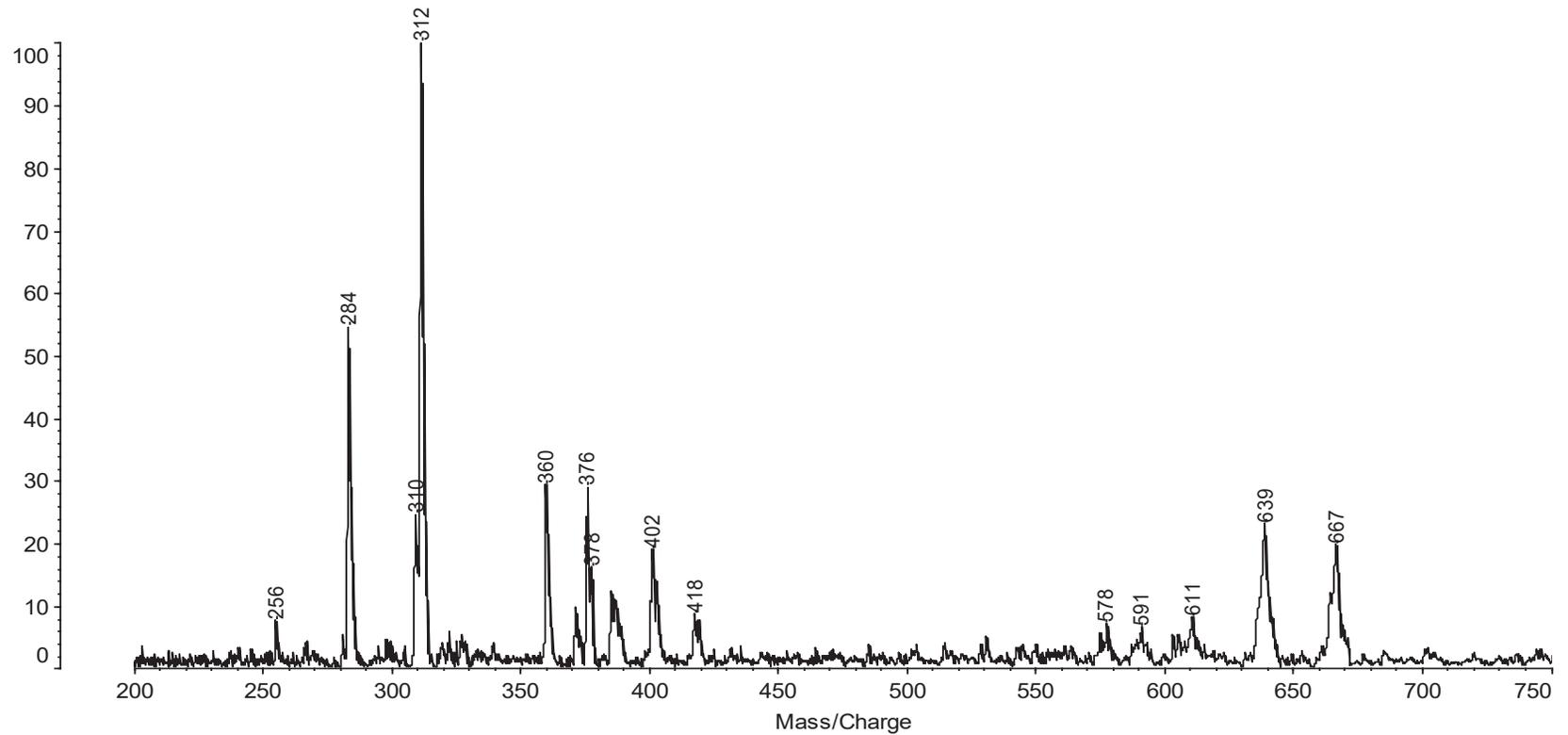
LNT_CO2_1, Na-Adducts; mass range: 200-750 Da TEMBEC Depolymerized

LNT_Co2_1 - Aceton

Data: Pizzi 09-03_0046.N13[c] 3 Jun 2009 17:48 Cal: tof-PEG1450-10000 3 Jun 2009 17:07

Shimadzu Biotech Axima ToF² 2.7.2.20070105: Mode Linear, Power: 85, P.Ext. @ 10000 (bin 149)

%Int. 32 mV[sum= 2403 mV] Profiles 29-103 Smooth Av 100 -Baseline 200



Anexo 3c. Espectro MALDI-TOF de la lignina Ln_CO2

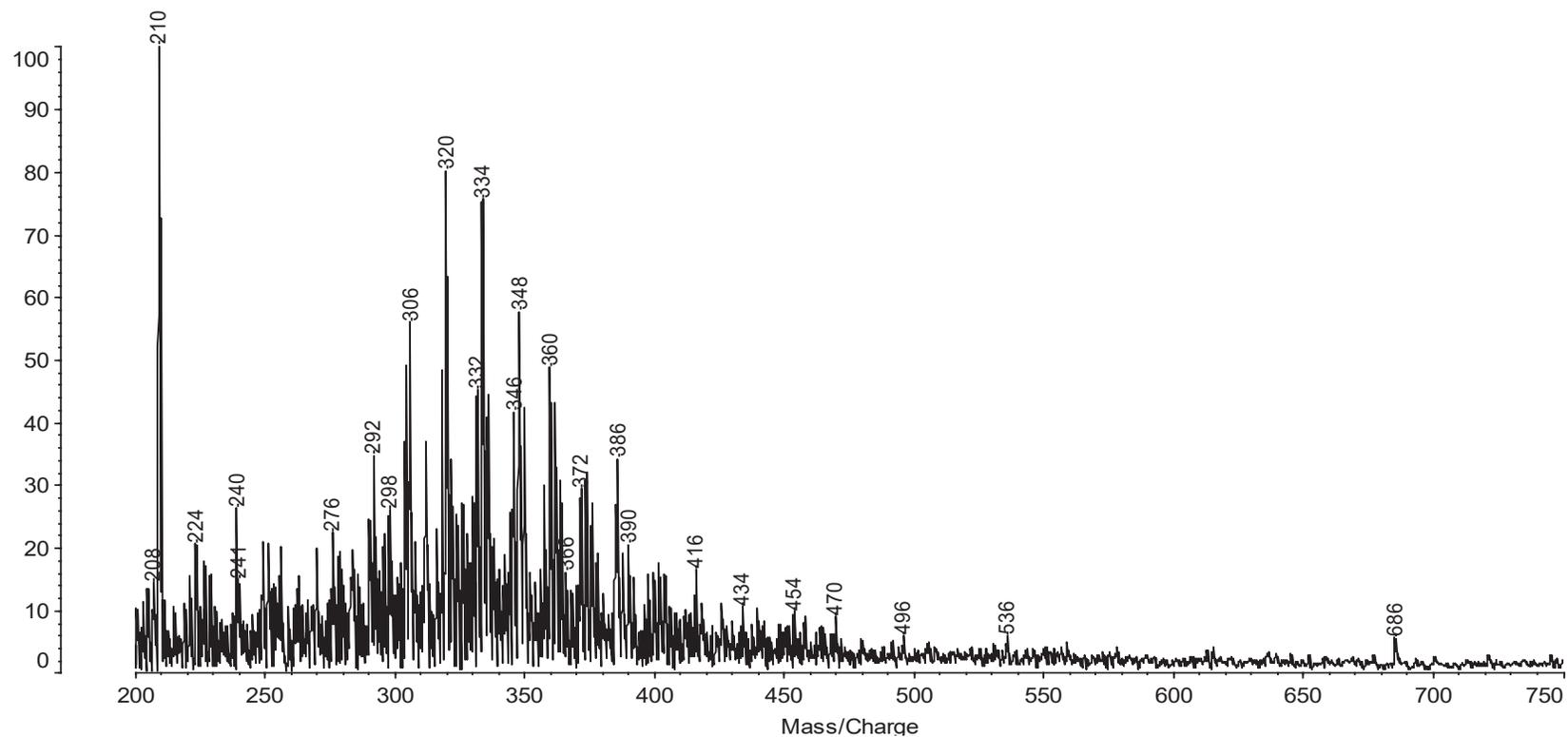
Lignina inde depolymerizade, Na-Adducts; mass range: 200-750 Da

Lignina inde depolymerizade - Aceton

Data: Pizzi 09-03_0029.M14[c] 3 Jun 2009 17:12 Cal: tof-PEG1450-10000 3 Jun 2009 17:07

Shimadzu Biotech Axima ToF² 2.7.2.20070105: Mode Linear, Power: 93, P.Ext. @ 10000 (bin 149)

%Int. 52 mV[sum= 5248 mV] Profiles 1-100 Smooth Av 100 -Baseline 50



Anexo 3d. Espectro MALDI-TOF de la lignina Ln_inde_dep.

Anexo 4. Productos obtenidos durante la realización de este trabajo.

1. Sedano, M. M., López, A. P. and Pizzi, A. (2009). Natural Lignans Adhesion to Cellulose: Computational vs Experimental Results. *Journal of Adhesion Science and Technology*. Enviado.
2. Martinez, C., Sedano, M., Munro, A., López, P. and Pizzi, A. (2010). Evaluation of some synthetic Oligolignols as Adhesives: A Molecular Docking Study. *Journal of Adhesion Science and Technology*. Enviado.