



Departamento de Química Orgánica  
Facultad de Química  
Universidad de la República



**Recuperación de productos químicos de alto valor agregado a partir de lignina Kraft. Preparación de modelos de lignina y estructuras relacionadas con potencial sintético.**

Trabajo presentado para aspirar al título de Doctor en Química

Lic. Virginia Aldabalde

**Tribunal:**

**Dr. Vittorio Vinciguerra**

**Dra. Pilar Menéndez**

**Dr. Eduardo Dellacasa**

**Directores:**

**Dra. Patricia Saenz Méndez**

**Dra. Daniela Gamenara**

**Dr. Gustavo Seoane**

**Marzo de 2015**

A mis padres, Glivia y Aparicio.



“La vida es linda, lo malo es que muchos confunden lindo con fácil.”

Mafalda (Quino)

## **Agradecimientos**

En primer lugar, me gustaría agradecer a mis padres. Porque ellos me apoyaron siempre, porque siempre creyeron en mí, porque siempre estuvieron ahí cuando los necesité. Gracias, por eso y por enseñarme todo lo que soy. Como dijo una amiga: sin ellos, nada hubiera sido posible.

A mis directores de tesis, Patricia, Daniela y Gustavo.

A Fede, Lucia, Matias y Santiago que son también parte de esta tesis.

A mis amigos y compañeros de Orgánica.

A los compañeros de Farmacia y LBB.

A UPM, Fanapel y Pamer, por brindarme la materia prima para mi trabajo.

Facultad de Química. UdelAR

ANII (Agencia Nacional de Investigación e Innovación).

PEDECIBA (Programa de Desarrollo de Ciencias Básicas).

Lindbergh Foundation.

CSIC (Comisión Sectorial de Investigación Científica)

Luis y Pilar por los experimentos de pirólisis.

Guille Moyna por los experimentos de HSQC y por dejarme meter mano en esos RMN de 400 y 500.

Vero y Horacio por los espectros de RMN de todos los días.

Laura Franco Fraguas, por brindarnos y ayudarnos con las enzimas HRPO.

Karen Ovsejevi y Larisa por la ayuda con las enzimas Lacasas.

Bruno y Pancho por los IR del comienzo.

Leopoldo por los experimentos de RX.

## **ÍNDICE**

<b>1. Introducción</b>	<b>2</b>
1.1. Referencias	
1.2. Bibliográficas	6
<b>2. Antecedentes</b>	<b>9</b>
2.1. Biomasa forestal y su uso a nivel mundial	9
2.2. Lignina: biosíntesis y procesos de extracción	11
2.2.1. Biosíntesis de lignina	11
2.2.2. Extracción y aislamiento de lignina de distintas plantas	16
2.2.3. Proceso Kraft y licor negro (LN)	18
2.2.4. Extracción de lignina a partir de licor negro	22
2.3. Degradación y estudio estructural de distintos tipos de lignina	23
2.3.1. Degradación y uso de lignina como materia prima renovable	23
2.3.2. Análisis estructural de lignina de distintos orígenes	29
2.4. Síntesis de modelos de lignina y derivados fenilpropanoides	35
2.4.1. Síntesis de derivados fenilpropanoide	36
2.4.2. Síntesis de modelos de lignina mediante distintas estrategias sintéticas	37
2.4. Referencias bibliográficas	44
<b>3. Objetivos y metodología</b>	<b>52</b>
3.1. Objetivo general	52
3.1.1. Objetivos específicos	52
3.2. Referencias bibliográficas	56
<b>4. Resultados y discusión</b>	<b>59</b>
4.1. Extracción, fraccionamiento e identificación de lignina a partir de licor negro (LN) de distintos orígenes	59
4.1.1. Precipitación de lignina mediante disminución de pH a 2	59
4.1.2. Fraccionamiento de lignina a partir de LN, mediante disminución gradual del pH	65
4.2. Síntesis de derivados fenilpropanoides	69
4.3. Síntesis de modelos de lignina	79
4.3.1. Síntesis de polímero con enlace $\beta$ -O-4	79
4.3.2. Síntesis de dímero $\beta$ -5 mediante el uso de HRPO	84

4.3.3.	Síntesis de dímero con enlace 5-5'	85
4.3.4.	Síntesis de modelo con enlace $\beta$ - $\beta$ resinol	89
4.3.5.	Síntesis de trímero conteniendo enlace 5-5' y $\beta$ -O-4	91
4.3.6.	Acoplamiento $\delta C/\delta H$ de los distintos modelos obtenidos	93
4.4.	Análisis estructural de lignina Kraft	93
4.4.1.	Tratamiento de lignina con distintos disolventes orgánicos	93
4.4.2.	Análisis complementario de lignina Kraft proveniente de UPM	107
4.5.	Referencias bibliográficas	113
<b>5.</b>	<b>Conclusiones y perspectivas</b>	116
5.1.	Conclusiones y perspectivas	117
5.1.1.	Extracción y fraccionamiento de lignina Kraft	117
5.1.2.	Análisis estructural de lignina Kraft y fracciones aisladas	117
5.1.3.	Degradación de lignina Kraft	118
5.1.4.	Síntesis de derivados fenilpropanoides	118
5.1.5.	Síntesis de modelos de lignina	119
5.2.	Referencias bibliográficas	119
<b>6.</b>	<b>Parte experimental</b>	121
6.1.	Generalidades	121
6.1.	Procedimientos de extracción de lignina Kraft a partir de licor negro (LN)	122
6.2.1.	Procedimiento 1: Extracción de lignina Kraft a pH=2	122
6.2.2.	Procedimiento 2: Extracción de lignina Kraft a distintos valores de pH	123
6.3.	Análisis y extracción de compuestos de bajo peso molecular a partir de lignina Kraft	123
6.3.1.	Extracción de lignina Kraft con distintos disolventes orgánicos y posterior fraccionamiento mediante columna cromatográfica	123
6.3.2.	Extracción de lignina Kraft con disolventes orgánicos de polaridad creciente	125
6.4.	Ozonólisis de lignina Kraft	129
6.5.	Hidrólisis de malonato de etilo	130
6.6.	Obtención de derivados de ácido cinámico	131
6.7.	Síntesis de modelo de lignina con enlace $\beta$ -O-4	138
6.8.	Síntesis de modelos con enlace $\beta$ -5	142
6.9.	Síntesis de modelo con enlace 5-5' y $\beta$ -O-4	143

6.10.	Síntesis de modelo con enlace $\beta$ - $\beta$	147
6.11.	Referencias bibliográficas	147
7.	Producción científica	149
7.1.	Publicaciones	150
7.2.	Presentación en congresos	150
7.3.	Difusión en prensa escrita	151

## **ÍNDICE DE FIGURAS**

### **Capítulo 1: Introducción**

- Figura 1: Biorrefinería integrada a partir de una planta de producción de pulpa de celulosa. 2
- Figura 2: Estructura de lignina y monolignoles que la componen. 3

### **Capítulo 2: Antecedentes**

- Figura 1: Composición de la madera. 9
- Figura 2: Modelo estructural de lignina. 11
- Figura 3: Principales unidades estructurales en la lignina. Los enlaces resaltados son aquellos que se forman en las reacciones de acoplamiento radicalario. 15
- Figura 4: Ejemplo de alguno de los tipos de enlace encontrados en ligninas Kraft. 20
- Figura 5: Proceso Kraft. 21
- Figura 6: Ejemplo de composición del LN. 22
- Figura 7: Distintos procesos de degradación de lignina (Adaptada de Chávez-Sifontes y colaboradores). 24
- Figura 8: Espectro de IR de dos tipos de ligninas de distinto origen. 30
- Figura 9: Bandas características de lignina en el espectro de UV. 31
- Figura 10: Espectros de HSQC de ligninas aisladas de *E. globulus* a diferentes tiempos de crecimiento. 33
- Figura 11: Principales estructuras presentes en maderas del género *E. globulus*. 34

### **Capítulo 3: Objetivos y Metodología**

- Figura 1: Distintas metodologías de degradación de lignina. 54

### **Capítulo 4: Resultados y discusión**

- Figura 1a: IR de lignina Kraft aislada de LN de Fanapel. 62
- Figura 1b: IR de lignina Kraft aislada de LN de Pamer. 62
- Figura 1c: IR de lignina Kraft aislada de LN de UPM. 63
- Figura 2: Espectroscopía de IR de distintas fracciones de lignina extraída a partir de *E. pellita*. 64
- Figura 3: IR de fracción precipitada a pH=7 durante neutralización de LN. 64
- Figura 4: Espectro de UV de la fracción F0 obtenida por disminución del pH del LN a 7. 65

Figura 5a: IR de lignina precipitada a pH 6	67
Figura 5b: IR de lignina precipitada a pH 4	68
Figura 5c: IR de lignina precipitada a pH 2	68
Figura 6: Espectros de UV de las fracciones obtenidas mediante disminución de pH del LN a 6, 4 y 2 respectivamente.	69
Figura 7: Estructura de RX del compuesto <b>5j</b> .	75
Figura 8: Espectro de <sup>1</sup> H-RMN del compuesto <b>6f</b> .	77
Figura 9: Modelos de lignina objetivo.	79
Figura 10: Señales identificadas en <sup>13</sup> C-RMN de <b>polímero A</b> .	82
Figura 11: Señales identificadas en <sup>13</sup> C-RMN de <b>polímero B</b> .	83
Figura 12: Sistema mediador de lacasas (LMS).	86
Figura 13: Estructura de RX de divainillina.	88
Figura 14: Interconexiones de la molécula de divainillina en su red cristalina.	89
Figura 15: Compuestos aislados a partir de lignina Kraft.	94
Figura 16a: Espectro de <sup>1</sup> H-RMN de dímero con enlace 4-O-4' ( <b>34</b> ).	94
Figura 16b: Espectro de <sup>1</sup> H-RMN de siringol ( <b>35</b> ).	95
Figura 16c: Espectro de <sup>1</sup> H-RMN de etilsiringol ( <b>36</b> ).	95
Figura 17: IRs de fracciones de lignina obtenidas a partir de la extracción sucesiva con distintos disolventes, de lignina Kraft proveniente de LN de UPM.	103
Figura 18: IRs de fracciones 1 y residuo, obtenidas a partir de la extracción de lignina Kraft proveniente de LN de Pamer.	104
Figura 19: Compuestos obtenidos mediante oxidación de lignina con ozono.	108
<b>Capítulo 6: Parte experimental</b>	
Figura 1: Estructura de <b>5f</b> , resultante de la difracción de RX de un monocristal.	135
Figura 2: Dímeros formados por de enlaces de hidrógeno centrosimétricos entre O1 y O3 de dos moléculas de <b>5f</b> .	137
Figura 3: Empaquetamiento de <b>5f</b> .	138
Figura 4: Estructura de divainillina ( <b>24</b> ), mediante difracción de RX de polvo.	144

## **ÍNDICE DE ESQUEMAS**

### **Capítulo 1: Introducción**

Esquema 1: Síntesis de derivados fenilpropanoides.	5
Esquema 2: Síntesis de modelos de lignina con diferentes tipos de enlaces.	6

### **Capítulo 2: Antecedentes**

Esquema 1: Biosíntesis propuesta para la lignina.	13
Esquema 2: Radicales que pueden formarse durante la biosíntesis de lignina.	14
Esquema 3: Formación de enlace enol éter, a través de un intermedio quinónico.	19
Esquema 4: Ruptura de enlace $\beta$ -aril éter.	19
Esquema 5: Alternativas sintéticas para la obtención de ésteres y ácidos $\alpha,\beta$ -insaturados.	36
Esquema 6: Condensación de Knoevenagel-Doebner.	36
Esquema 7: Obtención de derivados de ácido cinámico.	37
Esquema 8: Síntesis de polímeros con enlace $\beta$ -O-4.	38
Esquema 9: Estrategias sintéticas para la preparación de dímeros con enlace $\beta$ - $\beta$ resinol.	39
Esquema 10: Posibles acoplamientos en derivados fenilpropanoides utilizando HRPO.	40
Esquema 11: Síntesis de modelo deshidroferulato acoplado mediante enlace 5-5' presente en paredes celulares de plantas.	41
Esquema 12: Síntesis de bifenilos con acoplamiento 5-5'.	41
Esquema 13: Mecanismo de formación de polímeros fenólicos.	42
Esquema 14: Síntesis de divainillina.	43
Esquema 15: Síntesis de modelos con enlaces 5-5' y $\beta$ -O-4.	44

### **Capítulo 3: Objetivos y metodología**

Esquema 1: Metodología de extracción de lignina a partir de LN.	53
Esquema 2: Preparación de derivados fenilpropanoides.	54
Esquema 3: Síntesis de polímeros con enlace $\beta$ -O-4.	55
Esquema 4: Preparación de trímero con enlace $\beta$ -O-4 y 5-5'.	56
Esquema 5: Preparación de dímero con enlace $\beta$ - $\beta$ resinol.	56

### Capítulo 3: Resultados y discusión

Esquema 1: Extracción de lignina a partir de LN.	60
Esquema 2: Extracción de lignina a partir de LN, mediante disminución gradual del pH.	66
Esquema 3: Reacción de Knoevenagel-Doebner para la obtención de derivados de ácido cinámico.	70
Esquema 4: Mecanismo propuesto para la formación de ácidos $\alpha,\beta$ -insaturados y vinilfenoles, mediante la reacción de Knoevenagel-Doebner.	73
Esquema 5: Formación de metiluros de quinona, responsables de la formación de vinilfenoles y cumarinas.	74
Esquema 6: Mecanismo propuesto para la formación del producto <b>5j</b> .	75
Esquema 7: Formación de compuesto <b>6f</b> utilizando 2-metoxi-4-vinilfenol como material de partida.	78
Esquema 8: Mecanismo propuesto para la formación del dímero <b>6f</b> .	78
Esquema 9: Ruta sintética para la síntesis del monómero <b>11</b> precursor de los <b>polímeros A y B</b> .	80
Esquema 10: Inversión de pasos de síntesis para la preparación del monómero <b>11</b> .	80
Esquema 11: Síntesis de <b>polímero A</b> utilizando Cl-PMB como grupo protector.	81
Esquema 12: Síntesis de <b>polímero B</b> a partir de <b>polímero A</b> .	82
Esquema 13: Síntesis de ferulato de etilo y alcohol coniferílico.	84
Esquema 14: Síntesis de modelos con enlace $\beta$ -5	84
Esquema 15: Síntesis de divainillina mediada por lacasas.	86
Esquema 16: Síntesis de divainillina utilizando HRPO como biocatalizador.	88
Esquema 17: Síntesis de dímero $\beta$ - $\beta$ resinol a partir de alcohol coniferílico.	90
Esquema 18: Síntesis de dímero $\beta$ - $\beta$ resinol a partir de ácido ferúlico utilizando lacasas.	90
Esquema 19: Síntesis de trímero con enlace 5-5' y $\beta$ -O-4, descrito en literatura.	91
Esquema 20: Síntesis de trímero con enlace 5-5' y $\beta$ -O-4.	92
Esquema 21: Fraccionamiento de lignina Kraft mediante disolución secuencial.	101
Esquema 22: Ozonólisis de lignina Kraft de UPM.	107

## **ÍNDICE DE TABLAS**

### **Capítulo 2: Antecedentes**

Tabla 1: Capacidad de producción en distintas plantas de procesamiento de pulpa de celulosa a nivel mundial.	10
Tabla 2: Porcentajes de monolignoles presentes en las ligninas de distintos tipos de maderas.	14
Tabla 3: Metodologías de extracción de lignina (Adaptada de Obts y Kirk 1988).	17
Tabla 4: Métodos utilizados para la degradación oxidativa de la lignina, ventajas y desventajas.	26
Tabla 5: Efecto del disolvente sobre la absorción de ciertos grupos presentes en ligninas, en el espectro de UV.	32
Tabla 6: Datos de m/z de alguno de los compuestos obtenidos mediante pirólisis de lignina, y sus estructuras correspondientes.	35

### **Capítulo 4: Resultados y discusión**

Tabla 1: Extracción de lignina a partir de LN de distintos orígenes.	61
Tabla 2: Masa de fracciones precipitadas a distintos pH.	66
Tabla 3: Resultados obtenidos en las condiciones clásicas de Knoevenagel-Doebner con los derivados de benzaldehído ensayados.	70-71
Tabla 4: Reacción de Knoevenagel con vainillina, variando los equivalentes de piridina y piperidina, y el disolvente.	72
Tabla 5: Condiciones de reacción para la síntesis de modelos con enlace $\beta$ -5.	85
Tabla 6: Diferentes condiciones de reacción para la síntesis de divainillina catalizada por lacasas de <i>T. versicolor</i> .	87
Tabla 7: Condiciones de reacción para la obtención del dímero con enlace $\beta$ - $\beta$ resinol en ausencia de O <sub>2</sub> .	91
Tabla 8: Extracción y fraccionamiento de lignina Kraft mediante distintos disolventes.	93
Tabla 9: Lista de acoplamientos $\delta_C/\delta_H$ en los espectros de HSQC y sus correspondientes asignaciones.	97
Tablas 10 y 11: Asignación de acoplamientos $\delta_C/\delta_H$ presentes en los experimentos de HSQC de los distintos modelos sintetizados.	98-99

Tabla12a: Acoplamientos identificados en los distintos espectros de HSQC de lignina Kraft, obtenida mediante extracción con CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> y posterior separación en columna cromatográfica.	100
Tabla12b: Acoplamientos identificados en los distintos espectros de HSQC de lignina Kraft, obtenida mediante extracción con AcOEt y posterior separación en columna cromatográfica.	100
Tabla 13: Porcentajes de extracción con distintos disolventes en Soxhlet.	102
Tabla 14a: Acoplamientos identificados en los espectros de HSQC de fracciones de lignina proveniente de UPM, mediante extracción en Soxhlet.	105
Tabla 14b: Acoplamientos identificados en los espectros de HSQC de fracciones de lignina proveniente de Fanapel, mediante extracción en Soxhlet.	105
Tabla 14c: Acoplamientos identificados en los espectros de HSQC de fracciones de lignina proveniente de Pamer, mediante extracción en Soxhlet.	106
Tabla 15: Condiciones de reacción para ozonólisis de lignina Kraft.	108
Tabla 16: Resultados de la pirólisis de fracciones 2 a 5 (esquema 21) provenientes de lignina Kraft de UPM.	110
Tabla 17: Resultados obtenidos mediante pirólisis de modelos de lignina.	112
Tabla 18: Resultado obtenido para la pirólisis del modelo β-β resinol.	112
<b>Capítulo 6: Parte experimental</b>	
Tabla 1: Datos cristalinos y de la determinación estructural.	136
Tabla 2: Coordenadas atómicas fraccionarias y factores de temperatura.	137
Tabla 3: Datos cristalinos y de la determinación estructural.	145

## **TABLA DE ABREVIATURAS**

<b>ABTS</b>	Ácido 2,2-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)
<b>AcOEt</b>	Acetato de Etilo
<b>Ar</b>	Aromático
<b>BnBr</b>	Bromuro de bencilo
<b>BuLi</b>	n-butillitio
<b>c</b>	Cuarteto
<b>CaO</b>	Óxido de calcio
<b>CG o GC</b>	Cromatógrafo de gases
<b>CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub></b>	Diclorometano
<b>Cl-PMB</b>	Cloruro de <i>p</i> -metoxibencilo
<b>δ</b>	Desplazamiento químico (ppm)
<b>d</b>	Doblete
<b>dd</b>	Doblete de doblete
<b>DMF</b>	Dimetilformamida
<b>dtd</b>	Doblete de triplete de dobletes
<b>dt</b>	Doblete de triplete
<b>EM o MS</b>	Espectrometría de masas
<b>Et<sub>2</sub>O</b>	Dietiléter
<b>EtOH</b>	Etanol
<b>G</b>	guaiacilo
<b>H</b>	<i>p</i> -hidroxifenilo
<b>HBT</b>	1-hidroxibenzotriazol
<b>Hex</b>	Hexanos
<b>HRPO</b>	Peroxidasa de rábano picante
<b>HSQC</b>	Heteronuclear Single Quantum Coherence
<b>Hz</b>	Herzt
<b>IE</b>	Ionización electrónica
<b>IL</b>	Líquido iónico (Ionic liquid)
<b>IR</b>	Espectroscopia infrarroja
<b>ISO</b>	International Organization for Standardization
<b>J</b>	Constante de acopamiento
<b>KOH</b>	Hidróxido de potasio
<b>LIP</b>	Peroxidasa de lignina (lignin peroxidase)
<b>LN</b>	Licor negro

<b>LMS</b>	Sistema mediador de lacasa
<b>m</b>	Multiplete
<b>MeOH</b>	Metanol
<b>MnP</b>	Manganeso peroxidasa
<b>NaOH</b>	Hidróxido de sodio
<b>Na<sub>2</sub>S</b>	Sulfuro de sodio
<b>NBS</b>	<i>N</i> -bromosuccinimida
<b>nm</b>	nanometros
<b>PCC</b>	Clorocromato de piridinio
<b>ppm</b>	Partes por millón
<b>Py</b>	Piridina
<b>RMN</b>	Resonancia magnética nuclear
<b>RX</b>	Rayos X
<b>s</b>	Singulete
<b>S</b>	Siringilo
<b>t</b>	triplete
<b>TA</b>	Temperatura ambiente
<b>td</b>	Triplete de doblete
<b>TEMPO</b>	2,2',6,6'-tetrametilpiperidin- <i>N</i> -oxilo
<b>THF</b>	Tetrahidrofurano
<b>TLC</b>	Cromatografía en capa fina (Thin Layer Chromatography)
<b>t<sub>r</sub></b>	Tiempo de retención
<b>TsNH<sub>2</sub></b>	<i>p</i> -toluensulfonamida
<b>UV</b>	Espectroscopía ultravioleta

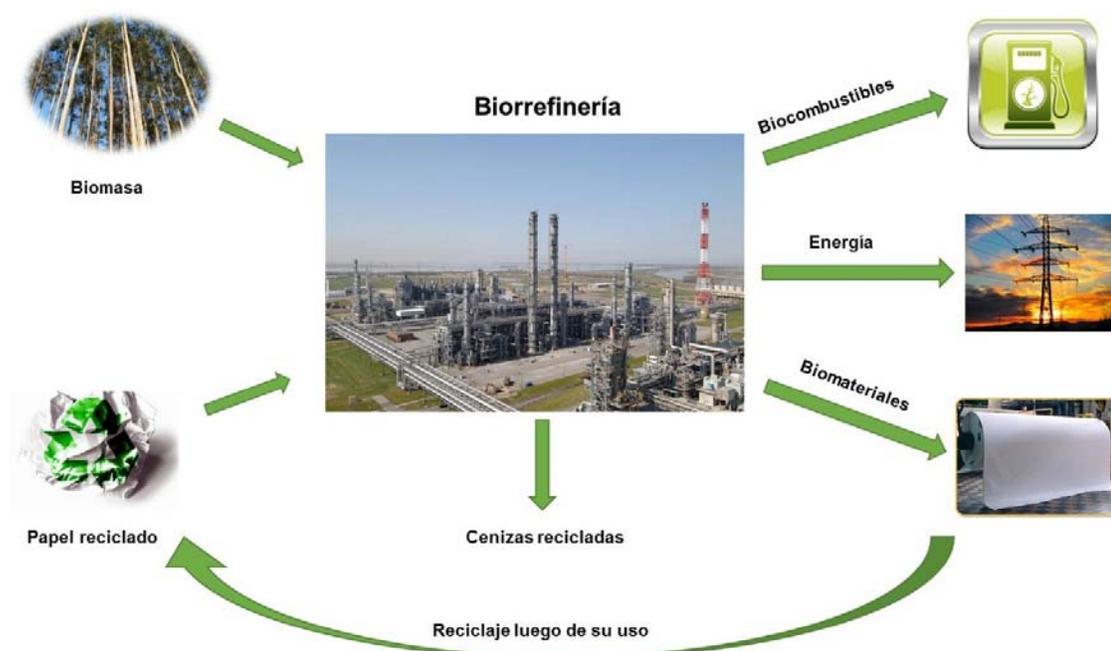
# **Capítulo 1**

## **Introducción**

## 1. INTRODUCCIÓN

El presente trabajo de tesis se enfoca en uno de los residuos forestales más abundante generados hoy en día, la lignina. Los resultados que se obtengan acerca de su composición son de gran interés para lograr un uso sustentable que permita incorporarla a un proceso de biorrefinería integrada.<sup>1,2</sup> Asimismo, esta tesis plantea el uso de distintas estrategias sintéticas para la preparación de modelos de lignina que a su vez puedan ser utilizados como posibles bloques de construcción de otra variedad de moléculas.

La posibilidad de obtener compuestos de mayor valor agregado a partir de un residuo industrial es uno de los desafíos más importantes hoy en día. Actualmente, se producen a nivel mundial un promedio de 70 millones de toneladas de lignina como subproducto de la producción de pulpa de celulosa, la cual es en su gran mayoría quemada para producir la energía necesaria para el funcionamiento de la fábrica.<sup>3</sup> Lograr un mejor aprovechamiento de la misma y de otras materias primas residuales, es un desafío que se plantea como una estrategia que permita alcanzar una economía global sustentable (Figura 1).

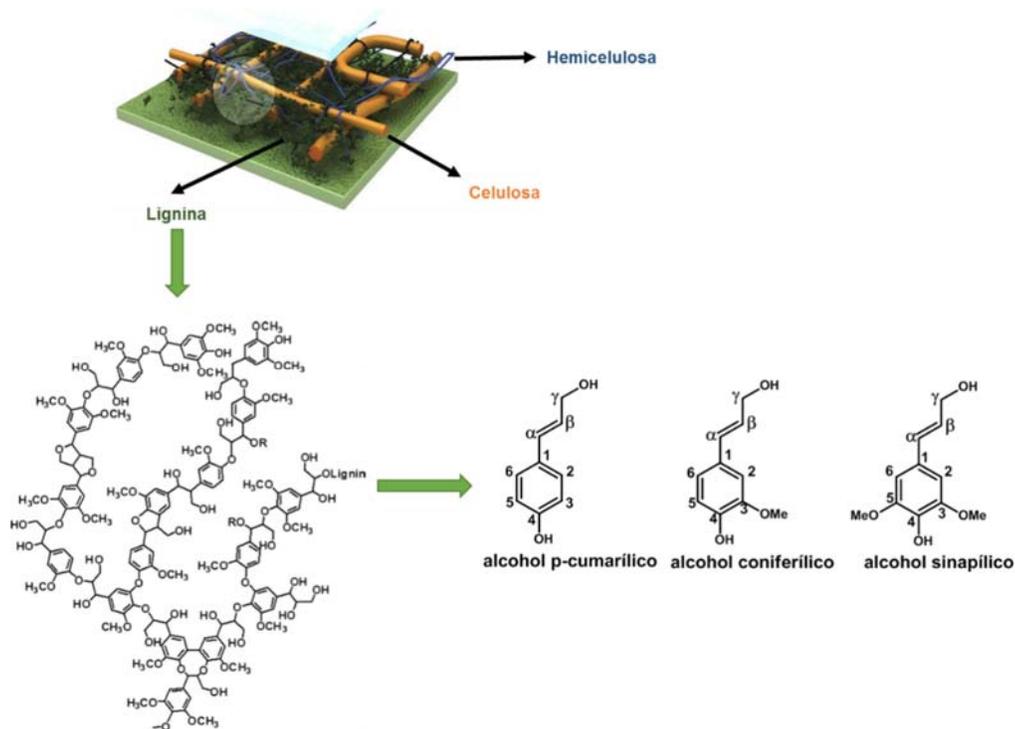


**Figura 1:** Biorrefinería integrada a partir de una planta de producción de pulpa de celulosa.<sup>4</sup>

El Licor Negro (LN) es el residuo que se genera durante la producción de pulpa de celulosa mediante el proceso Kraft (proceso por el cual la celulosa se separa de otros componentes de la madera) y su composición es mayoritaria en lignina (~37%) y hemicelulosa (~23%), además de los compuestos inorgánicos provenientes del proceso. La mayoría de las empresas utilizan actualmente el proceso Kraft para separar la celulosa de la lignina y otros componentes de la madera, como las empresas UPM y Fanapel instaladas en nuestro país.<sup>5</sup> Este proceso es muy eficiente, ya que recupera los compuestos inorgánicos ingresados al ciclo, generando energía con el material restante presente en la madera, a través de su quemado en una caldera. Encontrar un uso más rentable de estos desechos es un objetivo de interés dentro de la investigación en el área

forestal. Para ello es importante lograr un conocimiento de la lignina residual que otorgue información acerca de estructuras y grupos funcionales presentes en la misma.

La lignina es un heterobiopolímero con una estructura tridimensional compleja, formada a partir de tres monómeros llamados monolignoles (alcohol *p*-cumarílico, alcohol coniferílico y alcohol sinapílico, Figura 2). Se encuentra presente en todas las plantas, pero es mayoritaria en plantas leñosas, tanto las de maderas duras como blandas. Junto con la celulosa y la hemicelulosa, conforman la pared celular de las mismas y le otorgan sostén.



**Figura 2:** Estructura de lignina y monolignoles que la componen.

Aunque existe una aproximación estructural del biopolímero que data de 1939, descrita por Brauns,<sup>6</sup> su estudio se continúa hasta el día de hoy, debido a la gran variabilidad estructural de una planta a otra. Asimismo, durante los procesos de deslignificación de la madera, la lignina no sólo se separa de la celulosa, sino que también sufre una despolimerización y otras modificaciones químicas, como oxidación de grupos funcionales. Las ligninas obtenidas luego de los procesos de deslignificación se llaman ligninas técnicas (siendo la lignina Kraft una de ellas), y se encuentran en constante estudio para conocer su composición y lograr el aprovechamiento de las mismas.

El hecho de que la instalación de plantas de producción de pasta de celulosa se encuentre en crecimiento hoy en día en nuestro país, hace que la investigación en el tema contribuya a un conocimiento más amplio sobre las ligninas generadas durante el proceso Kraft (lignina Kraft), y por ende a un mejor aprovechamiento de las mismas.

Es así que se planteó un estudio de las ligninas Kraft producidas en nuestro país, utilizando las metodologías disponibles y comúnmente aplicadas para su análisis estructural.<sup>7-9</sup> En este trabajo se describen una variedad de técnicas analíticas para el estudio de las ligninas, entre las que se pueden enumerar: resonancia magnética nuclear (RMN) uni- y bidimensional,<sup>10,11</sup> espectroscopía de infrarrojo (IR),<sup>12</sup> espectroscopía ultravioleta (UV), pirólisis,<sup>13</sup> cromatografía de exclusión molecular, entre otras.<sup>14</sup> Nuestro

grupo de trabajo cuenta con una amplia experiencia en RMN, IR y UV, pero la pirólisis es una técnica que aún no había sido utilizada en nuestro laboratorio. Por lo tanto, el uso de la misma en este trabajo, no solo contribuyó a una mayor información sobre el biopolímero estudiado, sino que también generó experiencia en el uso de nuevas técnicas analíticas.

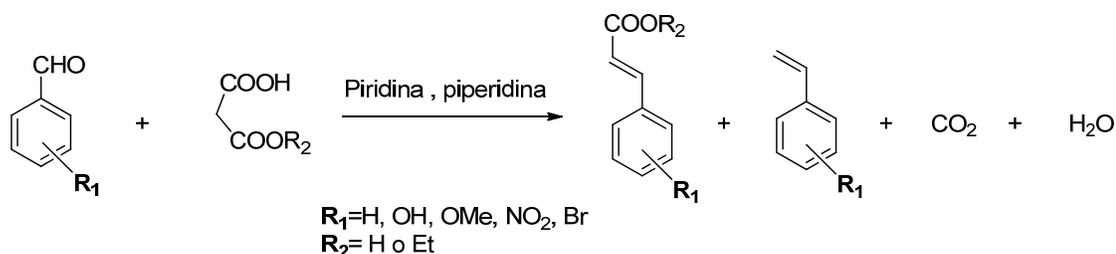
La lignina Kraft se puede extraer en forma sencilla y eficiente desde el LN que la contiene mediante una disminución del pH que provoca su precipitación, así como una separación del medio, basada en el tamaño molecular de los fragmentos obtenidos.<sup>15-17</sup> Una vez aislada, se puede utilizar cualquiera de las técnicas anteriormente mencionadas para estudiar su composición. Sin embargo, el hecho de que se trate de una mezcla compleja de compuestos hace necesaria la búsqueda de procedimientos que permitan obtener fracciones más simples, que no impliquen nuevas modificaciones químicas. Para ello, se ha descrito la precipitación selectiva mediante disminución del pH, así como el uso de disolventes orgánicos de distinta polaridad para extraer fracciones con distintas características.<sup>16,18</sup>

Un procedimiento alternativo para estudiar la composición y estructura de las ligninas consiste en su degradación. Existen una variedad de metodologías para degradar la lignina, siendo las más eficientes y que brindan mayor información, la oxidación mediante nitrobenzeno y la pirólisis; ambas ofrecen una aproximación de unidades *p*-hidroxifenilo (H), guaiacilo (G) y siringilo (S) presentes.

El uso de hongos provenientes de la madera, o sus enzimas aisladas (lacasas y peroxidasas), ha sido también uno de los métodos más estudiados para la despolimerización de lignina.<sup>19</sup> En los últimos años se ha incrementado la búsqueda para encontrar otro tipo de organismos que logren dicho objetivo, como por ejemplo bacterias.<sup>20</sup> Asimismo, el empleo de los hongos de la madera se centra en la posibilidad de su uso para degradar los desechos lignocelulósicos a productos de bajo impacto ambiental.

La síntesis de modelos es también una herramienta muy utilizada, para comparar los resultados analíticos de los mismos con los de la lignina natural o sus extractos parciales. Esto suele contribuir a un mejor entendimiento de los datos estructurales obtenidos.<sup>21,22</sup>

Nuestro grupo de trabajo ha estudiado la síntesis de derivados fenilpropanoides mediante el uso de la reacción de Knoevenagel-Doebner, aportando información acerca del mecanismo de dicha reacción, en relación a los benzaldehídos de partida utilizados y las condiciones de reacción ensayadas (Esquema 1).<sup>23</sup>



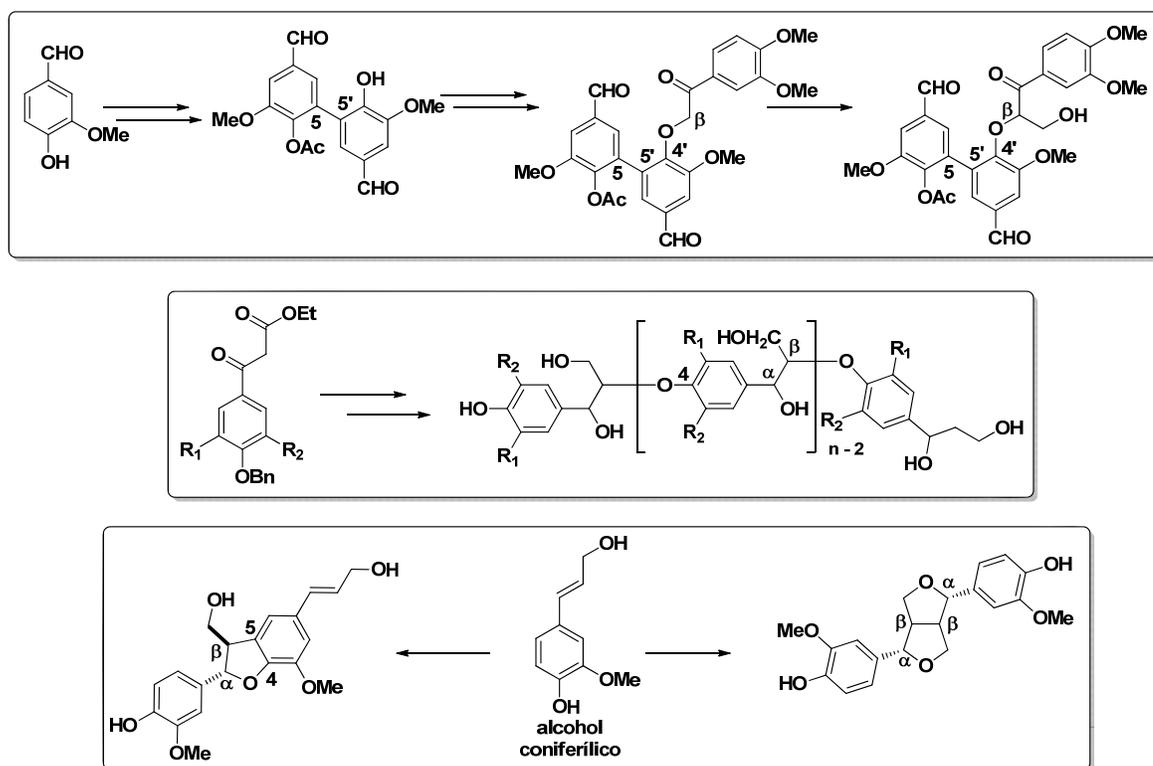
**Esquema 1:** Síntesis de derivados fenilpropanoides.<sup>23</sup>

La reacción se llevó a cabo en presencia de piperidina como organocatalizador, obteniéndose los productos deseados de forma muy eficiente. El término organocatalizador

fue introducido en 2000 por MacMillan y desde entonces, la organocatálisis representa un área muy atractiva dentro del campo de la investigación en química orgánica.<sup>24,25</sup>

Asimismo, la síntesis de modelos que contengan los tipos estructurales presentes en la lignina, es interesante para estudiar la reactividad de los enlaces formados (Esquema 2). Durante la biosíntesis de la lignina, los monolignoles se unen mediante varios tipos de enlace. Entre los más abundantes se encuentran:  $\beta$ -O-4,  $\beta$ -5 ( $\alpha$ -O-4),  $\beta$ - $\beta$  resinol, bifenilo 5-5' y difeniléter 4-O-5'. Durante el proceso Kraft los enlaces del tipo éter suelen romperse mientras que los C-C se mantienen intactos. Obtener modelos que los contengan, permite un mayor entendimiento sobre las reacciones que estos enlaces pueden sufrir durante los procesos de deslignificación, y otorga información para construir una base de datos de acoplamientos C-H en RMN bidimensional (HSQC).

Esta base de datos permite realizar un estudio comparativo con los resultados obtenidos de las distintas fracciones de lignina extraídas, y de esta forma lograr un mayor conocimiento de las mismas.



**Esquema 2:** Síntesis de modelos de lignina con diferentes tipos de enlaces.

Para la síntesis de estos modelos pueden utilizarse tanto reactivos químicos como enzimas aisladas. Las lacasas y peroxidasas son responsables de algunas etapas de la biosíntesis de la lignina en la madera, y también de su degradación. El uso de las mismas, como biocatalizadores para lograr sintetizar modelos de lignina es una estrategia utilizada por varios autores.<sup>26,27</sup>

El aporte de cada uno de los aspectos mencionados, se unen con el objetivo de lograr recuperar un desecho industrial con alto contenido de moléculas de interés (compuestos aromáticos), para ser utilizado como materia prima de nuevos compuestos de mayor valor

agregado. Conocer la composición de las ligninas Kraft producidas en Uruguay es importante para lograr un uso rentable y sostenible de las mismas, que permita utilizarlas como materia prima renovable.

### 1.1. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) Ragauskas, A. J.; Beckham, G. T.; Biddy, M., J.; Chandra, R.; Chen, F.; Davis, M. F.; Davison, B. H.; Dixon, R. A.; Glina, P.; Keller, M.; Langan, P.; Naskar, A. K.; Saddler, J. N.; Tschaplinski, T.; Tuskan, G. A.; Wyman, C. *Science* **2014**, *344*, 709.
- (2) Schorr, D.; Diouf, P. N.; Stevanovi, T. *Ind. Crops Prod.* **2014**, *52*, 65.
- (3) Berlin, A.; Balakshin, M. In *Bioenergy Research: Advances and Applications*; G. Gupta, M. T., Christian P. Kubicek, Jack Saddler and Feng Xu Ed.; Elsevier: CA, USA, 2014, p 315.
- (4) Ragauskas, A. J.; Williams, C. K.; Davison, B. H.; Britovsek, G.; Cairney, J.; Eckert, C. A.; Jr., W. J. F.; Hallett, J. P.; Leak, D. J.; Liotta, C. L.; Mielenz, J. R.; Murphy, R.; Templer, R.; Tschaplinski, T. *Science* **2006**, *311*, 484.
- (5) Smook, G. A. *Handbook for Pulp and Paper Technologists*; second ed.; Angus Wilde Publications, 1992; Vol. 11.
- (6) Brauns, F. E. *J. Am. Chem. Soc.* **1939**, *61*, 2120.
- (7) García, A.; Toledano, A.; Serrano, L.; Egüés, I.; González, M.; Marín, F.; Labidi, J. *Sep. Purif. Technol.* **2009**, *68*, 193.
- (8) Sette, M.; Wechselberger, R.; Crestini, C. *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 9529.
- (9) Ohra-aho, T.; Gomes, F. J. B.; Colodette, J. L.; Tamminena, T. *J. Anal. Appl. Pyrolysis* **2013**, *101*.
- (10) Rencoret, J.; Marques, G.; Gutiérrez, A.; Santos, J. I.; Jiménez-Barbero, J.; Martínez, A. T.; C. del Río, J. *Holzforschung* **2009**, *63*, 691.
- (11) Ede, R. M.; Brunow, G. *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 1477.
- (12) Nada, A.-A. M. A.; Yousef, M. A.; Shaffei, K. A.; Salah, A. M. *Polym. Degrad. Stab.* **1998**, *62*, 157.
- (13) Gooty, A. T.; Li, D.; Berruti, F.; Briens, C. *J. Anal. Appl. Pyrolysis* **2014**, *106*, 33.
- (14) Lin, S. Y.; Dence, C. W. *Methods in lignin chemistry*; Springer: NY, 1992.
- (15) Wallberg, O.; Jönsson, A.-S.; Wimmerstedt, R. *Desalination* **2003**, *156*, 145.
- (16) Sun, R.; Tomkinson, J. *Sep. Purif. Technol.* **2001**, *24*, 529.
- (17) Ragnar, M.; Lindgren, C. T.; Nilvebrant, N.-O. *J. Wood Chem. Technol.* **2000**, *20*, 277.
- (18) Li, M.-F.; Sun, S.-N.; Xu, F.; Sun, R.-C. *Sep. Purif. Technol.* **2012**, *101*, 18.
- (19) Knezevic, A.; Milovanovic, I.; Stajic, M.; Loncar, N.; Brceski, I.; Vukojevic, J.; Cilerdzic, J. *Bioresour. Technol.* **2013**, *138*, 117.
- (20) Bugg, T. D. H.; Ahmad, M.; Hardiman, E. M.; Singh, R. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2011**, *22*, 394.
- (21) Kishimoto, T.; Uraki, Y.; Ubukata, M. *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 2982.
- (22) Ciofi-Baffoni, S.; Banci, L.; Brandi, A. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1998**, 3207.
- (23) Aldabalde, V.; Risso, M.; Derrudi, M. L.; Geymonat, F.; Seoane, G.; Gamena, D.; Saenz-Méndez, P. *Open J. Phys. Chem.* **2011**, *1*, 85.
- (24) Ahrendt, K. A.; Borths, C. J.; MacMillan, D. W. C. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 4243.
- (25) MacMillan, D. W. C. *Nature* **2008**, *455*, 304.
- (26) Tranchimand, S.; Tron, T.; Gaudin, C.; Iacazio, G. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2006**, *42*, 27.

(27) Ralph, J.; Bunzel, M.; Marita, J.; Hatfield, R. D.; Lu, F.; Kim, H.; Schatz, P. F.; Grabber, J. H.; Steinhart, H. *Phytochem. Reviews* **2004**, 3, 79.

## **Capítulo 2**

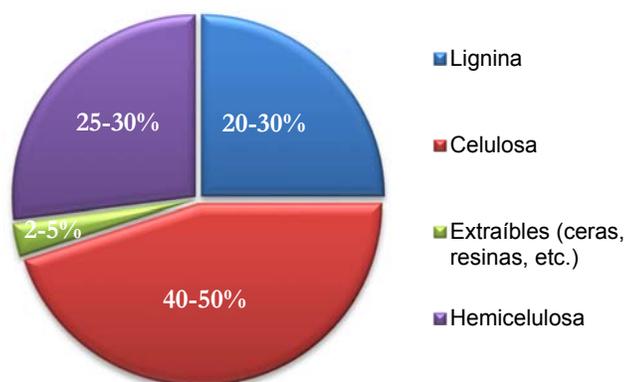
### **Antecedentes**

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. BIOMASA FORESTAL Y SU USO A NIVEL MUNDIAL

La biomasa es una de las fuentes de energías renovables más utilizadas en el mundo hoy en día, verificándose un incremento del uso de la misma en los últimos años. Por su parte, la biomasa proveniente del área forestal es una de las fuentes de energía más prometedoras, ya que la economía energética y los beneficios medioambientales que surgen del uso de la misma la hacen altamente conveniente. Adicionalmente, no sólo puede ser utilizada como fuente de energía sino que también es útil como materia prima para una variedad de compuestos de interés.

La biomasa forestal está compuesta mayoritariamente por carbohidratos complejos y lignina, producidos a través de procesos fotosintéticos. Hasta el momento, ha sido utilizada para la producción de biocombustibles y productos de mayor valor como adhesivos, disolventes, plásticos, tintas y lubricantes, entre otros. Existen dos tipos de biomasa forestal: la natural, que es la producida en la naturaleza sin ninguna intervención humana, y la residual que es la proveniente de residuos de actividades forestales o de la industria de la madera. La mayor parte de esta biomasa proviene de la madera, siendo la composición de la misma entre un 40-50% de celulosa, un 25-30 % de hemicelulosa, un 20-30% de lignina y un 2-5% de material extraíble como ceras, resinas, etc.(Figura 1).<sup>1</sup>



**Figura 1:** Composición de la madera.

Uno de los desafíos más significativos para la humanidad en el siglo XXI es el desarrollo de una economía global sustentable, desafío que de hecho requiere de procesos eficientes donde se aprovechen al máximo las materias primas. Las presiones sociales y gubernamentales respecto a la contaminación ambiental, la necesidad de conservación de los recursos para satisfacer los requerimientos crecientes de compuestos naturales, y el apremio por generar nuevos productos han sido responsables del desarrollo creciente de la investigación con miras a la utilización de materias primas renovables.<sup>2</sup>

Así, se encuentra planteado el desafío de desarrollar nuevas estrategias para la producción de materiales que sustituyan las actuales fuentes de productos químicos, provenientes

fundamentalmente de combustibles fósiles, generando así procesos ambientalmente amigables y reduciendo el costo de los mismos.

La conversión de biomasa en productos de alto valor es lo que se conoce como **biorrefinería**, un concepto que ofrece una solución a la dependencia mundial del petróleo, un recurso no renovable. A través de la producción de múltiples productos de interés, las biorrefinerías son capaces de aprovechar los componentes presentes en la biomasa, maximizando su valor y disminuyendo concomitantemente los desechos derivados de la misma.<sup>3,4</sup>

En nuestro país la industria forestal se ha incrementado en los últimos años, siendo la industria de procesado de pulpa de celulosa el principal consumidor de los productos forestales primarios. Actualmente, la producción mundial de pulpa de celulosa se encuentra entre 130 y 150 millones de toneladas por año, mientras que a nivel nacional la empresa UPM, localizada en Fray Bentos, está actualmente entre las dos de mayor capacidad de producción (Tabla 1).<sup>5</sup>

Empresa	Locación de la planta	Capacidad de producción de pulpa (1000 t de odw* /año)
<b>Domtar (USA/Canadá)</b>	Ashdown (AR, USA)	747
	Plymouth (NC, USA)	438
	Windsor (QC, Canadá)	447
<b>UPM (Finlandia)</b>	Fray Bentos (Uruguay)	1100
	Kaukas (Finlandia)	740
	Pietarsaari (Finlandia)	790
<b>Metsä-Botnia</b>	Husum (Suecia)	700
	Jutseno (Finlandia)	670
	Rauma (Finlandia)	630
<b>Arauco (Chile)</b>	Ránquil (Chile)	1027
	Arauco (Chile)	790

\*odw=peso seco en estufa

**Tabla 1:** Capacidad de producción en distintas plantas de procesado de pulpa de celulosa a nivel mundial.<sup>5</sup>

Dentro de la biomasa forestal, la lignina es uno de los componentes más abundantes y versátiles. Actualmente aproximadamente un 98% de este material se quema en las fábricas de producción de pasta de celulosa, en una etapa de recuperación de energía, restando sólo un 2% que se explota comercialmente para la producción de productos de mayor valor agregado.<sup>6</sup> No obstante, el uso de biomasa para la producción de biocombustibles es un objetivo que se ha incrementado en los últimos años. Hoy en día, la producción en la primera planta instalada de obtención de etanol a partir de celulosa, es de 75 millones L/año.<sup>7</sup>

Estos antecedentes, la necesidad de encontrar una alternativa sustentable a la dependencia del petróleo, y las grandes cantidades de biomasa generadas a nivel mundial, hacen de éste uno de los campos más prometedores y en crecimiento dentro de la investigación en materias primas renovables.

## 2.2. LIGNINA: BIOSÍNTESIS Y PROCESOS DE EXTRACCIÓN

### 2.2.1. Biosíntesis de lignina

La lignina es un biopolímero complejo, ramificado y amorfo, con una composición variable dependiendo de la fuente natural de donde provenga. La misma está presente en todas las plantas, siendo única debido a su complejidad y no habiéndose logrado hasta el momento definir una estructura primaria uniforme. El problema de una definición estructural de la misma se encuentra en la variedad de estructuras que la forman, en la materia prima de la cual provenga y en la forma de extracción. Junto con la celulosa y la hemicelulosa componen la pared celular vegetal, y le dan soporte mecánico, así como también son importantes en el transporte de agua y en la defensa contra patógenos en plantas vasculares.<sup>8,9</sup> Un modelo estructural aceptado hoy en día (Figura 2), puede resumirse en una serie de monómeros unidos entre sí mediante algunos enlaces característicos.

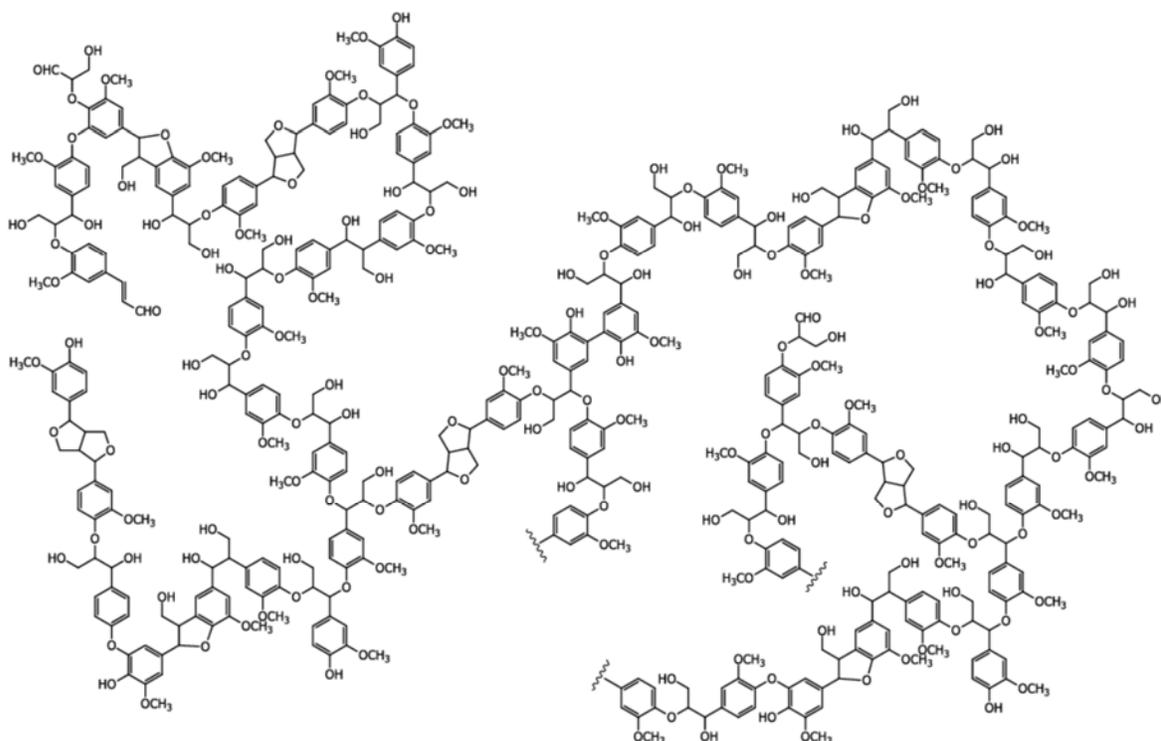
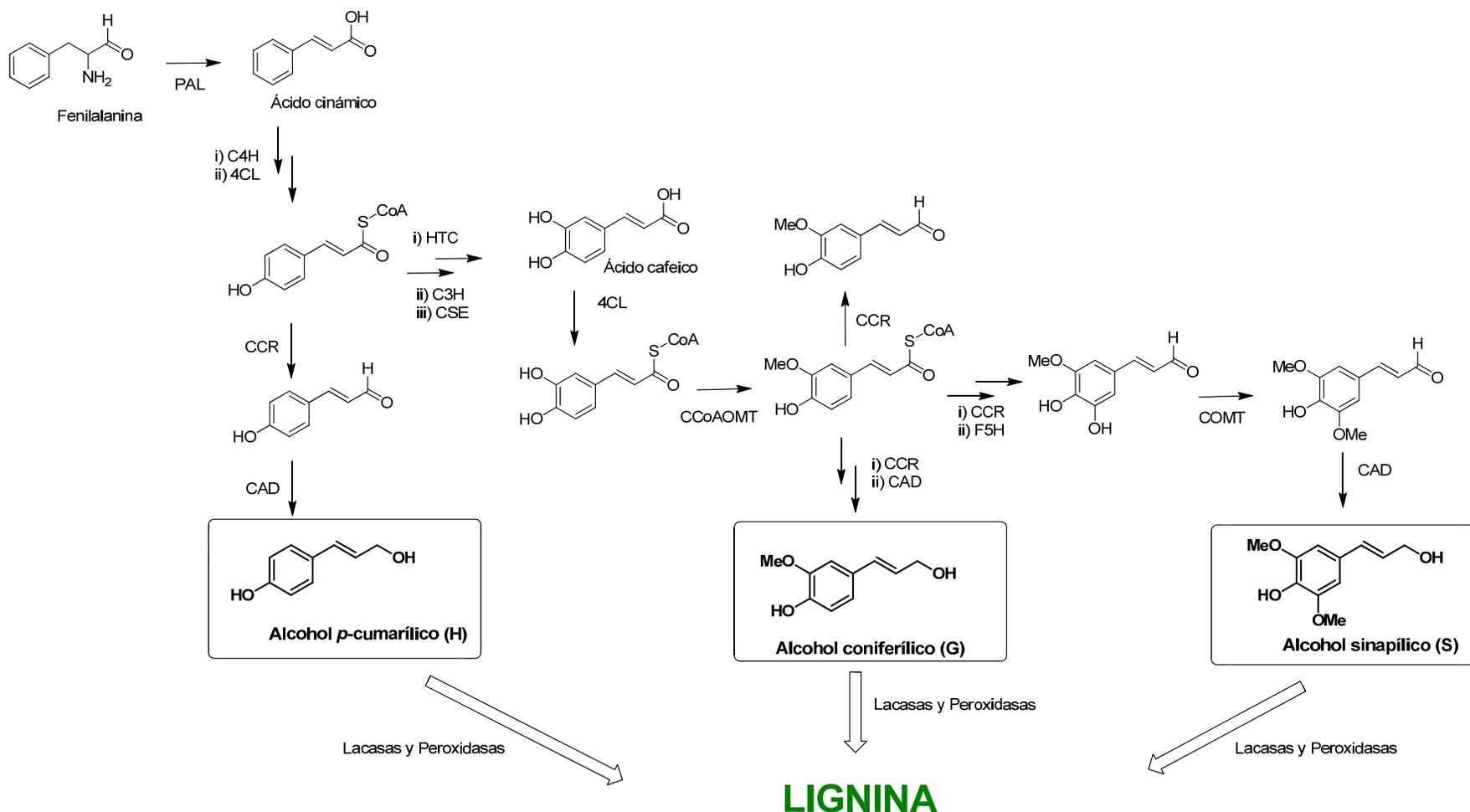


Figura 2: Modelo estructural de lignina.<sup>6</sup>

A pesar de su compleja estructura, la lignina puede ser racionalizada como un producto que polimeriza a partir de tres unidades monoméricas derivadas de fenilpropano. Estas se forman a partir de L-fenilalanina, y los estudios realizados hasta el momento reconocen una variedad de enzimas como las responsables del proceso biosintético. Este involucra la hidroxilación del anillo aromático, seguido por metilación y transformaciones a nivel de la cadena lateral (Esquema 1).<sup>8,9</sup> Sin embargo, el proceso de formación de la lignina en cada una de las plantas, es algo que se encuentra en continuo estudio, intentando determinar nuevas rutas biosintéticas. Recientemente se ha descrito alguno de los avances dentro de la ingeniería

genética, intentando controlar la biosíntesis de lignina con el fin de obtener una lignina de estructura más sencilla.<sup>7</sup>



**Esquema 1:** Biosíntesis propuesta para la lignina.<sup>8,9</sup> Enzimas involucradas: PAL: L-Fenilalanina amonio-liasa; C4H: cinamato 4-hidroxilasa; 4CL: 4-cumarato-CoA ligasa; CCR: cinamoil-CoA reductasa; CAD: Cinamil alcohol deshidrogenasa; HCT: *p*-hidroxicinamoil-CoA: quinasa shikimato *p*-hidroxicinamoiltransferasa; C3H: *p*-cumarato 3-hidroxilasa; CCoAOMT:cafeoil-CoA O-metiltransferasa; CSE: Cafeoil shikimato esterasa; F5H: ferulato 5-hidroxilasa; y COMT: Ácido cafeico O-metiltransferasa.

Las unidades fenilpropano que se muestran en la esquema 1, conocidas como “monolignoles”: alcohol *p*-cumarílico, alcohol coniferílico y alcohol sinapílico, se combinan mediante polimerización oxidativa, generando estructuras di-, tri-, oligo- o poliméricas.<sup>10-12</sup> Cada uno de estos monolignoles da lugar a las diferentes unidades de lignina, llamadas *p*-hidroxifenilo (H), guaiacilo (G) y siringilo (S) respectivamente, cuando son parte del biopolímero. Estas unidades son las más abundantes pero no las únicas presentes en la lignina.

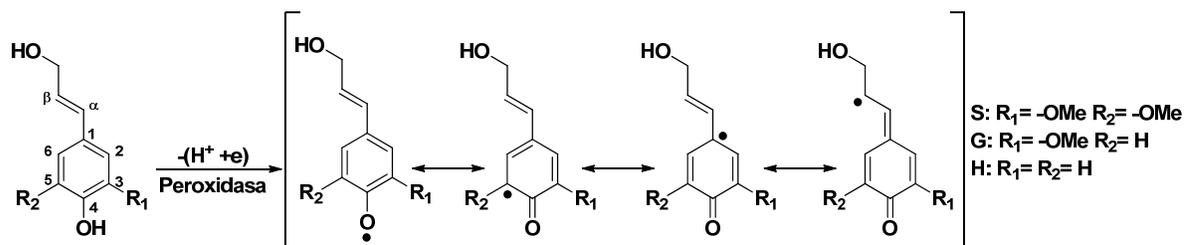
La cantidad y la composición de las ligninas en los diferentes tipos de plantas, varía según la taxonomía, los tipos de células, las condiciones de crecimiento y los años de la planta. Entre las ligninas provenientes de la madera podemos encontrar dos grandes grupos. Por un lado, las que provienen de maderas blandas, y prácticamente están compuestas por unidades G, y aquellas que provienen de maderas duras, y su composición es mayoritaria en unidades S y G. Las unidades H son minoritarias en ambos tipos de madera (Tabla 2).<sup>8</sup>

Tipo de madera	Porcentajes de monolignoles		
	Alcohol <i>p</i> -cumarílico	Alcohol coniferílico	Alcohol sinapílico
<b>Maderas blandas (coníferas)</b>	<5	>95	0
<b>Maderas duras (Eucotiledóneas)</b>	0-8	25-50	45-75

**Tabla 2:** Porcentajes de monolignoles presentes en las ligninas de distintos tipos de maderas.<sup>6</sup>

La biosíntesis de lignina comienza con la síntesis de los monolignoles. Estos son sintetizados y transportados a la pared celular, donde polimerizan de forma aleatoria, mediante un mecanismo de radicales libres mediado por enzimas que pueden ser peroxidasas y/o lacasas, generando variedad de uniones en el biopolímero.<sup>8,13</sup> La abundancia relativa de estas uniones, depende de la contribución de cada uno de los monolignoles, así como también del impedimento estérico y de las interacciones químicas durante el crecimiento de la pared celular.

Los enlaces que pueden formarse, aunque variados, son limitados y dependen de cuál sea el monolignol de partida. Los diferentes radicales libres que se generan durante la polimerización pueden situarse en la posición  $\beta$  del doble enlace, en el radical hidroxilo, o en las posiciones aromáticas C<sub>1</sub>, C<sub>3</sub> y C<sub>5</sub>, dependiendo de los sustituyentes sobre el anillo aromático (Esquema 2).

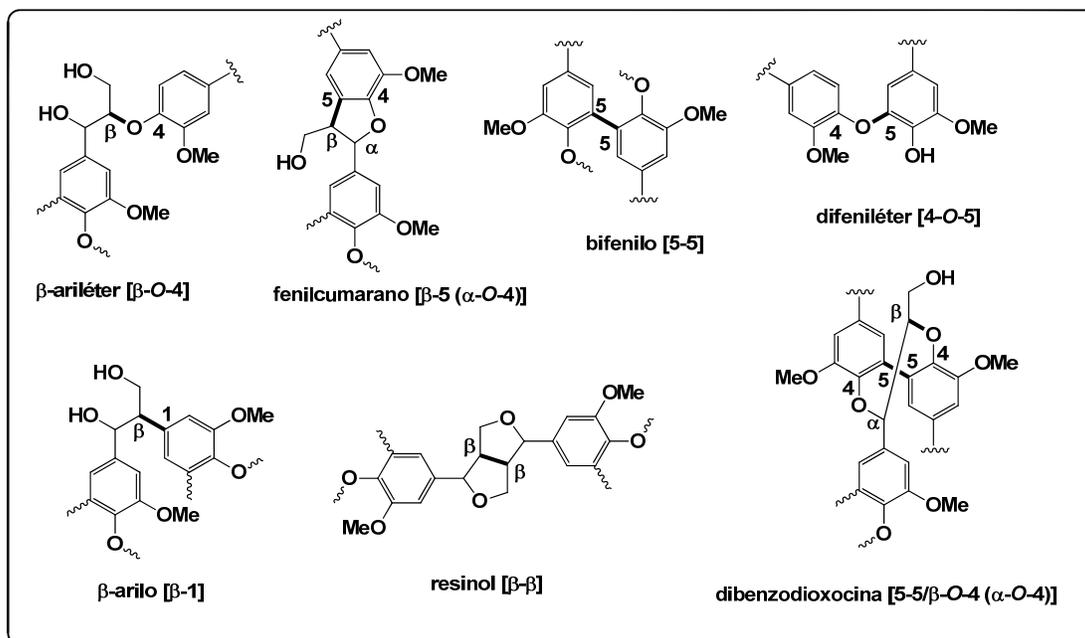


**Esquema 2:** Radicales que pueden formarse durante la biosíntesis de lignina.<sup>14</sup>

El proceso de polimerización comienza con el acoplamiento de los radicales libres generados en cada una de las estructuras resonantes. La formación de un intermedio reactivo denominado metiluro quinónico ayuda en este acoplamiento.<sup>14</sup> El ataque nucleofílico por agua, alcoholes o grupos hidroxilo fenólicos al intermedio, genera un dilignol. Los dilignoles generados sufren acoplamientos posteriores conduciendo al polímero resultante. El enlace más favorecido es el que involucra el radical en la posición  $\beta$  de los monolignoles, debido a una mayor estabilidad energética. Asimismo, es posible la formación de otros tipos de enlaces, además de los formados por los radicales libres, lo que da lugar a la amplia variedad de interconexiones presentes en la lignina.

A pesar de los estudios realizados para conocer más a fondo la biosíntesis de la lignina, hasta el momento no se sabe si existe o no un control en el proceso de polimerización. Sin embargo, la mayoría de los estudios se inclinan hacia una mezcla entre un control enzimático y una polimerización al azar, observando cambios estructurales dependiendo de las condiciones de crecimiento y edades de las maderas analizadas.<sup>12,15,16</sup>

Entre las principales uniones formadas se encuentran:  $\beta$ -O-4 ( $\beta$ -ariléter) presente en aproximadamente un 50% en ligninas nativas, mientras que más de un 12% son unidades  $\beta$ -5 o  $\alpha$ -O-4 (fenilcumarano).<sup>17</sup> En menores porcentajes se encuentran las uniones 5-5' (bifenilo), 4-O-5' (difeníléter),  $\beta$ - $\beta$  (resinol) y  $\beta$ -1 ( $\beta$ -arilo) (Figura 3).<sup>18,19</sup>



**Figura 3:** Principales unidades estructurales en la lignina. Los enlaces resaltados son aquellos que se forman en las reacciones de acoplamiento radicalario.

La abundancia relativa de las diferentes uniones depende de la contribución de cada monómero durante el proceso de polimerización. Las ligninas compuestas mayoritariamente por unidades G (maderas blandas) contienen uniones más resistentes a procesos químicos como:  $\beta$ -5, 5-5, y 4-O-5. Por su parte, las ligninas compuestas mayoritariamente por unidades S (maderas duras), no tienen la posibilidad de generar uniones a través del C<sub>5</sub> del anillo aromático, por lo que el porcentaje de estas uniones será menor.

La abundancia y disponibilidad de lignina en la biomasa forestal, su degradación, los procesos de extracción, así como los procesos posteriores para su aprovechamiento, siguen siendo actualmente objeto de estudio. La variabilidad estructural de este biopolímero hace difícil elaborar un proceso eficiente para el aprovechamiento de la misma, además de su uso actual como fuente de energía.

### **2.2.2. Extracción y aislamiento de lignina de distintas plantas**

El aislamiento de lignina nativa sin modificaciones no es posible debido a su insolubilidad en los diferentes disolventes disponibles, lo que hace necesario el uso de técnicas más drásticas para su extracción de la madera. La separación de la lignina de la celulosa se define como “deslignificación” y es uno de los desafíos más complejos en la industria papelera. Existen una variedad de procesos de deslignificación que han sido mejorados con el correr de los años, con el fin de lograr una celulosa libre de lignina. Estos procesos dan lugar a las que se denominan ligninas técnicas, con diferentes propiedades dependiendo del proceso utilizado y el estado de deslignificación obtenido.

En 1939 Brauns propuso una metodología para la extracción de lignina, obteniendo un extracto al cual denominó “lignina nativa”.<sup>20</sup> El procedimiento se basa en las metodologías clásicas de extracción de productos naturales; sin embargo el porcentaje de extracción no fue bueno y años más tarde sería sustituido por la metodología de Brökman, método que se conoce como lignina de la madera molida (Milled Wood Lignin: MWL).<sup>21</sup> Mediante dicho procedimiento se logra extraer entre un 20-30% del total de lignina contenida en la planta, prácticamente sin modificaciones, con un contenido de entre 2 a 10% de carbohidratos.<sup>14,22</sup> También se han desarrollado otros métodos, como extracción en condiciones ácidas (lignina de Klason), extracción en condiciones alcalinas (lignina sódica), proceso Kraft, o lignina tipo sulfito, entre otros. En la tabla 3 se describen alguno de los procesos más estudiados, así como una breve descripción de la lignina obtenida.

Preparación	Escala	Tratamiento	Observaciones
<b>Lignina de madera molida (MWL)</b>	Piloto / laboratorio	Extracción de lignina de madera finamente molida.	El porcentaje de recuperación de lignina es de aproximadamente 25%.
<b>Lignina nativa de Brauns</b>	Piloto / Laboratorio	Extracto etanólico de madera residual (madera tipo aserrín)	Bajo porcentaje de recuperación de lignina y menor peso molecular que la lignina MWL
<b>Lignina Kraft</b>	Industrial	Disolución química de lignina a altas temperaturas y presión	Lignina no representativa de la lignina original. Repolimerización durante el proceso.
<b>Lignosulfonato</b>	Industrial	Disolución en medio ácido.	Lignina de baja pureza y alto contenido de azufre, no representativa de la lignina nativa.
<b>Lignina Sódica</b>	Industrial	Disolución de lignina en medio alcalino.	Lignina insoluble de bajo peso molecular y bajo contenido de carbohidratos.
<b>Lignina hidrolizada (Klason)</b>	Industrial / Piloto	Insoluble, residuos condensables luego de hidrólisis de polisacáridos con ácido sulfúrico.	Lignina no representativa de la original. Método utilizado para la determinación del contenido de lignina.

**Tabla 3:** Metodologías de extracción de lignina (Adaptada de Obts y Kirk 1988).<sup>22</sup>

De los distintos procesos de extracción sólo tres se utilizan hoy en día en la mayoría de las industrias abocadas a la producción de pulpa de celulosa. Ellos son: proceso soda, proceso sulfito y proceso Kraft.

#### Lignina tipo soda

El procedimiento de extracción de lignina mediante el uso de hidróxido de sodio es el primer proceso desarrollado para la producción de pasta de celulosa, siendo históricamente el tipo de lignina industrial más abundante disponible comercialmente. El mismo se comenzó a utilizar a nivel industrial en 1853, específicamente sobre fibras como paja, bagazo o caña de azúcar, entre otras. Hasta principios del siglo pasado, este fue el proceso de elección para la fabricación de pasta de celulosa, y hasta el día de hoy alguna de las industrias pasteras de países en desarrollo continúa con su uso.

La lignina obtenida por este proceso suele ser de bajo peso molecular, insoluble en agua y con bajos contenidos de contaminantes como por ejemplo carbohidratos. A diferencia de los otros dos procesos industriales utilizados, la lignina tipo soda se encuentra libre de azufre,

por lo que se puede considerar como una lignina más cercana a la nativa, extraída mediante procesos industriales.

#### Lignina tipo sulfito

Este proceso fue desarrollado para la producción industrial de pasta de celulosa y por muchos años fue el principal proceso para la producción mundial de la misma. Se basa en el uso de bisulfito de calcio, un reactivo barato que hace al proceso sumamente rentable a nivel industrial. Sin embargo, en los últimos 50 años su uso ha bajado notablemente debido a la aparición del proceso Kraft, que permite un mejor aprovechamiento de los residuos sólidos producidos.

Durante el proceso tiene lugar la ruptura de los enlaces del tipo C-O, así como la sulfonación de las cadenas alifáticas. Aproximadamente entre un 4-8% de azufre es incorporado a las moléculas de lignina. Asimismo, la lignina se extrae junto con la hemicelulosa y otros carbohidratos presentes en la madera, por lo que debe ser purificada para utilizarse como materia prima de otros procesos.

#### Lignina tipo Kraft

El proceso Kraft es el más utilizado a nivel mundial en la actualidad. Mediante el mismo, se obtiene pasta de celulosa y la lignina se extrae junto con contaminantes como hemicelulosa, carbohidratos y azufre. A pesar del amplio uso de este proceso, la lignina obtenida mediante el mismo, así como otros componentes presentes en la madera, sólo se utilizan para producir energía, y no con otros fines. De esta manera las empresas generan su propia energía y recuperan los reactivos inorgánicos utilizados en el proceso. Así, las fábricas de pasta de celulosa son instalaciones con un sistema integrado de reciclaje de productos presentes en la pasta química, y generación de energía mediante la combustión de los compuestos obtenidos en el licor residual. El proceso Kraft se describirá en detalle en el ítem siguiente.

Durante los procesos de deslignificación algunas reacciones son reversibles y tiene lugar una repolimerización y/o condensación. Todos estos procesos son característicos en las ligninas técnicas y dependen de las condiciones de deslignificación (temperatura, pH, tiempo, etc.), así como del origen de las mismas. Es así que estas ligninas, aunque básicamente se constituyen de los mismos tipos de enlace que las ligninas nativas, suelen tener una complejidad aún mayor como resultado del proceso.<sup>23,24</sup>

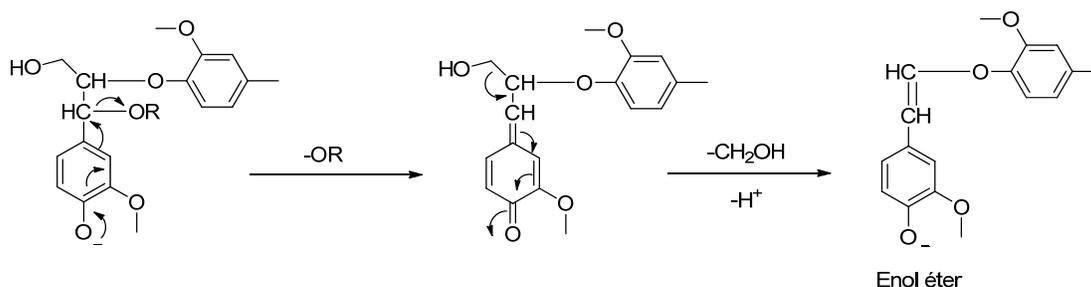
### **2.2.3. Proceso Kraft y licor negro (LN)**

Tal como se describió anteriormente, los procesos utilizados por las industrias para la obtención de la pulpa de celulosa son básicamente tres, y entre ellos, el proceso Kraft es el más utilizado actualmente, representando un 85% de la producción mundial de pulpa de celulosa.

En un proceso Kraft, una disolución acuosa de NaOH y Na<sub>2</sub>S, conocida como licor blanco, reacciona con los chips (pequeñas astillas) de madera a altas temperaturas y presiones en un equipo llamado digestor. La mezcla se calienta a 170°C durante aproximadamente dos horas.<sup>25</sup> Durante el tratamiento, los aniones hidróxido e hidrosulfuro reaccionan con la lignina, causando la fragmentación del polímero en fracciones solubles en medio básico. La

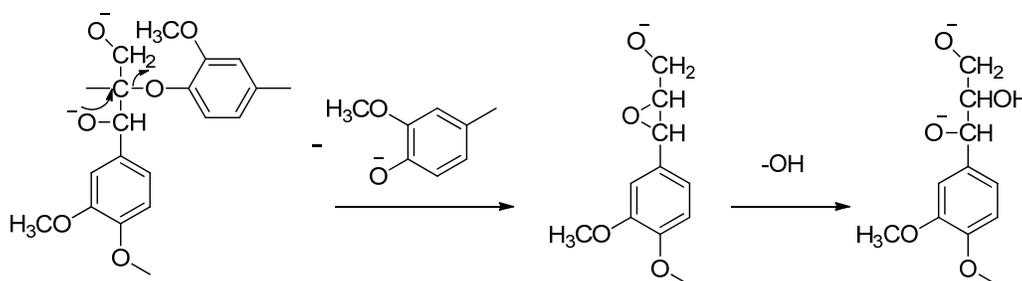
fragmentación de la macromolécula procede a través de la ruptura de los enlaces intermonoméricos, con la generación simultánea de grupos hidroxilo, que incrementan la hidrofiliabilidad de la lignina y de sus fragmentos. Como resultado, la solubilidad de los mismos en el licor de cocción se ve incrementada.<sup>26</sup> La lignina resultante del proceso es de menor peso molecular que la del tipo sulfito, con un menor contenido de azufre (1,5 – 3,0%) y carbohidratos, así como también un menor contenido de cenizas residuales.

Esta degradación ocurre predominantemente mediante la ruptura de los enlaces del tipo  $\beta$ -aril éter y  $\alpha$ -aril éter por diferentes mecanismos, lo cual da como resultado un incremento en los grupos fenólicos, mientras que los enlaces del tipo C-C suelen ser estables en las condiciones del proceso y no son afectados por el mismo. Los enlaces  $\alpha$ -aril éter son rápidamente escindidos para generar un intermedio metiluro de quinona (metiluro de quinona se refiere a una estructura quinoide con un grupo metilo) estable. Por otra parte, la ruptura de los enlaces del tipo  $\alpha$ -O-4 genera grupos fenóxido que pueden formar intermedios quinónicos, que mediante una serie de reacciones puede dar un enlace del tipo enol éter estable (Esquema 3).<sup>26</sup> Asimismo, a través de distintos estudios se ha observado una disminución en algunos grupos, como hidroxilos alifáticos, carboxilos y estructuras alifáticas saturadas.<sup>27</sup>



**Esquema 3:** Formación de enlace enol éter, a través de un intermedio quinónico.<sup>26</sup>

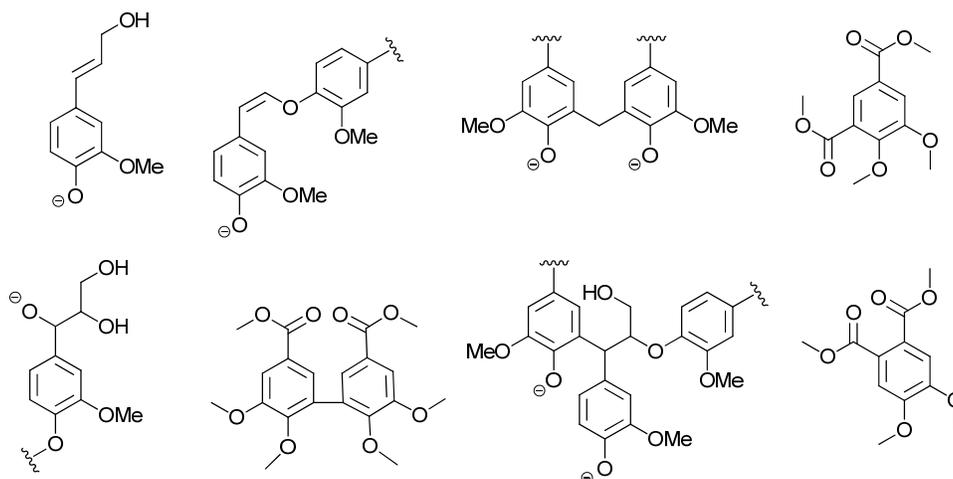
La ruptura de un enlace del tipo  $\beta$ -aril éter en estructuras no fenólicas, se ve favorecida mediante la presencia de un grupo hidroxilo en el carbono  $\alpha$  o  $\gamma$  (Esquema 4). Paralelamente, reacciones de condensación se ven favorecidas cuando un buen grupo saliente se sitúa sobre el carbono  $\beta$ , promoviendo la participación de grupos vecinos que provocan la ruptura del enlace  $\beta$ -arilo.<sup>26</sup>



**Esquema 4:** Ruptura de enlace  $\beta$ -aril éter.<sup>26</sup>

La lignina extraída mediante este proceso se denomina lignina Kraft y se caracteriza por contar con una variedad de enlaces mayor que la lignina nativa, conteniendo además enlaces sulfuro, provenientes del proceso y distintos contenidos de cenizas, dependiendo de la

materia prima de la cual provenga.<sup>28</sup> Como resultado del proceso Kraft pueden formarse nuevos tipos de enlace y algunos han sido identificados (Figura 4).



**Figura 4:** Ejemplo de alguno de los tipos de enlace encontrados en ligninas Kraft.<sup>24,29</sup>

Los productos del proceso Kraft son por un lado la pulpa de la celulosa y por otro lado el licor negro (LN) diluido que contiene las sustancias inorgánicas y la mayor parte de la lignina contenida en la madera. El LN es concentrado en una batería de evaporadores y se envía a una caldera donde se recuperan los productos inorgánicos, que se incorporan nuevamente en el proceso (licor blanco), mientras que la lignina es quemada para producir energía.<sup>30</sup> La recuperación de los productos inorgánicos se realiza mediante la eliminación de cenizas y caustificación (agregado de CaO) del licor verde, para obtener el licor blanco. De esta forma el proceso Kraft logra un ciclo cerrado donde se obtiene la pulpa de celulosa, se recuperan los reactivos inorgánicos ingresados al proceso, y se utiliza el total de la biomasa como biocombustible para generar la energía necesaria para la fábrica (Figura 5).



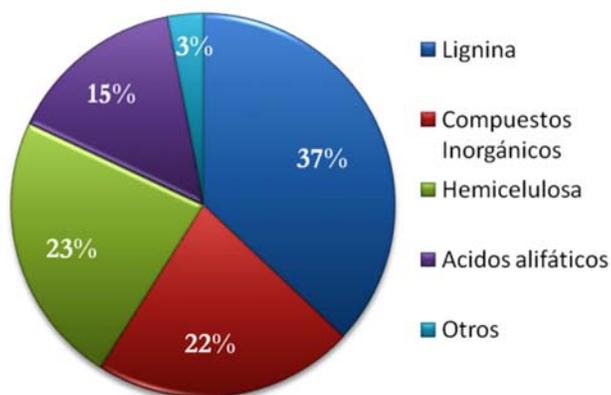
**Figura 5:** Proceso Kraft.

Aunque el proceso completa un ciclo cerrado prácticamente sin desechos, cuenta con un “cuello de botella”, ya que la producción de la fábrica no puede aumentarse más allá de la cantidad de LN que se puede quemar en la caldera. Una corriente de opinión en creciente desarrollo, sostiene que las plantas de producción de pulpa de celulosa deberían volcarse hacia la producción de bioenergía y fundamentalmente biomateriales además de pulpa y papel, convirtiéndose de esta forma en lo que se denomina “biorrefinería forestal integrada”.<sup>31</sup>

Actualmente, los trabajos de investigación en los cuales se utiliza la biomasa forestal resultante del proceso Kraft (fundamentalmente LN) como materia prima, buscan utilizar parte de esta biomasa generada de forma de lograr un aumento en la producción de la fábrica, sin comprometer la producción de pasta de celulosa.<sup>32</sup> Además, existen una variedad de posibles aplicaciones tanto para la lignina como para el resto de los componentes del LN, lo que hace interesante su aprovechamiento.<sup>33,34</sup>

Parte del LN puede ser extraído como LN diluido o concentrado, dependiendo del porcentaje de agua que contenga. Encontrar un uso rentable de este LN generado, alternativo al actual, es uno de los desafíos presentes en el área de la investigación de biomasa renovable.

La gran variedad de compuestos resultantes del proceso Kraft da origen al problema de determinar la composición del LN obtenido. La composición cuantitativa no es constante y varía según la fuente de madera utilizada y las características del proceso. En la Figura 6 se muestra un ejemplo de la composición aproximada del LN.<sup>35,36</sup>



**Figura 6:** Ejemplo de composición del LN.

Aproximadamente la mitad de la materia orgánica contenida en la madera se encuentra disuelta en el LN. Las propiedades químicas valiosas de la lignina y carbohidratos complejos no son utilizadas cuando el LN es simplemente quemado para generar energía. Existen muchas otras opciones para generar energía, mientras que las propiedades químicas de los materiales renovables son únicas. El espectro de los productos potencialmente interesantes que pueden obtenerse a partir de la lignina es amplio, incluyendo biopolímeros, aditivos, gomas, precursores de carbono activado, entre otros productos de mayor valor añadido.<sup>37,38</sup> La lignina es el principal componente del LN y el segundo biopolímero más abundante en la naturaleza luego de la celulosa, representando un 30% del carbono presente en la biomasa mundial.<sup>15</sup> Su composición, con un alto porcentaje de estructuras aromáticas, la vuelve interesante para su aprovechamiento como punto de partida para la producción de otros compuestos.

Anualmente se producen, como resultado de la producción de pulpa de celulosa, un promedio de 50 millones de toneladas de lignina.<sup>39</sup> Ésta es en su mayoría quemada para producir energía, debido a que contiene una alta relación C/H y C/O, mayor a otros polímeros, lo que resulta en un alto valor calorífico. Sólo un 2% de la lignina es aprovechada para producir otros productos de interés, lo que genera un desafío importante la búsqueda de un uso más rentable de la misma.

**2.2.4. Extracción de lignina a partir de licor negro** La recuperación de la lignina desde el LN ha sido estudiada básicamente mediante dos metodologías: ultrafiltración y precipitación mediante disminución del pH.<sup>40-42</sup> Estas metodologías logran la obtención de lignina sin mayores modificaciones que las que se producen sobre la misma luego de la extracción de su fuente original.

El LN tiene un pH entre 11 y 13 luego del proceso Kraft. A este pH la lignina Kraft se encuentra mayormente disuelta debido a la presencia de fracciones de menor peso molecular, con alto contenido de grupos hidroxilo que se encuentran como sales. Es por ello que una de las metodologías más utilizadas para su extracción es la precipitación mediante dióxido de carbono o ácidos minerales que protonen los grupos hidroxilo presentes.<sup>43,44</sup>

La precipitación de lignina desde el LN ha sido estudiada por más de un siglo por distintos grupos de investigación. Una completa protonación de los grupos hidroxilo y de los posibles grupos ácidos presentes, se logra mediante el uso de ácidos fuertes y una disminución del

pH a valores de aproximadamente 2.<sup>45</sup> De esta forma se asegura que la mayor parte de la lignina precipite y pueda ser separada del resto de los componentes presentes en el LN.

El pKa de la lignina Kraft es variable y depende de los distintos grupos que la componen. Por ejemplo, mientras que el pKa de los grupos hidroxilo es aproximadamente 10, los grupos ácido presentes tienen un pKa de aproximadamente 4.<sup>46</sup> Por lo tanto, dependiendo del contenido de cada uno de estos grupos tendremos un pKa diferente, logrando de esta forma lograr precipitar fracciones de lignina de distinta composición a distintos pH.<sup>47,48</sup> Varios autores han descrito la extracción mediante precipitación con distintos ácidos minerales a disminución gradual del pH.<sup>49,50</sup> En estos trabajos se utilizan ácidos como H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> y HCl para lograr la precipitación valiéndose de la variabilidad de pKa para realizar una precipitación fraccionada y lograr así un estudio más detallado de la lignina Kraft.

En los últimos años se ha combinado la metodología de precipitación con la extracción mediante distintos disolventes orgánicos. Yuan y colaboradores han logrado un fraccionamiento de la lignina precipitada con HCl a pH 2 mediante el uso de distintos disolventes orgánicos de distinta polaridad.<sup>51</sup> Los autores lograron obtener distintas fracciones de lignina que fueron analizadas mediante varias técnicas analíticas. Los resultados obtenidos se complementan con los obtenidos mediante la precipitación fraccionada a distintos pH, lo que hace de ésta una metodología eficaz y sencilla para el estudio de distintas ligninas. Esto ha permitido estudiar entre otras cosas la relación entre alguno de los grupos funcionales presentes y las unidades S y G, así como el peso molecular promedio de los fragmentos presentes.

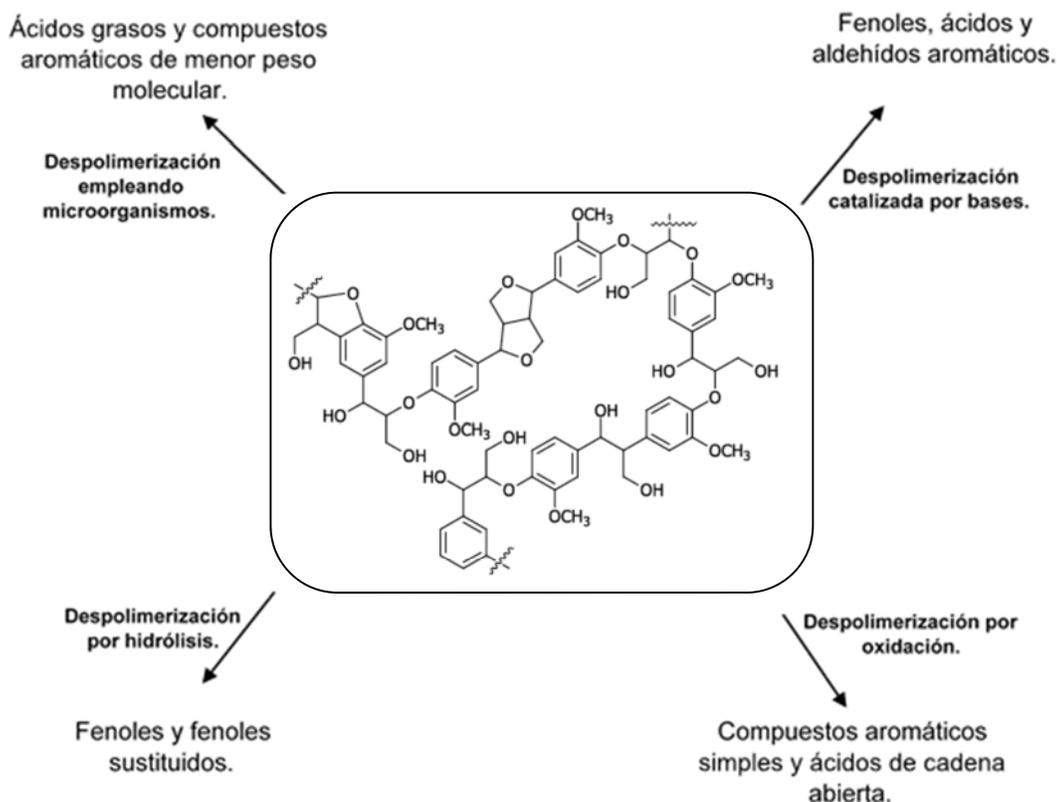
Otra metodología muy utilizada es la ultrafiltración. En este proceso la lignina se separa del LN mediante una filtración selectiva, obteniendo fracciones de lignina de distintos rangos de peso molecular. Para ello, se utilizan membranas de filtración (mayormente membranas acrílicas) de distintos tamaños de poro, y metodologías como ósmosis reversa, con el fin de obtener fracciones de lignina de peso molecular homogéneo. A pesar de que mediante esta técnica es posible obtener ligninas de mayor pureza, sigue estando en estudio, ya que uno de sus objetivos principales es separar las fracciones de lignina de bajo peso molecular, lo cual aún no se ha logrado con éxito.<sup>52</sup>

Para el análisis estructural de las fracciones aisladas pueden utilizarse diversas técnicas analíticas (RMN, UV, IR, etc.). De esta forma se logra un estudio aproximado de la composición de distintas ligninas técnicas, contribuyendo al conocimiento para su uso como materia prima de otros productos.

## **2.3. DEGRADACIÓN Y ESTUDIO ESTRUCTURAL DE DISTINTOS TIPOS DE LIGNINA**

### **2.3.1. Degradación y uso de lignina como materia prima renovable**

En los últimos 80 años se ha desarrollado una variedad de metodologías para degradar la lignina con el fin de obtener monómeros, dímeros y/o oligómeros que faciliten el análisis estructural de la misma. Por otro lado, se ha obtenido una serie de productos que pueden ser de gran interés para la producción de biocombustibles, biopolímeros, construcción de gomas, o como bloques de construcción de moléculas de mayor valor, entre otros.<sup>53,54</sup> En la figura 7 se observan alguno de los posibles procesos de degradación de lignina.



**Figura 7:** Distintos procesos de degradación de lignina (Adaptada de Chávez-Sifontes y colaboradores).<sup>6</sup>

### Degradación oxidativa

Una de las metodologías utilizadas es la oxidación alcalina de lignina con soluciones de nitrobenzeno o permanganato. La degradación con solución alcalina de nitrobenzeno fue introducida por Freudenberg y colaboradores en 1939, y utilizada fundamentalmente para determinar el origen botánico de diferentes plantas leñosas.<sup>55</sup> El procedimiento se basa en colocar la lignina extraída o los chips de madera en una solución de hidróxido de sodio 2 N en presencia de nitrobenzeno, durante 3-4 h a 170-180 °C. Los productos resultantes son en su mayoría aldehídos derivados de las distintas ligninas que luego son cuantificados. Mediante la oxidación se produce la ruptura de los enlaces del tipo  $\alpha$ -O-4 y  $\beta$ -O-4 mayoritariamente, y los aldehídos aromáticos resultantes son producto de la oxidación de las unidades *p*-hidroxifenilpropano formadas. Sin embargo, el mecanismo de reacción de lignina en condiciones oxidativas con nitrobenzeno no ha sido dilucidado hasta el momento.

Cuando las ligninas tratadas provienen de maderas blandas el producto mayoritario es vainillina, mientras que otros derivados de unidades guaiacilo (ácido vainillínico, guaiacol, 5-carboxivainillina, etc.) han sido identificados en menor porcentaje. Derivados de unidades siringilo y *p*-hidroxifenilo se han encontrado mayoritariamente en ligninas originarias de maderas duras.<sup>56,57</sup> Es por ello que esta metodología ofrece una descripción aproximada de las cantidades de unidades guaiacilo, siringilo y *p*-hidroxifenilo presentes en la lignina, a partir

de los productos generados durante la oxidación.<sup>58,59</sup> Ésta es además una de las metodologías más sencillas dentro de la degradación oxidativa.

En 1937, previo al desarrollo del procedimiento de oxidación con nitrobenzono, Freudenberg y colaboradores elaboraron otra metodología para la degradación de lignina utilizando permanganato de potasio ( $\text{KMnO}_4$ ) como agente oxidante. El método se basa en la oxidación de las cadenas laterales presentes en la lignina, dando como resultado una variedad de ácidos aromáticos. La identidad, así como también la cantidad de cada uno de ellos, provee información acerca del tipo de sustitución y la frecuencia de las mismas. El proceso original se ha visto modificado con el correr de los años, realizando una metilación previa de los grupos hidroxilos, con el fin de volverlos resistentes a la oxidación, y posterior oxidación de las cadenas laterales.<sup>60</sup>

La oxidación con  $\text{KMnO}_4$  se aplica a ligninas extraídas mediante los diferentes procesos de extracción, siendo una de las metodologías más utilizada por la industria del papel en la determinación de lignina proveniente de distintos procesos de pulpado, lo que se conoce como el número kappa (volumen de  $\text{KMnO}_4$  0.1 N consumidos por 1 g de pulpa seca).<sup>61</sup> En la industria del papel el número kappa ha sido incluido como una de las normas ISO para determinar la calidad de la pulpa de celulosa obtenida. Actualmente, la norma ISO 302:2004 establece que el número kappa debe encontrarse entre el 25 y 30% para la elaboración de papeles de buena calidad, entre 45 y 65% para papeles de baja calidad y entre 60 y 90% para cartón corrugado.<sup>62</sup>

La mayoría de los procesos de oxidación utilizados hoy en día involucran el uso de  $\text{O}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , catalizadores ácidos y en algunos casos la combinación con metales (Cu, Fe, Ni, Ru, etc.).<sup>63-</sup><sup>66</sup> En los últimos años se han desarrollado otros procedimientos, incorporando catalizadores en presencia de  $\text{O}_2$  como agente oxidante.<sup>67</sup> El uso de oxígeno en condiciones básicas, sin el agregado de catalizadores, requiere altas temperaturas y presiones, lo que hace difícil su escalado a nivel industrial por el alto costo del proceso. Sin embargo, a nivel de laboratorio, esta oxidación ha sido muy estudiada, observando que la lignina se degrada en compuestos aromáticos simples como vainillina y siringaldehído. Rodríguez y su grupo han estudiado el uso de  $\text{O}_2$  como agente oxidante para la obtención de compuestos aromáticos simples a partir de lignina.<sup>68</sup> Ensayaron distintas condiciones de temperatura, presión y pH para mejorar la obtención de aldehídos fenólicos a partir de las mismas. Los resultados obtenidos muestran que los porcentajes de recuperación suelen ser bajos, comparados con los obtenidos, por ejemplo, con nitrobenzono. Es por ello que el uso de catalizadores combinados con  $\text{O}_2$  se ha vuelto indispensable para mejorar no sólo los porcentajes de recuperación, sino también disminuir las temperaturas y presiones del proceso.<sup>69</sup>

Por otro lado, se ha descrito una estrategia oxidativa que involucra catalizadores como metiltioxorenio ( $\text{MeReO}_3$ , MTO) en combinación con  $\text{H}_2\text{O}_2$ , o 4-acetamido-TEMPO (TEMPO 2,2',6,6'-tetrametilpiperidin-*N*-oxilo) combinado con ácidos minerales, así como también el uso de metales nobles.<sup>70,71</sup> Utilizando este tipo de catalizadores, se logra obtener un mayor porcentaje de aldehídos y ácidos aromáticos a partir de lignina; usando metodologías menos agresivas que las que utilizan oxidantes fuertes como  $\text{KMnO}_4$ , o la necesidad de altas temperaturas y presiones.

Por último, el ozono ha sido otra alternativa para la degradación oxidativa de lignina.<sup>72</sup> La ozonólisis se ha estudiado en modelos de lignina, para tratar de comprender el total de los

mecanismos involucrados, y así lograr un control sobre la reacción que permita obtener mayor cantidad de ciertos polímeros de degradación.<sup>73,74</sup> A partir de estos datos experimentales distintos grupos de investigación ensayaron distintas condiciones de ozonólisis.<sup>75-77</sup> Este procedimiento cuenta con una serie de ventajas que lo hacen interesante para su desarrollo, ya que las condiciones de reacción suelen involucrar temperaturas bajas y presión atmosférica, los productos secundarios formados no cuentan con un alto grado de toxicidad y la producción de ozono es sencilla y económica. Sin embargo, existen pocas evidencias de los productos formados, y lo descrito hasta el momento muestra que a tiempos cortos de reacción el porcentaje de degradación no excede el 14%, obteniendo distintos compuestos aromáticos sustituidos, mientras que a tiempos más prolongados (mayores a 24h) la degradación es mayor al 80% pero los productos obtenidos son mayoritariamente resultado de la degradación de los anillos aromáticos.<sup>75</sup> Lo que se observa es que el ozono reacciona con los anillos aromáticos presentes en la lignina, mientras que las cadenas laterales suelen no ser afectadas. Esto hace que no sea una metodología completamente eficiente para determinar la composición de la lignina, pero puede ser complementaria a los procedimientos que la degradan en sus cadenas laterales, brindando información sobre las uniones más frecuentes entre los monolignoles.

En la tabla 4 se muestra un resumen de los agentes oxidantes más utilizados hasta el momento, junto con las ventajas y desventajas de cada uno de ellos.

Agente oxidante	Ventajas	Desventajas
<b>Oxígeno</b>	Barato y verde. Anillos aromáticos se mantienen intactos.	Altas temperaturas de reacción. No selectivo.
<b>Ozono</b>	Condiciones suaves de reacción. Subproductos no nocivos.	Rompe anillos aromáticos.
<b>Peróxido de hidrógeno</b>	Eficiente Barato y verde. Subproducto: agua.	Rompe anillos aromáticos y genera ácidos.
<b>Nitrobenceno</b>	Efectivo Anillos aromáticos se mantienen intactos.	Posibles productos nocivos.
<b>Iones metálicos (Cu, Fe)</b>	Efectivo.	Dificultades para separar los metales del medio de reacción.

**Tabla 4:** Métodos utilizados para la degradación oxidativa de la lignina, ventajas y desventajas.

### Despolimerización mediante hidrólisis

La despolimerización de lignina mediante la hidrólisis ácida o básica (en presencia de catalizadores en la mayoría de los casos) es una estrategia estudiada por distintos autores.<sup>78,79</sup> La catálisis básica en medio acuoso, utilizando catalizadores homogéneos (NaOH, KOH, etc.) y temperaturas entre 240-340 °C, ha sido una de las metodologías más ensayadas. Se ha logrado obtener una serie de fenoles aromáticos derivados de las distintas unidades (S, G y H), cuando se utilizan temperaturas de alrededor de los 300 °C y 250 bar de presión. Sin embargo, los porcentajes de despolimerización son menores al 20%, lo que

indica que la mayor parte de la lignina queda sin reaccionar. Algunos autores describen una repolimerización durante el proceso de hidrólisis, lo que podría ser causante de los bajos rendimientos de recuperación.<sup>80</sup>

El grupo de Lavoie elaboró un reactor de flujo continuo para realizar un estudio de la hidrólisis de lignina.<sup>81</sup> De esta forma se logró analizar una variedad de temperaturas para determinar las mejores condiciones de despolimerización, observando que el proceso se da en etapas, pero que debido a las altas temperaturas (>300 °C) y presiones (> 200 bar), la formación de productos secundarios no puede ser controlada, lo que provoca una mezcla de compuestos altamente compleja.

Aunque la mayoría de los artículos describen la despolimerización mediante hidrólisis utilizando catalizadores homogéneos, existen reportes que describen el uso de catalizadores heterogéneos obteniendo buenos resultados.<sup>82</sup> Asimismo, la hidrólisis de lignina también se ha llevado a cabo utilizando agua en condiciones supercríticas, en presencia y ausencia de catalizadores. El agua supercrítica es un disolvente polar, capaz de disolver e hidrolizar la lignina, para producir productos de interés a partir de la misma.<sup>83</sup>

### Degradación enzimática

Muchos microorganismos son capaces de degradar la celulosa y la hemicelulosa, sin embargo un pequeño grupo de hongos filamentosos se ha descrito con la capacidad de romper completamente la lignina en componentes más simples. Estos son conocidos como los hongos de la podredumbre blanca de la madera, los cuales tienen gran habilidad para degradar lignina a CO<sub>2</sub>. Otros hongos capaces de degradar material lignocelulósico son los hongos que producen la podredumbre marrón de la madera, los cuales despolimerizan rápidamente la celulosa, pero sólo una pequeña parte de la lignina es degradada.<sup>84</sup> De los hongos xilófagos, la división Basidiomycota, entre los cuales se han identificado *Coriolus versicolor* (también conocido como *Trametes versicolor*), *Phanerochaete chrysosporium* y *Phlebia radiata*, es la más frecuentemente involucrada en la biodegradación.<sup>85</sup> La degradación se produce extracelularmente, debido a la insolubilidad tanto de la celulosa, la hemicelulosa, como la lignina. Cuenta con dos tipos de sistemas enzimáticos, un sistema hidrolítico, el cual genera hidrolasas responsables de la degradación de polisacáridos, y otro sistema oxidativo y lignolítico el cual degrada lignina y otros componentes fenólicos.<sup>84</sup>

Estos hongos han sido ampliamente estudiados por su capacidad de degradación, no sólo de la madera sino también de otros compuestos como pesticidas, hidrocarburos poliaromáticos, algunos colorantes, trinitrotolueno (TNT) y otros explosivos nitrados, así como otros compuestos tóxicos y también por su uso en síntesis como biocatalizadores.<sup>86,87</sup>

Actualmente son utilizados para completar la deslignificación de distintos tipos de pulpas de celulosa, obtenidas de procesos deslignificación de la madera, lo que se conoce como blanqueo, así como para el tratamiento de restos lignocelulósicos.<sup>84</sup> Las enzimas responsables de este efecto son oxidorreductasas extracelulares, conocidas como enzimas lignolíticas [lacasas, peroxidasas de lignina (LiP) y manganeso peroxidasas (MnP)].

Por su capacidad para degradar la lignina, estas enzimas han sido estudiadas en la biodegradación de la misma para la obtención de compuestos de menor peso molecular, observando que las peroxidasas son capaces de degradar las fracciones no fenólicas,

mientras que las lacasas degradan las fracciones fenólicas.<sup>88,89</sup> Los grupos de investigación que han centrado su estudio en las lacasas buscan mejorar las condiciones de cultivo, así como aumentar su capacidad oxidante para mejorar el grado de degradación.<sup>90</sup> Sin embargo, la necesidad de utilizar mediadores, para imitar los sistemas presentes en la naturaleza (laccase-mediator system: LMS), ha hecho que su uso a nivel industrial se vea disminuido, ya que el valor de dichos mediadores encarece al proceso.<sup>91</sup>

Se estudió una variedad de compuestos como posibles mediadores, siendo el ácido 2,2-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS), el 1-hidroxibenzotriazol (HBT) y el 2,2',6,6'-tetrametilpiperidin-*N*-oxilo (TEMPO), los mediadores sintéticos más eficientes. A pesar de su eficiencia, existe una preocupación por la posible toxicidad de los mismos, ya que alguno de ellos contienen subunidades tales como N-(OH)-, y pueden producir compuestos residuales tóxicos. Es por ello que el estudio para la búsqueda de nuevos mediadores, especialmente los llamados mediadores naturales (acetosiringona, siringaldehído, 2,6-dimetilfenol, etc.) se ha incrementado en los últimos años.<sup>90,92</sup>

Las especies del género *Trametes* son reconocidas como las mayores productoras de lacasas, entre ellas *T. versicolor* y *T. elegans*. Otros géneros como *Pleurotus* y *Pandora* también fueron reconocidas como capaces de generar altos niveles de lacasas.<sup>93,94</sup> En todos los casos, las investigaciones buscan las mejores condiciones de cultivo para un aumento de la producción tanto de lacasas como de otras enzimas lignolíticas, así como el aumento en sus poderes oxidantes con el fin de incrementar la capacidad de degradación de cada una de ellas. Sin embargo, al ser estas enzimas responsables también de la biosíntesis de lignina, la repolimerización durante los procesos de degradación es un hecho que no se ha logrado controlar hasta el momento.

A pesar de los estudios realizados sobre hongos y enzimas aisladas, aún no se han encontrado las mejores condiciones de cultivo para lograr el uso masivo de éstos en procesos biodegradativos a nivel industrial.

Recientemente se ha comenzado a estudiar el uso de bacterias como microorganismos capaces de degradar la lignina.<sup>95-97</sup> Algunas de las bacterias ensayadas pertenecen a los géneros *Pseudomonas* y *Rhodococcus*, pero aún no se han encontrado las mejores condiciones de cultivo para obtener buenos porcentajes de degradación. En 2013, Wu y colaboradores estudiaron la capacidad de un consorcio bacteriano en condiciones anaerobias, capaz de utilizar la lignina como única fuente de carbono para producir biogás-metano, así como también aumentar la biodisponibilidad de hemicelulosa y celulosa presente en los residuos lignocelulósicos.<sup>98</sup>

### Disolución y despolimerización en líquidos iónicos

El uso de líquidos iónicos (ILs) es una técnica que se encuentra en desarrollo y es cada día más utilizada en distintos procesos químicos. Los ILs son sales orgánicas con un punto de fusión menor a los 100 °C y muchas veces menor a la temperatura ambiente. Cuentan con propiedades únicas que los hacen de gran interés, como baja presión de vapor, alta conductividad iónica, y gran estabilidad química y termoquímica.<sup>99</sup> El rol de los ILs como disolvente en reacciones que involucran macromoléculas se ha incrementado en los últimos años debido a que sus propiedades físicas los hacen amigables con el medio ambiente.

Los sistemas más utilizados son mezclas binarias de aniones ( $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Br}^-$ ,  $\text{BF}_4^-$ ,  $\text{PF}_6^-$ ,  $\text{CF}_3\text{SO}_3^-$ ) y cationes (imidazolio, piridinio, fosfonio, amonios cuaternarios, etc.).<sup>100</sup> Los ILs se han ensayado sobre material lignocelulósico, pero la mayoría de los estudios se han hecho sobre celulosa.<sup>101,102</sup> En 2009 Lee y colaboradores describieron que ciertos ILs pueden disolver tanto celulosa como lignina, dando un punto de partida a su uso en procesos de degradación.<sup>103</sup>

Una de las ventajas más importantes de los ILs es el hecho de que pueden actuar como disolventes y/o como catalizadores. Además pueden disolver grandes cantidades de sustancias poliméricas (500g de lignina por kg de IL). Se ha descrito una despolimerización parcial de lignina utilizando ILs aniónicos. Esta despolimerización es causada por la nucleofilia de los átomos electronegativos presentes en dichos ILs, así como por la fuerza con la que se coordinan a los grupos fenólicos.<sup>104,105</sup> No obstante, los porcentajes de conversión son bajos en la mayoría de los estudios descritos.<sup>106</sup> Es por ello que se ha optado por alternativas como el agregado de metales de transición u oxidantes, con el fin de aumentar los rendimientos de recuperación de compuestos aromáticos simples. A pesar de los avances obtenidos hasta el momento, esta metodología se encuentra aún en desarrollo y necesita de mayores avances para alcanzar un proceso eficiente.

Las diferentes metodologías de degradación descritas son algunas de las más utilizadas. El estudio de éstas y otras que logren degradar la lignina de forma eficaz mediante un proceso eficiente, es uno de los objetivos principales de la biorrefinería.

### **2.3.2. Análisis estructural de lignina de distintos orígenes**

Uno de los objetivos de la degradación de lignina es estudiar la composición de la misma, desde el punto de vista de las unidades S, G y H, así como la abundancia de los distintos tipos de enlace. Debido a su complejidad estructural, este estudio ha sido abarcado mediante una variedad de técnicas analíticas.

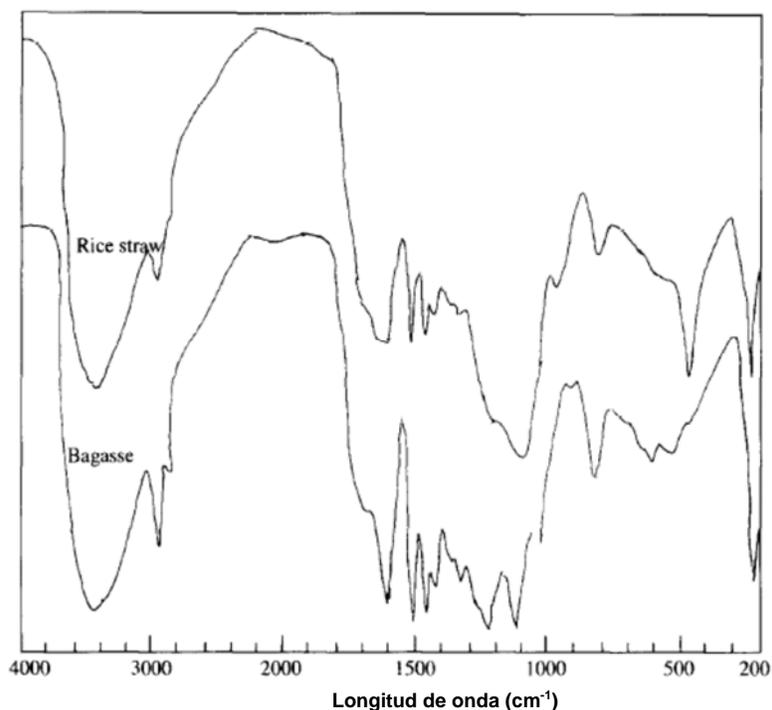
Entre las técnicas analíticas más utilizadas se encuentran: espectroscopía infrarroja (IR), pirólisis acoplada a cromatografía de gases/espectrometría de masas (Py-GC/MS), espectroscopía de resonancia magnética nuclear, uni- y bidimensional ( $^1\text{H}$ -RMN,  $^{13}\text{C}$ -RMN, HSQC), espectroscopía ultravioleta (UV), cromatografía de exclusión molecular, cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), entre otras.

A continuación se describen algunas de estas técnicas y los avances alcanzados hasta el momento.

#### Espectroscopía Infrarroja

La espectroscopía de infrarrojo (IR) es una técnica utilizada en química para el estudio de grupos funcionales. A principios de la década de los 90, algunos autores la utilizaron para el análisis estructural de distintos tipos de lignina, basándose en los cambios que sufren al ser extraídas de su fuente natural.<sup>107,108</sup> Las variaciones comúnmente observadas se producen sobre los grupos funcionales presentes en las cadenas laterales y sobre los anillos aromáticos. Uno de las principales observaciones se produce cuando se escinden los enlaces del tipo aril éter, lo que genera un aumento de los grupos hidroxilo que se registra claramente en el espectro de IR.

Sólo un pequeño conjunto de frecuencias y bandas pueden ser inequívocamente asignadas, mientras que otras pueden ser interpretadas de varias maneras, dado que se trata de un polímero con una variedad de grupos funcionales. Las bandas claramente identificables que pueden ser utilizadas para el estudio comparativo de distintos tipos de ligninas son las correspondientes a: los estiramientos de O-H entre  $3500-3400\text{ cm}^{-1}$ , C-H metílicos y metilénicos entre  $3000-2800\text{ cm}^{-1}$ , C=O en el entorno de  $1600-1750\text{ cm}^{-1}$ , y las vibraciones del esqueleto aromático en el entorno de los  $1500\text{ cm}^{-1}$ , consideradas bandas puras. Entre  $2700$  y  $3700\text{ cm}^{-1}$  la intensidad de las bandas es similar para todos los tipos de lignina. Las diferencias espectroscópicas a este nivel están dadas mayormente por la relación entre las unidades G, H y S presentes. Por debajo de  $1430\text{ cm}^{-1}$  la interpretación de las bandas se hace dificultosa y es poco frecuente sacar una buena información de ese sector del espectro.<sup>61</sup> En la figura 8 se pueden observar espectros de IR de dos tipos de ligninas.



**Figura 8:** Espectro de IR de dos tipos de ligninas de distinto origen.<sup>108</sup>

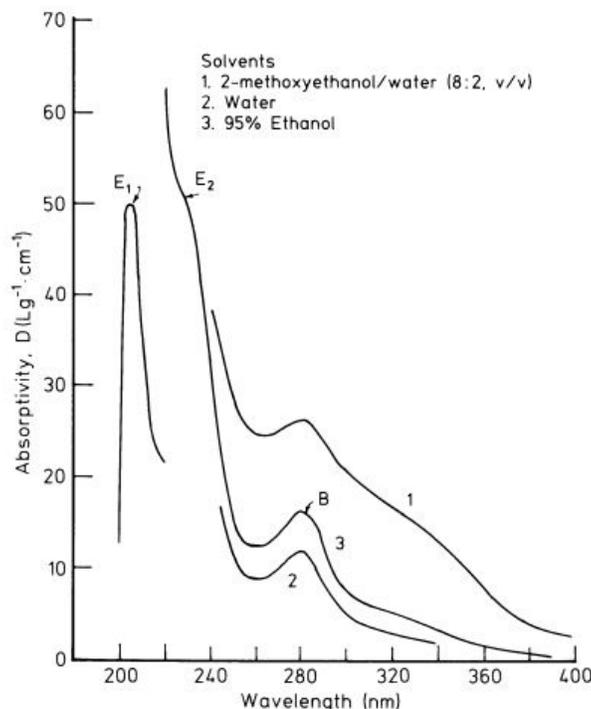
Se puede observar que el perfil de bandas es prácticamente el mismo para cada una de las ligninas, encontrando algunas variaciones de intensidad entre bandas de cada espectro. Un análisis detallado de los espectros de IR y la comparación entre distintas ligninas, ofrece también una idea de los cambios químicos que éstas sufren mediante las distintas metodologías de extracción.

### Espectroscopía ultravioleta

La estructura de la lignina es adecuada para su estudio mediante espectroscopía ultravioleta (UV), ya que los monómeros que la componen son estructuras aromáticas que absorben en el espectro visible entre  $200$  y  $300\text{ nm}$ . Asimismo, los procesos de extracción y/o degradación de lignina suelen generar dobles enlaces conjugados a los anillos aromáticos, lo que produce

la condensación de los grupos fenólicos. Varios grupos de investigación utilizan la espectroscopía UV como una de las metodologías para la caracterización de distintas ligninas, así como para su determinación semi-cuantitativa.<sup>109-111</sup>

Las bandas de absorción que presentan las diferentes ligninas suelen ser particularmente anchas y difusas. Aunque se ha logrado extraer la lignina prácticamente pura, muchas veces restos de hemicelulosa quedan enlazados, lo que puede provocar interacciones con las transiciones electrónicas de la lignina. De todas formas, se han logrado distinguir claramente tres bandas características que varían según su origen (Figura 9).



**Figura 9:** Bandas características de lignina en el espectro de UV.<sup>61</sup>

Cuando la lignina proviene de maderas blandas se observa una banda de absorción (identificada como **B**) en el entorno de 280 nm con un hombro (identificado como  $E_2$ ) en 230 nm, resultante de la composición en unidades guaiacilo de la misma. Por su parte, en ligninas provenientes de maderas duras exhiben una banda entre 268-277 nm (**B**), sin la presencia de un hombro y de menor absorbancia que la presente en maderas blandas. Junto con esta banda **B**, en ambos tipos de madera se observa una banda aguda (identificada como  $E_1$ ) en el entorno de 200-210 nm. Los procesos de deslignificación como el Kraft o sulfito, provocan un aumento en la absorción de estas bandas, pero no se ha observado un efecto sobre el corrimiento de las mismas.<sup>61</sup>

Por otro lado, los disolventes ejercen un efecto sobre la absorción de las ligninas en el UV. El efecto depende de la polaridad del disolvente utilizado, así como de los sustituyentes presentes en los anillos aromáticos. Disolventes polares como etanol o agua provocan un desplazamiento hipsocrómico de las señales cuando los sustituyentes del anillo son en su mayoría electrón-dadores, y un efecto batocrómico cuando los sustituyentes son electrón-aceptores (Tabla 5).

R	$\lambda_{\text{máx}}$ nm			
	Agua	Etanol	2-Metoxietanol	Ciclohexano
CH <sub>2</sub> OH	278	279.5	280	---
H	275.5	277	278	282
COOH	289	292	293	293.5
CHO	314	312	310	307.5
COCH <sub>3</sub>	306	305	304.5	---

**Tabla 5:** Efecto del disolvente sobre la absorción de ciertos grupos presentes en ligninas, en el espectro de UV.

La espectroscopía de UV es una herramienta sumamente útil y sencilla para el análisis estructural de este biopolímero, ya que permite conocer la composición y origen de la lignina, así como determinar de forma aproximada la proporción entre grupos hidroxilos y otros grupos funcionales presentes en la misma.

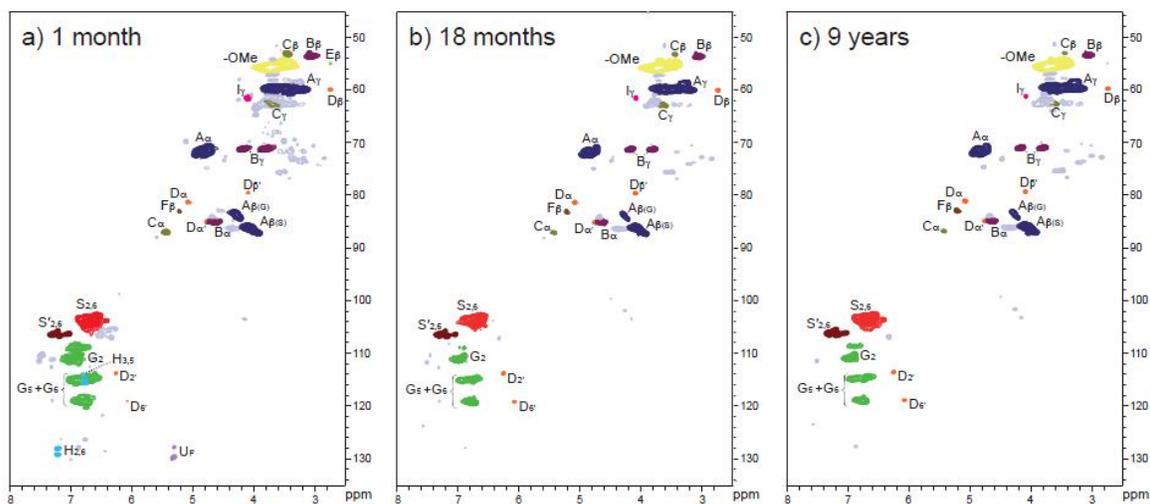
#### Espectroscopía de resonancia magnética nuclear

La espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN) es la técnica más utilizada actualmente para la elucidación estructural de moléculas orgánicas, tanto simples como complejas. El estudio estructural de la lignina mediante esta técnica ha avanzado considerablemente en los últimos 40 años. Los primeros reportes utilizaron la RMN de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C sobre modelos sintéticos de lignina, para realizar un estudio comparativo de las señales obtenidas con espectros de lignina natural.<sup>112,113</sup> Sin embargo, uno de los inconvenientes más importantes en la RMN unidimensional es la superposición de señales, que no permite una caracterización confiable de las mismas.

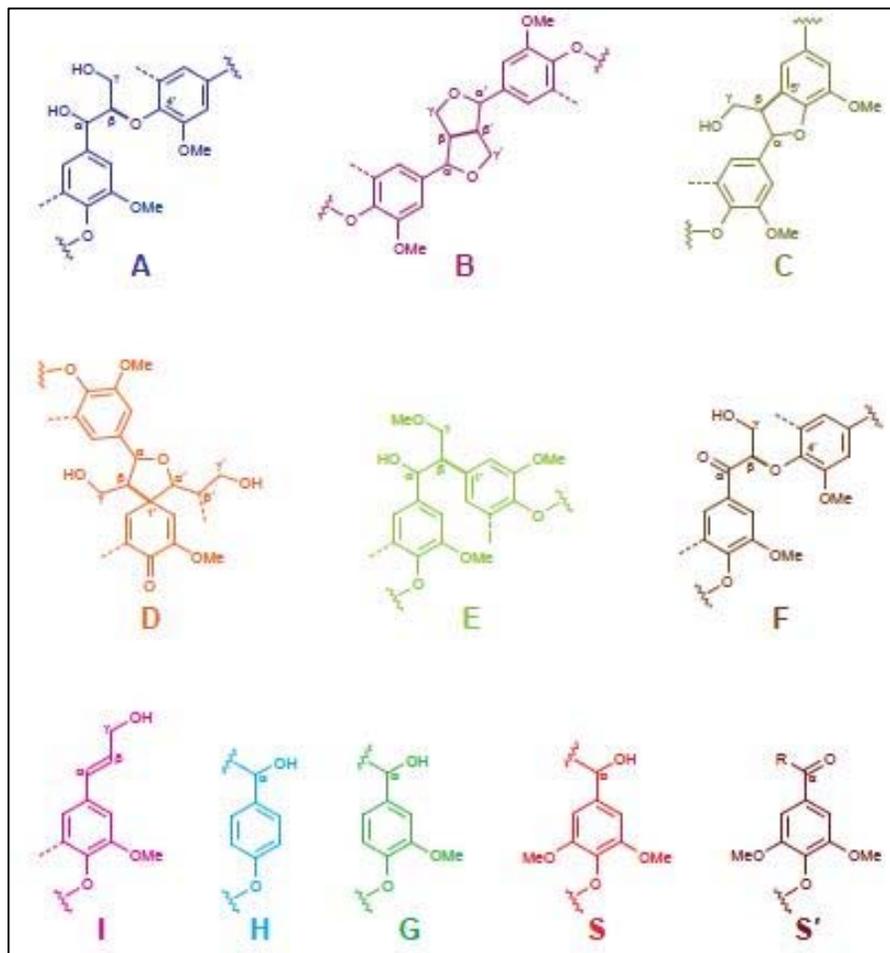
Con el correr de los años, el avance de la RMN y el uso de técnicas más complejas como la RMN bidimensional (2D RMN), lograron que esta técnica no sólo fuera útil para la elucidación estructural de moléculas simples, sino que también se logró elucidar moléculas más complejas, y así utilizarla como una herramienta eficaz para la caracterización de distintos polímeros y biomoléculas.<sup>114,115</sup> Basados en estos avances, Ede y Brunow utilizaron la RMN bidimensional para realizar la caracterización de lignina extraída de pino (*Picea abies*).<sup>112</sup> Mediante los distintos acoplamientos presentes en los espectros de 2D RMN, los autores lograron caracterizar alguna de las cadenas laterales presentes. Estos primeros estudios, así como el avance que se ha logrado con el correr de los años, han hecho de la RMN una de las técnicas más eficaces para la caracterización de distintas ligninas.

La mayoría de los autores han basado sus trabajos en el análisis mediante 2D RMN, y más específicamente sobre experimentos HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence).<sup>116-118</sup> A través de experimentos HSQC se pueden observar las correlaciones entre protones y carbonos enlazados directamente. Esta técnica combina la sensibilidad de <sup>1</sup>H-RMN con la alta resolución de <sup>13</sup>C-RMN, logrando una buena identificación de las distintas unidades de lignina, así como las interconexiones entre ellas. Se logró entonces analizar muestras complejas (ligninas aisladas y muestras de maderas, entre otras) con un alto grado de sensibilidad y confiabilidad.

En los experimentos de HSQC, es posible identificar alguno de los tipos de enlace, así como cadenas laterales y la frecuencia de las unidades S, G y H presentes en las distintas muestras. Las señales más identificables y estudiadas son las sustituciones de los anillos aromáticos y las posiciones  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  de las cadenas laterales (Figura 10 y 11). Mediante un estudio comparativo de muestras de lignina, ha sido posible contar con un buen análisis que brinde información sobre la estructura de nuevas ligninas aisladas.



**Figura 10:** Espectros de HSQC de ligninas aisladas de *E. globulus* a diferentes tiempos de crecimiento.<sup>119</sup>



**Figura 11:** Principales estructuras presentes en maderas del género *E. globulus*. **A** estructuras con uniones del tipo  $\beta$ -O-4. **B** estructuras con uniones del tipo  $\beta$ - $\beta$  resinol. **C** estructuras del tipo fenilcumaranos. **D** estructuras del tipo espirodienona. **E** estructuras abiertas con enlace  $\beta$ -1'. **F** estructuras con enlace  $\beta$ -O-4 y  $C_{\alpha}$  oxidado. **I** alcohol coniferílico como terminación de cadena. **H** unidades *p*-hidroxifenílicas. **G** unidades guaiacilo. **S** unidades siringilo. **S'** unidades siringilo oxidadas en el  $C_{\alpha}$ .<sup>119</sup>

Algunos trabajos recientes han utilizado 2D RMN como una metodología para la elucidación estructural cuantitativa de lignina.<sup>117</sup> Los autores aplicaron la técnica QQ-HSQC (Quick Quantitative HSQC) sobre muestras de lignina acetilada, utilizando la señal de acoplamiento C2-H de unidades guaiacilo como estándar interno para cuantificar las unidades fenilpropanoides. Aunque la cuantificación mediante 2D RMN puede ser una técnica alentadora para el análisis de ligninas, los errores aun suelen ser grandes y se continúa con el estudio para la mejora de la misma.

#### Pirólisis acoplada a GC-MS

La pirólisis es una técnica que descompone térmicamente la materia orgánica en ausencia de oxígeno, y ha sido utilizada para convertir los residuos forestales en biocombustibles. Asimismo, la pirólisis es una herramienta eficaz y sencilla para determinar el contenido de las distintas unidades S, G y H en maderas de distintos orígenes y/o distintos tiempos de

crecimiento.<sup>120</sup> Esto es sumamente importante en la industria papelera, ya que los porcentajes de los distintos monolignoles presentes en la lignina afectan directamente el proceso de deslignificación.

Se han ensayado diversos procedimientos analíticos, entre los que se encuentran pirólisis acoplada a cromatografía gaseosa seguida de espectrometría de masas (Py-GC/MS), pirólisis acoplada a espectroscopía de IR (Py-IR), pirólisis acoplada a cromatografía gaseosa seguida de RMN (Py-GC/RMN), entre otras. Sin embargo, la metodología más utilizada por los distintos grupos de investigación ha sido la Py-GC/MS.

Durante la pirólisis de lignina se generan principalmente gases y un residuo aceitoso oscuro (muchas veces llamado alquitrán), que varía en su composición dependiendo de las condiciones de pirólisis y de la fuente de donde provenga el material. La posibilidad de acoplar un cromatógrafo de gases seguido de un espectrómetro de masas, permite un buen análisis del residuo aceitoso, obteniendo de esta manera una composición relativa de las distintas unidades de lignina (S, G y H). Los compuestos producidos en la pirólisis se separan en el cromatógrafo de gases, y luego pueden ser identificados, según su fragmentación, analizando su espectro de masas. En la tabla 6 se muestran alguno de los compuestos y su correspondiente relación m/z, determinados en comparación con la base de datos de espectrometría de masas.

H		G		S	
m/z	compuesto	m/z	compuesto	m/z	compuesto
94	fenol	124	guaiacol	154	siringol
107	alquilfenoles	135	vinilguaiacol	165	vinilsiringol
108	metilfenol	137	etilguaiacol, homovainillina, alcohol coniferílico	167	etilsiringol, siringilacetona, homosiringaldehído
120	vinilfenifenoles	138	metilguaiacol	168	metilsiringol
121	alquilfenoles	151	vainillina, acetoguaicona y propioguaicona	181	siringaldehído, acetosiringona y propiosiringona
134	propenilfenoles	134	alil y propenilguaiacol	194	alil y propilsiringol
148	cumarilaldehído	178	coniferilaldehído	208	sinapinaldehído

**Tabla 6:** Datos de m/z de alguno de los compuestos obtenidos mediante pirólisis de lignina, y sus estructuras correspondientes.<sup>121</sup>

Las distintas metodologías aplicadas para estudiar la estructura de la lignina son utilizadas de forma complementaria, debido a que ninguna de ellas da una información concluyente de la misma. Sin embargo, hasta el momento, no se cuenta con una estructura certera de la lignina, quedando mucho por analizar.

## **2.4. SÍNTESIS DE MODELOS DE LIGNINA Y DERIVADOS FENILPROPANOIDES**

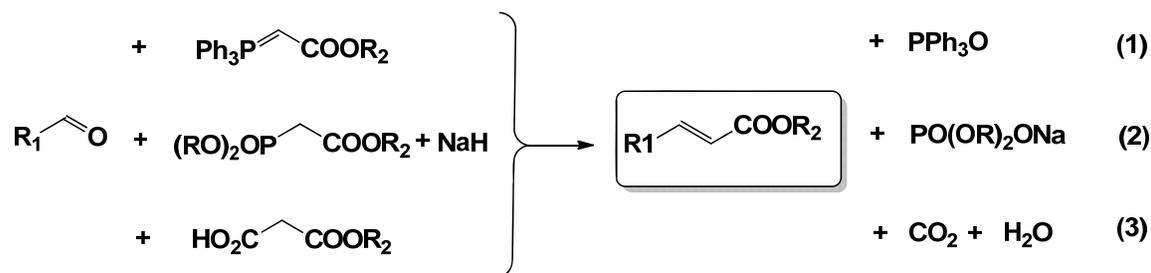
Como se describiera anteriormente, los lignanos son una clase de compuestos estructuralmente variable, producidos a partir de unidades fenilpropanoide, que constituyen la lignina. La síntesis de los mismos y de otros derivados es de gran interés, debido a que complementan el estudio estructural de la lignina, y permiten un conocimiento más profundo

de la misma para su aprovechamiento posterior. Asimismo, muchos de ellos son estructuras potencialmente bioactivas o de interés sintético.<sup>122-124</sup>

### 2.4.1. Síntesis de derivados fenilpropanoide

Dentro de los derivados fenilpropanoide, los ácidos carboxílicos  $\alpha,\beta$ -insaturados son una serie de compuestos de gran versatilidad sintética y se han usado como intermedios en rutas para la preparación de lignanos o estructuras relacionadas.<sup>125</sup>

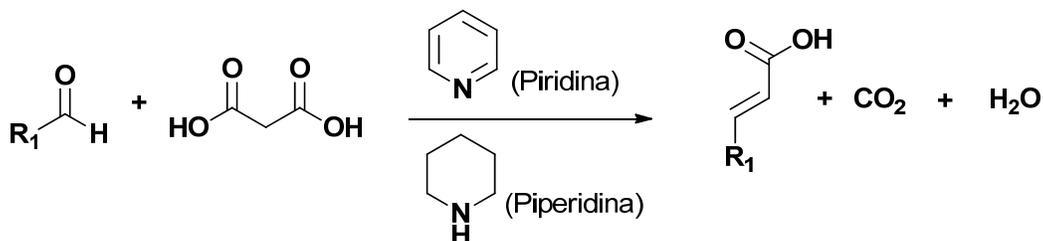
La síntesis de estos compuestos  $\alpha,\beta$ -insaturados puede realizarse mediante más de una estrategia sintética, por ejemplo reacción de Wittig (Ec. 1), reacción de Horner-Wadsworth-Emmons (Ec. 2) o condensación de Knoevenagel (Ec.3), entre otras (Esquema 5).<sup>126-129</sup> En la reacción de Wittig, el óxido de trifenilfosfina es un subproducto estequiométrico que debe ser removido cromatográficamente. La variante de Horner-Wadsworth-Emmons tiene la ventaja de producir una sal de fosfato soluble en agua. Sin embargo, típicamente requiere el uso de bases fuertes. Una limitación de estas reacciones es su aplicación a gran escala, debido a la modesta economía atómica de las mismas.<sup>130</sup>



**Esquema 5:** Alternativas sintéticas para la obtención de ésteres y ácidos  $\alpha,\beta$ -insaturados.<sup>129</sup>

La reacción descarboxilativa de Knoevenagel, entre ácido malónico o monoésteres del mismo con aldehídos, es una alternativa que ha sido mucho menos usada hasta el momento.<sup>131,132</sup> Dado que los únicos subproductos de la reacción son dióxido de carbono y agua, ésta tiene una mejor economía atómica. Adicionalmente, los reactivos son baratos y la purificación de los productos muy sencilla. Sin embargo, presenta algunos inconvenientes como el uso de reactivos en exceso y las altas temperaturas de reacción.

Cuando la condensación de Knoevenagel se realiza utilizando piperidina como organocatalizador y piridina como disolvente, nos encontramos frente a la modificación de Doebner (condensación de Knoevenagel-Doebner) (Esquema 6).<sup>130</sup>



**Esquema 6:** Condensación de Knoevenagel-Doebner.

Mediante esta reacción es posible obtener derivados de ácido cinámico, utilizando una metodología barata y eficiente (Esquema 7).



$\text{R}_1 = \text{H, OH, OCH}_3, \text{NO}_2, \text{N(CH}_3)_2, \text{F, Cl, Br}$

$\text{R}_2 = \text{H, Et}$

**Esquema 7:** Obtención de derivados de ácido cinámico.<sup>133</sup>

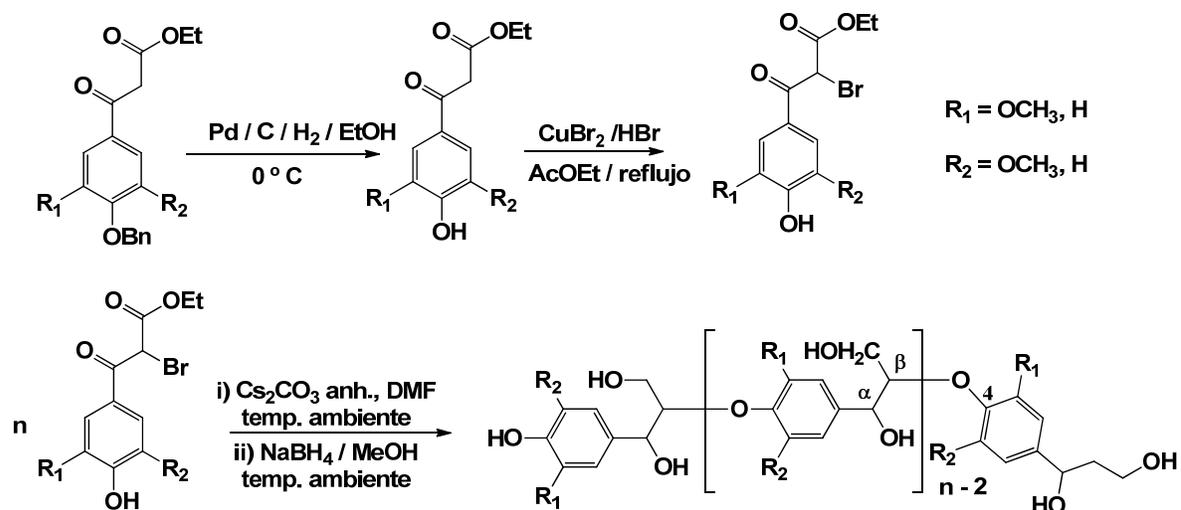
Los trabajos publicados hasta el momento demuestran buenos avances de reacción para aldehídos aromáticos sustituidos. Asimismo, ésta es una estrategia sintética versátil, que logra disminuir los equivalentes de piridina utilizados a valores estequiométricos y la reacción puede hacerse en diferentes disolventes orgánicos o agua.<sup>134-136</sup>

#### 2.4.2. Síntesis de modelos de lignina mediante distintas estrategias sintéticas

Como se ha descrito anteriormente la síntesis de modelos de lignina, entre los cuales podemos encontrar dímeros, trímeros, oligómeros y polímeros que contienen los distintos tipos de enlace, es otra de las estrategias utilizadas para contribuir al conocimiento estructural de este biopolímero.<sup>137</sup> En este sentido, los derivados sintéticos de ácido cinámico pueden ser utilizados como material de partida en una serie de reacciones con el fin de generar modelos con distintos tipos de enlaces presentes en la misma.

##### Polímeros con enlace $\beta$ -O-4

El tipo de enlace más abundante en la lignina es el  $\beta$ -O-4, y es por ello que la mayoría de los autores se han centrado en la síntesis de modelos que lo contengan. El grupo de Kishimoto ha estudiado la síntesis de polímeros de lignina artificial, logrando elaborar una estrategia sintética eficiente (Esquema 8) y un amplio estudio analítico de los polímeros obtenidos.<sup>137-139</sup>



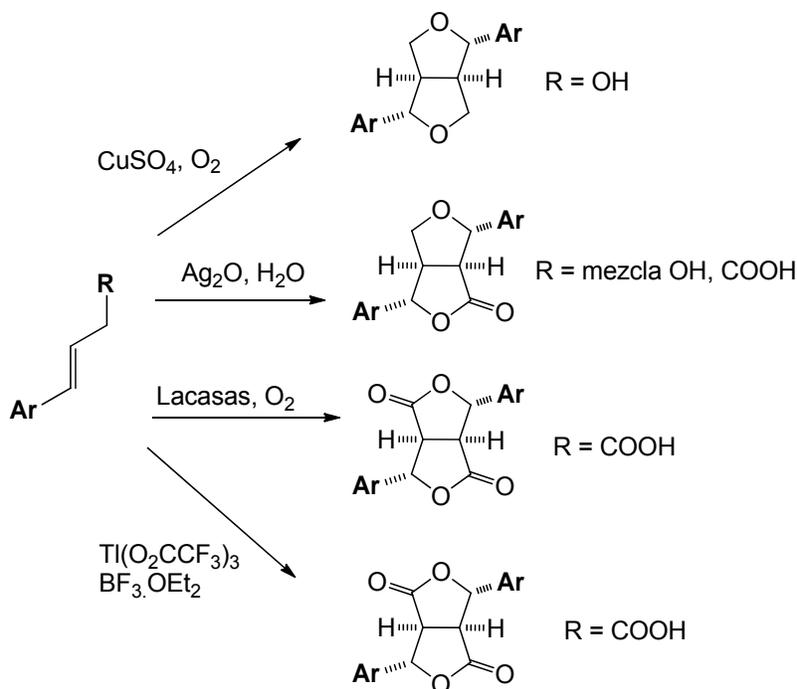
**Esquema 8:** Síntesis de polímeros con enlace  $\beta$ -O-4.

Los polímeros sintetizados tienen una estructura lineal, de cadena lateral de hidroximetílica. Su estructura está bien definida y pueden ser utilizados como modelos sintéticos de lignina. Mediante el estudio detallado de los mismos por espectroscopia de RMN, se logró obtener una serie de datos que colaboraron en el estudio de las estructuras de ligninas técnicas, así como también en un mejor entendimiento de la biosíntesis de la lignina nativa.<sup>140,141</sup>

#### Modelos con enlace $\beta$ - $\beta$ o $\beta$ -5

Varios autores han descrito la síntesis de dímeros con enlaces presentes en las ligninas, utilizando distintos derivados de ácido cinámico mediante el uso de enzimas redox como peroxidasas y lacasas, o mediante el uso de reactivos químicos.<sup>142-146</sup>

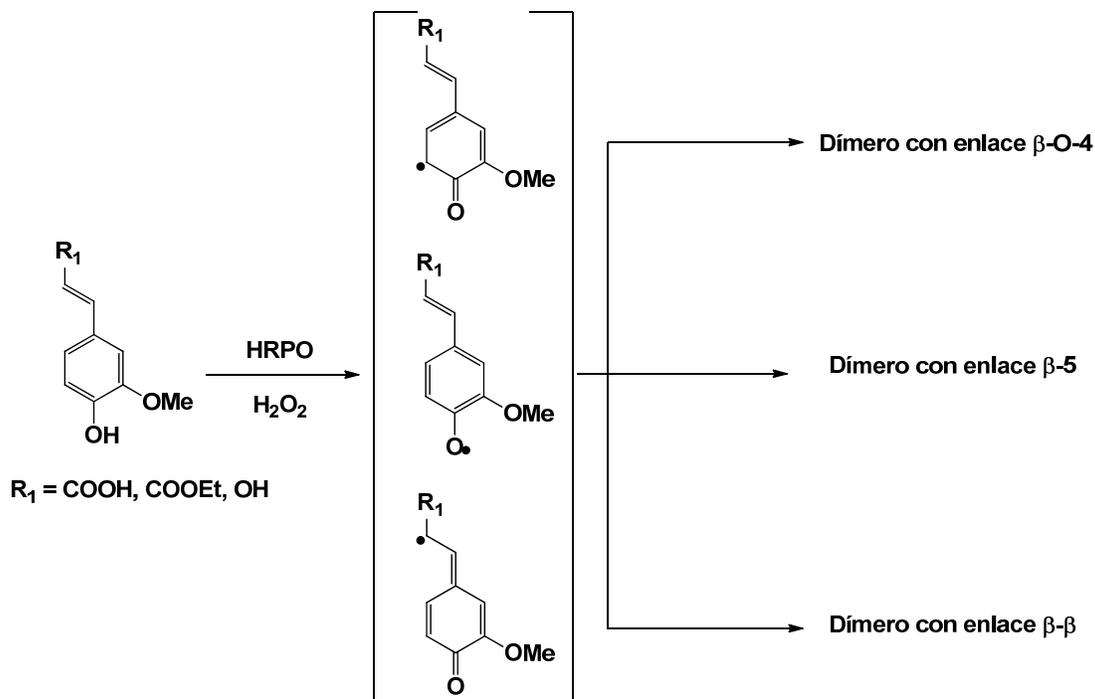
Un tipo de enlace de particular interés sintético suele ser el  $\beta$ - $\beta$ , que acopla dos anillos furano en su estructura. Estas estructuras son conocidas como furofuranos y suelen ser un objetivo sintético, ya que se les atribuye una variedad de propiedades biológicas, tales como actividad antitumoral, antialérgica, antihipertensiva, antimicótica, entre otras.<sup>147,148</sup> Adicionalmente, los posibles centros asimétricos presentes en este tipo de moléculas, y la contribución al estudio estructural de biomoléculas como la lignina, los hace objeto de estudio dentro de la síntesis orgánica. Algunas de las estrategias sintéticas desarrolladas, utilizando derivados de ácido cinámico, se muestran en la esquema 9.<sup>146</sup>



**Esquema 9:** Estrategias sintéticas para la preparación de dímeros con enlace β-β resinol.<sup>146</sup>

Las peroxidasas están involucradas en la biosíntesis de compuestos presentes en las paredes celulares de las plantas, entre ellos la lignina, siendo las responsables de la generación de radicales fenólicos, que más tarde se acoplan mediante los distintos tipos de enlaces (ver esquema 2 en sección 2.1).

La primera descripción del uso de peroxidasas en síntesis fue realizada por Sheinbein en 1855, oxidando una variedad de compuestos orgánicos mediante una solución diluida de la misma en  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Sin embargo, el primer aislamiento de una peroxidasa fue descrito recién a principios del siglo XX por Bach y colaboradores.<sup>149,150</sup> Existen tres clases de peroxidasas de acuerdo a su origen: provenientes de bacterias, de hongos y de plantas. Dentro de las dos últimas clases encontramos las que se describen como responsables de la biosíntesis y/o degradación de lignina (LiP y MnP), y aquellas que forman parte de la biosíntesis de hormonas en plantas (peroxidasas de rábano picante, HRPO).<sup>151</sup> Estas últimas, son enzimas muy versátiles y sólo necesitan de la presencia de un agente oxidante como  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Son capaces de oxidar compuestos aromáticos, heteroátomos, formar epóxidos, y han sido estudiadas sobre una gran diversidad de compuestos orgánicos, entre los cuales se encuentran fenoles y fenilpropanoides (Esquema 10).<sup>151-154</sup>



**Esquema 10:** Posibles acoplamientos en derivados fenilpropanoides utilizando HRPO.<sup>154</sup>

Para la síntesis de modelos de lignina, se han utilizado ácidos, ésteres y alcoholes derivados de ácido cinámico como sustratos de HRPO. En la mayoría de los trabajos publicados se describe la formación de dímeros y trímeros, que dependiendo de las condiciones de reacción pueden ser obtenidos en mayor o menor porcentaje.<sup>154-156</sup> Entre las variantes ensayadas se describen diferentes temperaturas, disolventes, concentración de sustrato, y unidades de enzima (UE). En todos los casos se busca evitar una reacción en cadena de los radicales fenóxico producidos, que llevan a la formación de una mezcla polimérica compleja de difícil análisis.

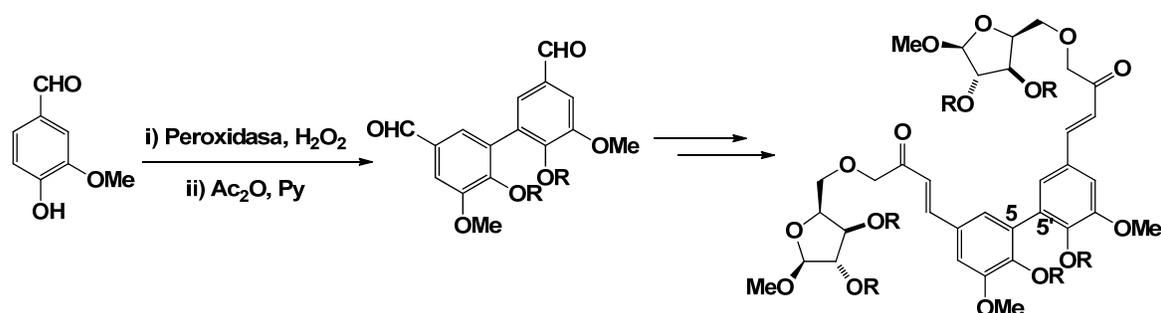
Cuando el sustrato utilizado es un derivado guaiacilo, hay más dímeros posibles, que cuando el sustrato es un derivado sinapílico. Esto se debe a que la posición 5 de los derivados sinapílicos se encuentra sustituida, evitando el acoplamiento de los mismos a ese nivel.<sup>152</sup>

Por otro lado, las lacasas también han sido utilizadas en la síntesis de modelos de lignina debido a su capacidad de degradarla. Se han ensayado diferentes condiciones con el fin de obtener buenos rendimientos, sin embargo los resultados obtenidos hasta el momento no son tan buenos como los obtenidos mediante peroxidasas. Esto se debe a algunas limitaciones de las lacasas, ya que cuentan con una baja especificidad de sustrato y necesitan de cofactores o mediadores que incrementen su potencial redox.<sup>157</sup> La necesidad de utilizar mediadores como ABTS, HBT o TEMPO, todos reactivos de alto costo, hacen a esta metodología menos eficiente. Sin embargo, existen reportes que describen el uso de las mismas para la síntesis de dímeros obteniendo resultados prometedores para continuar con su estudio.<sup>145,158</sup>

### Dímeros con enlace 5-5'

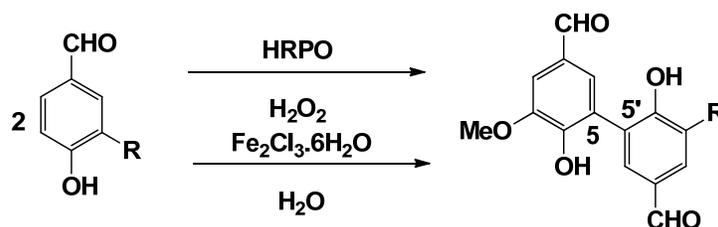
La formación de enlaces bifenilo (específicamente el enlace 5-5') es un problema clave en química orgánica, debido a la ocurrencia que éste tiene en diferentes compuestos naturales. No solo tenemos el ejemplo de la lignina, sino que la dimerización de algunos ésteres derivados de alcoholes *p*-hidroxicinámicos también ocupan un importante rol en la biosíntesis de otros compuestos naturales.<sup>159,160</sup>

La vainillina es un compuesto de bajo costo, muy utilizado en síntesis orgánica. Es un intermedio sintético para una variedad de compuestos como L-dopa, papaverina, herbicidas, etc., pero su uso más difundido es en la industria química como saborizante.<sup>160</sup> Asimismo, la vainillina se ha utilizado como material de partida para la síntesis de otros compuestos bifenílicos naturales (Esquema 11).<sup>161</sup>



**Esquema 11:** Síntesis de modelo deshidroferulato acoplado mediante enlace 5-5' presente en paredes celulares de plantas.

El acoplamiento bifenilo 5-5' puede ser preparado mediante síntesis clásica, utilizando ácidos de Lewis como  $\text{FeCl}_3$  o mediante el uso de enzimas (peroxidasas) (Esquema 12).<sup>160,162-164</sup> La mayoría de los trabajos describen la síntesis mediante el uso de peroxidasas, específicamente HRPO, ya que es un procedimiento sencillo y se encuentra dentro del campo de la química verde. Sin embargo, la insolubilidad de la vainillina en medio acuoso hace que los volúmenes necesarios para llevar a cabo la reacción sean altos y, por lo tanto, ésta sea una metodología de difícil escalado.



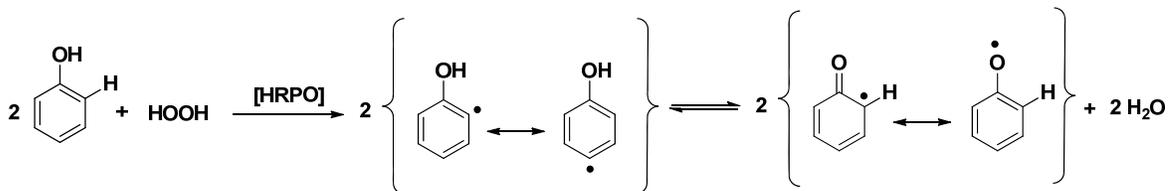
**Esquema 12:** Síntesis de bifenilos con acoplamiento 5-5'.

Por otro lado, se han combinado disolventes orgánicos con buffers acuosos como medio de reacción, y los resultados demuestran que aunque se logra aumentar la solubilidad del sustrato, las reacciones de polimerización aumentan, obteniendo productos secundarios.

Esto no sucede cuando la reacción se realiza exclusivamente en medio acuoso, ya que el dímero formado (cinéticamente el más favorable) precipita en el medio de reacción y no tiene la posibilidad de continuar reaccionando.<sup>151</sup>

La polimerización oxidativa de fenoles mediada por enzimas peroxidadas, comienza con la formación de radicales libres fenóxido, siendo éste el único paso controlado por la cinética enzimática. Los radicales así formados, se combinan para producir polímeros, mediante reacciones de policondensación (Esquema 13).<sup>151</sup>

a) Formación de radicales libres fenóxido



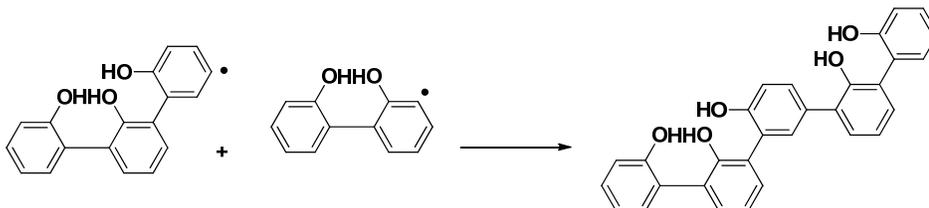
b) Recombinación de radicales fenóxido



c) Transeferencia de radical



d) Crecimiento de la cadena por tranferencia y recombinación de radicales (repetición de paso b)



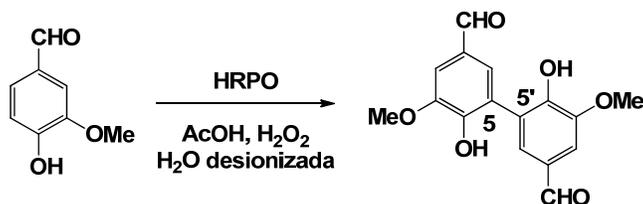
**Esquema 13:** Mecanismo de formación de polímeros fenólicos.<sup>151</sup>

Existe la hipótesis de que la polimerización se da en etapas. En un primer paso de reacción prácticamente todos los radicales se combinan para dar dímeros, que posteriormente reaccionan entre sí para dar oligómeros y los correspondientes polímeros.

La estabilidad y posterior reacción de los grupos fenilo depende del patrón de sustitución del anillo aromático, de la posición de los sustituyentes (-o, -m, -p) y de la naturaleza de los

mismos. Sustituyentes dadores de electrones activan el anillo y lo hacen más reactivo que sustituyentes aceptores.

En 2010 Nishimura y colaboradores elaboraron una estrategia sintética sencilla, ambientalmente responsable y fácilmente reproducible para la síntesis de divainillina mediante el uso de peroxidasa (HRPO), obteniendo buenos rendimientos (Esquema 14).<sup>165</sup>

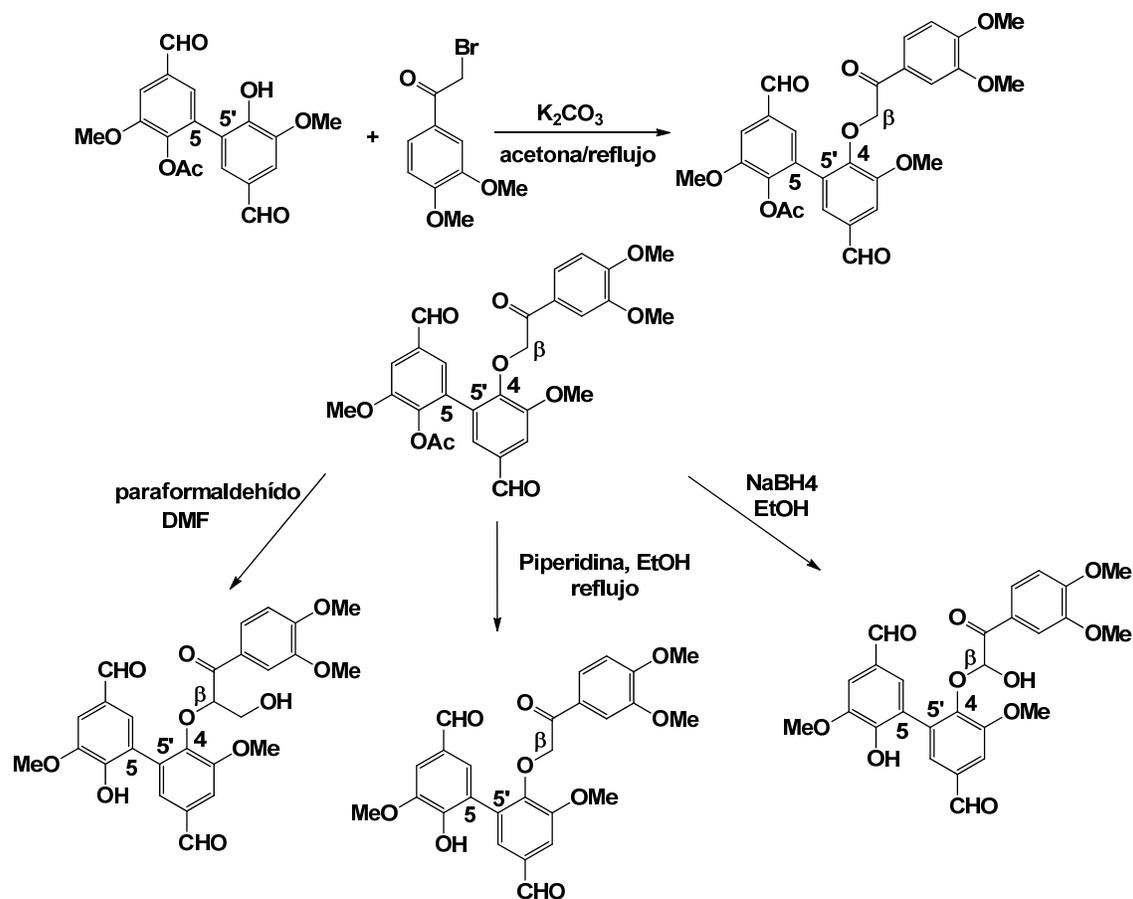


**Esquema 14:** Síntesis de divainillina.<sup>165</sup>

El uso de lacasas, con diferentes condiciones de reacción y mediadores, también ha sido ensayado para lograr este tipo de acoplamientos.<sup>142,166,167</sup> Sin embargo, hasta el momento el uso de peroxidasa es más eficiente, logrando mejores rendimientos y un menor costo de proceso.

#### Modelos con más de un tipo de enlace

Combinar enlaces del tipo aril éter con enlaces C-C en una misma molécula es de gran ayuda para la simulación de fragmentos de lignina. Los enlaces del tipo aril éter son los más abundantes en la mayoría de las ligninas, y los enlaces C-C suelen ser los más resistentes frente a los procesos de deslignificación como el Kraft. Es por ello que algunos autores se han centrado en sintetizar un modelo que contenga ambos enlaces, ya que la preparación de los mismos amplía la información espectroscópica para lograr una mayor identificación de fragmentos en distintas ligninas aisladas (Esquema 15).<sup>168</sup>



**Esquema 15:** Síntesis de modelos con enlaces 5-5' y  $\beta$ -O-4.<sup>168</sup>

Estos son sólo algunas de las estrategias sintéticas utilizadas para la síntesis de modelos. La preparación de nuevos modelos de lignina más complejos, que imiten la estructura del biopolímero, es de gran aporte para complementar el análisis de las mismas.

La búsqueda de un conocimiento mayor sobre la biosíntesis de una molécula tan compleja como esta, fue y continúa siendo uno de los objetivos dentro de la química de los productos naturales. Esto, sumado a que se ha convertido en uno de los mayores subproductos industriales, y su estructura es sumamente rica en compuestos de interés sintético, hace que la lignina sea un biopolímeros muy estudiado hoy en día.

## 2.5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) Hubbard, W.; Biles, L.; Mayfield, C.; Ashton, S. *Sustainable Forestry for Bioenergy and Bio-based Products: Trainers Curriculum Notebook*; Athens, GA: Southern Forest Research Partnership, Inc., 2007.
- (2) Collinson, S. R.; Thielemans, W. *Coord. Chem. Rev.* **2010**, *254*, 1854.
- (3) <http://www.nrel.gov/biomass/biorefinery.html> In *National Renewable Energy Laboratory Website* 2014.
- (4) Ragauskas, A. J.; Nagy, M.; Ho Kim, D.; Eckert, C. A.; Hallett, J. P.; Liotta, C. L. *Indust. Biotechnol* **2006**, *2*, 55.

- (5) Berlin, A.; Balakshin, M. In *Bioenergy Research: Advances and Applications*; G. Gupta, M. T., Christian P. Kubicek, Jack Saddler and Feng Xu Ed.; Elsevier: CA, USA, 2014, p 315.
- (6) Chávez-Sifontes, M.; Domine, M. E. *Avances en Ciencias e Ingeniería* **2013**, *4*, 15.
- (7) Ragauskas, A. J.; Beckham, G. T.; Biddy, M., J.; Chandra, R.; Chen, F.; Davis, M. F.; Davison, B. H.; Dixon, R. A.; Glina, P.; Keller, M.; Langan, P.; Naskar, A. K.; Saddler, J. N.; Tschaplinski, T.; Tuskan, G. A.; Wyman, C. *Science* **2014**, *344*, 709.
- (8) Boerjan, W.; Ralph, J.; Baucher, M. *Annu. Rev. Plant. Bio.* **2003**, *54*, 519.
- (9) Campbell, M.; Sederoff, R. *Plant. Physiol.* **1996**, *110*, 3.
- (10) Freudenberg, K. *Science* **1965**, *148*, 595.
- (11) Higuchi, T. In *Biosynthesis of lignin: Biosynthesis and Biodegradation of Wood Components.*; Higuchi, T., Ed.; Academic press: Orlando, 1985, p 141.
- (12) Hatfield, R.; Vermerris, W. *Plant Physiol.* **2001**, *126*, 1351.
- (13) Ralph, J.; Lundquist, K.; Brunow, G.; Lu, F.; Kim, H.; Schatz, P. F.; Marita, J. M.; Hatfield, R. D.; Ralph, S. A.; Christensen, J. H.; Boerjan, W. *Phytochem. Reviews* **2004**, *3*, 29.
- (14) Argyropoulos, D. S.; Menachem, S. B. *Adv. Biochem. Eng./Biotechnol.* **1997**, *57*, 127.
- (15) Boudet, A.-M. *Plant Physiology Biochemistry* **2000**, *38*, 81.
- (16) Davin, L. B.; Lewis, N. G. *Plant. Physiol.* **2000**, *123*, 453.
- (17) Xu, C.; Arancon, R. A.; Labidi, J.; Luque, R. *Chem. Soc. Review* **2014**, *43*, 485.
- (18) Higuchi, T. *Wood Sci. Technol.* **1990**, *23*, 23.
- (19) Neutelings, G. *Plant Science* **2011**, *181*, 379.
- (20) Brauns, F. E. *J. Am. Chem. Soc.* **1939**, *61*, 2120.
- (21) Björkman, A. *Sven. Papperstidn* **1956**, *13*, 477.
- (22) Obst, J. R.; Kirk, T. K. In *Methods Enzymol*; Willis A.; Kellogg, Scott T. (Eds.): San Diego, CA, 1988; Vol. 161, p 3.
- (23) Liitiä, T. M.; Maunu, S. L.; Hortling, B.; Toikka, M.; Kilpeläinen, I. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 2136.
- (24) Balakshin, M. Y.; Capanema, E. A.; Chen, C.-L.; Gracz, H. S. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 6116.
- (25) Smook, G. A. *Handbook for Pulp and Paper Technologists*; second ed.; Angus Wilde Publications, 1992; Vol. 11.
- (26) Chakar, F. S.; Ragauskas, A. J. *Ind. Crops Prod.* **2004**, *20*, 131.
- (27) Hu, J.; Xiao, R.; Shen, D.; Zhang, H. *Bioresour. Technol.* **2013**, *128*, 633.
- (28) Gierer, J. *Wood Sci. Technol.* **1980**, *14*, 241.
- (29) Baptista, C.; Robert, D.; Duarte, A. P. *Chem. Eng. J.* **2006**, *121*, 153.
- (30) *Profile of the Pulp and Paper Industry. EPA Office of Compliance Sector Notebook EPA-310-R-02-002*; Epa, in 2nd (Ed.) ed. Washington, DC, 2002.
- (31) Holladay, J. E.; Bozell, J. J.; White, J. F.; Johnson, D. *Top Value-Added Chemicals from Biomass Volume II—Results of Screening for Potential Candidates from Biorefinery Lignin US*, 2007.
- (32) Ragauskas, A. J.; Williams, C. K.; Davison, B. H.; Britovsek, G.; Cairney, J.; Eckert, C. A.; Jr., W. J. F.; Hallett, J. P.; Leak, D. J.; Liotta, C. L.; Mielenz, J. R.; Murphy, R.; Templer, R.; Tschaplinski, T. *Science* **2006**, *311*, 484.
- (33) Doherty, W. O. S.; Mousavioun, P.; Fellows, C. M. *Ind. Crops Prod.* **2011**, *33*, 259.
- (34) Suparno, O.; Covington, A. D.; Phillips, P. S. *Resour. Conserv. Recycl.* **2005**, *45*, 114.
- (35) Alén, R.; Rytönen, S.; McKeough, P. *J. Anal. Appl. Pyrolysis* **1995**, *31*, 1.
- (36) Larsson, A.; Nordin, A.; Backman, R.; Warnqvist, B. *Energy Fuels* **2000**, *20*, 359.
- (37) Chahar, S.; Dastidar, M. G.; Choudhary, V.; Sharma, D. K. *J. Adhesion Sci. Technol.* **2004**, *18*, 169.
- (38) Suparno, O.; Covington, A. D.; Evans, C. S. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **2005**, *80*, 44.
- (39) Norgren, M.; Edlund, H. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2014**, *19*, 409.
- (40) Sun, R.; Tomkinson, J. *Sep. Purif. Technol.* **2001**, *24*, 529.
- (41) Liu, G.; Liu, Y.; Ni, J.-e.; Shi, H.; Qian, Y. *Desalination* **2004**, *160*, 131.

- (42) Öhman, F.; Wallmo, H.; Theliander, H. *Nord. Pulp Pap. Res. J.* **2007**, *22*, 188.
- (43) Nagy, M.; Kosa, M.; Theliander, H.; Ragauskas, A. J. *Green Chem.* **2010**, *12*, 31.
- (44) Ibrahim, M. N. M.; Chuah, S. B. *AJSTD* **2004**, *21*, 57.
- (45) Sun, R.; Tomkinson, J.; Jones, G. L. *Polym. Degrad. Stab.* **2000**, *68*, 111.
- (46) Ragnar, M.; Lindgren, C. T.; Nilvebrant, N.-O. *J. Wood Chem. Technol.* **2000**, *20*, 277.
- (47) Helander, M.; Theliander, H.; Lawoko, M.; Henriksson, G.; Zhang, L.; Lindström, M. E. *Bioresour. Technol.* **2013**, *8*, 2270.
- (48) dos Santos, P. S. B.; Erdocia, X.; Gatto, D. A.; Labidi, J. *Ind. Crops Prod.* **2014**, *55*, 149.
- (49) Sun, R.; Tomkinson, J.; Bolton, J. *Polym. Degrad. Stab.* **1999**, *63*, 195.
- (50) García, A.; Toledano, A.; Serrano, L.; Egüés, I.; González, M.; Marín, F.; Labidi, J. *Sep. Purif. Technol.* **2009**, *68*, 193.
- (51) Yuan, T.-Q.; He, J.; Xu, F.; Sun, R.-C. *Polym. Degrad. Stab.* **2009**, *94*, 1142.
- (52) Keyoumu, A.; Sjö Dahl, R.; Henriksson, R.; Gellerstedt, M. E. G.; Lindström, M. E. *Ind. Crops Prods.* **2004**, *20*, 143.
- (53) Argyropoulos, D. S.; Gaspar, A.; Lucia, L.; Rojas, O. J. *La Chimica e l'Industria* **2006**, *88*, 74.
- (54) Yoshikawa, T.; Yagi, T.; Shinohara, S.; Fukunaga, T.; Nakasaka, Y.; Tago, T.; Masuda, T. *Fuel Process. Technol.* **2013**, *108*, 69.
- (55) Freudenberg, K. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1939**, *52*, 362.
- (56) Reeves, J. B. *J. Dairy. Sci.* **1986**, *69*, 71.
- (57) Sun, R.; Lawther, J. M.; Banks, W. B. *Ind. Crops Prod.* **1995**, *4*, 241.
- (58) Bose, S. K.; Francis, R. C.; Govender, M.; Bush, T.; Spark, A. *Bioresour. Technol.* **2009**, *100*, 1628.
- (59) Ohra-aho, T.; Gomes, F. J. B.; Colodette, J. L.; Tamminena, T. *J. Anal. Appl. Pyrolysis* **2013**, *101*
- (60) Adler, E. *Wood Sci. Technol.* **1977**, 169.
- (61) Lin, S. Y.; Dence, C. W. *Methods in lignin chemistry*; Springer: NY, 1992.
- (62) [http://www.iso.org/iso/catalogue\\_detail.htm?csnumber=36604](http://www.iso.org/iso/catalogue_detail.htm?csnumber=36604).
- (63) Yan, N.; Zhao, C.; Dyson, P. J.; Wang, C.; Liu, L.-t.; Kou, Y. *Chem. Sus. Chem.* **2008**, *1*, 626.
- (64) Xin-ping, O.; You-dan, T.; Xue-qing, Q. *J. Fuel. Chem. Technol.* **2014**, *42*, 677.
- (65) Massignale, M. P.; Alves, E. F.; Korbieh, T. N.; Bose, S. K.; Francis, R. C. *BioResource* **2009**, *4*, 1139.
- (66) Suzuki, H.; Cao, J.; Jin, F.; Kishita, A.; Enomoto, H. *J Mater Sci* **2006**, *41*, 1591.
- (67) Crestini, C.; Crucianelli, M.; Orlandi, M.; Saladino, R. *Catal. Today* **2010**, *156*, 8.
- (68) Pinto, P. C. R.; Silva, E. A. B. d.; Rodrigues, A. E. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2011**, *50*, 741.
- (69) Villar, J. C.; Caperos, A.; Gracia-Ochoa, F. *Wood Sci. Technol.* **2001**, *35*, 245.
- (70) Crestini, C.; Caponi, M. C.; Argyropoulos, D. S.; Saladino, R. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 5292.
- (71) Rahimi, A.; Azarpira, A.; Kim, H.; Ralph, J.; Stahl, S. S. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 6415.
- (72) Mbachu, D.; Manley, J. J. *Polym. Sci., Part A: Polym. Chem* **1981**, *19*, 2053.
- (73) Ragnar, M.; Eriksson, T.; Reitberger, T.; Brandt, P. *Holzforchung* **1999**, *53*, 423.
- (74) Ragnar, M.; Eriksson, T.; Reitberger, T. *Holzforchung* **1999**, *53*, 292.
- (75) Chuck, C. J.; Parker, H. J.; Jenkins, R. W.; Donnelly, J. *Bioresour. Technol.* **2013**, *143*, 549.
- (76) Miura, T.; Lee, S.-H.; Inoue, S.; Endo, T. *Bioresour. Technol.* **2012**, *126*, 182.
- (77) Travaini, R.; Otero, M. D. M.; Coca, M.; Da-Silva, R.; Bolado, S. *Bioresour. Technol.* **2013**, *133*, 332.
- (78) Reiner, T.; Lemonidou, A.; Li, X.; Lerche, J. A. *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 5939.

- (79) Sazanova, Y. N.; Popovaa, E. N.; Summerskiib, I. V.; Mokeeva, M. V.; Kulikovaa, E. M.; Litvinovaa, L. S.; Kevera, E. E.; Krutovb, S. M.; Gribanov, A. V. *Russ. J. Appl. Chem.* **2010**, *83*, 1607.
- (80) Toledano, A.; Serrano, L.; Labidi, J. J. *Chem. Technol. Biotechnol.* **2012**, *87*, 1593.
- (81) Beauchet, R.; b, F. M.-R.; Lavoie, J. M. *Bioresour. Technol.* **2012**, *121*, 328.
- (82) Finch, K. B. H.; Richards, R. M.; Richel, A.; Medvedovici, A. V.; Gheorghe, N. G.; Verziue, M.; Comane, S. M.; Parvulescu, V. I. *Catal. Today* **2012**, *196*, 3.
- (83) Fang, Z.; Sato, T.; Jr., R. L. S.; Hiroshi Inomata; Arai, K.; Kozinski, J. A. *Bioresour. Technol.* **2008**, *99*, 3424.
- (84) Sánchez, C. *Biotechnol. Adv.* **2009**, *27*, 185.
- (85) Higuchi, T. *J. Biotechnol.* **1993**, *30*, 1.
- (86) Lara, M. A.; Rodríguez-Malaver, A. J.; Rojas, O. J.; Holmquist, O.; González, A. M.; Bullón, J.; Peñalosa, N.; Araujo, E. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **2003**, *52*, 167.
- (87) Riva, S. *Trends Biotechnol.* **2006**, *24*, 221.
- (88) Barreca, A. M.; Fabbrini, M.; Galli, C.; Gentili, P.; Ljunggren, S. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2003**, *26*, 105.
- (89) Kamwilaisak, K.; Wright, P. C. *Energy Fuels* **2012**, *26*, 2400.
- (90) Camarero, S.; Ibarra, D.; Martínez, Á. T.; Romerob, J.; Gutiérrez, A.; Río, J. C. d. *Enzyme Microb. Technol.* **2007**, *40*, 1264.
- (91) Widsten, P.; Kandelbauer, A. *Enzyme Microb. Technol.* **2008**, *42*, 293.
- (92) Du, X.; Li, J.; Gellerstedt, G.; Rencoret, J.; Río, J. C. D.; MARTÍNEZ, A. T.; Gutiérrez, A. *Biomacromolecules* **2013**, *14*, 3073.
- (93) Knezevic, A.; Milovanovic, I.; Stajic, M.; Loncar, N.; Brceski, I.; Vukojevic, J.; Cilerdzic, J. *Bioresour. Technol.* **2013**, *138*, 117.
- (94) Shi, Y.; Chai, L.; Tang, C.; Yang, Z.; Zheng, Y.; Chen, Y.; Jing, Q. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **2013**, *36*, 1957.
- (95) Ahmad, M.; Taylor, C. R.; Pink, D.; Burton, K.; Eastwood, D.; Bendingb, G. D.; Bugg, T. D. H. *Mol. BioSyst.* **2010**, *6*, 815.
- (96) Bugg, T. D. H.; Ahmad, M.; Hardiman, E. M.; Singh, R. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2011**, *22*, 394.
- (97) Bugg, T. D. H.; Ahmad, M.; Hardiman, E. M.; Rahmanpour, R. *Nat. Prod. Rep.* **2011**, *28*, 1883.
- (98) Wu, Y.-R.; He, J. *Bioresour. Technol.* **2013**, *139*, 5.
- (99) Welton, T. *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 2071.
- (100) Diop, A.; Daneault, C.; Montplaisir, D.; Bouazza, A. H. *Bioresources* **2013**, *8*, 4270.
- (101) Xiao, S.; Liu, B.; Wang, Y.; Fang, Z.; Zhang, Z. *Bioresour. Technol.* **2014**, *151*, 361.
- (102) Xu, A.; Zhang, Y.; Zhao, Y.; Wang, J. *Carbohydr. Polym.* **2013**, *92*, 540.
- (103) Lee, S. H.; Doherty, T. V.; Linhardt, R. J.; Dordick, J. S. *Biotechnol. Bioeng.* **2009**, *102*, 1368.
- (104) George, A.; Tran, K.; Morgan, T. J.; Benke, P. I.; Berrueco, C.; Lorente, E.; Wu, B. C.; Keasling, J. D.; Simmonsac, B. A.; Holmes, B. M. *Green Chem.* **2011**, *13*, 3375.
- (105) Cox, B. J.; Jia, S.; Zhang, Z. C.; Ekerdt, J. G. *Polym. Degrad. Stab.* **2011**, *96*, 426.
- (106) Chatel, G.; Rogers, R. D. *ACS Sustainable Chem. Eng.* **2014**, *2*, 322.
- (107) Nada, A. M. A.; El-Saied, H.; Fadl, M. H.; Nassar, M. *Polym. Degrad. Stab.* **1994**, *43*, 55.
- (108) Nada, A.-A. M. A.; Yousef, M. A.; Shaffei, K. A.; Salah, A. M. *Polym. Degrad. Stab.* **1998**, *62*, 157.
- (109) Bunzel, M.; Ralph, J.; Funk, C.; Steinhart, H. *Eur. Food Res. Technol.* **2003**, *217*, 128.
- (110) Südekum, K.-H.; Voigt, K.; Monties, B.; Stangassinger, M. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45*, 1220.
- (111) Bunzel, M.; Ralph, J.; Brünning, P.; Steinhart, H. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 6409.
- (112) Ede, R. M.; Brunow, G. *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 1477.
- (113) Lundquist, K. *Acta Chem. Scand.* **1979**, *B33*, 418.

- (114) Nada, A. M. A.; Fadly, M.; Dawy, M. *Polym. Degrad. Stab.* **1992**, *37*, 125.
- (115) Lewis, N. G.; Razal, R. A.; Dhara, K. P.; Yamamoto, E.; Bokelman, G. H.; Wooten, J. B. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1988**, 1626.
- (116) Martínez, Á. T.; Rencoret, J.; Marques, G.; Gutiérrez, A.; Ibarra, D.; Jiménez-Barbero, J.; Río, J. C. d. *Phytochemistry* **2008**, *69*, 2831.
- (117) Sette, M.; Wechselberger, R.; Crestini, C. *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 9529.
- (118) Río, J. C. d.; Rencoret, J.; Prinsen, P.; Martínez, Á. T.; Ralph, J.; Gutierrez, A. *J. Agric. Food Chem.* **2012**, *60*, 5922.
- (119) Rencoret, J.; Gutiérrez, A.; Nieto, L.; Jiménez-Barbero, J.; Faulds, C. B.; Kim, H.; Ralph, J.; Matínez, Á. T.; Río, J. C. d. *Plant Physiology* **2011**, *155*, 667.
- (120) Ohra-ahoa, T.; Gomes, F. J. B.; Colodette, J. L.; Tamminena, T. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* **2013**, *101*, 166.
- (121) Moldoveanu, S. C. *Analytical pyrolysis of natural organic polymers*; Elsevier: Macon, GA, USA, 1998; Vol. 20.
- (122) Akita, H.; Kawahara, E.; Kishida, M.; Kato, K. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2006**, *40*, 8.
- (123) Sinha, A. K.; Kumar, V.; Sharma, A.; Sharma, A.; Kumar, R. *Tetrahedron* **2007**, *63*, 11070.
- (124) She, X.; Qui, S.; Gu, W.; Pan, X. *J. Chem. Research (S)* **1998**, 436.
- (125) Tanaka, H.; Ishihara, M.; Ichino, K. *Chem. Pharm. Bull.* **1988**, *36*, 3833.
- (126) Taha, N.; Sasson, Y.; Chidambaram, M. *Appl. Catal., A* **2008**, 350.
- (127) Barma, D. K.; Kundu, A.; Bandyopadhyay, A.; Kundu, A.; Sangras, B.; Briot, A.; Mioskowski, C.; Falck, J. R. *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 5917.
- (128) Ledford, B. E.; Carretra, E. M. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 8125.
- (129) List, B.; Doehring, A.; Fonseca, M. T. H.; Jobb, A.; Torres, R. R. *Tetrahedron* **2006**, *62*, 476.
- (130) Kürti, L.; Czakó, B. *Strategic Applications of Named Reactions in Organic Synthesis*; Elsevier Academic Press: USA, 2005.
- (131) Ragoussis, N. *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 93.
- (132) Hubrich, F.; Mordhorst, S.; Andexer, J. N. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, *23*, 1477.
- (133) Aldabalde, V.; Risso, M.; Derrudi, M. L.; Geymonat, F.; Seoane, G.; Gaménara, D.; Saenz-Méndez, P. *Open J. Phys. Chem.* **2011**, *1*, 85.
- (134) Heravi, M. M.; Asadi, S.; Azarakhshi, F. *Curr. Org. Syn.* **2014**, *11*, 701.
- (135) Peng, Y.; Song, G. *Green Chem.* **2003**, *5*, 704.
- (136) McCluskey, A.; Robinson, P. J.; Hill, T.; Scott, J. L.; Edwards, J. K. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 3117.
- (137) Kishimoto, T.; Uraki, Y.; Ubukata, M. *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 2982.
- (138) Kishimoto, T.; Uraki, Y.; Ubukata, M. *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 1343.
- (139) Kishimoto, T.; Uraki, Y.; Ubukata, M. *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3*, 1067.
- (140) Lu, F.; Ralph, J. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45*, 4655.
- (141) Ralph, J.; Helm, R. F.; Quideau, S. *J. Chem. Soc., Perkin Trans 1* **1992**, 2971.
- (142) Lahtinen, M.; Kruus, K.; Heinonen, P.; Sipila, J. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 8357.
- (143) Adelakun, O. E.; Kudanga, T.; Parker, A.; Green, I. R.; Roes-Hill, M. I.; Burton, S. G. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2012**, *74*, 29.
- (144) Pickel, B.; Constantin, M.-A.; Pfannstiel, J.; Conrad, J.; Beifuss, U.; Schaller, A. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 202.
- (145) Tranchimand, S.; Tron, T.; Gaudin, C.; Iacazio, G. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2006**, *42*, 27.
- (146) Brown, R. C. D.; Swain, N. A. *Synthesis* **2004**, *6*, 811.
- (147) Macrae, W. D.; Towers, G. H. N. *Phytochemistry* **1984**, *23*, 1207.
- (148) Pan, J.; Hensens, O. D.; Zink, D. L.; Chang, M. N.; Hwang, S.-B. *Phytochemistry* **1987**, *26*, 1377.
- (149) Bach, A. N.; Chodat, R. *Ber. Deutsch. Chem. Gesell.* **1902**, *35*, 2466.

- (150) Eisenstadt, M. A.; Bogolitsyn, K. G. *Russ. J. Bioorg. Chem* **2010**, *36*, 802.
- (151) Reihmann, M.; Ritter, H. In *Enzyme-Catalyzed Synthesis of Polymers*; Springer Berlin Heidelberg: 2006; Vol. 194, p 1.
- (152) Syrjänen, K.; Brunow, G. *Tetrahedron* **2001**, *57*, 365.
- (153) Zhang, A.; Lu, F.; Sun, R.; Ralph, J. *Planta* **2009**, *229*, 1099.
- (154) Yue, F.; Lu, F.; Sun, R.; Ralph, J. *Chem. Eur. J.* **2012**, *18*, 16402.
- (155) Ralph, J.; Bunzel, M.; Marita, J.; Hatfield, R. D.; Lu, F.; Kim, H.; Schatz, P. F.; Grabber, J. H.; Steinhart, H. *Phytochem. Reviews* **2004**, *3*, 79.
- (156) Lu, F.; Ralph, J.; Morreel, K.; Messens, E.; Boerjan, W. *Org. Biomol. Chem.* **2004**, *2*, 2888.
- (157) Areskoggh, D.; Li, J.; Nousiainen, P.; Gellerstedt, G. r.; Sipilä, J.; Henriksson, G. *Holzforschung* **2010**, *64*, 21.
- (158) Constantin, M. B.; Conrad, J.; Beifuss, U. *Green Chem.* **2012**, *14*, 2375.
- (159) Delomenede, M.; Bedos-Belval, F.; Duran, H.; Vindis, C.; Baltas, M.; Negre-Salvayre, A. *J. Med. Chem.* **2008**.
- (160) Amarasekara, A. S.; Wiredu, B.; Razzaq, A. *Green Chem.* **2012**, *14*, 2395.
- (161) Quideau, S.; Ralph, J. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1997**, 2351.
- (162) Yamamoto, H.; Hoshino, T.; Uchiyama, T. *Biosci., Biotechnol., Biochem.* **1999**, *63*, 390.
- (163) Drumond, M. G.; PiloVeloso, D.; Cota, S. D. S.; Morais, S. A. L. d.; Nascimento, E. A. d.; Chen, C.-L. *Holzforschung* **1992**, *46*, 127.
- (164) Saá, J. M.; Martorell, G. *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 1963.
- (165) Nishimura, R. T.; Giammanco, C. H.; Vosburg, D. A. *J. Chem. Educ.* **2010**, *87*, 526.
- (166) Ciecholewski, S.; Hammer, E.; Manda, K.; Bose, G.; Nguyen, V. T. H.; Langer, P.; Schauer, F. *Tetrahedron* **2005**, *61*, 4615.
- (167) Mita, N.; Tawaki, S.-i.; Uyama, H.; Kobayashi, S. *Macromol. Biosci.* **2003**, *3*, 253.
- (168) Alves, V. L.; Drumond, M. G.; Stefani, G. M.; Cheng, C.-L.; Piló-Veloso, D. *Journal Brazilian Chemical Society* **2000**, *11*, 467.

## **Capítulo 3**

### **Objetivos y metodología**

### **3. OBJETIVOS Y METODOLOGÍA**

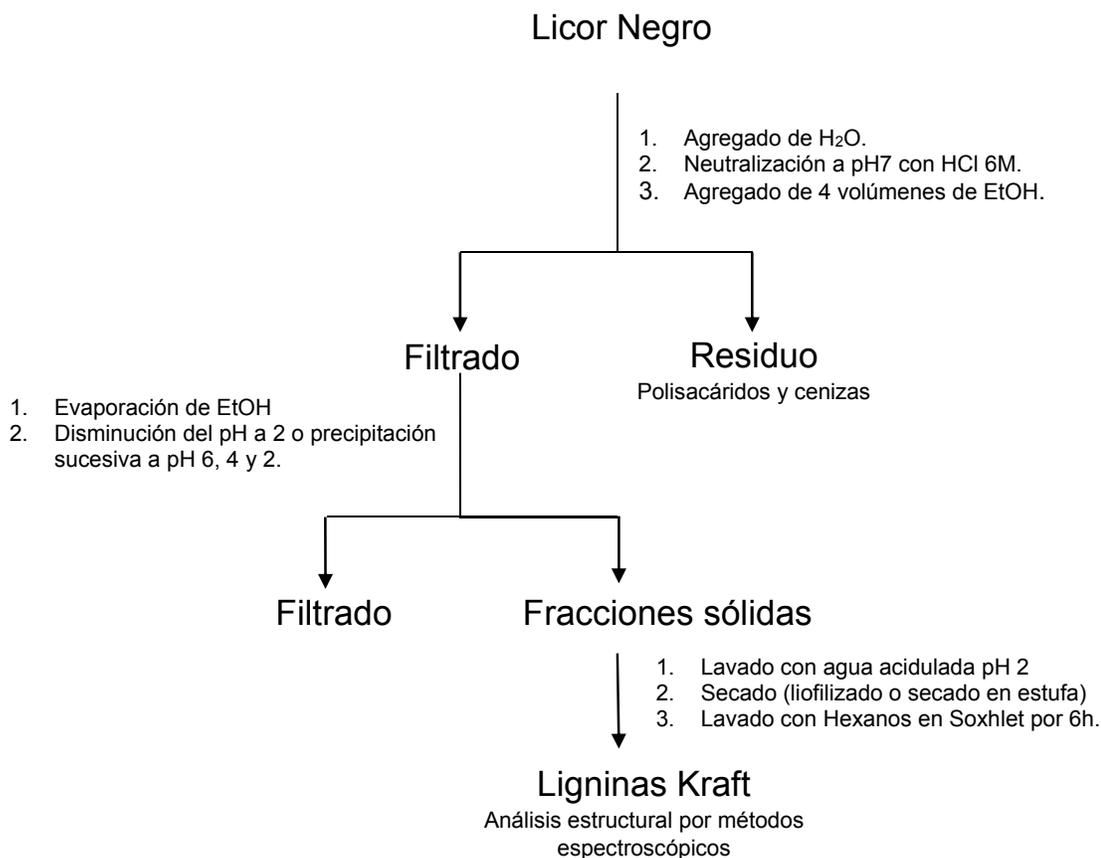
#### **3.1. OBJETIVO GENERAL**

El objetivo general del presente trabajo de tesis se enmarca en el análisis y uso de la biomasa lignocelulósica producida en nuestro país, para obtener un conocimiento estructural de la lignina contenida en la misma, con el fin de lograr la recuperación de productos de mayor valor a partir de esta última. Para dicho fin se plantean los siguientes objetivos específicos:

##### **3.1.1. Objetivos específicos**

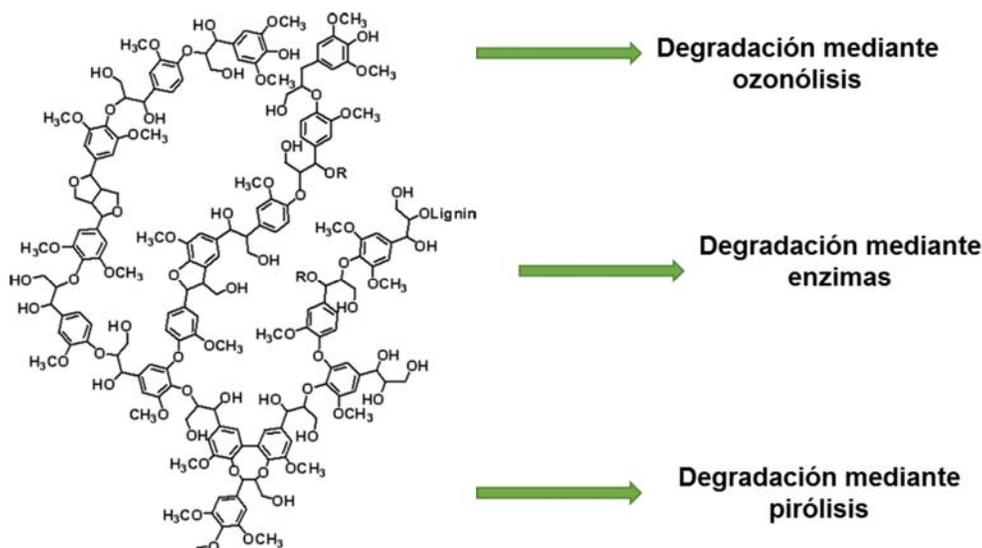
*Caracterización de la estructura de la lignina remanente del proceso Kraft y recuperación de productos químicos de alto valor agregado a partir de la misma, y sus productos de descomposición presentes en el licor negro (LN).*

Los LNs utilizados fueron suministrados por tres de las empresas productoras de pasta de celulosa presentes en nuestro país: Fanapel, Pamer y UPM. Como metodología de trabajo se plantea el uso de técnicas simples y eficientes para la extracción de ligninas de los distintos LNs. El procedimiento empleado será un proceso de fraccionamiento simple, obteniendo la lignina mediante sucesivas precipitaciones por acidificación. El LN se neutralizará, y las cenizas y productos de degradación de polisacáridos contenidos en el mismo se removerán por filtración. La lignina será posteriormente precipitada mediante acidificación, y las ceras y otros compuestos lipídicos, serán removidos mediante extracción en Soxhlet (Esquema 1).<sup>1,2</sup>



**Esquema 1:** Metodología de extracción de lignina a partir de LN.

Las distintas ligninas Kraft aisladas serán identificadas y analizadas mediante diferentes métodos analíticos como espectroscopía IR, espectroscopía de RMN uni- y bidimensional, y espectroscopía UV. Se ensayarán además metodologías de degradación para determinar la relación entre cada una de las unidades [ $p$ -hidroxifenilo (H), guaiacilo (G) y siringilo (S)] presentes en las distintas fracciones aisladas (Figura 1).



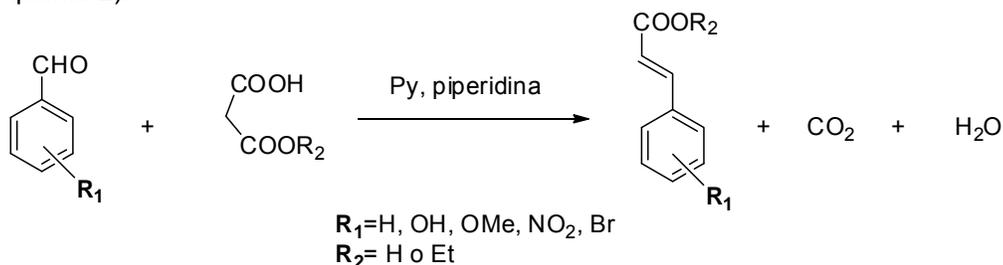
**Figura 1:** Distintas metodologías de degradación de lignina.

Adicionalmente, la lignina Kraft aislada será secuencialmente fraccionada mediante extracción con diferentes disolventes. En cada paso de extracción la lignina será extraída con un disolvente y luego filtrada. El residuo será secado y extraído con otro disolvente de polaridad y capacidad de formación de enlaces de hidrógeno crecientes. Los extractos obtenidos en cada etapa serán analizados mediante las técnicas antes mencionadas. Las fracciones más simples serán separadas mediante cromatografía y los compuestos aislados caracterizados mediante técnicas espectroscópicas.

La suma de los estudios en las ligninas Kraft con las distintas fracciones de lignina aisladas, permitirá alcanzar un conocimiento de la composición de la misma, así como un acercamiento a su estructura. De esta forma se obtendrá un conocimiento sobre las ligninas técnicas producidas en nuestro país, y su potencial uso como materias primas renovables.

*Síntesis de moléculas relacionadas estructuralmente con la lignina, con potencial sintético como bloques de construcción.*

Se utilizará la condensación de Knoevenagel para la preparación de distintos derivados fenilpropanoides, utilizando piperidina como organocatalizador (modificación de Doebner) (Esquema 2).<sup>3</sup>



**Esquema 2:** Preparación de derivados fenilpropanoides.

Se utilizarán aldehídos aromáticos con distintos patrones de sustitución (grupos dadores de electrones (ej.: OMe) y grupos aceptores de electrones (ej.: NO<sub>2</sub>), y se evaluarán

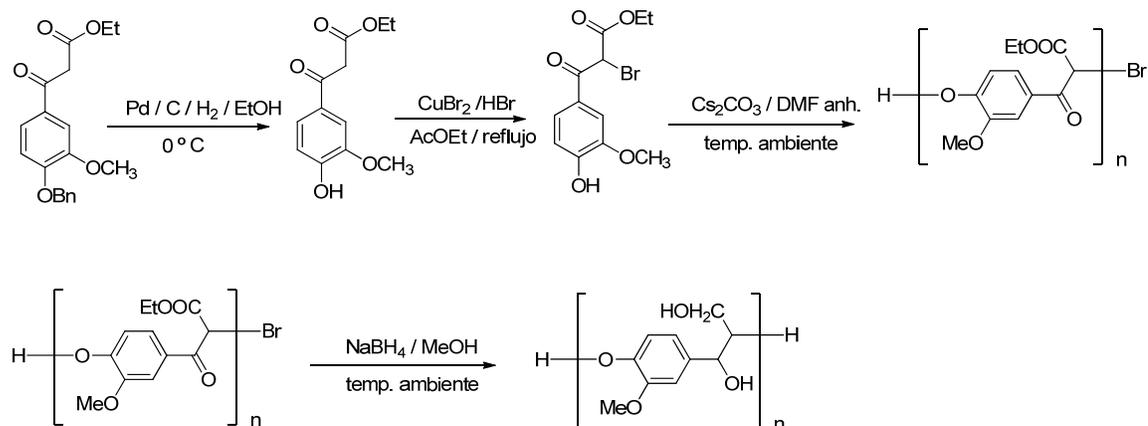
distintas cantidades de organocatalizador y distintos disolventes, con el fin de encontrar las mejores condiciones de reacción.

Una vez obtenidos los ácidos y ésteres correspondientes, los mismos servirán como bloques de construcción de nuevas moléculas de interés, así como para la síntesis de modelos de lignina.

*Síntesis de modelos de lignina que representen los diferentes tipos de uniones presentes en el polímero natural, caracterización de los mismos, y comparación espectroscópica con la lignina Kraft, para estudiar la abundancia de tales estructuras en la misma.*

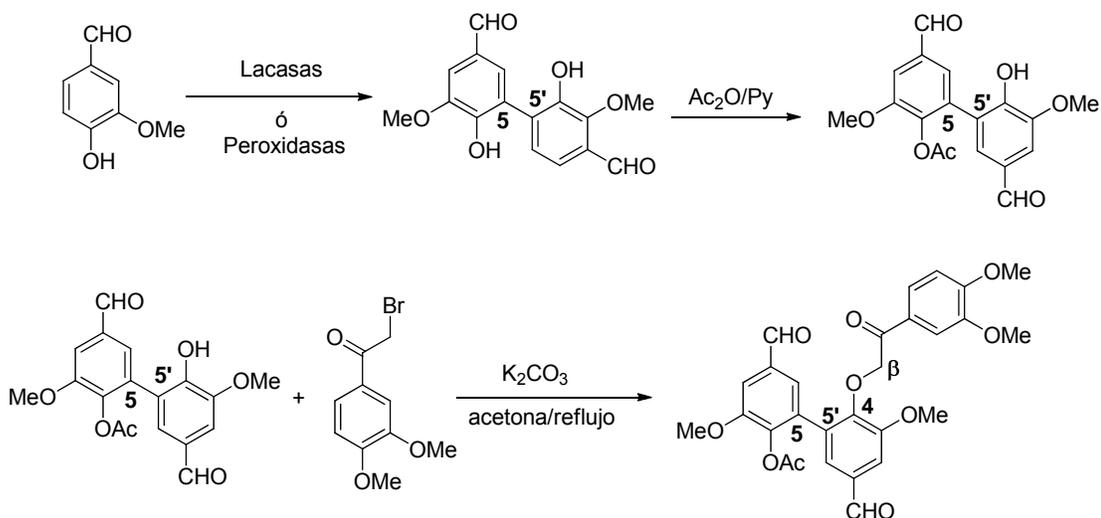
Se sintetizarán una serie de modelos de lignina que contengan los patrones de enlace típicos presentes en la misma, o como resultado del proceso Kraft. Se propone la síntesis de diferentes modelos alternativos que asistan en la elucidación de la estructura de la lignina y de los fragmentos de la misma, así como su reactividad y el comportamiento frente al fraccionamiento con diferentes disolventes.

Se sintetizará un polímero con el tipo de enlace más abundante ( $\beta$ -O-4), basado en las síntesis descritas en bibliografía para su preparación (Esquema 3).<sup>4-6</sup>

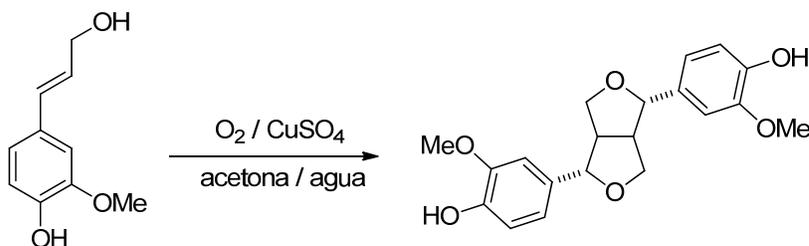


**Esquema 3:** Síntesis de polímeros con enlace  $\beta$ -O-4.

Por otro lado, se plantea la preparación de un trímero con los enlaces  $\beta$ -O-4 y 5-5' (enlace del tipo C-C, esquema 4), y un dímero con el tipo de enlace  $\beta$ - $\beta$  resinol (Esquema 5).<sup>7,8</sup>



**Esquema 4:** Preparación de trímero con enlace  $\beta$ -O-4 y 5-5'.



**Esquema 5:** Preparación de dímery con enlace  $\beta$ - $\beta$  resinol.

Una vez sintetizados estos modelos, se realizará un estudio analítico de los mismos (RMN (uni- y bidimensional), IR y pirólisis acoplada a GC/MS), y se generará una base de datos para comparar con los resultados obtenidos de las distintas ligninas aisladas.

La información que se obtenga a partir de los distintos análisis de las ligninas extraídas, generará conocimiento sobre de las ligninas técnicas producidas en nuestro país, y las diferencias estructurales que estas tengan con las ligninas nativas de donde provienen.

### 3.2. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) Sun, R.; Tomkinson, J. *Separation and Purification Technology* **2001**, 24, 529.
- (2) Sun, R.; Tomkinson, J.; Bolton, J. *Polymer Degradation and Stability* **1999**, 63, 195.
- (3) Kürti, L.; Czakó, B. *Strategic Applications of Named Reactions in Organic Synthesis*; Elsevier Academic Press: USA, 2005.
- (4) Kishimoto, T.; Uraki, Y.; Ubukata, M. *Org. Biomol. Chem.* **2005**, 3, 1067.
- (5) Kishimoto, T.; Uraki, Y.; Ubukata, M. *Org. Biomol. Chem.* **2008**, 6, 2982.
- (6) Kishimoto, T.; Uraki, Y.; Ubukata, M. *Org. Biomol. Chem.* **2006**, 4, 1343.

- (7) Alves, V. L.; Drumond, M. G.; Stefani, G. M.; Cheng, C.-L.; Piló-Veloso, D. *Journal Brazilian Chemical Society* **2000**, *11*, 467.
- (8) Brown, R. C. D.; Swain, N. A. *Synthesis* **2004**, *6*, 811.

## **Capítulo 4**

### **Resultados y discusión**

---

## **4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **4.1. EXTRACCIÓN, FRACCIONAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE LIGNINA A PARTIR DE LICOR NEGRO (LN) DE DISTINTOS ORÍGENES**

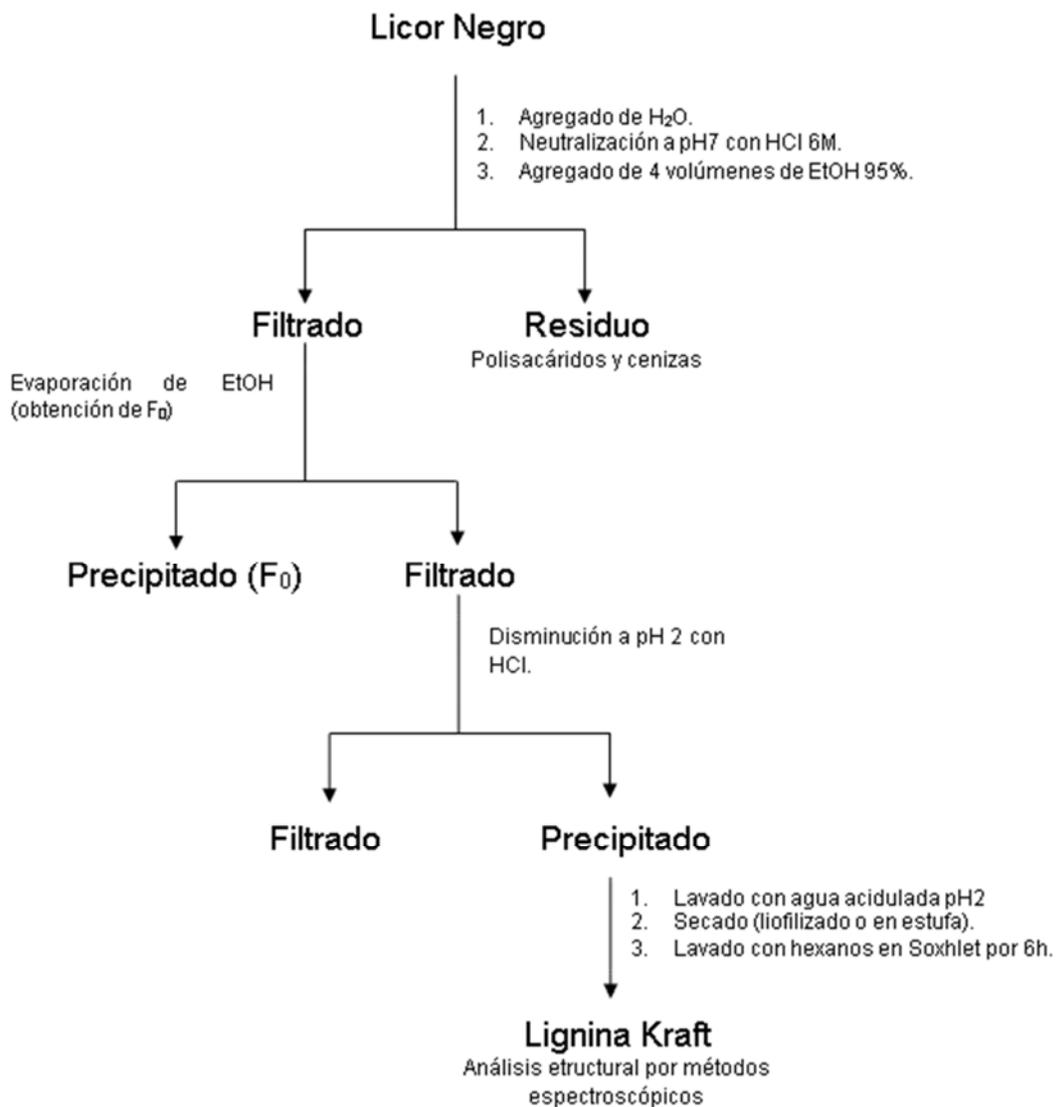
Como se describiera en el capítulo de antecedentes, las metodologías más ensayadas para la extracción de lignina sin modificaciones a partir de distintos licores negros (LNs) han sido la precipitación mediante agregado de ácidos minerales y la ultrafiltración.<sup>1-4</sup> Se han descrito algunos análisis comparativos de la rentabilidad de ambas metodologías, verificando que la precipitación continúa siendo el proceso más eficiente hasta el momento.<sup>5-7</sup>

La precipitación de la lignina puede realizarse mediante el agregado de ácidos minerales como H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> y HCl.<sup>8-10</sup> Asimismo, se ha estudiado la extracción de la misma a distintos pH de modo de lograr una mayor pureza de las fracciones aisladas, lo que es de gran importancia para un posterior análisis estructural y aprovechamiento como material de partida de otros productos de interés.<sup>11</sup> Es por ello que en este apartado nos enfocaremos en los procedimientos desarrollados durante el trabajo de tesis para la extracción de lignina Kraft de distintos orígenes.

#### **4.1.1. Precipitación de lignina mediante disminución de pH a 2**

El LN es el residuo resultante del procesado de la madera para obtener pulpa de celulosa, y la composición del mismo depende del origen del cual provenga y de las condiciones de cultivo de la misma. En este trabajo se utilizaron LNs provenientes de las tres empresas de procesado de pulpa de celulosa presentes en nuestro país, ellas son: Fanapel, Pamer y UPM (ex Botnia SA). Desde Fanapel se suministró LN concentrado con un contenido de agua de aproximadamente 40% en masa. Por su parte, tanto Pamer como UPM suministraron LN diluido, con un contenido de agua de aproximadamente 80%. Todas las muestras fueron suministradas entre los años 2008 y 2009.

La metodología que se utilizó para la extracción de lignina está basada en la descrita por Sun y colaboradores, donde se precipita la misma mediante la disminución del pH utilizando HCl 6M (Figura 1).<sup>11</sup>



**Esquema 1:** Extracción de lignina a partir de LN.

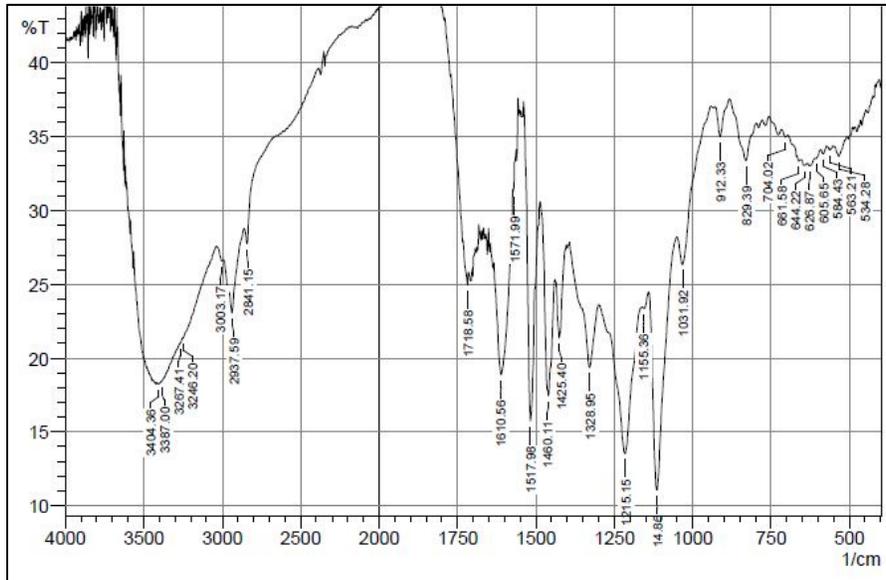
El lavado con hexanos en Soxhlet de las ligninas obtenidas tiene el fin de eliminar posibles componentes apolares como fitoesteres y ceras. Los porcentajes de recuperación de lignina a partir de los distintos LNs se resumen en la tabla 1.

Procedencia del LN	pH de LN	Masa antes de Soxhlet(g)	Masa después de Soxhlet(g)	Porcentaje de recuperación en base a masa seca	Coloración
Fanapel (40% en agua)	~13	6,51	5,91	12%	Marrón oscuro
Pamer (80% en agua)	~11	2,17	1,94	6,5%	Marrón claro
UPM (80 % en agua)	~13	7,77	6,66	22%	Marrón oscuro

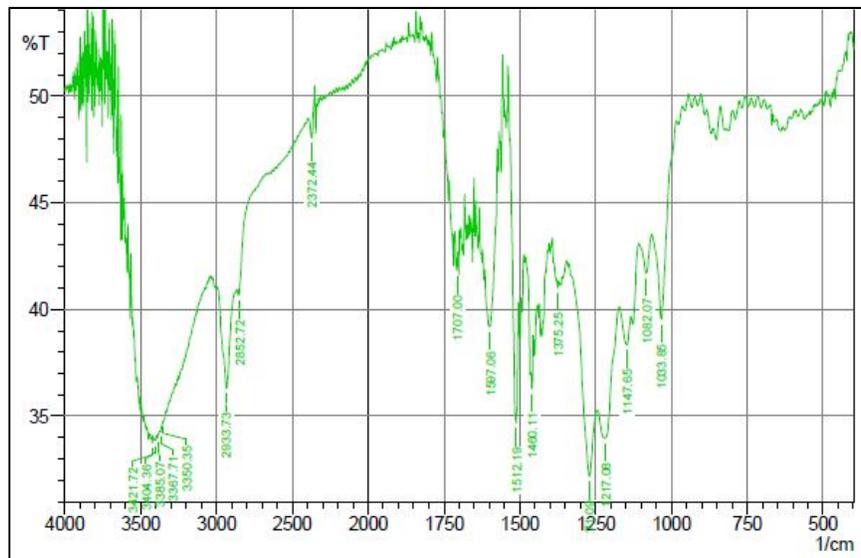
**Tabla 1:** Extracción de lignina a partir de LN de distintos orígenes.

Los resultados muestran que las cantidades de lignina extraíble varían entre los distintos LNs. Si comparamos los porcentajes de los LNs de UPM y Fanapel con los de Pamer, se puede observar una diferencia importante en la cantidad de lignina Kraft recuperada. Este resultado puede deberse a varios factores, entre los cuales podemos enumerar como más importantes, las condiciones del procesos de deslignificación y las materias primas utilizadas por cada empresa. Mientras que Pamer se especializa en productos reciclados como cartón corrugado (alto contenido de lignina residual), UPM y Fanapel se centran en obtener pulpa de celulosa con alto grado de blanqueo para la fabricación de papel de alta calidad (bajo contenido de lignina residual).<sup>12-14</sup> Los procesos de deslignificación separan la mayor cantidad de lignina presente, pero un porcentaje menor queda unida a la celulosa siendo necesario un posterior blanqueo de la pulpa en caso de que se busque un papel de buena calidad. Asimismo, la materia prima necesaria en cada caso varía, ya que para la producción de cartón corrugado se mezclan chips de madera con papel reciclado, mientras que para papel de alta calidad se utilizan únicamente chips de maderas seleccionadas. Estas variables hacen que el LN proveniente de UPM y Fanapel cuente con un porcentaje de lignina diferente al obtenido a partir del LN proveniente de Pamer.

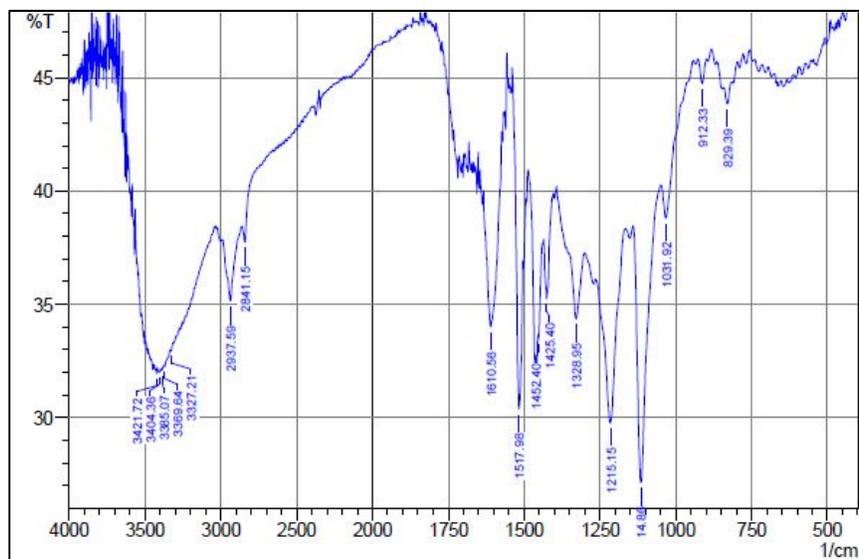
Las distintas ligninas aisladas fueron identificadas mediante espectroscopía de IR, observando un perfil de bandas característico de la misma, según lo descrito en bibliografía (Figura 1a, 1b y 1c).<sup>15,16</sup>



**Figura 1a:** IR de lignina Kraft aislada de LN de Fanapel.



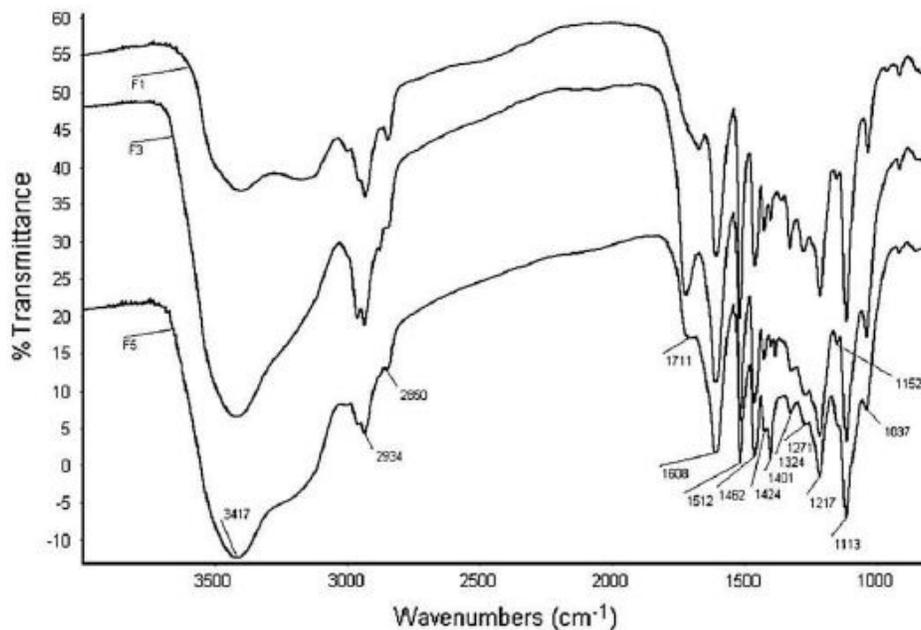
**Figura 1b:** IR de lignina Kraft aislada de LN de Pamer.



**Figura 1c:** IR de lignina Kraft aislada de LN de UPM.

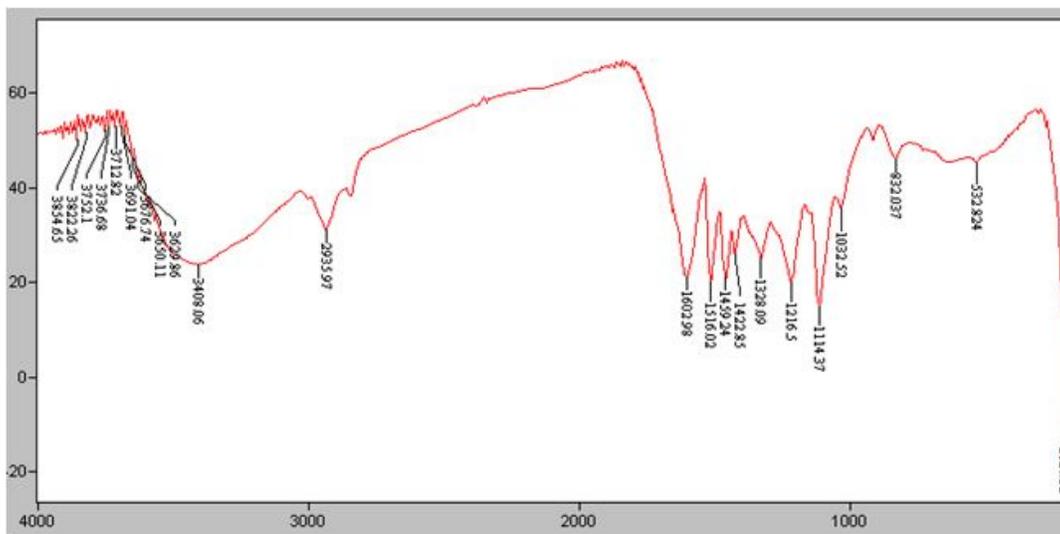
Como puede observarse en cada uno de los espectros obtenidos, existen bandas características, correspondientes a los grupos funcionales presentes más abundantes en las ligninas. En todos los casos se observa la banda intensa en el entorno de  $3400\text{ cm}^{-1}$ , correspondiente a los grupos OH (fundamentalmente fenoles). Por debajo de  $1800\text{ cm}^{-1}$  pueden observarse bandas correspondientes a grupos carbonilos (entre  $1800$  y  $1600\text{ cm}^{-1}$ ), en el entorno de  $1600$  y  $1500\text{ cm}^{-1}$  las características a las vibraciones del anillo aromático, y en el entorno de los  $2930\text{ cm}^{-1}$  las bandas características del estiramiento C-H de  $-\text{OCH}_3$ .

Estos tres espectros de IR permiten de esta forma, lograr una identificación primaria de la lignina extraída, comparando los espectros obtenidos con los de literatura (Figura 2), y observando que en los tres casos el perfil de bandas entre cada uno de los espectros es similar, aunque existen pequeñas diferencias.



**Figura 2:** Espectroscopía de IR de distintas fracciones de lignina extraída a partir de *E. pellita*.<sup>3</sup>

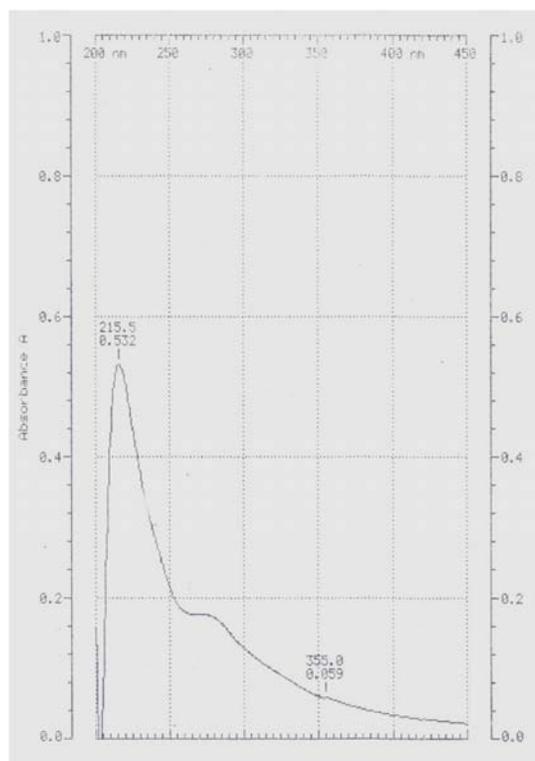
Por otro lado, durante la neutralización de LN proveniente de Fanapel (ver esquema 1), se observó la formación de un precipitado ( $F_0$ ) que fue separado y analizado por espectroscopía de IR, confirmando que se trataba de lignina (Figura 3). Esta observación hace pensar que parte de la lignina contenida en los distintos LNs está formada por fracciones de alto pKa, lo que provoca una precipitación a pH cercanos a 7.



**Figura 3:** IR de fracción precipitada a pH=7 durante neutralización de LN.

Como se puede observar en el espectro, el perfil de bandas obtenido para  $F_0$  es prácticamente el mismo que el obtenido para las distintas ligninas Kraft extraídas.

Para completar la identificación de esta fracción, se realizó el espectro de UV obteniendo las bandas características de absorción aguda a 215, y otra a 275 nm, ambas correspondientes a transiciones del anillo aromático (Figura 4).



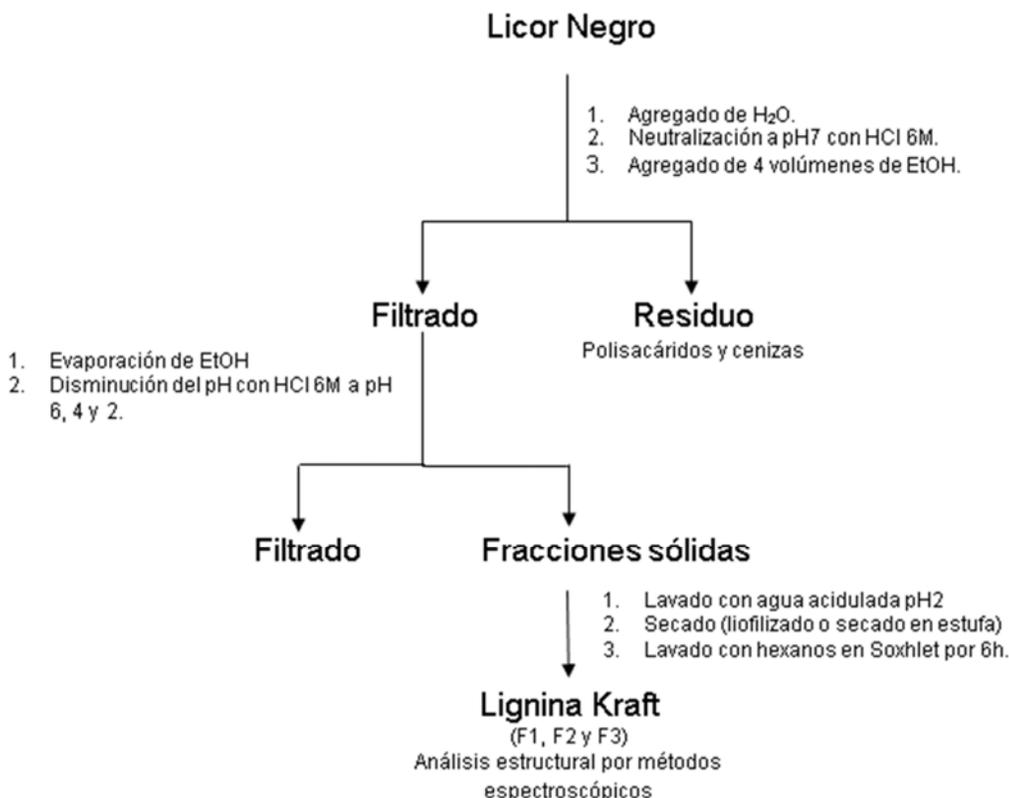
**Figura 4:** Espectro de UV de la fracción  $F_0$  obtenida por disminución del pH del LN a 7.

En el espectro puede observarse un efecto batocrómico de la banda aguda, que aparece a 215 nm en lugar de 210 nm como se describe en literatura.<sup>17</sup> Esto puede deberse a la presencia de grupos aceptores de electrones sobre el anillo aromático como aldehídos y cetonas, lo que puede coincidir con el hecho de que se trate de fracciones pequeñas resultado de oxidaciones durante el proceso Kraft.

Esta determinación completa la identificación de la fracción  $F_0$ , demostrando que la misma se trata de lignina Kraft, seguramente con un pKa mayor a otras fracciones que precipitan a pH menores.

#### **4.1.2. Fraccionamiento de lignina a partir de LN, mediante disminución gradual del pH**

En el marco de los objetivos de esta tesis, y en busca de un análisis más profundo de la lignina Kraft extraída, se elaboró un procedimiento para precipitar la lignina de forma fraccionada, basándonos en lo descrito en literatura sobre el fraccionamiento a distintos pH y la relación de éste con la presencia de las distintas unidades (G: guaiacilo, S: siringilo y H: *p*-hidroxifenilo) y grupos funcionales presentes.<sup>3,4,8,18</sup> Para ello se utilizó una metodología basada en el proceso de extracción indicado en el esquema 1, pero con la variante de agregar HCl de forma gradual y obtener ligninas precipitadas a pH 6, 4 y 2 respectivamente (Esquema 2).



**Esquema 2:** Extracción de lignina a partir de LN, mediante disminución gradual del pH.

Para este estudio se utilizó lignina Kraft obtenida a partir de LN de Fanapel. Los resultados obtenidos se resumen en la tabla 2.

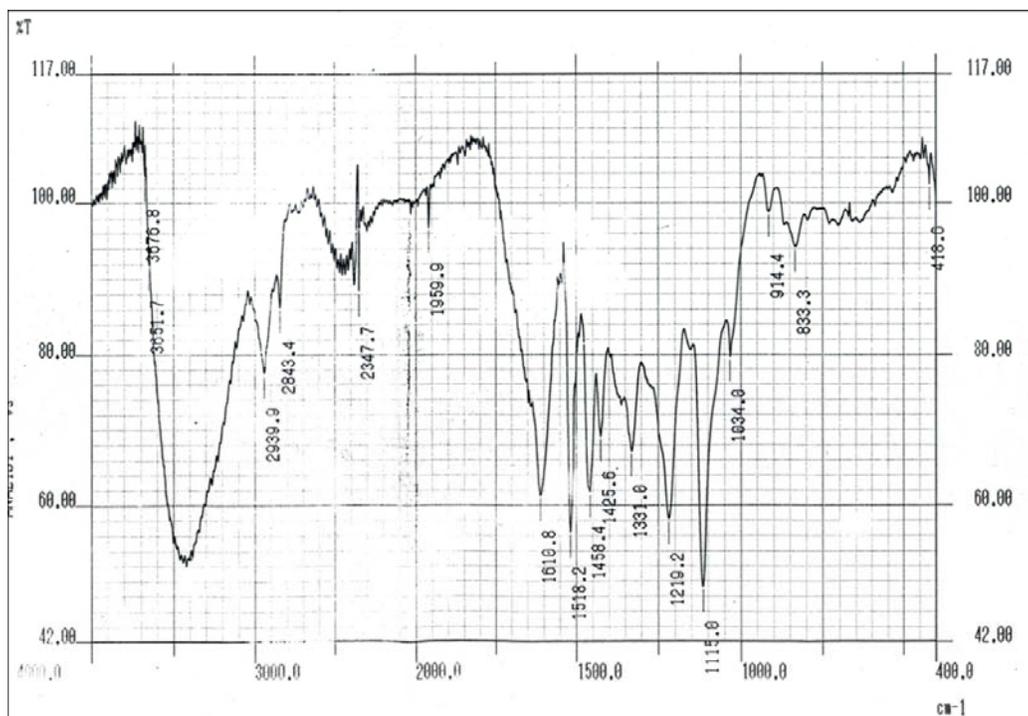
	Masa de LN: 50 (g)		
Masa (g)*	Fracción 1 (lignina precipitada a pH 6)	Fracción 2 (lignina precipitada a pH 4)	Fracción 3 (Lignina precipitada a pH2)
	1,242	0,159	0,355

\*Porcentaje de lignina extraída a partir de LN 12% (ver tabla 2).

**Tabla 2:** Masa de fracciones precipitadas a distintos pH.

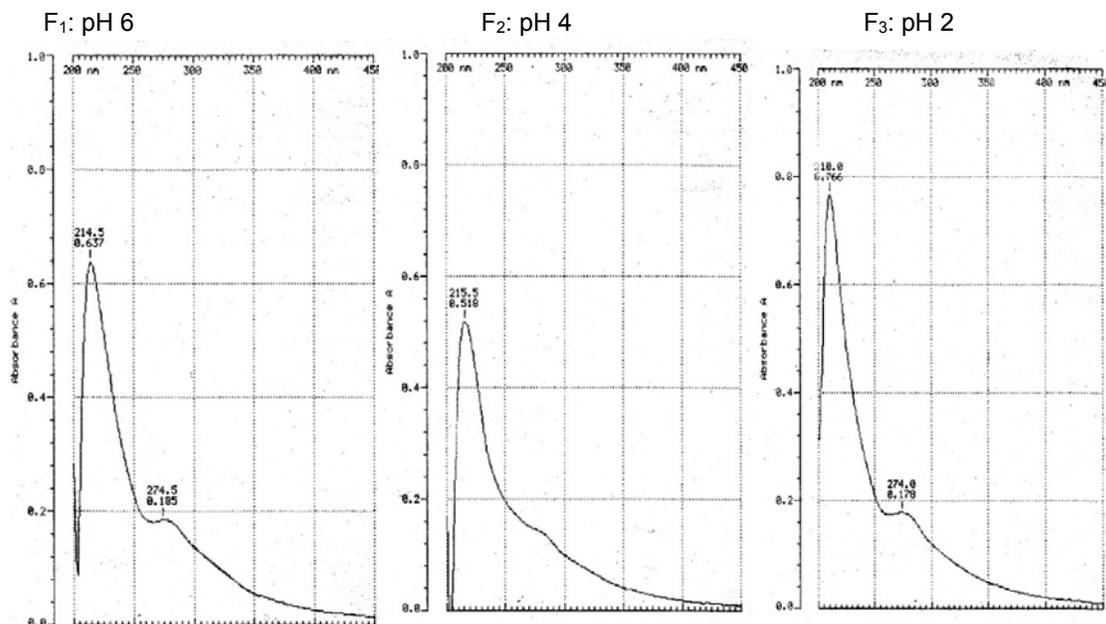
Como se puede observar gran parte de la lignina fue precipitada a pH 6, lo que hace pensar que la mayoría de los grupos protonados son ácidos débiles, pertenecientes a fracciones de altos pKa, lo que es acorde a una prevalencia de grupos fenólicos. A pH 4 y 2 la precipitación fue baja, recuperando menos de la mitad de lignina precipitada a pH 6. Estos valores de recuperación indican que existe una baja presencia de grupos funcionales de mayor acidez, como por ejemplo ácidos carboxílicos. Estos grupos suelen ser cadenas laterales oxidadas que disminuyen el pKa de los fragmentos aislados. Es de destacar que el alto valor de recuperación a pH 6 también está de acuerdo con la obtención de la fracción F<sub>0</sub> cuando se disminuye el pH a 7.

Las hipótesis anteriores fueron confirmadas mediante espectroscopía IR de las distintas fracciones aisladas. En la figura 5a se puede ver una banda en el entorno de los  $3400\text{ cm}^{-1}$ , correspondiente al estiramiento O-H, de mayor intensidad que la banda observada a  $1610\text{ cm}^{-1}$  correspondiente a grupos C=O. Si observamos en cambio la figura 5c, vemos que las intensidades se invierten y la banda correspondiente a grupos carbonilo es mayor que la correspondiente a grupos fenólicos, por lo que la fracción precipitada a pH 2 cuenta con una mayor proporción de los primeros. Por su parte, la figura 5b muestra que para la fracción precipitada a pH 4 la proporción entre fenoles y grupos carbonilo es intermedia entre las fracciones 1 y 3.



**Figura 5a:** IR de lignina precipitada a pH 6





**Figura 6:** Espectros de UV de las fracciones obtenidas mediante disminución de pH del LN a 6, 4 y 2 respectivamente.

En los espectros pueden observarse las bandas características de lignina en el entorno de 215 y 275 nm. Por su parte, la fracción 3 tiene una mayor absorbancia a 210 nm que las otras dos fracciones, lo que indica una mayor concentración de anillos aromáticos que las fracciones 1 y 2, ya que las medidas fueron realizadas todas a la misma concentración. Asimismo, se observa un efecto batocrómico en la banda a 215 nm de las fracciones 1 y 2, lo que puede deberse a la presencia de grupos funcionales aceptores de electrones, al igual que en el caso de  $F_0$ . Esto es coincidente, ya que las fracciones con este efecto son las precipitadas a pH 6 y 4, mientras que en la precipitada a pH 2 no se observa dicho efecto.

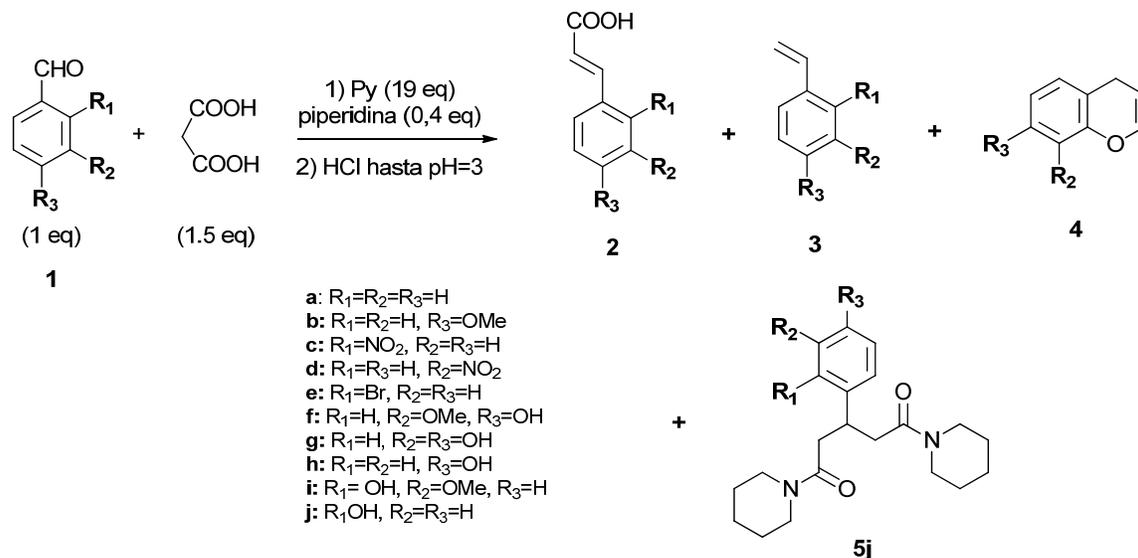
La disminución gradual del pH permitió discriminar fracciones con distinta composición de grupos funcionales. A pesar de esta discriminación, las cantidades precipitadas a pH bajos fue bastante menor que la precipitada a pH 6. Esto último hace pensar que el fraccionamiento de esta lignina Kraft utilizando este procedimiento no sería el más eficiente para el análisis de la misma, llevando esto a la búsqueda de otras metodologías. Sin embargo, ésta puede ser una forma eficaz de purificar las fracciones más ricas en grupos fenólicos, de modo de lograr fracciones de ciertas características, lo que es importante para el aprovechamiento de la misma como material de partida de otros compuestos poliméricos.<sup>19-23</sup>

#### **4.2. SÍNTESIS DE DERIVADOS FENILPROPANOIDES**

Las estructuras del tipo fenilpropanoide no sólo son de importancia para la síntesis de modelos de lignina, sino que además cuentan con una variedad de propiedades, y pueden ser bloques de construcción para otro tipo de moléculas de interés sintético.<sup>24-26</sup> Esta es la razón por la cual nuestro trabajo se centró en la síntesis de las mismas mediante una estrategia sencilla y eficiente, buscando generar derivados ácidos y ésteres  $\alpha,\beta$ -insaturados.

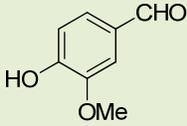
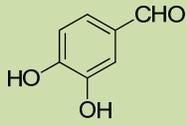
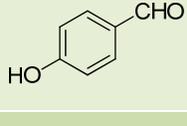
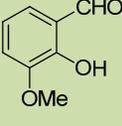
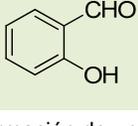
Para la síntesis de estos compuestos se ensayaron las condiciones de reacción de Knoevenagel-Doebner, con el agregado de piperidina como organocatalizador.<sup>27,28</sup> Se utilizaron una variedad de derivados de benzaldehído con distinto patrón de sustitución obteniendo en la mayoría de los casos el ácido carboxílico como producto principal. Sin

embargo, con aldehídos sustituidos con grupos hidroxilo en las posiciones 2 o 4 del anillo aromático, se obtuvieron mayoritariamente los estirenos o la cumarina correspondientes, y en uno de los casos la formación de un nuevo compuesto (Esquema 3). Los resultados obtenidos con cada uno de los derivados de benzaldehído utilizados se resumen en la tabla 3.



**Esquema 3:** Reacción de Knoevenagel-Doebner para la obtención de derivados de ácido cinámico.

Entrada	Benzaldehído	tiempo de reacción (h)	Ácido (%)	Estireno (%)	Cumarina (%)
a		2.5	54	---	---
b		3	59	---	---
c		2.5	66	---	---
d		2.5	78	---	---
e		1	79	---	---

f		2	0	80	---
g		2	0	60	---
h		2	0	60	---
i		5	0.6	1.2	20
j		5	0	trazas	15 (19% producto 5j)*

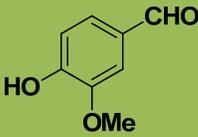
\*se observa la formación de un nuevo producto (5j) aislado con un 19% de recuperación. Los porcentajes son de producto aislado.

**Tabla 3:** Resultados obtenidos en las condiciones clásicas de Knoevenagel-Doebner con los derivados de benzaldehído ensayados.

En la mayoría de los casos se obtuvo el ácido o estireno correspondientes con rendimientos de moderados a buenos. Los rendimientos moderados son debidos a una recuperación de reactivo y/o pérdidas durante la recuperación, el aislamiento y la purificación (de aquí en adelante work up) del producto, ya que el agregado de 19 eq. de piridina hizo dificultoso este procedimiento.

La reacción de Knoevenagel-Doebner se ha utilizado tradicionalmente para la preparación de ácidos carboxílicos  $\alpha,\beta$ -insaturados mediante la condensación de distintos derivados de benzaldehído con ácido malónico. Sin embargo, existen datos en la literatura que verifican la formación de estirenos a partir de ciertos benzaldehídos, a través de una doble descarboxilación.<sup>29</sup> Simpson y colaboradores describieron la formación de vinilfenoles a partir de benzaldehídos con sustituyentes hidroxilo en posición *meta* y/o *para* como resultado del work up de la reacción, y no durante la misma. También observaron que el agregado de ácido para cortar el avance de reacción favorecía la formación del estireno. En cambio, los resultados obtenidos en este trabajo de tesis son diferentes, observando la formación de los mismos durante el transcurso de la reacción.

Con el fin de estudiar la influencia de las condiciones de reacción sobre el mecanismo de la misma, se variaron las cantidades de piperidina, piridina y el disolvente, utilizando vainillina como reactivo de partida (Tabla 4).

Aldehído	Entrada	eq. de piridina	eq. de piperidina	Disolvente	Producto/s*
 1f	1	1.1	0	THF	2f (ND, reactivo sin reaccionar)
	2	1.1	0.2	THF	2f (ND, reactivo sin reaccionar)
	3	1.1	0.3	THF	2f (60%)
	4	19	0.4	Piridina	3f (80%)
	5	1.1	0.4	THF	2f (80%)
	6	1.1	0.4	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	2f (35%)
	7	1.1	0.4	H <sub>2</sub> O	2f (17%) + 3f (8%)
	8	1.1	0.8	THF	2f (81%) + 3f (trazas)

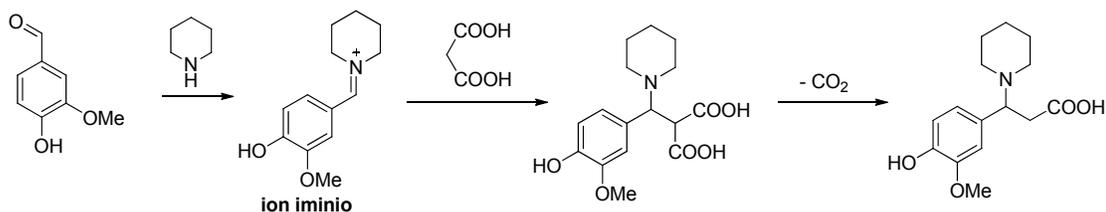
\*ND= No determinado

**Tabla 4:** Reacción de Knoevenagel con vainillina, variando los equivalentes de piridina y piperidina, y el disolvente.

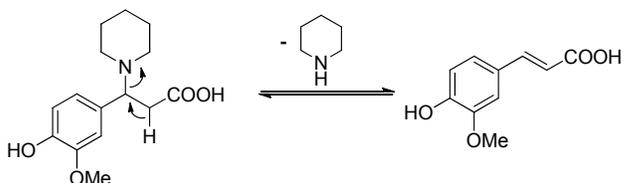
Los resultados obtenidos muestran la influencia de la piridina, ya que un exceso de la misma (19 eq.) favorece la formación del vinilfenol correspondiente. Los equivalentes de piperidina utilizados variaron desde 0 a 0.8 eq., observando que con el agregado de 0.4 eq. se alcanzó el rendimiento máximo de la reacción para la formación del ácido. Cuando el número de equivalentes de piperidina se aumentó al doble, y se utilizaron 1.1 eq de piridina, se obtuvieron trazas de estireno (entrada 8, tabla 4).

Basados en los mecanismos propuestos hasta el momento para la formación de vinilfenoles,<sup>28,29</sup> planteamos un mecanismo por el cual se podría dar la formación de los mismos, sin la obtención previa del ácido correspondiente (Esquema 4).

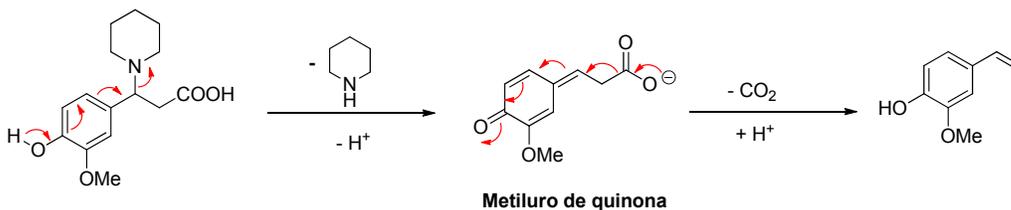
### Reacción de Koenigsel-Doebner organocatalizada por piperidina



#### Ruta 1

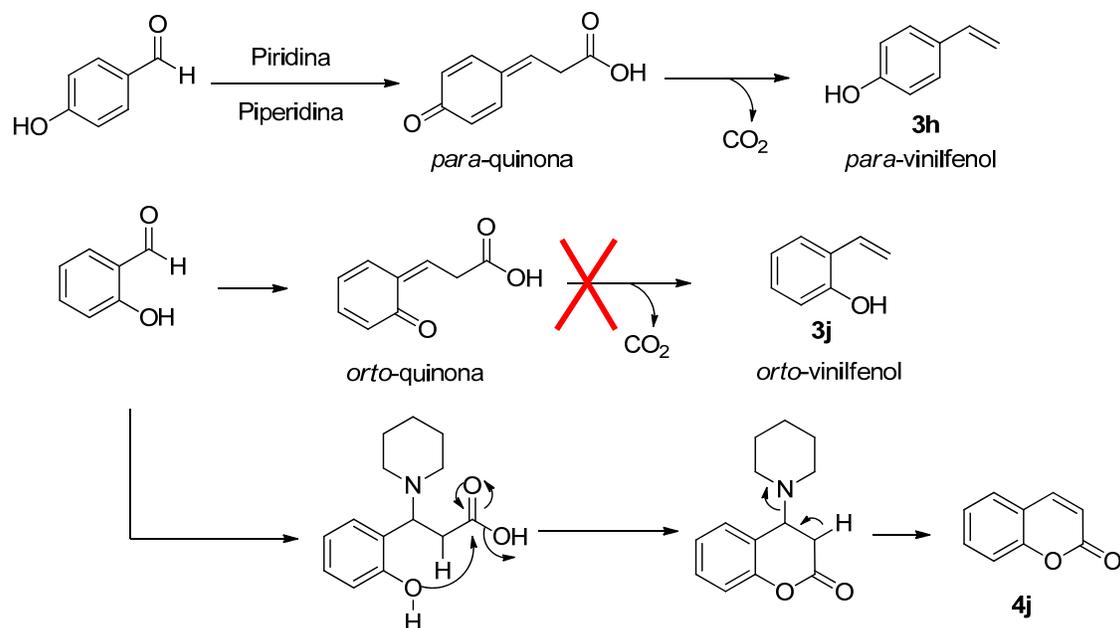


#### Ruta 2



### Esquema 4: Mecanismo propuesto para la formación de ácidos $\alpha,\beta$ -insaturados y vinilfenoles, mediante la reacción de Knoevenagel-Doebner.

La formación de un intermedio metiluro de quinona se ve favorecida por benzaldehídos sustituidos en posición *orto* y/o *para* del anillo aromático. Esto se debe a una estabilidad mayor de estos intermedios, lo que hace que pueda darse otros mecanismos que llevan a la formación de vinilfenoles y/o cumarinas (Esquema 5).

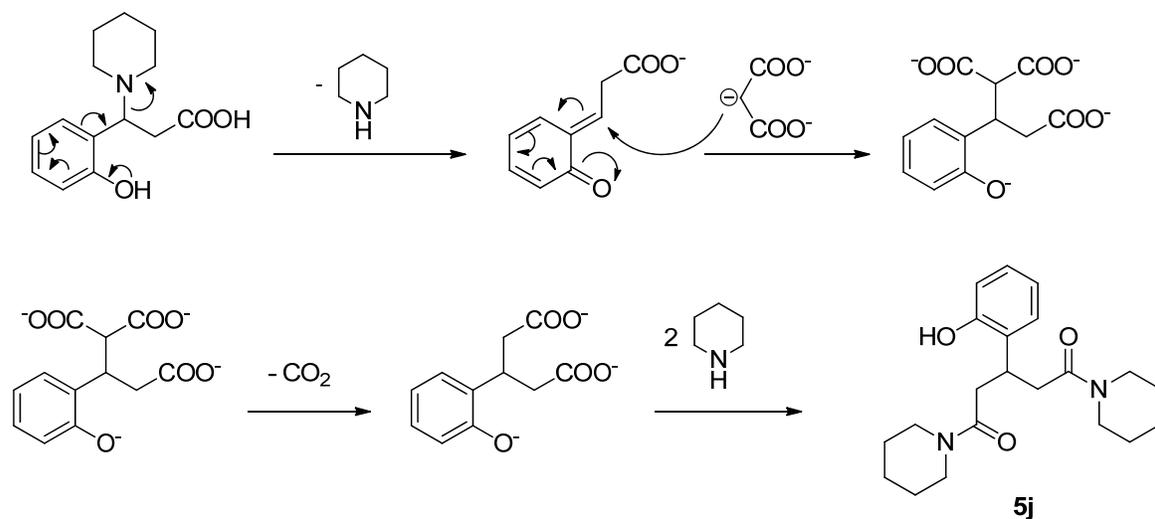


**Esquema 5:** Formación de metiluros de quinona, responsables de la formación de vinilfenoles y cumarinas.

Esta es la razón por la cual la formación de los vinilfenoles sólo se observa cuando se tienen sustituyentes hidroxilo en las posiciones 2- y 4- del anillo aromático. Sin embargo, existe una diferencia entre los resultados obtenidos de los 4-vinilfenoles con los 2-vinilfenoles. Mientras que los 4-vinilfenoles se obtienen en buenos rendimientos, los 2-vinilfenoles no superan el 20%, observándose la formación de la cumarina correspondiente.

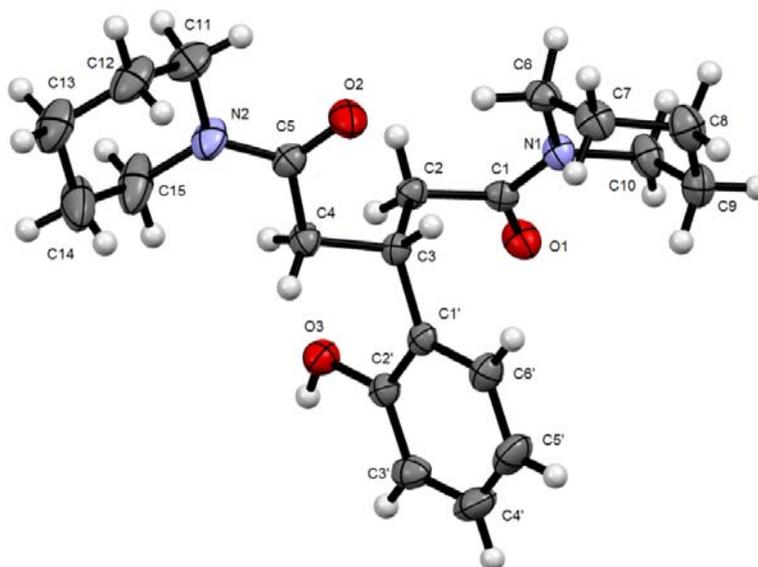
Estos intermedios metiluro de quinona, son comúnmente empleados en la naturaleza, en los mecanismos de acción de diferentes compuestos bioactivos.<sup>30,31</sup> Una evaluación sobre la estabilidad de los mismos, demuestra que los intermedios metiluro de *orto*-quinona son menos estables que los correspondientes isómeros *para*-, por lo que la formación de éste último se ve favorecida, beneficiando de esta forma una segunda descarboxilación que da lugar al vinilfenol correspondiente.<sup>30,31</sup>

La formación de un nuevo producto fue observado cuando el reactivo utilizado fue el 2-hidroxibenzaldehído (entrada 10 de tabla 3). En este caso, a pesar de formarse algo de la cumarina correspondiente, el producto mayoritario corresponde a la formación de una diamida. Basados nuevamente en las estabilidades de los metiluros quinónicos (metiluro de *orto*-quinona), propusimos un mecanismo por el cual se forma el compuesto **5j**, que involucra el ataque del ácido malónico sobre el intermedio metiluro para luego de una descarboxilación, ser atacado por dos moléculas de piperidina, y así formar las amidas correspondientes (Esquema 6).



**Esquema 6:** Mecanismo propuesto para la formación del producto **5j**.

El nuevo compuesto fue elucidado por RMN y se confirmó su estructura por medio de difracción de RX (Figura 7).



**Figura 7:** Estructura de RX del compuesto **5j**.

En la estructura obtenida se puede observar claramente la presencia de los dos grupos amida, formados por las piperidinas. Los resultados obtenidos sobre la formación de este nuevo compuesto, serán publicados en una revista científica del área. Actualmente el manuscrito se encuentra en preparación.

Por otro lado, para evaluar el avance de la reacción, se ensayaron distintos disolventes orgánicos. Cuando el disolvente fue  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , el único producto formado fue el ácido carboxílico, pero el avance de la reacción fue pobre, recuperando gran parte del material de partida. Este bajo rendimiento puede deberse a la necesidad de utilizar una temperatura más

---

alta a la de ebullición del  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , para alcanzar la energía de activación de formación de productos. En cambio, cuando el disolvente fue THF el porcentaje de recuperación del ácido es máximo, no observándose formación del estireno. Por último, utilizando  $\text{H}_2\text{O}$  como disolvente, se obtuvo un nuevo producto **6f**, que fue aislado e identificado como un dímero del estireno. En la figura 8 se muestra el espectro de  $^1\text{H}$ -RMN correspondiente a **6f**.

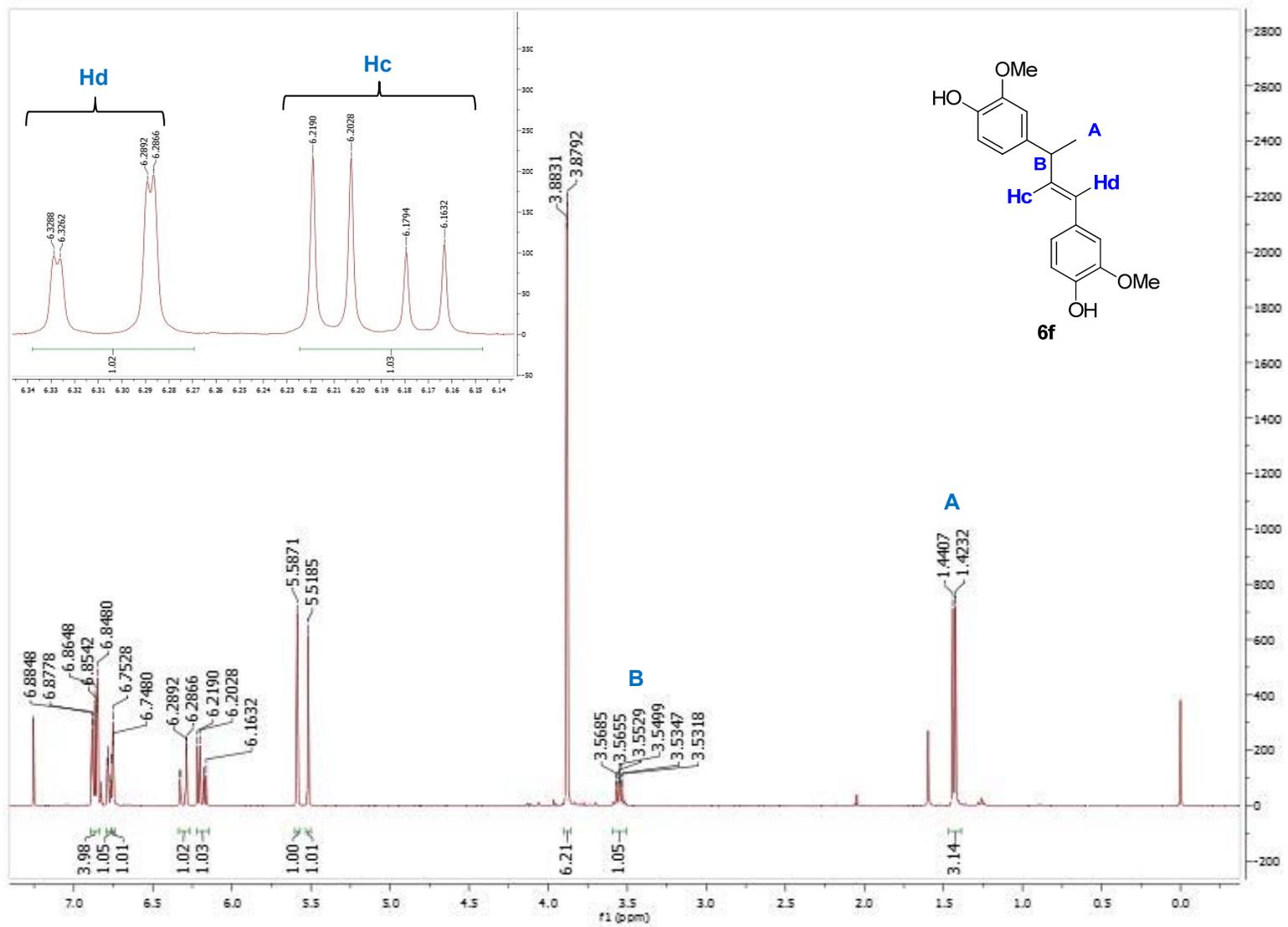
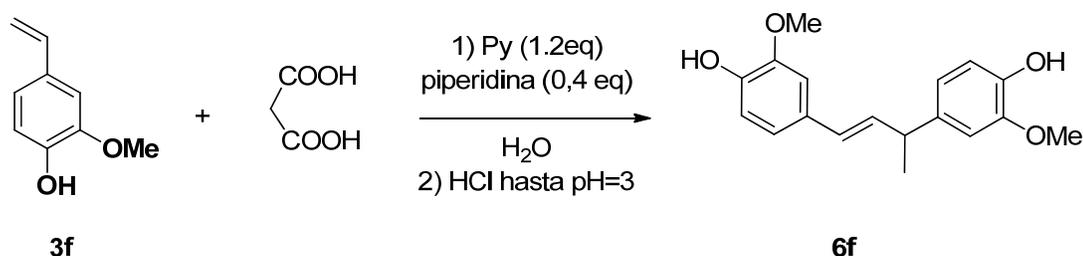


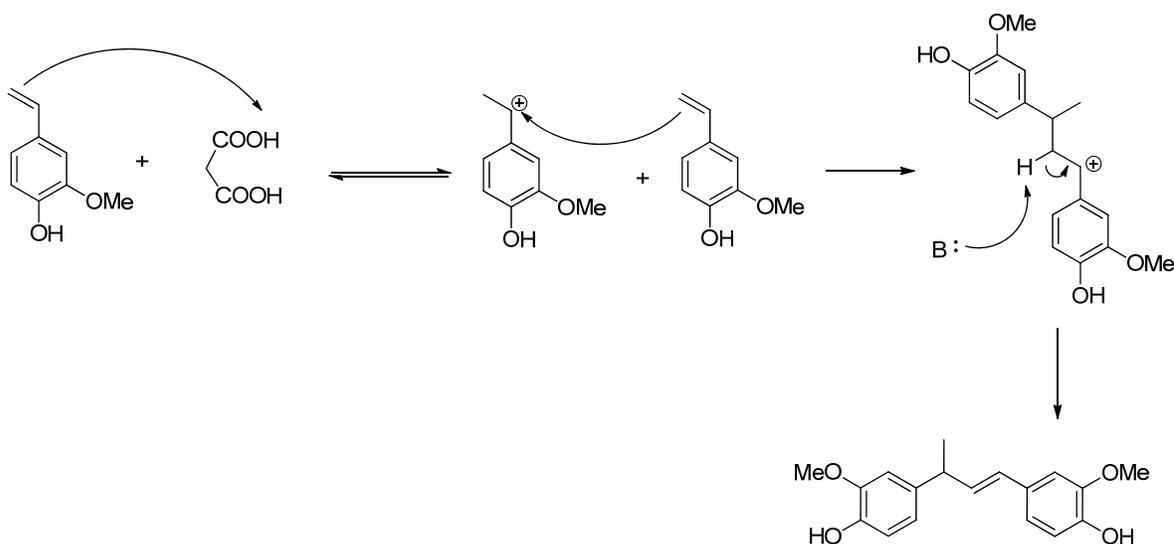
Figura 8: Espectro de <sup>1</sup>H-RMN del compuesto **6f**.

La estructura de este compuesto sugiere que el mismo puede formarse a partir de una dimerización de 2-metoxi-4-vinilfenol (**3f**). Algunos autores describen la dimerización de estirenos en distintas condiciones.<sup>32-34</sup> Para confirmar una reacción de dimerización, se ensayaron las mismas condiciones de reacción que las de la entrada 7 (tabla 4), pero utilizando 2-metoxi-4-vinilfenol como sustrato (Esquema 7).



**Esquema 7:** Formación de compuesto **6f** utilizando 2-metoxi-4-vinilfenol como material de partida.

Luego de 2 h de reflujo, el único producto observado fue el dímero **6f**, mientras que al aumentar el tiempo de reflujo, se observó la formación de productos polares y un consumo del dímero formado. En las condiciones de reacción, el ácido malónico se encuentra en un leve exceso, lo que genera un medio ácido y la posible formación de un carbocatión estable sobre el estireno de partida. La reacción de esta especie con otra molécula de estireno sin protonar puede generar la formación del dímero correspondiente (Esquema 8).

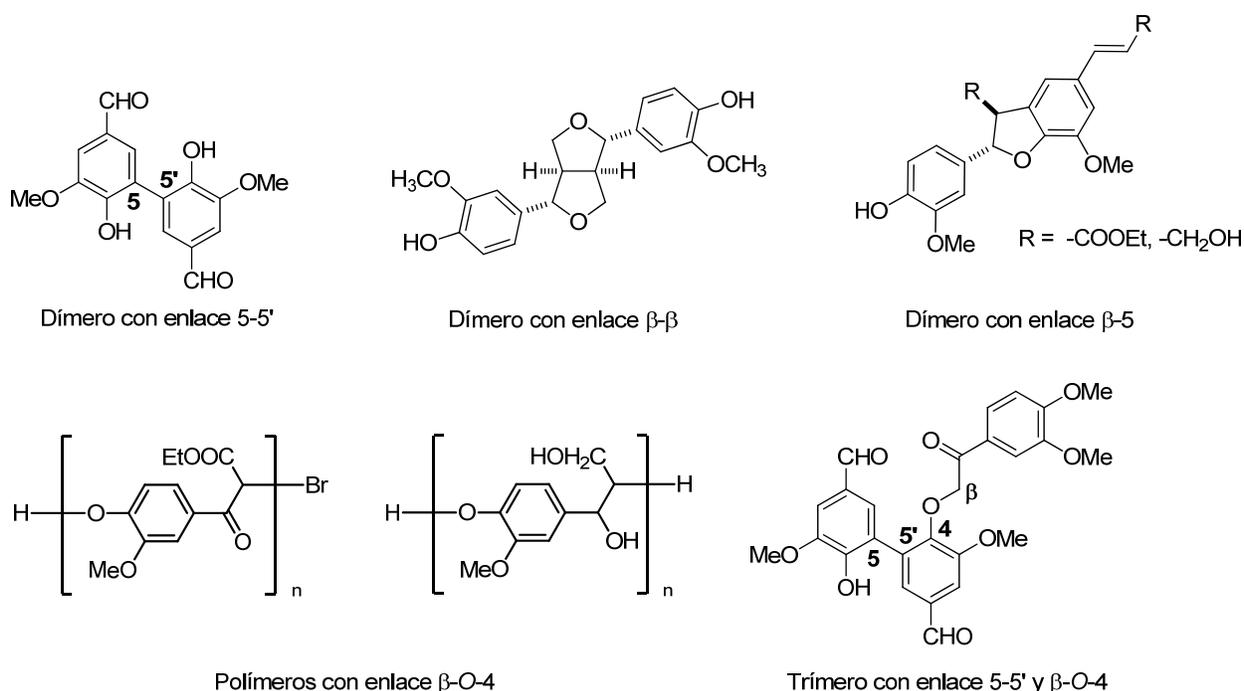


Para corroborar esta hipótesis se ensayaron las mismas condiciones, pero utilizando ácido salicílico (pKa=2.98) en lugar de ácido malónico (pKa=2.85).<sup>35</sup> Nuevamente, el único producto formado fue el dímero **6f**. Este resultado corrobora que existe un efecto del medio ácido sobre la formación del mismo, favorecido por el uso de agua como disolvente de la reacción. Los resultados de esta parte del trabajo se publicaron en una revista especializada en el área.<sup>36</sup>

Los resultados obtenidos durante el estudio de la reacción de Knoevenagel-Doebner son de gran interés, no sólo porque muchos de ellos sirven como material de partida para la síntesis de modelos de lignina, sino que también son interesantes bloques de construcción para otro tipo de moléculas.

### 4.3. SÍNTESIS DE MODELOS DE LIGNINA

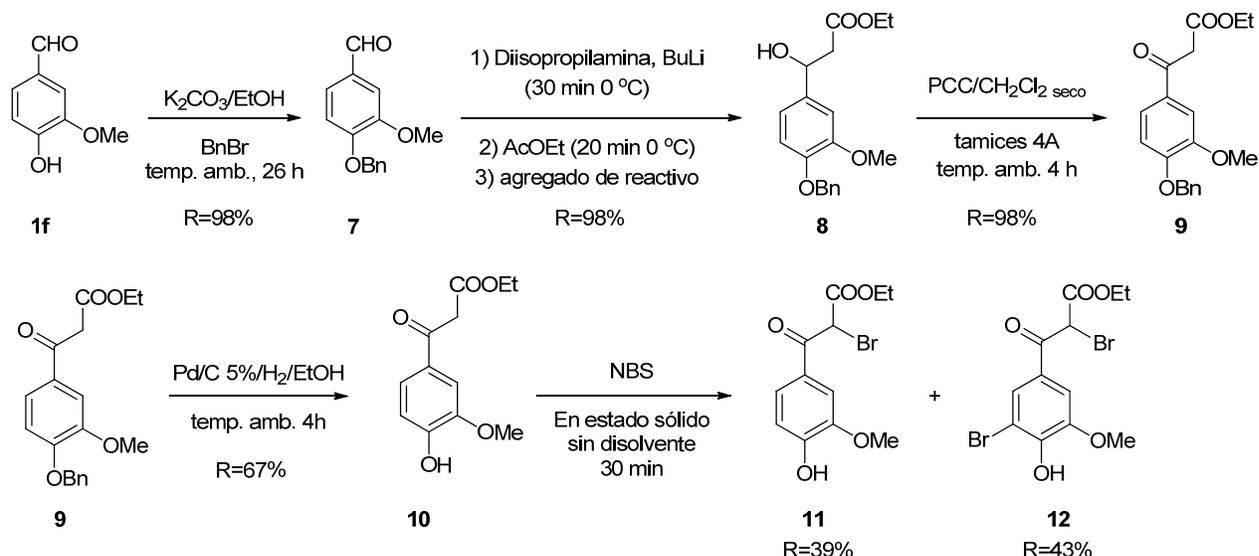
En el marco de los objetivos de esta tesis se planteó la síntesis de modelos de lignina con distintos tipos de enlaces característicos (Figura 9). Se sintetizaron un total de cinco modelos con diferentes tipos de enlaces. Los mismos fueron analizados mediante espectroscopía de RMN con el fin de generar una base de datos que permitan identificar señales características en las mezclas aisladas desde lignina Kraft. Las rutas sintéticas utilizadas se describen a continuación.



**Figura 9:** Modelos de lignina objetivo.

#### 4.3.1. Síntesis de polímero con enlace $\beta$ -O-4

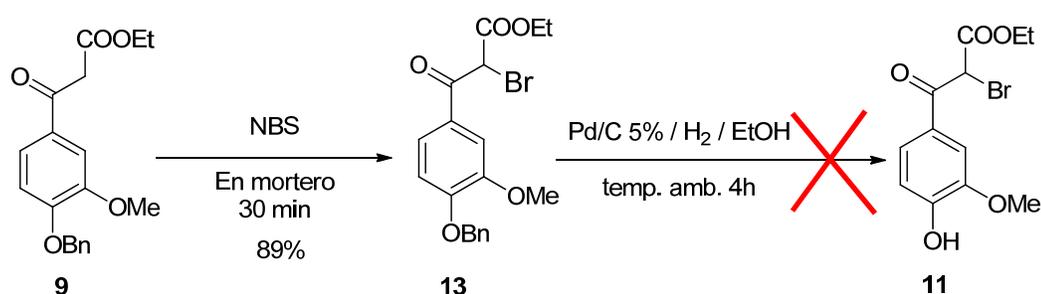
La importancia de contar con un modelo polimérico que contenga el enlace  $\beta$ -O-4 se debe a la abundancia del mismo en la lignina. Como se mencionara en antecedentes, este tipo de enlace es el más abundante dentro de la lignina, pudiendo alcanzar hasta un 60% en maderas duras.<sup>37,38</sup> Para la síntesis del mismo se planteó una secuencia sintética basada en los trabajos descritos por Kishimoto y colaboradores, modificando alguno de los pasos de síntesis y utilizando vainillina como reactivo de partida (Esquema 9).<sup>39-41</sup> La estrategia planteada inicialmente, busca sintetizar el compuesto **11**, monómero del polímero buscado, con un buen rendimiento global.



**Esquema 9:** Ruta sint\u00e9tica para la s\u00edntesis del mon\u00f3mero **11** precursor de los pol\u00edmeros A y B.

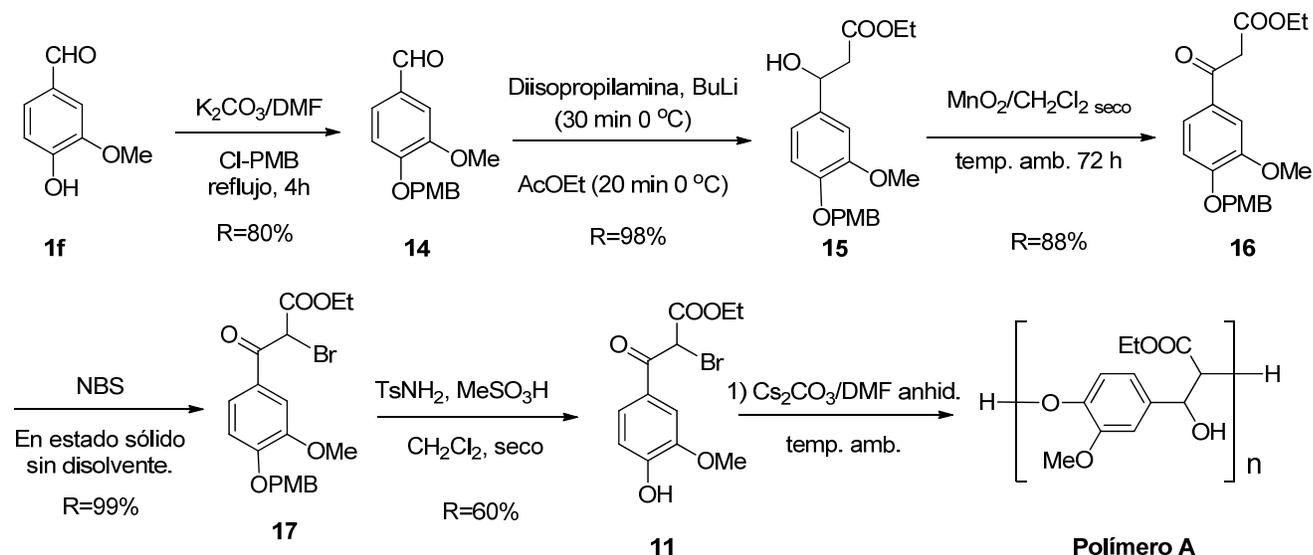
Partiendo de 4-hidroxi-3-metoxibenzaldeh\u00eddo, mediante una protecci\u00f3n y posterior condensaci\u00f3n ald\u00f3ica con acetato de etilo, se obtuvo el compuesto **8**.<sup>42,43</sup> Una vez obtenido \u00e9ste, se oxid\u00f3 con PCC obteniendo el derivado  $\beta$ -ceto\u00e9ster **9**, para luego realizar la desprotecci\u00f3n utilizando las condiciones cl\u00e1sicas para desproteger grupos bencilo (Bn), obteniendo el compuesto **10** con un rendimiento global de 63%. El paso final para la formaci\u00f3n del mon\u00f3mero **11** se realiz\u00f3 mediante una  $\alpha$ -halogenaci\u00f3n. Esta reacci\u00f3n se llev\u00f3 a cabo por medio de un procedimiento que destaca los principios de la “Qu\u00edmica Verde”, utilizando *N*-bromosuccinimida (NBS), en mortero y en ausencia de disolvente.<sup>44</sup> En estas condiciones los productos obtenidos fueron los resultantes de la  $\alpha$ -halogenaci\u00f3n **11** y halogenaci\u00f3n a nivel del anillo arom\u00e1tico **12**, no separables mediante cromatograf\u00eda en columna.

Los resultados obtenidos durante el paso de halogenaci\u00f3n mostraron que al estar el anillo arom\u00e1tico activado por el sustituyente hidroxilo, favoreci\u00f3 la reacci\u00f3n de sustituci\u00f3n electrof\u00edlica arom\u00e1tica. Para evitar este efecto, se opt\u00f3 por invertir los pasos de s\u00edntesis, realizando primero el paso de halogenaci\u00f3n sobre el compuesto **9**, y luego desproteger el producto halogenado (Esquema 10).



**Esquema 10:** Inversi\u00f3n de pasos de s\u00edntesis para la preparaci\u00f3n del mon\u00f3mero **11**.

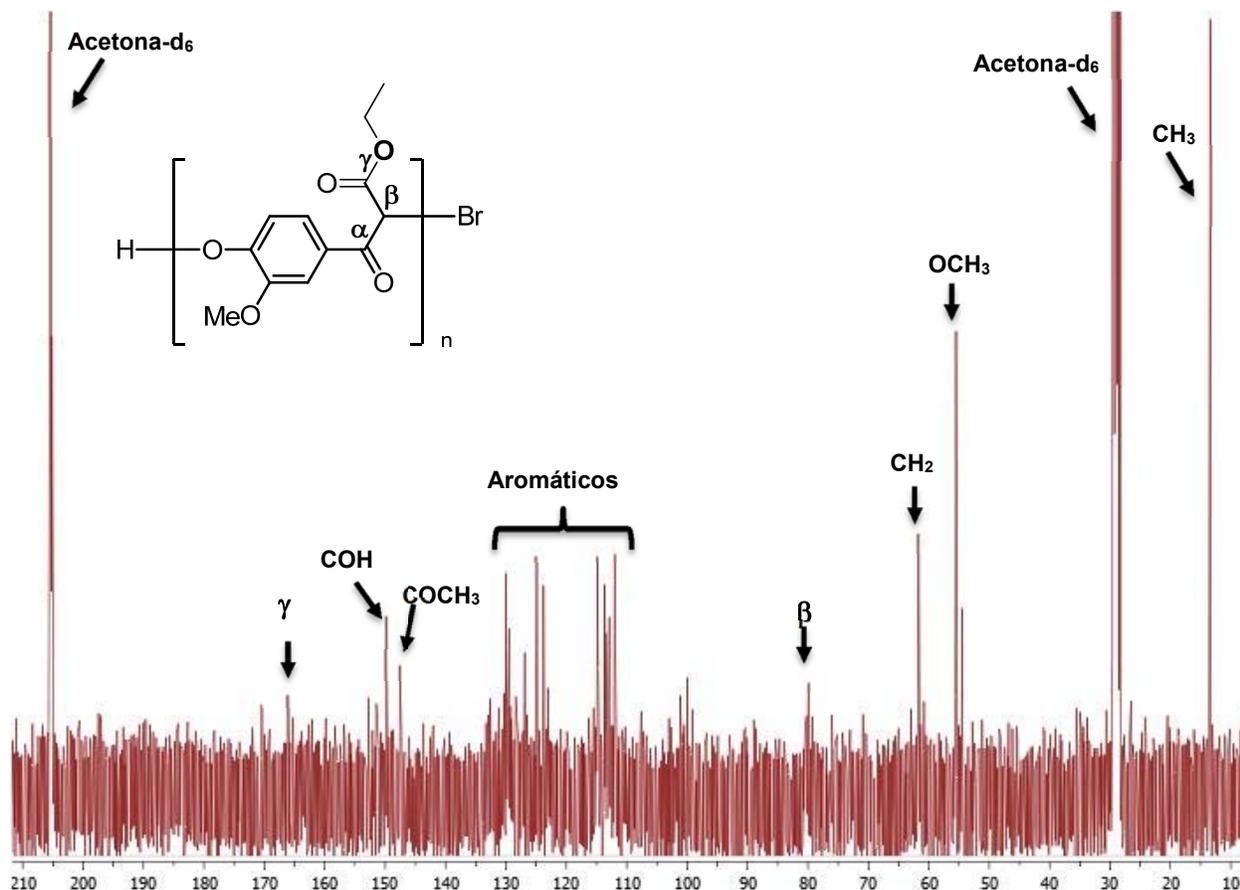
La formación del compuesto **13** se logró con éxito, sin embargo al momento de desproteger el grupo fenol, el producto formado fue **10** (ver esquema 9) y no **11** como se esperaba. Las condiciones de  $H_2$  /Pd-C 5% son indicadas para desprotección de grupos bencilo, sin embargo el sistema  $\beta$ -cetoéster conjugado con el anillo aromático es susceptible de una sustitución del bromo por un hidruro. Es por ello que, debido a que no fue posible obtener el compuesto **11** mediante la ruta sintética planteada inicialmente, se optó por otra estrategia similar que utiliza cloruro de *p*-metoxibencilo (Cl-PMB) en lugar de cloruro de bencilo (BnCl) como grupo protector (Esquema 11).



**Esquema 11:** Síntesis de polímero A utilizando Cl-PMB como grupo protector.

Mediante esta estrategia sintética se logró obtener el monómero **11** con un rendimiento global de 40% luego de cinco pasos de reacción, utilizando dos pasos novedosos para la obtención de los compuestos **17** y **11**. Por un lado el compuesto **17** se obtuvo mediante las mismas condiciones de reacción anteriormente descritas en los esquemas 7 y 8: con NBS y sin disolvente en mortero; mientras que para la preparación del compuesto **11** se ensayaron condiciones no convencionales para la desprotección de PMB, utilizando sulfonamida ( $TsNH_2$ ) y ácido metanosulfónico ( $MeSO_3H$ ).<sup>45</sup>

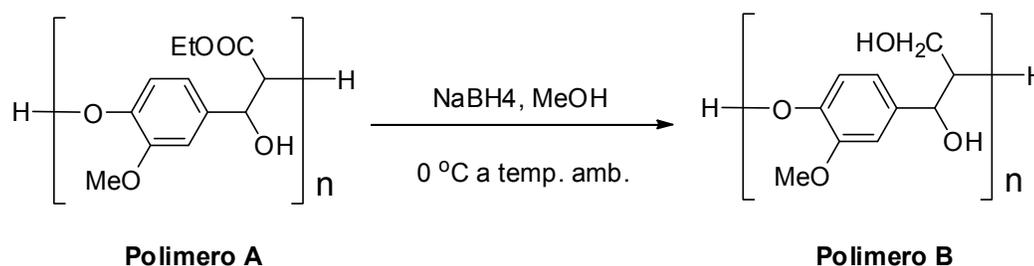
Al compuesto **11** se lo hizo reaccionar en las condiciones de reacción planteadas y se obtuvo el **polímero A**, al cual se le realizó un espectro de  $^{13}C$ -RMN que, comparado con datos de literatura muestra las mismas señales, lo que corrobora la formación del enlace  $\beta$ -O-4 (Figura 10).<sup>41</sup>



**Figura 10:** Señales identificadas en  $^{13}\text{C}$ -RMN de polímero A.

La señal correspondiente al  $\text{C}_\alpha$  no se logró identificar, ya que es difícil de determinar por la presencia de ruido en el espectro, y por tratarse de un C cuaternario que brinda una señal de baja intensidad.

Por último, el polímero A se redujo utilizando  $\text{NaBH}_4$  para obtener el **polímero B** que fue identificado mediante  $^{13}\text{C}$ -RMN al ser comparado con datos bibliográficos (Esquema 12 y Figura 11).<sup>40</sup>



**Esquema 12:** Síntesis de polímero B a partir de polímero A.

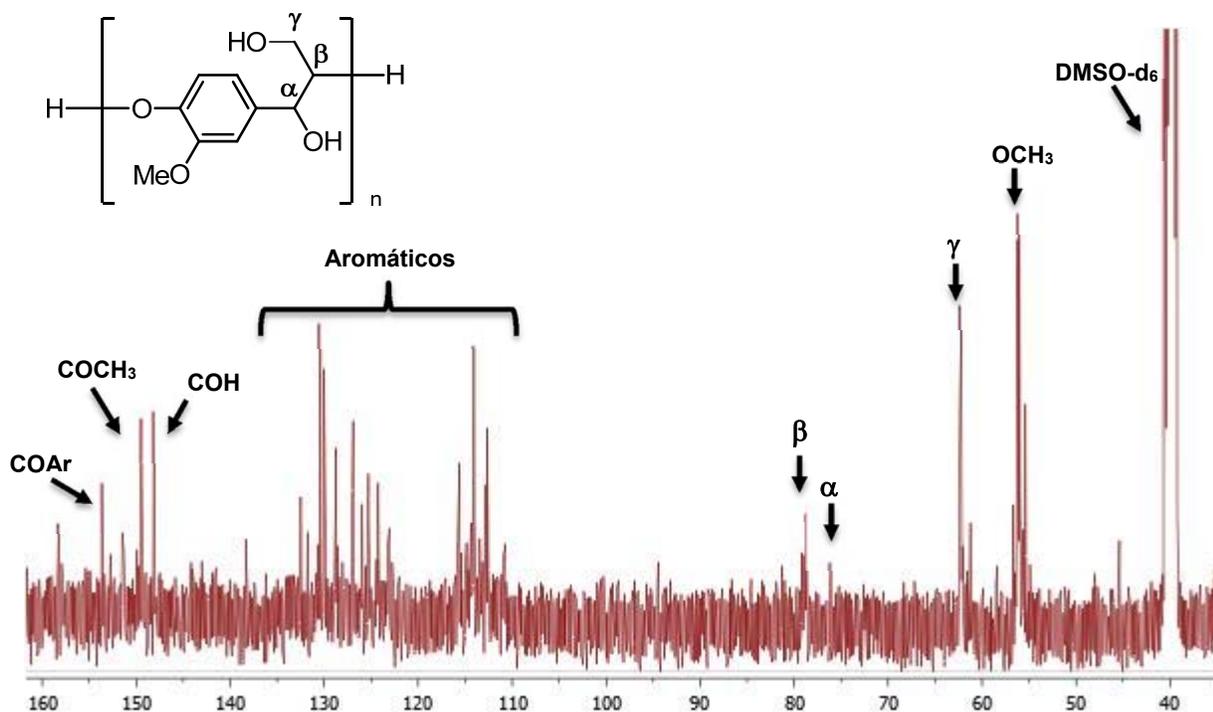


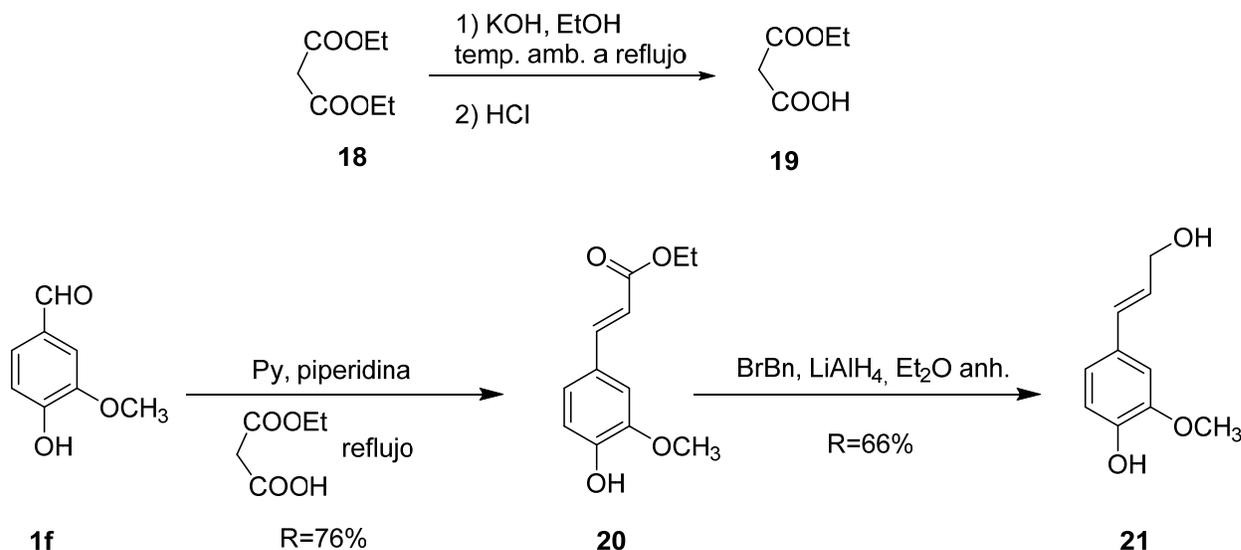
Figura 11: Señales identificadas en  $^{13}\text{C}$ -RMN de **polímero B**.

Aunque se lograron identificar varias de las señales, el espectro del **polímero B** resultó en una mezcla más compleja que el **polímero A**, asimismo la masa recuperada del mismo fue baja, es por ello que se eligió éste último como modelo para ser utilizado en el registro de señales del experimento de HSQC.

La síntesis de estas dos estructuras conteniendo el tipo de enlace más abundante de la lignina, permitió contar con modelos que dieran información acerca de las posibles reacciones que estos sufren. Asimismo, se pueden obtener datos espectroscópicos que permitan reconocer señales características, en los espectros bidimensionales de HSQC de las fracciones de lignina aisladas.

#### 4.3.2. Síntesis de dímero $\beta$ -5 mediante el uso de HRPO

La síntesis de modelos mediante el uso de enzimas peroxidasas y lacasas es una estrategia sintética frecuentemente utilizada. En colaboración con el laboratorio de Bioquímica de la Facultad de Química, y a través de la Prof. Laura Franco Fraguas, se utilizó peroxidasa de rábano picante (HRPO, tipo VI-A, EC 1.11.1.7) con el fin de obtener nuevos modelos de lignina. Las condiciones de reacción ensayadas se basaron en lo descrito por Zhang y colaboradores, utilizando (*E*)-4-hidroxi-3-metoxicinamato de etilo (ferulato de etilo) y alcohol 4-hidroxi-3-metoxicinámico (alcohol coniferílico), previamente sintetizados, como sustratos de la enzima en la reacción (Esquema 13).<sup>46,47</sup>

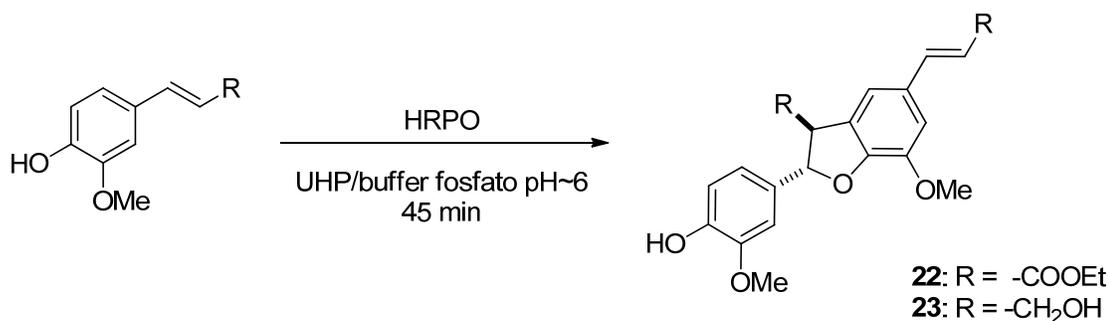


**Esquema 13:** Síntesis de ferulato de etilo y alcohol coniferílico.

Basados en los resultados obtenidos mediante las reacciones de Knoevenagel-Doebner, nuestro grupo de trabajo se centró en la síntesis de ésteres a partir de diferentes benzaldehídos. En lugar de ácido malónico se utilizó el monoácido de malonato de dietilo (**19**) sintetizado a partir de malonato de dietilo (**18**), mediante una hidrólisis selectiva.

Distintos benzaldehídos fueron ensayados, obteniendo en la mayoría de los casos el éster correspondiente. Entre los benzaldehídos elegidos, el 4-hidroxi-3-metoxibenzaldehído (**1f**) es el de interés para sintetizar ferulato de etilo (**20**), material de partida utilizado en la preparación de modelos de lignina. El ferulato de etilo fue también el precursor de alcohol coniferílico (**21**), uno de los monolignoles de mayor abundancia en las distintas maderas, y de alto costo en el mercado de reactivos debido a su gran inestabilidad a temperaturas mayores a 0 °C. El mismo fue obtenido mediante la reducción de ferulato con  $\text{LiAlH}_4$  y BrBn en un 66% de rendimiento (ver esquema 13).<sup>46</sup>

Una vez sintetizados los sustratos correspondientes (**20** y **21**), se llevó a cabo la reacción con HRPO utilizando UHP (complejo urea peróxido) como dador de peróxido y buffer fosfato de pH~6 (Esquema 14).<sup>48</sup>



**Esquema 14:** Síntesis de modelos con enlace  $\beta$ -5

Se ensayaron distintas condiciones de reacción, utilizando ferulato de etilo como sustrato y variando los equivalentes de UHP, la concentración de enzima y la temperatura, con el fin de obtener mayores porcentajes de recuperación del dímero correspondiente. Luego de varios intentos el mejor resultado se obtuvo cuando se utilizaron 0,55 eq. de UHP y una concentración de enzima de 0,012 mg/mL, a temperatura ambiente (entrada 3, Tabla 5).

Entrada	Sustrato	Eq. de UHP	enzima (mg/mL)	Rend. (%)
1	20	1.1	0.025	7
2	20	1.1	0.012	15
3	20	0.55	0.012	17
4	20	1.1	0.006	7
5	21	0.55	0.012	7

\*Los rendimientos son de producto aislado.

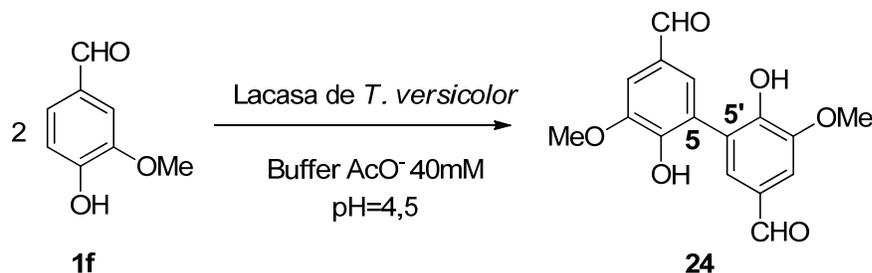
**Tabla 5:** Condiciones de reacción para la síntesis de modelos con enlace  $\beta$ -5.

En todos los casos se realizó el seguimiento de la reacción por cromatografía en capa fina (TLC) cada 5 min, observando que se consumió completamente el sustrato a los 45 min de reacción, formando el dímero correspondiente y otros productos de polimerización que no pudieron ser identificados. A tiempos mayores a 45 min se observó un consumo del dímero formado. Cuando la temperatura se disminuyó a 5 °C, se observó un consumo menor de sustrato, la formación de los mismos productos secundarios de polimerización, y se obtuvo un rendimiento de recuperación de 5%, menor al obtenido a temperatura ambiente.

Los compuestos obtenidos fueron analizados mediante RMN, obteniendo datos espectroscópicos para encontrar nuevas señales características que permitieron ampliar la base de datos de acoplamientos  $\delta_C/\delta_H$  en espectroscopía bidimensional HSQC.

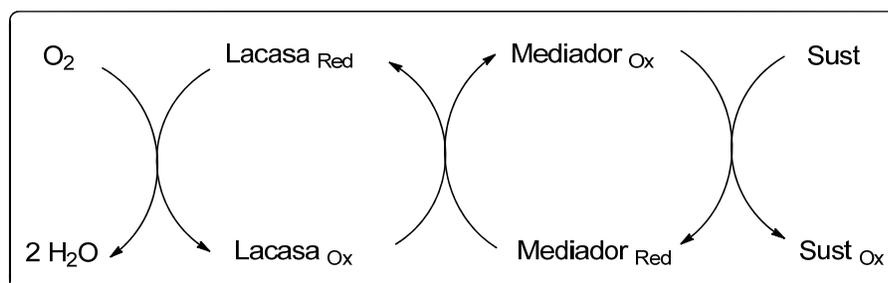
### 4.3.3. Síntesis de dímero con enlace 5-5'

Los enlaces del tipo C-C son de interés debido a su gran estabilidad frente a distintas condiciones a las que se somete la lignina durante la producción de pasta de celulosa, ya que suelen resistir procesos de deslignificación, a diferencia de los enlaces del tipo ariléter. La síntesis de enlaces del tipo C-C bifenilo puede ser efectuada por métodos químicos, pero se ha demostrado que utilizando enzimas como biocatalizadores es posible obtener el enlace 5-5' con buen rendimiento.<sup>49-51</sup> Basados en lo descrito en literatura, se ensayaron diferentes condiciones de reacción, utilizando vainillina como sustrato y lacasa (EC 1.10.3.2) de *T. versicolor* disponible comercialmente, para sintetizar divainillina (Esquema 15).



**Esquema 15:** Síntesis de divainillina mediada por lacasas.

Las lacasas muchas veces requieren un sistema mediador (LMS), el cual es necesario para que las mismas alcancen su máxima eficiencia redox (Figura 12). Este LMS cuenta con la presencia de un mediador que cataliza la reacción y aumenta el potencial redox de la enzima, logrando de esta forma la oxidación tanto de compuestos fenólicos como no fenólicos. La enzima activa al mediador, produciendo una especie oxidada del mismo que provoca la oxidación del sustrato. La capacidad de oxidación depende entonces tanto de la enzima como del mediador utilizado, y la combinación de los mismos resultante en el aumento del potencial redox del sistema.<sup>52</sup>



**Figura 12:** Sistema mediador de lacasas (LMS).<sup>52</sup>

Los mediadores pueden ser sintéticos o naturales. En las condiciones de laboratorio, se utilizaron mediadores sintéticos como TEMPO, ABTS o HBT y burbujeo de oxígeno en el medio de reacción.

Según lo descrito,<sup>53</sup> TEMPO es uno de los mediadores con los que se han obtenido mejores resultados, por lo cual se utilizó el mismo como mediador y se realizó la reacción en diferentes condiciones (Tabla 6).

Entrada	Conc. Lacasa (UE/mL)	V (mL) Buffer AcO <sup>-</sup> pH=4,5	Flujo O <sub>2</sub>	MeOH (mL)	AcOEt (mL)	Temp. °C	Rendimiento (%)
1	47	4	no	--	---	25	No reacciona
2	23	4	no	--	---	25	No reacciona
3	23	4	si	--	---	25	No reacciona
4	23	4	no	0,5	---	25	No reacciona
5	47	4	si	0,5	---	25	No reacciona
6	23	4	si	0,5	---	25	No reacciona
7	23	4	no	0,5	---	37	No reacciona
8	47	4	no	0,5	---	37	No reacciona
9	47	2	no	---	8	25	Trazas
10	23	2	no	---	8	25	Trazas
11	75	2	si	---	8	25	16

Los moles de TEMPO fueron 0,075 en todos los casos.

MeOH fue utilizado para disolver el sustrato antes de incorporarlo al medio de reacción.

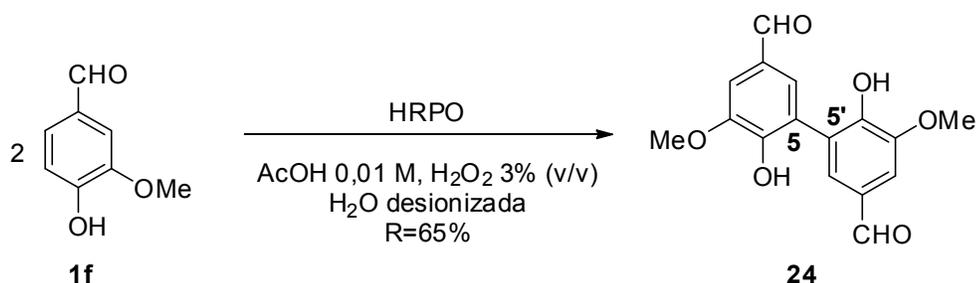
**Tabla 6:** Diferentes condiciones de reacción para la síntesis de divainillina catalizada por lacasas de *T. versicolor*.

Se ensayaron distintas condiciones de temperatura, concentración de enzima y disolventes. En la mayoría de los casos no se observó reacción, recuperándose el material de partida. Sólo se observó la formación del dímero cuando se utilizó un sistema bifásico AcOEt:buffer (8:2) como medio de reacción, bajo corriente constante de oxígeno. En un comienzo se ensayaron condiciones de sistema bifásico ya descritas en bibliografía,<sup>54</sup> en las cuales se varió la concentración de enzima, utilizando 23 y 47 UE/mL sin corriente de oxígeno. En ambos casos se logró observar la formación de productos, pero no fue posible obtener un rendimiento significativo. Con el fin de mejorar los resultados obtenidos, se realizó un ensayo donde se comenzó utilizando una concentración de enzima de 47 UE/mL bajo corriente de oxígeno, y se fue aumentando gradualmente hasta 75 UE/mL. Luego de 48h de reacción se obtuvo el producto deseado en un 16% de rendimiento con una alta recuperación de reactivo.

Los resultados obtenidos muestran que cuando el medio de reacción es buffer acetato el sustrato no reacciona, inclusive aumentando las unidades de enzima y/o la temperatura. Esto puede deberse a problemas de solubilidad, que dificultan su disponibilidad para reaccionar con la enzima. En cambio,

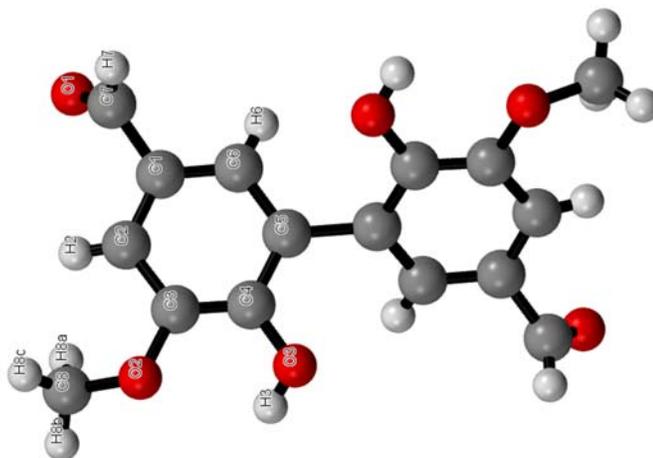
cuando se utilizó un sistema bifásico, el producto se obtuvo, aunque en muy bajos rendimientos. El sistema bifásico permite una liberación del sustrato en forma gradual hacia el buffer donde se encuentra la enzima, lo que favorece la no saturación de la misma. Por otro lado, una vez formado, el producto pasa del buffer a la fase orgánica, retirándolo del medio en que se encuentra la enzima, minimizando así posibles polimerizaciones del mismo. Sin embargo, el aumento de la cantidad de enzima a valores de hasta 75 UE/mL, hace que ya no se esté trabajando en condiciones catalíticas, ya que se agregan cantidades en masa similares al sustrato.

Debido a los inconvenientes con el uso de lacasas, y basados en lo descrito por varios autores sobre el uso de HRPO, y a nuestra experiencia previa, se decidió utilizarla como biocatalizador en la síntesis de divainillina. En 2010 Nishimura elaboró un procedimiento sencillo por el cual se obtuvo el dímero 5-5' de la vainillina, utilizando HRPO y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en un medio acuoso, en buenos rendimientos y como único producto.<sup>55</sup> Utilizando las condiciones descritas se realizó la síntesis de divainillina obteniendo asimismo buenos rendimientos (Esquema 16).



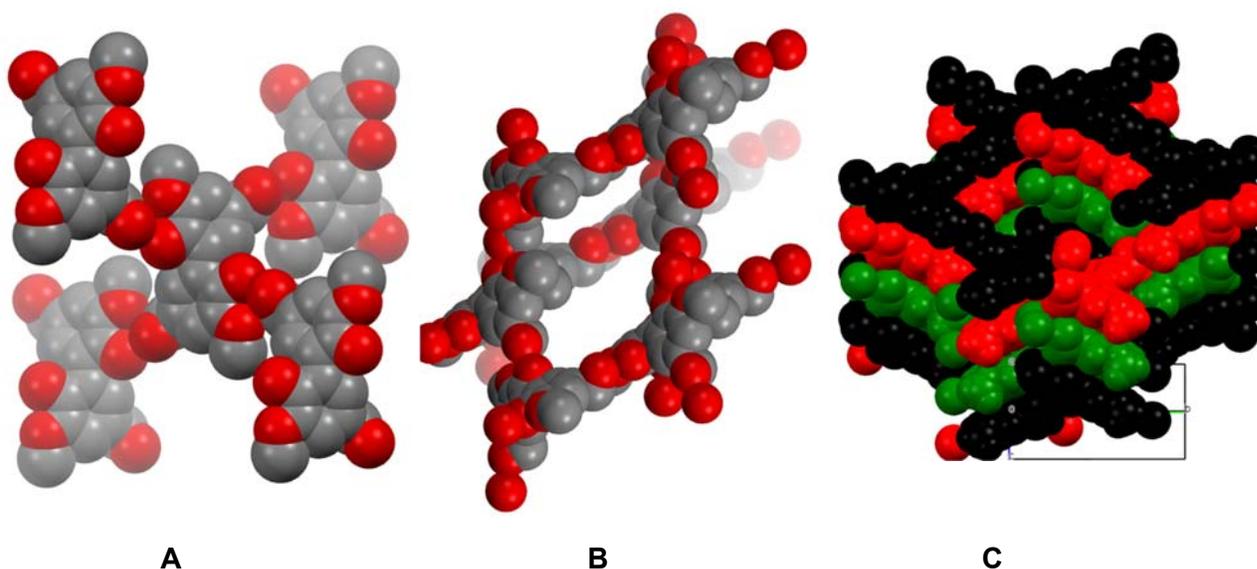
**Esquema 16:** Síntesis de divainillina utilizando HRPO como biocatalizador.

Se ensayaron dos tiempos de reacción (5 y 15 min) con el fin de evaluar el rendimiento obtenido. En ambos casos se obtuvo como producto un sólido de color grisáceo que correspondía a divainillina. Sin embargo, el sólido obtenido a los 15 min fue sólo parcialmente soluble en DMSO a temperatura ambiente, mientras que el sólido obtenido a los 5 min fue totalmente soluble. Para lograr identificar posibles diferencias estructurales se realizó difracción de rayos X (RX) de polvo para ambos sólidos, observando que en ambos casos se trataba de divainillina (Figura 13).



**Figura 13:** Estructura de RX de divainillina.

Sin embargo, cuando se estudió la disposición espacial de la molécula en el polvo obtenido a los 15 min., pudo observarse la formación de una red tridimensional compleja. La molécula de divainillina en el cristal adquiere un empaquetamiento en donde solo media molécula es independiente. Cada molécula se conecta con otras cuatro moléculas vecinas ( figura 14A) a través de enlaces de hidrógeno fuertes C=O $\cdots$ H-O del aldehído de una unidad al alcohol de la siguiente. Cada unidad pertenece a una subred tridimensional de moléculas conectadas que deja huecos (figura 14B) ocupados por otras dos subredes idénticas interpenetrantes entre sí (figura 14C). Las moléculas de distintas subredes presentan fuertes interacciones  $\pi$ - $\pi$ . Esto fue consistente con la forma acicular que se observó en cristales obtenidos de la recristalización lenta de la parte soluble de la divainillina.



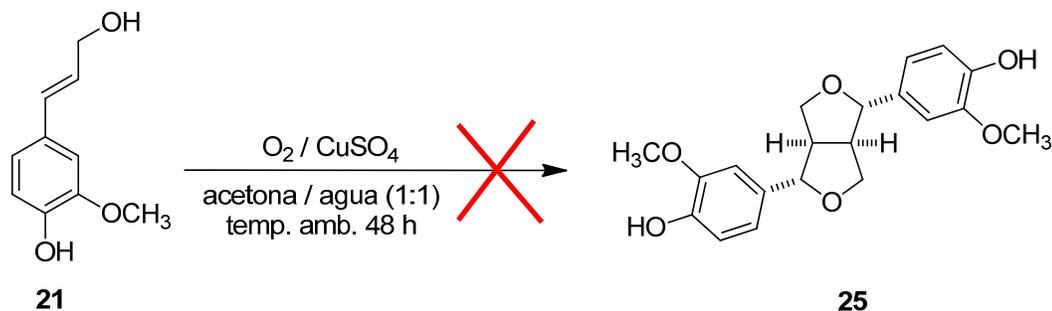
**Figura 14:** Interconexiones de la molécula de divainillina en su red cristalina.

Esta disposición espacial compacta, provoca la formación de una alta cantidad de enlaces de hidrógeno que puede ser la responsable de la insolubilidad parcial observada. A pesar de esto, se continúa con los estudios sobre la formación de divainillina (**24**) a distintos tiempos, así como también el estudio de derivados de la misma para ampliar los resultados obtenidos hasta el momento.

#### 4.3.4. Síntesis de modelo con enlace $\beta$ - $\beta$ resinol

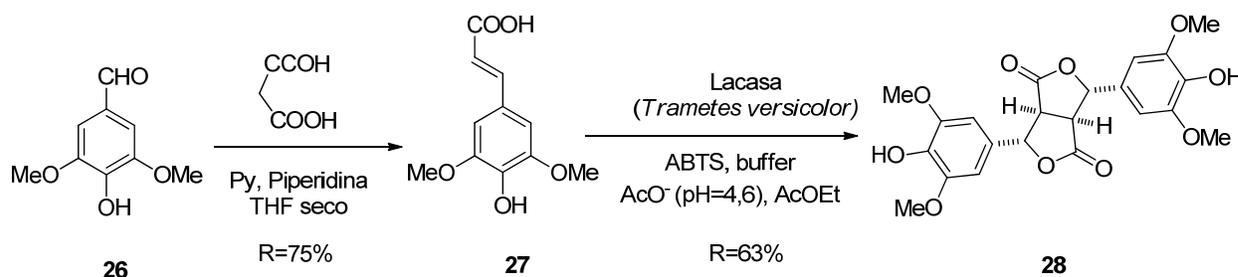
De acuerdo a lo mencionado en el capítulo de antecedentes, la síntesis de dímeros con enlace tipo  $\beta$ - $\beta$  resinol es interesante por la presencia de anillos furano fusionados que forman los llamados furofuranos.<sup>56</sup> La preparación de los mismos puede realizarse mediante una variedad de estrategias sintéticas entre las que se encuentra el uso de enzimas.<sup>54,57,58</sup>

En un principio se llevó a cabo la síntesis del dímero, utilizando como sustrato alcohol coniferílico, en presencia CuSO<sub>4</sub> y O<sub>2</sub>, produciendo la descomposición total del material de partida (Esquema 17).



**Esquema 17:** Síntesis de dímero  $\beta$ - $\beta$  resinol a partir de alcohol coniferílico.

Luego del resultado negativo obtenido con la síntesis química partiendo de alcohol coniferílico, se optó por utilizar otro tipo de sustrato, específicamente derivados de siringilo. Como se ha dicho, de los tres monómeros encontrados en la lignina, el alcohol sinapílico es el que cuenta con menor posibilidad de formar varios tipos de enlace, debido a su sustitución en 3, 4 y 5 del anillo. Esto hace que las posibilidades de obtener productos secundarios se reduzcan al mínimo. Asimismo, varios autores describen el uso de lacasas para la síntesis de este tipo de enlace, lo que sumado a nuestra experiencia en el uso de la misma para formar la divainillina, hizo que se optara por utilizarla para la síntesis del dímero **28** (Esquema 18).



**Esquema 18:** Síntesis de dímero  $\beta$ - $\beta$  resinol a partir de ácido ferúlico utilizando lacasas.

Para esta reacción se utilizó ABTS como mediador, y se observó que el efecto sobre el poder reductor de la enzima es mayor que cuando el mediador fue TEMPO. Se ensayaron diferentes condiciones de reacción, en presencia y ausencia de oxígeno, no observando diferencias en los productos obtenidos y el avance de reacción. Basados en estos resultados, se continuaron los ensayos sin burbujeo de oxígeno en el medio de reacción. Los mejores resultados se obtuvieron en las condiciones de la entrada 1, tabla 7, recuperando el máximo rendimiento (63%).

Entrada	m sustrato (mg)	Enzima (UE/mL)	ABTS (mg)	V buffer (mL)	V AcOEt (mL)	Tiempo (min)	Consumo sustrato (%)
1	8	3,35	10	2	8	20	100
2	8	2,68	10	2	8	20	100
3	50	2,68	10	4	16	60	<100
4	50	2,68	10	2	8	60	<100
5	50	2,68	20	4	16	60	100

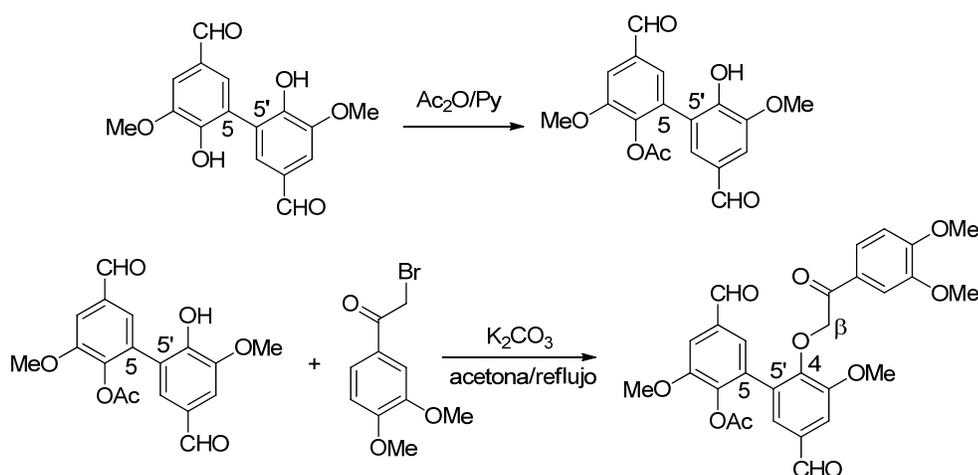
**Tabla 7:** Condiciones de reacción para la obtención del dímero con enlace  $\beta$ - $\beta$  resinol en ausencia de  $O_2$ .

En este caso, al igual que el anterior, la concentración de enzima necesaria para lograr un consumo total de sustrato y un buen porcentaje de recuperación del producto, es excesiva, alcanzando incluso cantidades en masa mayores a la masa de sustrato. Esto hace que el procedimiento no sea eficiente, y demuestra que la enzima de *T. versicolor* de la que disponemos no cuenta con un buen poder reductor para lograr las reacciones de acoplamiento buscadas.

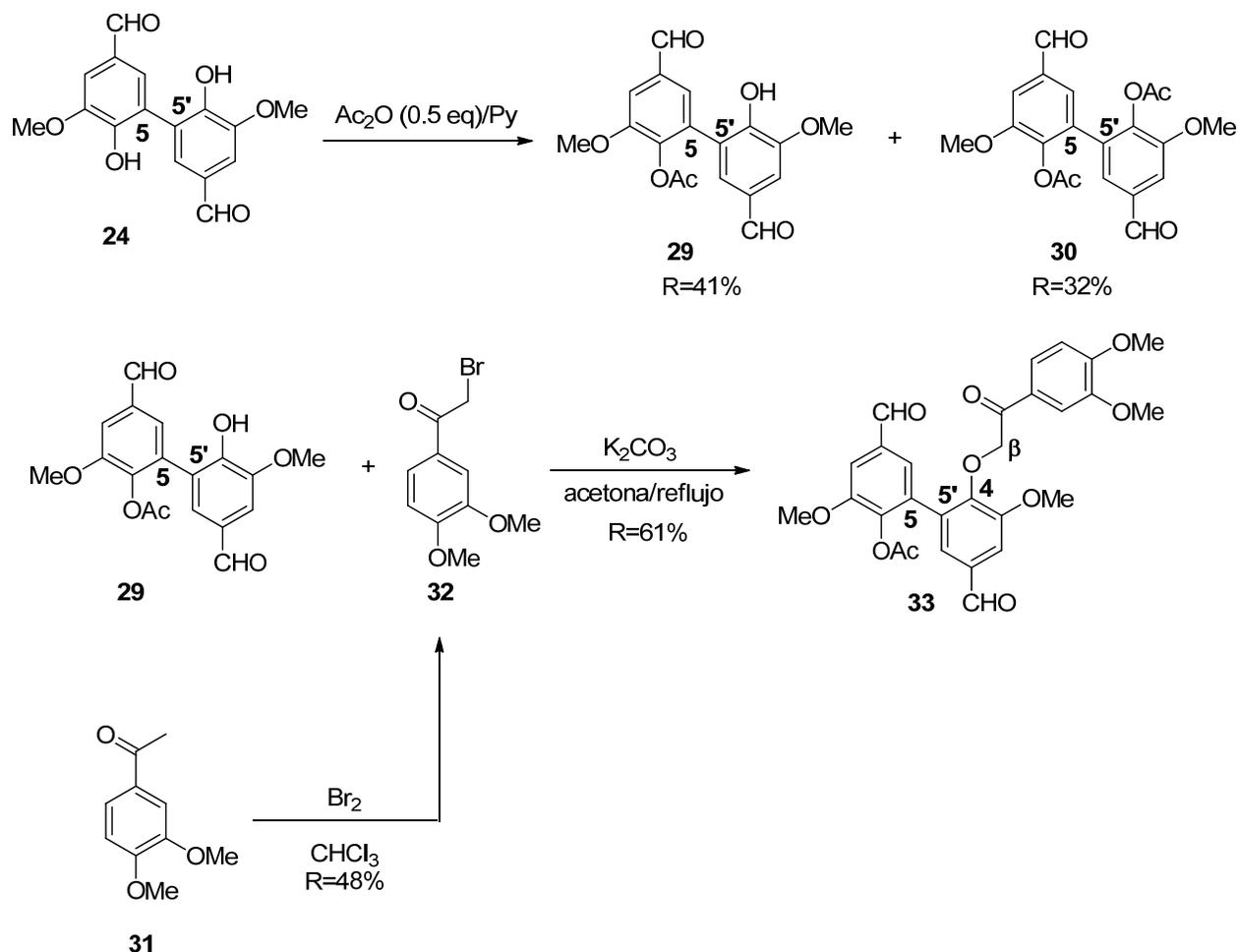
A pesar de que este no resultó un procedimiento eficiente, el mismo permitió sintetizar el dímero  $\beta$ - $\beta$  resinol, obteniendo así un nuevo modelo de lignina para el estudio espectroscópico del mismo.

#### 4.3.5. Síntesis de trímero conteniendo enlace 5-5' y $\beta$ -O-4

La posibilidad de obtener un modelo que contenga más de un tipo de enlace, es de interés para conocer más acerca de la lignina.<sup>59</sup> Para la síntesis de este modelo, se utilizaron las condiciones de reacción de literatura (Esquema 19), donde se monoacetila la divainillina para luego hacerla reaccionar con 2-bromo-1-(3',4'-dimetoxifenil)etanona (**32**) y así formar el trímero deseado (Esquema 20).



**Esquema 19:** Síntesis de trímero con enlace 5-5' y  $\beta$ -O-4, descrito en literatura.<sup>59,60</sup>



**Esquema 20:** Síntesis de trímero con enlace 5-5' y β-O-4.

La divainillina **24** previamente sintetizada mediante el uso de HRPO, se colocó en condiciones de acetilación selectiva, buscando obtener el producto monoacetilado **29**. El mismo se obtuvo con un rendimiento de 41%, obteniendo el compuesto diacetilado **30** como producto secundario de la reacción en un rendimiento de 32%.

El compuesto monoacetilado **29** se hizo reaccionar con 2-bromo-1-(3',4'-dimetoxifenil)etanona (**32**), obtenida previamente a partir de la α-halogenación de 3',4'-dimetoxiacetofenona (**31**) con bromo molecular en cloroformo. De la reacción de **29** con **32** se obtuvo el trímero **33** que contiene los tipos de enlace deseados.

La síntesis de este compuesto completa los objetivos en cuanto a la preparación de modelos de lignina. Los mismos fueron más tarde utilizados como base de datos espectroscópicos para compararlos con los distintos fragmentos de lignina, así como su uso para un análisis comparativo en pirólisis.

#### 4.3.6. Acoplamientos $\delta C/\delta H$ de los distintos modelos obtenidos

Una vez sintetizados los distintos modelos, se realizó el análisis mediante RMN bidimensional (HSQC), para obtener una tabla de acoplamientos C-H, como base de datos para comparar con los datos obtenidos de las distintas ligninas aisladas. Los acoplamientos se detallan en las siguientes tablas.

### 4.4. ANÁLISIS ESTRUCTURAL DE LIGNINA KRAFT

#### 4.4.1. Tratamiento de lignina con distintos disolventes orgánicos

A las ligninas Kraft aisladas mediante precipitación a pH 2, se las extrajo utilizando diferentes disolventes orgánicos, de forma de lograr un fraccionamiento de la misma en base a la diferencia de polaridades de los distintos fragmentos presentes, así como el aislamiento de moléculas de bajo peso molecular. En un principio se utilizaron los disolventes por separado para verificar la solubilidad de las distintas muestras de lignina en cada uno de ellos, y más tarde se realizó una extracción secuencial con diferentes disolventes orgánicos en Soxhlet.

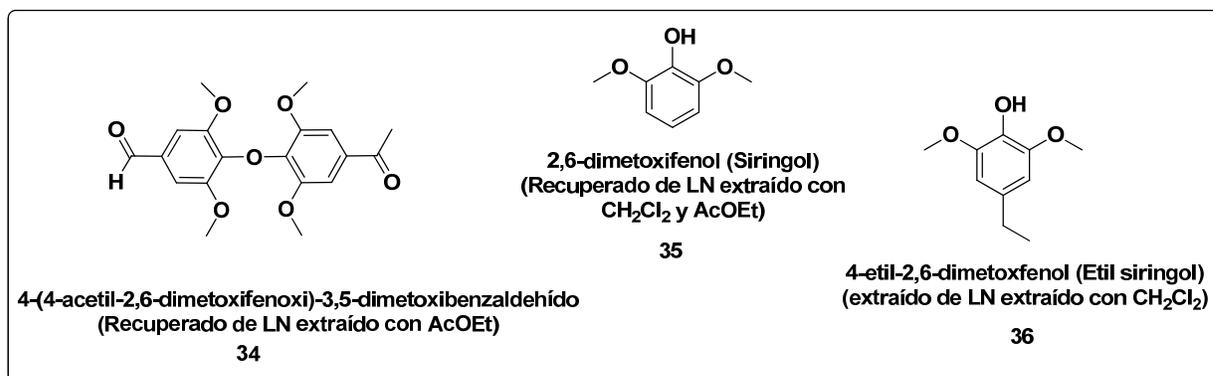
##### Extracción con $CH_2Cl_2$ y AcOEt en frío

Luego de evaluar una serie de disolventes disponibles, se optó por  $CH_2Cl_2$  y AcOEt para la extracción directa del LN. Los extractos obtenidos fueron fraccionados en mezclas menos complejas mediante columna cromatográfica y más tarde analizados mediante espectroscopía de RMN. Sin embargo, parte de los extractos no lograron ser eluidos de la columna cromatográfica mediante las fases móviles utilizadas, teniendo una pérdida importante cuando el disolvente de extracción fue AcOEt (Tabla 8).

Masa de lignina Kraft 2.5 g			
Disolvente de extracción	Masa de extracto (g)	Masa total de las fracciones eluidas (g).	% de masa perdido en la columna cromatográfica
$CH_2Cl_2$	0.318	0.248	22%
AcOEt	0.580	0.152	84%

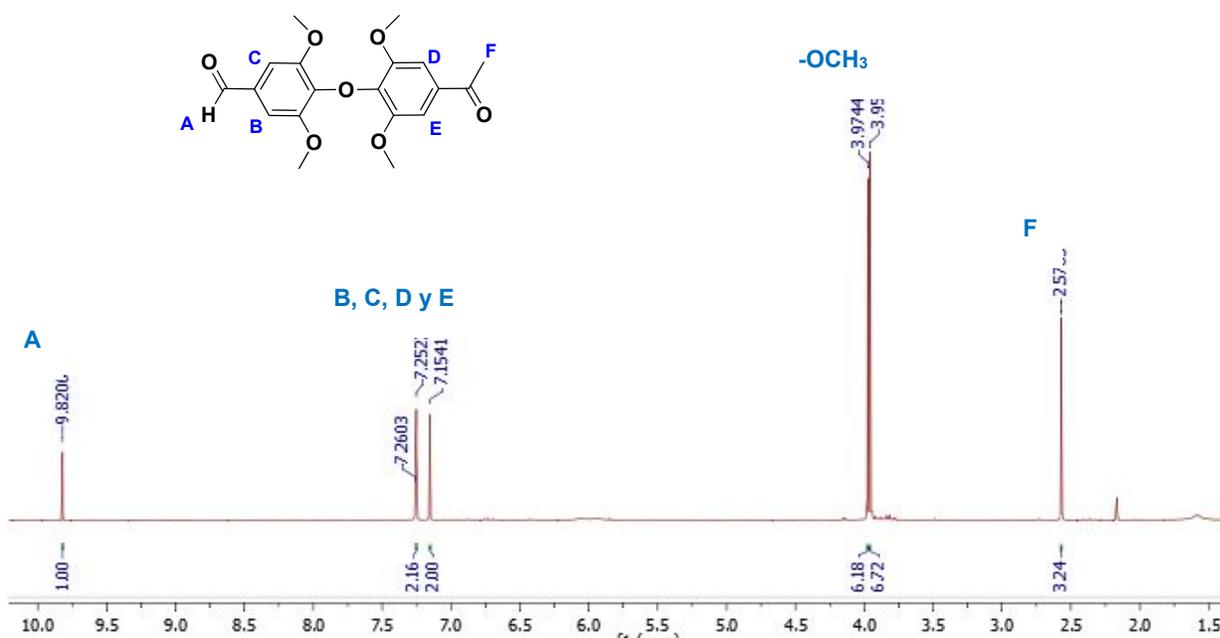
**Tabla 8:** Extracción y fraccionamiento de lignina Kraft mediante distintos disolventes.

Para ambos disolventes fue posible obtener compuestos aislados que pudieron ser elucidados mediante RMN. Los productos completamente elucidados fueron un dímero de restos sinapílicos **34**, siringol **35**, etilsiringol **36** (Figura 15).



**Figura 15:** Compuestos aislados a partir de lignina Kraft.

Los compuestos identificados son todos derivados de unidades siringilo, lo que es acorde al tipo de madera utilizada (maderas duras de la especie *Eucaliptus*) en nuestro país por las empresas de producción de pasta de celulosa. Tanto el compuesto **35** como el **36** han sido identificados mediante distintas caracterizaciones de ligninas Kraft.<sup>61-63</sup> Sin embargo, el dímero **34** que contiene un enlace del tipo 4-O-4' no ha sido descrito hasta el momento como presente en la madera. Los espectros de RMN de protón y las señales correspondientes a la identificación de cada uno de los compuestos se muestran en la figura 16a, 16b y 16c.



**Figura 16a:** Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN de dímero con enlace 4-O-4' (**34**).

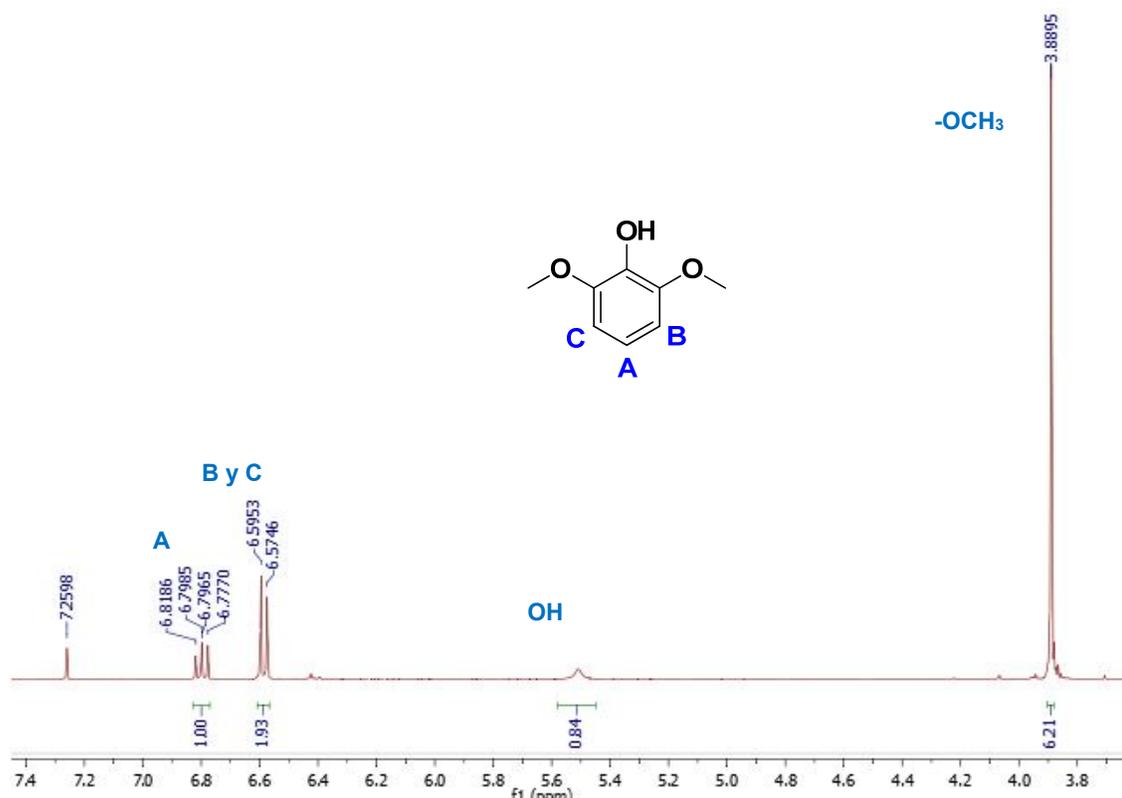


Figura 16b: Espectro de  $^1\text{H-RMN}$  de siringol (35).

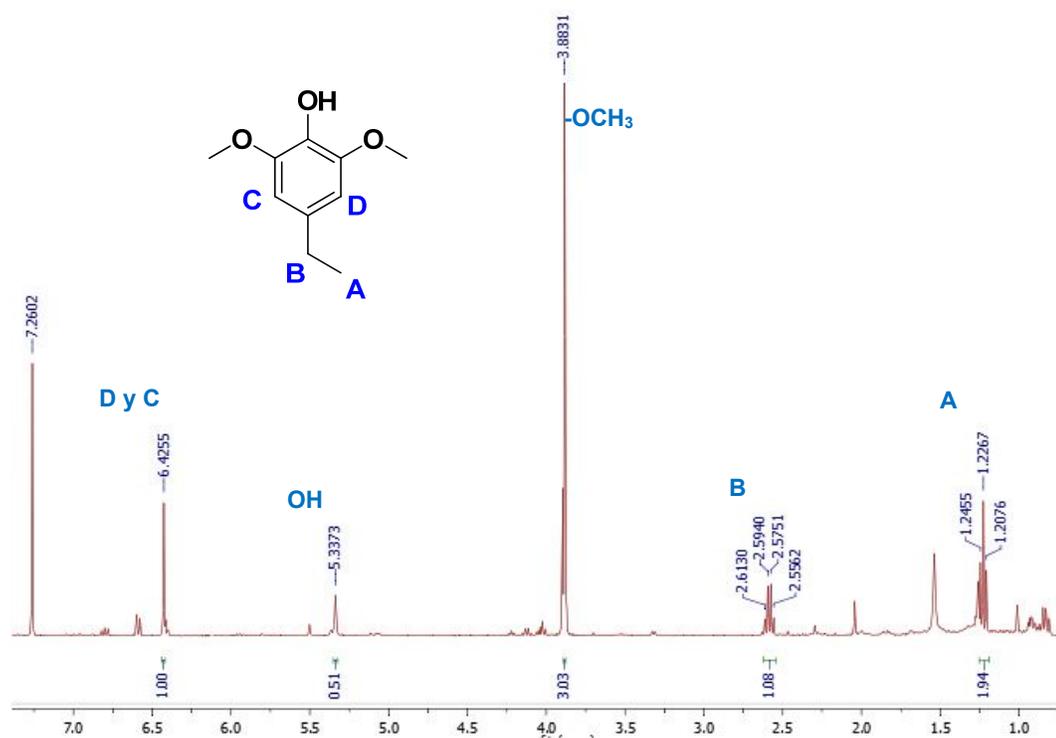


Figura 16c: Espectro de  $^1\text{H-RMN}$  de etilsiringol (36).

---

La mayoría de los autores describe la formación de siringol y otros derivados de monolignoles durante el análisis de ligninas mediante Py-GC/MS y otras técnicas.<sup>63-65</sup> Sin embargo, no se ha encontrado una descripción sobre la identificación de éste y otros derivados sin un tratamiento previo de degradación, tanto de lignina nativas como técnicas. El siringol es un compuesto muy utilizado en la industria alimentaria como aromatizante, ya que cuenta con un fuerte aroma ahumado, por lo que su recuperación desde lignina Kraft mediante una metodología sencilla sería de gran aprovechamiento. El inconveniente surge en los porcentajes de recuperación de este producto, ya que las cantidades recuperadas fueron siempre menores al 3% sobre la masa de lignina extraída.

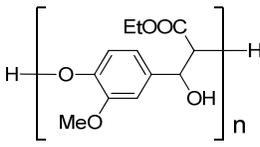
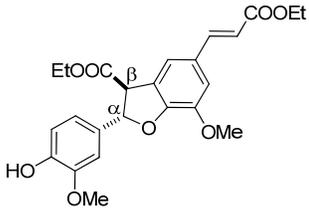
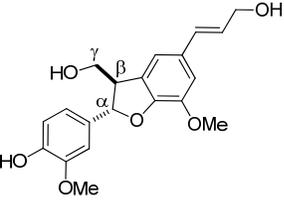
Por otro lado, el dímero aislado cuenta con un enlace difeniléter 4-O-4' no encontrado hasta el momento en ligninas nativas, lo que hace pensar que el mismo puede ser resultado de condensaciones durante el proceso Kraft. Como se dijo en el capítulo de antecedentes, durante el proceso no solo se da la ruptura de enlaces de la lignina, sino que también se generan condensaciones que pueden llevar a los mismos tipos de enlaces o a la formación de nuevas uniones.<sup>66,67</sup> Este dímero adquiere importancia ya que podría ser utilizado como material de partida de otros compuestos, pero el principal aporte se basa en el análisis para encontrar cuál o cuáles son los mecanismos para que el mismo se forme.

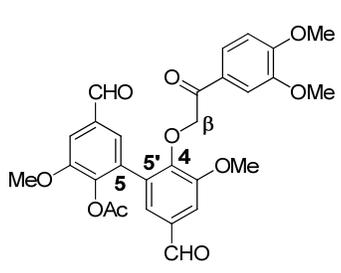
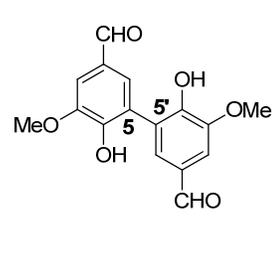
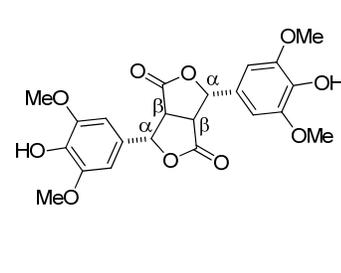
Estos tres compuestos fueron los únicos recuperados y completamente elucidados en las condiciones de extracción. El resto de las fracciones aisladas se identificaron como mezclas complejas de compuestos que fueron analizadas mediante espectroscopía de RMN bidimensional (HSQC), al igual que el crudo de extracción. Para cada fracción se realizó un registro de los acoplamientos  $\delta_C/\delta_H$  realizando un estudio comparativo de los mismos con lo registrado hasta el momento en bibliografía.<sup>63,65,68</sup> Como resultado de este estudio se logró realizar una estimación de la presencia de unidades S y G en cada una de las mezclas, así como abundancia relativa de distintos tipos de enlace en la lignina Kraft. En la tabla 9 se enumeran las principales asignaciones descritas en bibliografía,<sup>65,68</sup> y su correspondencia con las subestructuras correspondientes (ver figura 11 de capítulo antecedentes).

Notación	$\delta_C/\delta_H$ ppm	Asignación
<b>B<math>_{\beta}</math></b>	53.7/3.12	C $_{\beta}$ -H $_{\beta}$ en $\beta$ - $\beta'$ (resinol) subestructura ( <b>B</b> )
<b>C<math>_{\beta}</math></b>	53.7/3.44	C $_{\beta}$ -H $_{\beta}$ en $\beta$ -5 (fenilcumarano) subestructura ( <b>C</b> )
<b>E<math>_{\beta}</math></b>	55.0/2.75	C $_{\beta}$ -H $_{\beta}$ in $\beta$ -1' subestructuras ( <b>E</b> )
<b>-OMe</b>	55.6/3.73	C-H en metoxilos
<b>A<math>_{\gamma}</math></b>	59.4/3.40 y 3.72	C $_{\gamma}$ -H $_{\gamma}$ $\beta$ -O-4' subestructuras ( <b>A</b> )
<b>D<math>_{\beta}</math></b>	59.6/2.75	C $_{\beta}$ -H $_{\beta}$ en subestructuras espirodienona ( <b>D</b> )
<b>I<math>_{\gamma}</math></b>	61.3/4.09	C $_{\gamma}$ -H $_{\gamma}$ en cinamil (sinapil/coniferil) grupo terminal alcohol ( <b>I</b> )
<b>C<math>_{\gamma}</math></b>	62.5/3.72	C $_{\gamma}$ -H $_{\gamma}$ en subestructuras fenilcumarano ( <b>C</b> )
<b>B<math>_{\gamma}</math></b>	71.0/3.83 y 4.19	C $_{\gamma}$ -H $_{\gamma}$ en subestructuras resinol ( <b>B</b> )
<b>A<math>_{\alpha}</math></b>	71.7/4.86	C $_{\alpha}$ -H $_{\alpha}$ en subestructuras $\beta$ -O-4' ( <b>A</b> )
<b>D<math>_{\beta'}</math></b>	79.3/4.11	C $_{\beta'}$ -H $_{\beta'}$ en subestructuras espirodienona ( <b>D</b> )
<b>D<math>_{\alpha}</math></b>	81.2/5.09	C $_{\alpha}$ -H $_{\alpha}$ en subestructuras espirodienona ( <b>D</b> )
<b>A<math>_{\beta(G)}</math></b>	83.5/4.28	C $_{\beta}$ -H $_{\beta}$ en uniones $\beta$ -O-4' a unidades G ( <b>A</b> )
<b>F<math>_{\beta}</math></b>	83.8/5.23	C $_{\beta}$ -H $_{\beta}$ en subestructuras (C $_{\alpha}$ =O) $\beta$ -O-4' oxidadas ( <b>F</b> )
<b>B<math>_{\alpha}</math></b>	84.8/4.67	C $_{\alpha}$ -H $_{\alpha}$ en subestructuras resinol ( <b>B</b> )
<b>D<math>_{\alpha'}</math></b>	84.8/4.75	C $_{\alpha'}$ -H $_{\alpha'}$ en subestructuras espirodienona ( <b>D</b> )
<b>A<math>_{\beta(S)}</math></b>	85.8/4.11	C $_{\beta}$ -H $_{\beta}$ en uniones $\beta$ -O-4' a unidades S ( <b>A</b> )
<b>C<math>_{\alpha}</math></b>	86.8/5.46	C $_{\alpha}$ -H $_{\alpha}$ en subestructuras fenilcumarano ( <b>C</b> )
<b>S<math>_{2,6}</math></b>	103.8/6.69	C $_{2,6}$ -H $_{2,6}$ en unidades siringilo tipo éter ( <b>S</b> )
<b>S'<math>_{2,6}</math></b>	106.6/7.32 y 7.19	C $_{2,6}$ -H $_{2,6}$ en unidades siringilo fenólicas oxidadas (C $_{\alpha}$ =O) ( <b>S'</b> )
<b>G<math>_2</math></b>	110.9/6.99	C $_2$ -H $_2$ en unidades guaiacilo ( <b>G</b> )
<b>D<math>_2'</math></b>	113.2/6.27	C $_2$ -H $_2'$ en subestructuras espirodienona ( <b>D</b> )
<b>H<math>_{3,5}</math></b>	114.9/6.74	C $_{3,5}$ -H $_{3,5}$ en unidades <i>p</i> -hidroxyfenilo ( <b>H</b> )
<b>G<math>_5</math>/G<math>_6</math></b>	114.9/6.72 y 6.94 118.7/6.77	C $_5$ -H $_5$ y C $_6$ -H $_6$ en unidades guaiacilo ( <b>G</b> )
<b>D<math>_6'</math></b>	118.9/6.09	C $_6$ -H $_6$ en subestructuras espirodienona ( <b>D</b> )
<b>H<math>_{2,6}</math></b>	128.0/7.23	C $_{2,6}$ -H $_{2,6}$ en unidades <i>p</i> -hidroxyfenilo ( <b>H</b> )

**Tabla 9:** Lista de acoplamientos  $\delta_C/\delta_H$  en los espectros de HSQC y sus correspondientes asignaciones.<sup>65</sup>

Por su parte, de los distintos modelos sintetizados se logró realizar tablas de acoplamientos para comparar con las distintas fracciones aisladas. Los acoplamientos registrados en cada uno de los modelos se resumen en las tablas 10 y 11.

					
$\delta_C/\delta_H$ ppm	Asignación	$\delta_C/\delta_H$ ppm	Asignación	$\delta_C/\delta_H$ ppm	Asignación
13.0/1.21	CH <sub>3</sub> éster	14.6/1.36	CH <sub>3</sub> éster	53.8/3.55	CH $\beta$
55.5/3.88	-OMe	56.9/3.91	-OMe	55.5/3.85	-OMe
61.8/4.23	CH <sub>2</sub> éster	55.8/3.34	CH $\beta$	64.4/3.87	CH <sub>2</sub> $\gamma$
112.5/7.72	Aromático	61.1/4.29	CH <sub>2</sub> éster	87.5/5.58	CH $\alpha$
113.7/6.81	Aromático	87.6/6.13	CH $\alpha$	109.8/7.05	Aromático
114.3/6.98	Aromático	108.6/6.93	Aromático	110.8/6.96	Aromático
114.7/7.13	Aromático	111.8/7.05	Aromático	114.5/6.82	Aromático
123.3/7.61	Aromático	114.1/6.91	Aromático	115.2/6.98	Aromático
124.3/7.77	Aromático	116.0/6.32	CH=CH	118.7/6.89	Aromático
129.6/7.20	Aromático	117.8/7.21	Aromático	127.8/6.26	CH=CH
		119.5/6.93	Aromático	129.7/6.54	CH=CH
		144.0/7.66	CH=CH		

					
$\delta_C/\delta_H$ ppm	Asignación	$\delta_C/\delta_H$ ppm	Asignación	$\delta_C/\delta_H$ ppm	Asignación
20.5/2.14	CH <sub>3</sub> Acetato	56.4/3.94	-OMe	47.7/4.14	CH $\beta$
56.0/3.88	-OMe	109.7/7.43	Aromático	55.7/3.84	-OMe
76.6/5.19	CH <sub>2</sub> $\beta$	128.8/7.43	Aromático	82.5/5.78	CH $\alpha$
109.8/6.78	Aromático			102.9/6.74	Aromático
109.7/7.50	Aromático				
119.3/7.50	Aromático				
122.8/7.40	Aromático				
127.4/7.38	Aromático				
127.6/7.51	Aromático				
191.0/9.89	CHO				

**Tablas 10 y 11:** Asignación de acoplamiento  $\delta_C/\delta_H$  presentes en los experimentos de HSQC de los distintos modelos sintetizados.

Los distintos acoplamiento identificados en cada uno de los HSQC realizados a las distintas fracciones, se muestran en las tablas 12a y 12b, indicando en cada caso la asignación correspondiente. Fracciones extraídas con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>.

Fracciones extraídas con CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	
Fracción	Acoplamientos identificados
1	56.5/3.90 y 3.97 (OMe); 104.0/6.74 (S <sub>2,6</sub> ); 119.1/6,83 (G <sub>5</sub> /G <sub>6</sub> ); 128.2/7.45 (H <sub>2,6</sub> ); 191.2/9.85 (CHO)
2	56.5/3.96 y 56.9/3.85 (OMe); 103.1/6.75 (S <sub>2,6</sub> ); 106.0/7.26 y 106.9/7.17 (S' <sub>2,6</sub> ); 110.8/6.72 (G <sub>2</sub> ); 114.8/6.91 (G <sub>5</sub> /G <sub>6</sub> ); 128.6/7.34 (H <sub>2,6</sub> ); 191.2/9.83 (CHO)
3	53.8/3.12 (B <sub>β</sub> ); 56.5/3.90 (OMe); 71.0/4.16 y 71.4/4.30 (B <sub>γ</sub> ); 103.6/6.78 (S <sub>2,6</sub> ); 114.4/6.90 (G <sub>5</sub> /G <sub>6</sub> )
4	56.5/3.96 y 56.3/3.90 (OMe); 103.8/6.85 (S <sub>2,6</sub> ); 106.7/7.24 (S' <sub>2,6</sub> )

**Tabla12a:** Acoplamientos identificados en los distintos espectros de HSQC de lignina Kraft, obtenida mediante extracción con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y posterior separación en columna cromatográfica.

Fracciones extraídas con AcOEt	
Fracción	Acoplamientos identificados
1	56.5/3.85 y 56.7/3.97 (OMe); 103.2/6.75 (S <sub>2,6</sub> ); 106.7/7.17 (S' <sub>2,6</sub> ); 114.6/6.92 (G <sub>5</sub> /G <sub>6</sub> ); 128.3/7.43 (H <sub>2,6</sub> ); 191.4/9.48 (CHO)
2	53.4/3.94 (C <sub>β</sub> ); 55.9/3.92 (OMe); 59.7/3.94 (A <sub>γ</sub> ); 103.0/6.77 (S <sub>2,6</sub> ); 110.3/6.76(G <sub>2</sub> ); 114.1/6.90 (G <sub>5</sub> /G <sub>6</sub> )127.8/7.42 (H <sub>2,6</sub> ); 191.0/9.82 (CHO)
3	56.1/3.88 (OMe); 59.6/3.88 (A <sub>γ</sub> ); 71.0/3.88 y 71.4/4.28 (B <sub>γ</sub> ); 81.8/4.85 (D <sub>α</sub> ); 106.9/7.14 (S' <sub>2,6</sub> ); 114.1/6.83 (G <sub>5</sub> /G <sub>6</sub> )

**Tabla12b:** Acoplamientos identificados en los distintos espectros de HSQC de lignina Kraft, obtenida mediante extracción con AcOEt y posterior separación en columna cromatográfica.

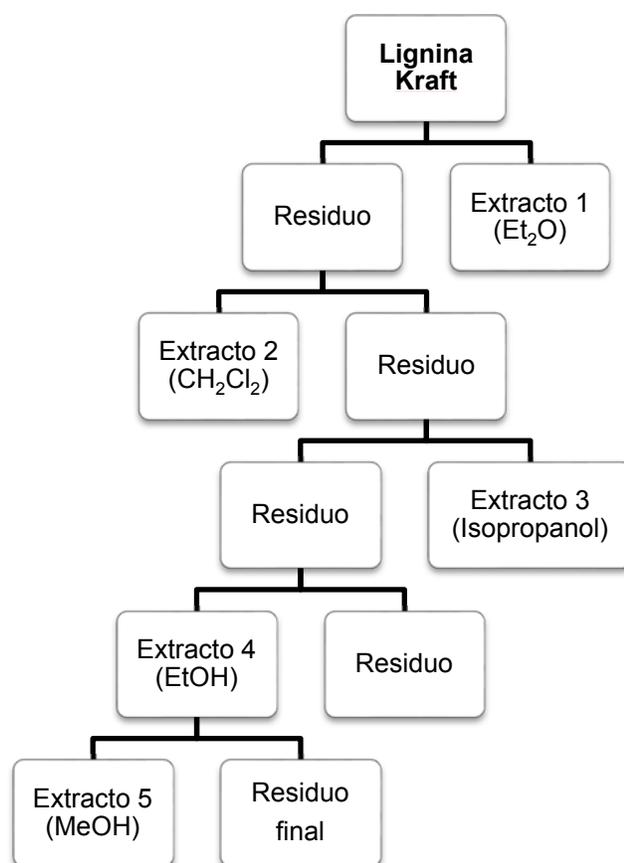
Los acoplamientos identificados muestran un alto contenido de unidades S, S' y G, ya que las mismas están presentes en la mayoría de las fracciones aisladas. Este resultado es acorde al tipo de madera de la cual proviene dicha lignina. Como ya se mencionara, la madera utilizada por las empresas UPM y Fanapel es del género *Eucalyptus*, un tipo de madera dura de elección para la obtención de pulpa de celulosa. La misma se caracteriza por tener un porcentaje mayor de unidades siringilo sobre las guaiacilo, mientras que las *p*-hidroxifenilo se encuentran en bajas proporciones.

Complementariamente, se identifican acoplamientos del tipo β-5 y β-O-4, dos tipos de enlace que a pesar de ser susceptibles en las condiciones de reacción, alguno de ellos puede resistir dicho proceso o tal vez formarse como parte de la repolimerización que existe durante el mismo.

Por otro lado, se identifican acoplamientos a bajos ppm (9.7/1.28; 29.7/1.27; 26.4/2.58) que pueden corresponder a  $\text{CH}_2$  y  $\text{CH}_3$  de cadenas laterales carbonadas que se forman durante el proceso, similares a las identificadas en el compuesto **36**, o a grupos metilo adyacentes a un grupo carbonilo formado por procesos de oxidación. Asimismo, alguna de las fracciones contiene el acoplamiento característico de grupos aldehídos, lo que reafirma la formación de los mismos durante el proceso de deslignificación. Sin embargo, en ambos casos se identifican en las primeras fracciones extraídas de la columna cromatográfica, lo que lleva a pensar que dichos grupos forman parte de moléculas de bajo peso molecular, ya que se encuentran en fracciones eluidas con mezclas apolares.

### Extracción secuencial en Soxhlet

En busca de un análisis más detallado de los tres tipos de lignina Kraft (Fanapel, Pamer y UPM), nos planteamos como objetivo de esta tesis el estudio de las mismas mediante una disolución secuencial con cinco disolventes orgánicos de polaridad creciente en Soxhlet (Esquema 21).



**Esquema 21:** Fraccionamiento de lignina Kraft mediante disolución secuencial.

Los disolventes elegidos fueron:  $\text{Et}_2\text{O}$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , Isopropanol, EtOH y MeOH, obteniendo los extractos de 1 a 5 respectivamente. Las cantidades extraídas en cada uno de los casos se resumen en la tabla 13.

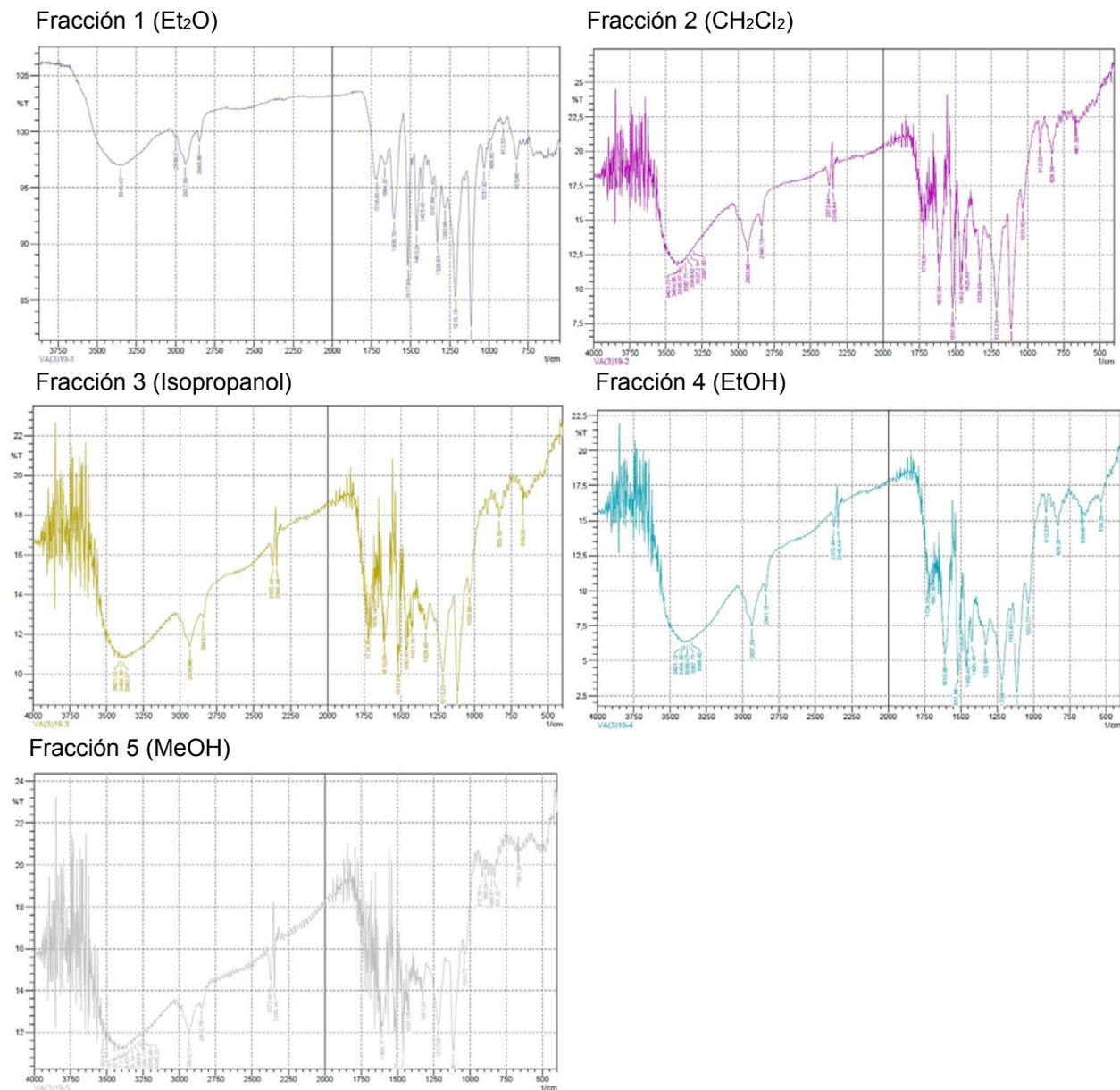
Porcentaje en masa de lignina extraída (% $m_{\text{ext.}}/m_{\text{lignina}}$ )			
Extracto	Lignina UPM	Lignina Pamer	Lignina Fanapel
1 (Et <sub>2</sub> O)	1%	17%	2%
2 (CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> )	21%	7%	5%
3 (iPrOH)	11%	2%	19%
4 (EtOH)	27%	16%	68%
5 (MeOH)	32%	14%	0%
Residuo final	0%	35%	0%

**Tabla 13:** Porcentajes de extracción con distintos disolventes en Soxhlet.

Mediante este procedimiento fue posible obtener una variedad de fracciones de lignina para analizar mediante IR y HSQC. Como se observa en la tabla 13, los porcentajes de extracción con los distintos disolventes elegidos varían dependiendo de la fuente de la cual proviene cada lignina. Mientras que la lignina proveniente de Fanapel es totalmente soluble en EtOH, la proveniente de UPM se solubiliza completamente con MeOH, mientras que un gran porcentaje de la lignina de Pamer es insoluble en los disolventes polares elegidos. Estas diferencias de solubilidades muestran mayor homogeneidad en las ligninas provenientes de Fanapel y UPM, ya que el mayor porcentaje de recuperación se obtiene con los alcoholes EtOH y MeOH, mientras que la lignina Kraft de Pamer contiene un alto porcentaje de compuestos apolares extraíbles con Et<sub>2</sub>O, no logrando disolver parte de la misma en MeOH. Estas diferencias, confirman una mayor variabilidad de estructuras resultado de las materias primas utilizadas por la empresa, como se mencionara anteriormente.

La lignina Kraft de Pamer es la única con la que se obtuvieron fracciones extraíbles con cada uno de los disolventes elegidos, y de las tres es la que contiene mayor cantidad de moléculas de bajo peso molecular. Al mismo tiempo, contiene compuestos insolubles en MeOH, esto es un indicio de contiene fragmentos de alto peso molecular, ya que fragmentos de lignina de alto peso molecular suelen ser insolubles en disolventes orgánicos. Por el contrario, tanto la lignina Kraft de Fanapel como la de UPM prácticamente no contienen fracciones apolares que se extraigan con Et<sub>2</sub>O. Sin embargo, cuando se comparó la extracción con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> de ambas muestras, se observó un porcentaje 4 veces mayor de material extraíble para la lignina Kraft de UPM. Este resultado puede deberse tanto a las maderas utilizadas como al proceso de deslignificación, ya que estos dos factores son los que determinan la lignina Kraft obtenida luego de proceso.

A cada una de las fracciones se les realizó IR para determinar diferencias en su composición. En la figura 17 se observan los distintos IRs obtenidos para la extracción de lignina Kraft proveniente de LN de UPM.

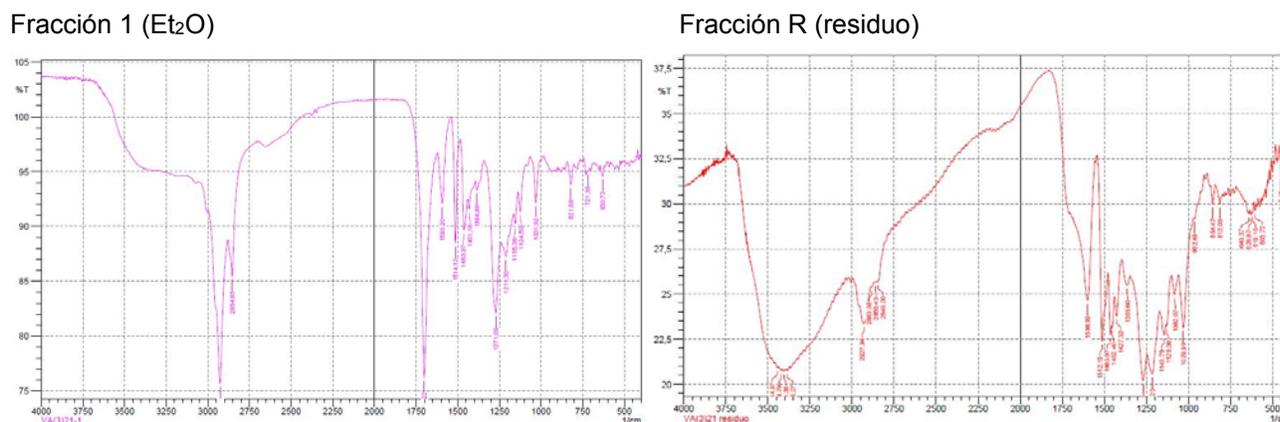


**Figura 17:** IRs de fracciones de lignina obtenidas a partir de la extracción sucesiva con distintos disolventes, de lignina Kraft proveniente de LN de UPM.

Los distintos IRs muestran distintas relaciones de intensidad de las bandas dentro de cada una de las fracciones aisladas, logrando de esta forma algunas conclusiones en cuanto a las abundancias de los grupos funcionales presentes. Mientras que en el espectro de fracciones extraídas con disolventes apolares la banda en el entorno de los  $3350\text{ cm}^{-1}$  (correspondiente a estiramiento O-H) tiene menor intensidad que las presentes en el entorno entre  $1600$  a  $1750\text{ cm}^{-1}$  (correspondiente a estiramiento C=O y C=C), en fracciones extraídas con disolventes polares ésta diferencia disminuye, para finalmente invertirse. Este resultado es acorde a lo discutido anteriormente, ya que las fracciones extraídas con disolventes polares contendrán mayor porcentaje de grupos OH, tanto de fenoles como

de ácidos carboxílicos. Los compuestos de bajo peso molecular, presentes en las fracciones Et<sub>2</sub>O y CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> suelen ser resultado de un primer paso de deslignificación y posterior oxidación de sus cadenas laterales. Esto provoca un aumento en los grupos carbonilo que se observa en una intensidad mayor de las bandas presentes en el entorno de 1600 a 1750.

Por otro lado, como se puede observar en la figura 18, en el caso de la fracción 1 de Pamer, la banda en el entorno a los 3350 cm<sup>-1</sup> prácticamente no existe, mientras que las bandas en el entorno de 2850 y 2930 cm<sup>-1</sup> aumentan su intensidad significativamente. Esto indica que los grupos metoxilo (OMe) son más abundantes que los grupos hidroxilo presentes, lo que puede deberse a una cantidad mayor de unidades siringilo.



**Figura 18:** IRs de fracciones 1 y residuo, obtenidas a partir de la extracción de lignina Kraft proveniente de LN de Pamer.

También, como se mencionara anteriormente, este fue el único caso donde se obtuvo un residuo luego de las extracciones con los distintos disolventes. Si se observa el espectro de IR para dicha fracción (fracción R), puede verse como la banda correspondiente a los grupos hidroxilos se incrementa, mientras que las bandas correspondientes a grupos carbonilo en el entorno de 1600 a 1750 cm<sup>-1</sup>, no se encuentran presentes. Esto da un indicio, de que los componentes presentes en esta fracción, cuentan con un alto contenido de fenoles. Por otra parte, la ausencia de grupos carbonilo, posiblemente se deba a que los mismos están presentes en fragmentos de menor peso molecular y menor polaridad, ya que se forman como resultado de oxidaciones que se dan durante el proceso de deslignificación.

Esta diferencia de la lignina Kraft de Pamer con la de UPM y Fanapel, es una prueba más de que la misma proviene de diferentes tipos de materias primas (madera y material reciclado), lo que sumado a un proceso de deslignificación menos exigente, debido a que el papel a fabricar es cartón corrugado, lleva a una composición de fragmentos de lignina variados.

Aunque los espectros de IR otorgan información sobre los grupos funcionales de las moléculas, así como una estimación de la abundancia relativa de los mismos, es necesario un análisis complementario para lograr más información acerca de la composición de cada una de las fracciones. Para ello se realizó HSQC de cada una de las muestras, obteniendo una serie de datos que ofrece

información sobre la presencia de los distintas unidades S, G y H. Los distintos espectros de IR pueden observarse en el anexo espectroscopía.

En las tablas 14a-c se resumen los acoplamientos identificados para cada grupo de fracciones aisladas.

Fracciones UPM	
Fracción	Acoplamientos identificados
1	56.3/3.75 y 3.83 (OMe); 60.5/3.74 (A <sub>v</sub> ); 63.3/3.59 (C <sub>v</sub> ); 71.1/4.16 (B <sub>v</sub> ), 85.7/4.62 (A <sub>β</sub> ); 111.1/7.39 (G <sub>2</sub> ); 118.7/6.69 (G <sub>5</sub> /G <sub>6</sub> ); 143.2/7.74 (CH=CH modelo β-5)
2	53.5/3.75 (C <sub>β</sub> ); 56.4/3.75 (OMe); 106.9/7.23 (S' <sub>2,6</sub> )
3	56.4/3.74 (OMe); 62.5/3.78 (C <sub>v</sub> ); 71.0/3.88 (B <sub>v</sub> ); 115.6/6.70 (Ar G <sub>5</sub> modelo β-5)
4	56.3/3.73 (OMe); 59.6/3.33 (A <sub>v</sub> ); 71.6/3.81 (B <sub>v</sub> ); 85.5/4.62 (A <sub>β</sub> ); 106.5/7.22 (S' <sub>2,6</sub> ); 114.2/6.91 (G <sub>5</sub> /G <sub>6</sub> )
5	56.3/3.72 (OMe); 59.6/3.23 (A <sub>v</sub> ); 71.7/3.80 (B <sub>v</sub> ); 106.7/7.22 (S' <sub>2,6</sub> ); 128,8/7.53 (G <sub>2,6</sub> modelo 5-5')

**Tabla 14a:** Acoplamientos identificados en los espectros de HSQC de fracciones de lignina proveniente de UPM, mediante extracción en Soxhlet.

Fracciones Fanapel	
Fracción	Acoplamientos identificados
1	56.4/3.74 y 3.83 (OMe); 59.3/3.29 (A <sub>v</sub> ); 71.1/3.88 (B <sub>v</sub> ); 106.9/7.22 (S' <sub>2,6</sub> )
2	56.3/3.74 y 3.83 (OMe); 59.3/3.28 (A <sub>v</sub> ); 71.4/3.76 y 71.5/4.16 (B <sub>v</sub> ); 103.9/6.61 (S <sub>2,6</sub> ); 106.9/7.23 (S' <sub>2,6</sub> )
3	56.3/3.74 y 3.83 (OMe); 59.3/3.28 (A <sub>v</sub> ); 103.9/6.61 (S <sub>2,6</sub> ); 106.5/7.24 y 7.43 (S' <sub>2,6</sub> )
4	56.2/3.75 (OMe), 59.3/3.25 (A <sub>v</sub> ); 71.3/4.16 (B <sub>v</sub> ); 106.2/7.39 (S' <sub>2,6</sub> )

**Tabla 14b:** Acoplamientos identificados en los espectros de HSQC de fracciones de lignina proveniente de Fanapel, mediante extracción en Soxhlet.

Fracciones Pamer	
Fracción	Acoplamientos identificados
1	55.7/3.72 y 56.0/3.83 (OMe)
2	56.0/3.75 (OMe); 61.9/4.11 (I <sub>V</sub> ); 71.4/4.14 (B <sub>V</sub> )
3	56.0/3.75 (OMe)
4	56.0/3.73 (OMe); 71.1/3.71 y 71.4/4.12 (B <sub>V</sub> ); 71.5/4.76 (A <sub>α</sub> )
5	56.0/3.74 (OMe); 62.9/3.44 (C <sub>V</sub> ); 71.7/4.75 (A <sub>α</sub> ); 113.8/6.94 (S <sub>2,6</sub> )
Residuo final	56.0/3.72 (OMe); 71.6/4.76 (A <sub>α</sub> )

**Tabla 14c:** Acoplamientos identificados en los espectros de HSQC de fracciones de lignina proveniente de Pamer, mediante extracción en Soxhlet.

Los compuestos extraídos con Et<sub>2</sub>O y CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, forman una mezcla compleja de compuestos de bajo peso molecular, lo que lleva a una variedad de acoplamientos a bajos ppm observados en el HSQC. Estos acoplamientos pueden corresponder, como se mencionara anteriormente, a cadenas laterales que sufren modificaciones durante el proceso, obteniendo una variedad de de grupos metilen y metilo que presentan señales entre 0.90 y 4.50 ppm en el <sup>1</sup>H-RMN, y 0.0 y 80 ppm en el <sup>13</sup>C-RMN, que no lograron ser identificadas.

A diferencia de los resultados obtenidos con la extracción y posterior separación por columna cromatográfica, en este caso no se observan acoplamientos característicos de grupos aldehído. Esto hace pensar que la abundancia de los mismos es baja, y solo están presentes en algunas moléculas, mientras que la mayoría contiene otro tipo de grupos funcionales resultado de oxidaciones, como cetonas y ácidos carboxílicos. Este bajo contenido de aldehídos, en relación a otras moléculas presentes, es la razón por la cual no se detecta el acoplamiento, ya que la RMN depende de la cantidad de moléculas presentes en disolución. Cuanto menor la cantidad de las mismas respecto a otras presentes, peor será el registro de las señales en el espectro, no logrando observar el acoplamiento correspondiente.

Nuevamente, los resultados de los HSQC confirman la abundancia de unidades S y G en las distintas fracciones, mediante la identificación de acoplamientos del tipo C-H aromáticos (G<sub>2</sub>, G<sub>5</sub>/G<sub>6</sub>, S<sub>2,6</sub> y S'<sub>2,6</sub>). Además, se logró identificar acoplamientos C<sub>β</sub>-H<sub>β</sub> de uniones β-5 y β-β, C<sub>V</sub>-H<sub>V</sub> de uniones β-O-4, β-5 y β-β, y C<sub>α</sub>-H<sub>α</sub> de β-O-4. Estos resultados demuestran que durante la deslignificación alguna de las uniones presentes se mantienen intactas, mientras que gran parte de las mismas sufre ruptura y posterior oxidación dando como resultado estructuras del tipo G, S y S'.

Sin embargo, lo observado con la lignina Kraft proveniente de Pamer es apreciablemente diferente a lo obtenido con las de UPM y Fanapel. Por un lado, en las fracciones aisladas de UPM y Fanapel se observó una uniformidad de los acoplamientos, identificando unidades S y G, así como estructuras con distintos tipos de enlaces, en cada una de las fracciones aisladas. En cambio, para las fracciones de Pamer, se logró identificar sólo una pequeña proporción de los acoplamientos observados, que en algunos casos correspondió únicamente al acoplamiento -OMe. Una vez más, se confirmó una

variabilidad compleja de estructura presentes en lignina Kraft de Pamer, lo que dificultó la caracterización por falta de homogeneidad entre las distintas muestras. Adicionalmente, los acoplamientos registrados en este caso no pudieron ser identificados como parte de moléculas características resultantes de la deslignificación. Es necesario entonces emplear técnicas analíticas adicionales para lograr una identificación mayor de los componentes de dicha lignina, y así lograr un conocimiento más amplio de la misma.

Por otro lado, se utilizaron los modelos sintetizados para lograr identificar otros acoplamientos presentes, no identificados en comparación con los datos bibliográficos. De esta forma fueron asignados algunos acoplamientos como los correspondientes a dobles enlaces conjugados al anillo aromático (CH=CH) o CH aromáticos de unidades G formando parte de un acoplamiento bifenilo del tipo 5-5'. Estas identificaciones son útiles para conocer más a fondo la composición de las ligninas estudiadas, siendo importante la síntesis de otros modelos que puedan contribuir a nuevos acoplamientos.

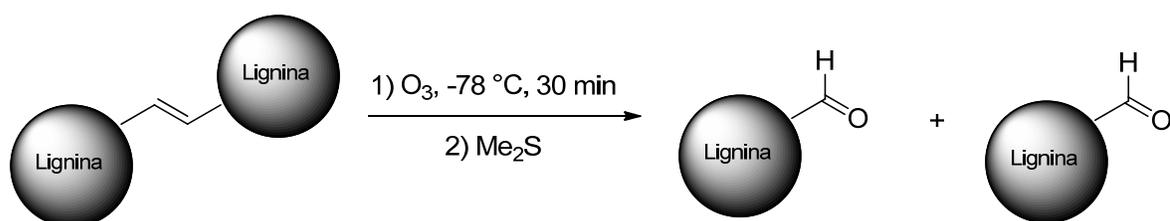
A pesar de las asignaciones logradas, resta asignar una variedad de acoplamientos presentes en cada una de las fracciones. Es importante lograr la identificación de la mayor cantidad de acoplamientos, con el fin de conocer más a fondo la composición de las ligninas y de esa forma poder elaborar una estrategia que permita obtener compuestos de mayor valor a partir de las mismas.

#### 4.4.2. Análisis complementario de lignina Kraft proveniente de UPM

Debido a la mayor homogeneidad de las ligninas Kraft extraídas de LN de UPM, se decidió ampliar el análisis de las mismas mediante el uso de otras técnicas analíticas. Para ello se le realizó a cada una de las fracciones, pirólisis acoplada a GC/MS para determinar la composición relativa de unidades S/G. Asimismo, a la lignina Kraft se la sometió a condiciones de ozonólisis para observar la reactividad de la misma.

##### Ozonólisis de Lignina Kraft UPM

Basándonos en lo descrito en bibliografía sobre la degradación de lignina mediante el uso de ozono,<sup>69,70</sup> nos planteamos realizar dicha reacción sobre la lignina Kraft extraída de LN de UPM. Para ello se utilizaron condiciones de ozonólisis reductiva clásicas (Esquema 22), variando masa de lignina y disolvente utilizado, para evaluar la reactividad de la misma con el ozono (Tabla 15).



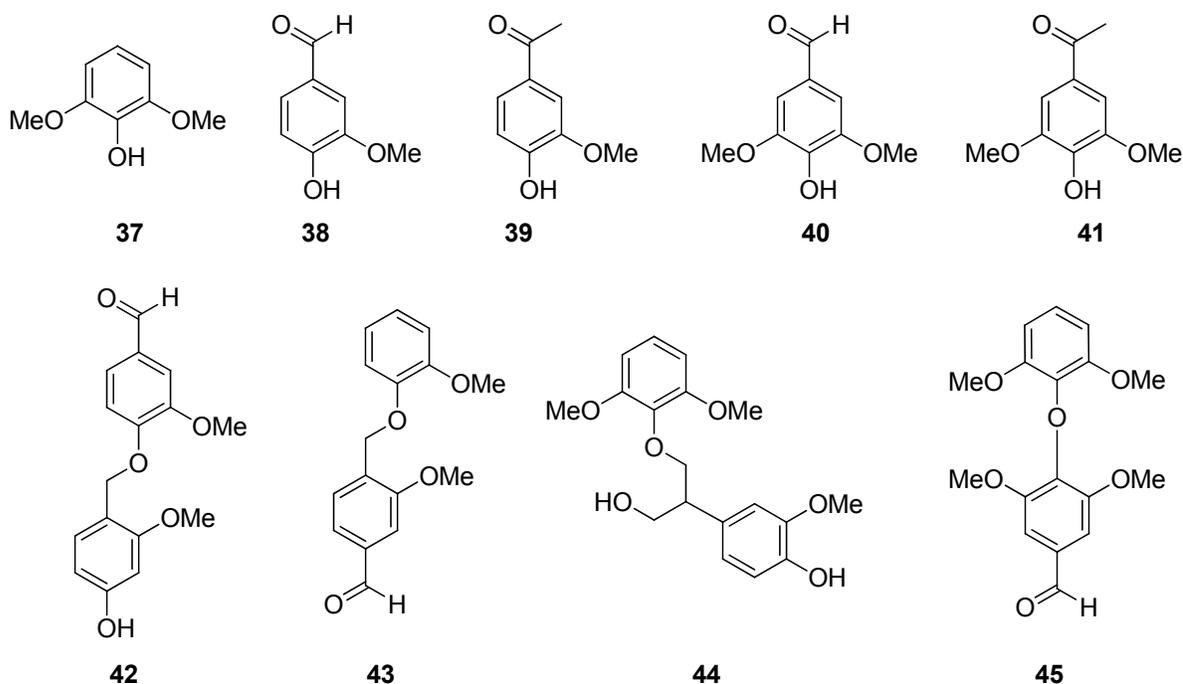
**Esquema 22:** Ozonólisis de lignina Kraft de UPM.

Entrada	Masa de lignina Kraft (g)	Disolvente	Volumen de disolvente (mL)
1	2.80	MeOH	15
2	1.00	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	15
3	0.1	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :MeOH	15 (10:5)

**Tabla 15:** Condiciones de reacción para ozonólisis de lignina Kraft.

Las cantidades de lignina utilizadas variaron desde valores de gramos a miligramos con el fin de observar si la concentración de lignina afectaba a la reacción. Los resultados obtenidos demostraron, que a pesar de utilizar concentraciones bajas de lignina (entrada 3, tabla 15), el porcentaje de degradación no aumentó al disminuir la concentración, recuperando un crudo de reacción  $\leq 10\%$  para las entradas 2 y 3 de la tabla 15.

A pesar de la baja degradación de lignina, la fracción degradada se recuperó del medio de reacción y fue analizada mediante GC-MS para lograr identificar posibles compuestos formados. Luego de dicho análisis se logró identificar un total de 9 compuestos (Figura 19).



**Figura 19:** Compuestos obtenidos mediante oxidación de lignina con ozono.

La determinación de los compuestos **37** a **45** se realizó utilizando la base de datos presente en el espectrómetro de masas donde se inyectaron las muestras. Para el resto de los compuestos la determinación se basó en la abundancia de unidades S y G presentes, los tipos de enlace clásicos encontrados en las ligninas y el nuevo tipo de enlace 4-O-4' determinado para el compuesto **33**. La mayoría de los compuestos identificados son resultado de la ozonólisis reductiva, ya que se trata de aldehídos y cetonas. Sin embargo el compuesto **37** (siringol), seguramente sea resultado de la

---

extracción en los 30 min. de reacción, cuando se utilizó  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  como disolvente. Cuando el disolvente fue MeOH, se obtuvo una disolución prácticamente total de la muestra, pero al momento de purificar el crudo mediante columna cromatográfica, solamente las primeras fracciones eluidas fueron mezclas fácilmente identificables. Esto hace suponer, que aunque la lignina es soluble en MeOH no significa que la misma haya reaccionado con ozono.

Los bajos porcentajes de oxidación de lignina hacen pensar que se necesitan tiempos de reacción más extensos que los 30 min utilizados, para que el ozono reaccione con los dobles enlaces presentes en la misma. Como ya se ha discutido, esta lignina está compuesta mayoritariamente por fragmentos de alto peso molecular y pocos fragmentos de bajo peso molecular. Cuando los compuestos son de alto peso molecular, pueden contar con una disposición espacial compleja, lo que provoca una baja disponibilidad de los dobles enlaces para reaccionar. Si los tiempos de reacción se aumentan, el ozono podría tener la posibilidad de alcanzar dichos dobles enlaces y reaccionar con los mismos. Otra discusión puede centrarse en el contenido de dobles enlaces presentes en la lignina. Se conoce la presencia de los mismos, pero no se tiene un dato certero de la abundancia, por lo que un bajo contenido puede ser otra de las razones de la baja reactividad.

#### Pirólisis de fracciones obtenidas a partir de lignina Kraft de UPM.

La pirólisis es una técnica ampliamente utilizada para degradar macromoléculas orgánicas, entre ellas los distintos biopolímeros presentes en la madera, en compuestos de menor peso molecular. Existe una gran variedad de artículos científicos en los que se describe el uso de pirólisis para la fragmentación de celulosa, hemicelulosa, lignina y madera entera.<sup>71-74</sup> En este contexto, se realizó pirólisis sobre las muestras obtenidas del fraccionamiento de lignina Kraft proveniente de UPM (ver esquema 21). La metodología utilizada fue pirólisis a 450°C, acoplada a cromatografía gaseosa, seguida de espectrometría de masa (Py-GC/MS).

Los resultados obtenidos mediante este proceso se detallan en la tabla 16.

Lignina Kraft UPM		Extracción con CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>		Extracción con Isopropanol		Extracción con EtOH		Extracción con MeOH	
Compuesto	Origen	Compuesto	Origen	Compuesto	Origen	Compuesto	Origen	Compuesto	Origen
Guaiacol	G	Guaiacol	G	Guaiacol	G	Guaiacol	G	Guaiacol	G
4-Vinilguaiacol	G	4-Metilguaiacol	G	4-Metilguaiacol	G	4-Vinilguaiacol	G	4-Vinilguaiacol	G
Siringol	S	4-Vinilguaiacol	G	4-Vinilguaiacol	G	Siringol	S	Siringol	S
4-Metilsiringol	S	Siringol	S	Siringol	S	4-Metilsiringol	S	4-Metilsiringol	S
4-Vinilsiringol	S	4-Metilsiringol	S	4-Metilsiringol	S	4-Vinilsiringol	S	4-Vinilsiringol	S
Siringaldehído	S	Vainillina	S	4-Etilsiringol	S	Acetosiringona	S		
Acetosiringona	S	4-Etilsiringol	S	4-Vinilsiringol	S				
		Acetoguaiacona	G	4-Propenilsiringol	S				
		4-Vinilsiringol	S	Siringaldehído	S				
		4-Propenilsiringol	S	Acetosiringona	S				
		Siringaldehído	S						
		Acetosiringona	G						
Relación S/G 5,10		Relación S/G 3,72		Relación S/G 4,28		Relación S/G 4,18		Relación S/G 3,88	

**Tabla 16:** Resultados de la pirólisis de fracciones 2 a 5 (esquema 21) provenientes de lignina Kraft de UPM.

Mediante esta metodología se logró obtener e identificar una serie de compuestos derivados de la pirólisis de diferentes muestras de lignina, dando un perfil de la abundancia de unidades siringilo (S) y guaiacilo (G) presentes en cada una de ellas. Las moléculas obtenidas derivan de una unidad (S o G), y la abundancia de cada una de ellas resulta en una relación S/G en cada pirólisis.

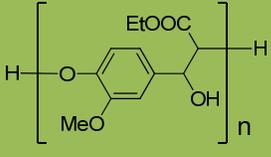
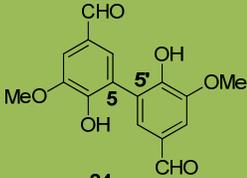
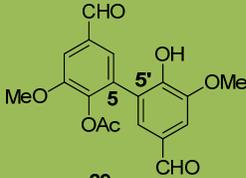
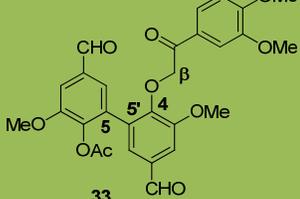
Los resultados obtenidos muestran mayor cantidad de unidades S sobre G, lo que es acorde al tipo de madera y a los resultados obtenidos mediante otras metodologías analíticas descritas. Asimismo, los compuestos identificados luego de la pirólisis corresponden a fragmentos provenientes de lignina, lo que demuestra que el proceso de extracción utilizado es eficiente, ya que no se registraron compuestos como catecoles o benzoquinonas, resultado de ligninas modificadas. Tampoco se observaron fragmentos con contenido de azufre, por lo que se estima que el azufre residual luego del proceso es mínimo.

La proporción S/G es mayor para las fracciones extraídas con isopropanol y EtOH (4.28 y 4.18), que para las obtenidas con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y MeOH (3.72 y 3.78). Por otro lado, la relación S/G obtenida para la lignina Kraft resultó en un valor un tanto mayor a lo esperado según lo descrito en bibliografía.<sup>64,75</sup> Por otro lado, la variedad de compuestos identificados es significativamente menor a la obtenida durante la pirólisis de las fracciones  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  e isopropanol. Este resultado resulta contradictorio, debido a que cada una de las fracciones proviene de la lignina Kraft, entonces lo esperado sería obtener el total de los compuestos obtenidos y no solo una pequeña fracción de los mismos. Los estudios realizados hasta el momento son sobre distintas ligninas y la comparación entre ellas con otras metodologías utilizadas para determinar la relación S/G, pero no se registran trabajos que describan la pirólisis sobre fracciones aisladas mediante estos procedimientos.

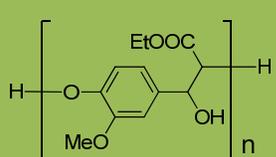
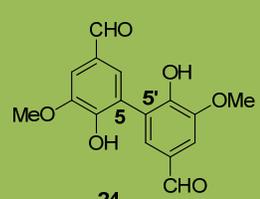
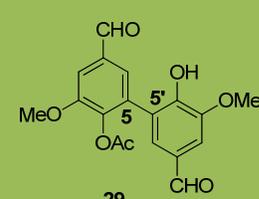
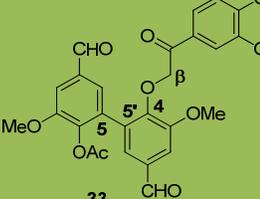
La pirólisis es un proceso que se utiliza fundamentalmente sobre compuestos poliméricos, logrando fragmentar la macromolécula en compuestos de bajo peso molecular. Sin embargo, no es el único proceso que sucede durante la misma, sino que también se registran una serie de reacciones que pueden dar lugar a nuevas estructuras, como reacciones de eliminación, rearrreglos, oxidaciones, entre otras.<sup>72,76</sup> Estas reacciones son resultado de las altas temperaturas que se alcanzan durante la pirólisis, pero también depende de la composición de la mezcla a pirolizar.

Existen una serie de factores termodinámicos que determinan las reacciones que tienen lugar durante el proceso de pirólisis. Durante el mismo la temperatura se mantiene constante, por lo que nos encontramos en condiciones isotérmicas, y además se puede considerar el mismo como un sistema aislado, por lo que termodinámicamente se producirán reacciones espontáneas que lleven consigo un incremento en la entropía del sistema. El sistema formado por la lignina Kraft es significativamente distinto al formado por las fracciones  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  e isopropanol, por lo que las reacciones que tendrán lugar pueden variar en cada uno de los sistemas, generando diferentes productos de reacción. Esta puede ser una de las razones por la cual se obtienen menor variedad de compuestos en la pirólisis de lignina Kraft comparado con las dos primeras fracciones.

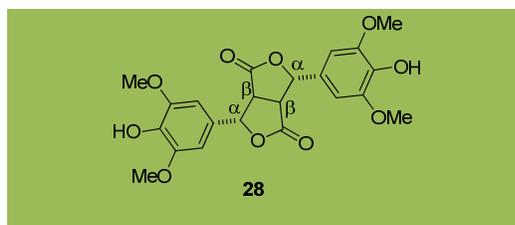
Con el fin de obtener más información acerca de este proceso sobre fracciones de lignina, algunos de los modelos obtenidos mediante síntesis fueron sometidos a las mismas condiciones de pirólisis (Tabla 17 y 18).

 <b>Polímero A</b>	 <b>24</b>	 <b>29</b>	 <b>33</b>
<b>Compuestos identificados</b>	<b>Compuestos identificados</b>	<b>Compuestos identificados</b>	<b>Compuestos identificados</b>
Guiacol	Vainillina	Ácido acético	Benzaldehído
4-hidroxi-3-metoxibenzoato de metilo		Vainillina	3,4-dimetoxibenzaldehído
Acetoguacona			3,4-dimetoxifenilacetona
3,4-dimetoxibenzoato de metilo			
4-hidroxi-3-metoxibenzoato de etilo			

**Tabla 17a:** Fragmentos identificados durante la pirólisis de lignina.

 <b>Polímero A</b>		 <b>24</b>		 <b>29</b>		 <b>33</b>	
Tiempo de retención (min.)	Ion molecular	Tiempo de retención (min.)	Ion molecular	Tiempo de retención (min.)	Ion molecular	Tiempo de retención (min.)	Ion molecular
49.61	193	56.07	330	56.05	330	41.20	165
49.90	177	59.05	214	56.33	316	46.75	165
51.00	235			57.22	191	50.65	358
57.95	286			57.70	274	55.17	340
						56.06	330
						56.37	344

**Tabla 17b:** Fragmentos no identificadas durante la pirólisis de modelos de lignina.



Compuesto	Origen
Siringol	S
2,6-dimetoxi-4-metilfenol	S
4-vinilsiringol	S
Siringaldehído	S
Homosiringaldehído	S

**Tabla 18:** Resultado obtenido para la pirólisis del modelo  $\beta$ - $\beta$  resinol.

Como se muestra en las tablas 17a y 17b, la pirólisis de los modelos **polímero A**, **24**, **29** y **33** muestran que durante la pirólisis existió una fragmentación de los mismos, obteniendo fragmentos que fueron identificados y otros que no se logró su identificación. Los fragmentos identificados, muestran que las rupturas durante la pirólisis se dan fundamentalmente a nivel de la cadena lateral, obteniendo fragmentos que concuerdan con los obtenidos a partir de la pirólisis tanto de la lignina Kraft como de las fracciones de la misma. Por otro lado, se obtuvieron fragmentos con tiempos de retención mayores. Los espectros de masa registrados para cada uno de estos compuestos obtenidos no coincidió con los compuestos presentes en la base de datos del equipo, por lo que no lograron ser identificados (Tabla 17b). Asimismo, el modelo  $\beta$ - $\beta$  resinol **28**, a diferencia del resto, se fragmentó completamente en compuestos identificables y comúnmente obtenidos mediante pirólisis de ligninas.

Los espectros de masas obtenidos aún se encuentran en estudio, con el fin de identificar los compuestos generados a partir de la pirólisis. Una vez identificados dichos compuestos será posible tener un mayor conocimiento de algunas de las reacciones que sufre la lignina durante la pirólisis para así aportar a un mayor entendimiento de los resultados obtenidos.

Durante esta tesis se ha trabajado para lograr un conocimiento de las ligninas Kraft producidas en nuestro país. Cada tipo de lignina Kraft es diferente, y esas diferencias varían según la materia prima de origen, la cual depende de la región en donde se cultive la madera a utilizar, así como también de las modificaciones de ingeniería genética de los cultivos que se realicen. Contar con un conocimiento más amplio de dichas ligninas puede generar un uso de las mismas como materia prima de biocombustibles y otra variedad de biopolímeros de interés.

#### **4.5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- (1) Wallberg, O.; Jönsson, A.-S.; Wimmerstedt, R. *Desalination* **2003**, *154*, 187.
- (2) Wallberg, O.; Linde, M.; Jönsson, A.-S. *Desalination* **2006**, *199*, 413.
- (3) Yuan, T.-Q.; He, J.; Xu, F.; Sun, R.-C. *Polym. Degrad. Stab.* **2009**, *94*, 1142.
- (4) Ibrahim, M. N. M.; Chuah, S. B. *AJSTD* **2004**, *21*, 57.
- (5) dos Santos, P. S. B.; Erdocia, X.; Gatto, D. A.; Labidi, J. *Ind. Crops Prod.* **2014**, *55*, 149.

- (6) Jönsson, A.-S.; Wallberg, O. *Desalination* **2009**, 237, 254.
- (7) Toledano, A.; Serrano, L.; Garcia, A.; Mondragon, I.; Labid, J. *Chem. Eng. J.* **2010**, 157, 93.
- (8) García, A.; Toledano, A.; Serrano, L.; Egüés, I.; González, M.; Marín, F.; Labidi, J. *Sep. Purif. Technol.* **2009**, 68, 193.
- (9) Pouteau, C.; Cathala, B.; Dole, P.; Kurek, B.; Monties, B. *Ind. Crops Prod.* **2005**, 21, 101.
- (10) Sun, R.; Tomkinson, J.; Bolton, J. *Polym. Degrad. Stab.* **1999**, 63, 195.
- (11) Sun, R.; Tomkinson, J.; Jones, G. L. *Polym. Degrad. Stab.* **2000**, 68, 111.
- (12) UPM; <http://www.upm.com/uy/Pages/default.aspx>; 2015.
- (13) Fanapel S.A.; <http://www.fanapel.com.uy/en/>; 2015.
- (14) Pamer S.A., 2015, p <http://www.pamer.com.uy/>.
- (15) Nada, A.-A. M. A.; Yousef, M. A.; Shaffei, K. A.; Salah, A. M. *Polym. Degrad. Stab.* **1998**, 62, 157.
- (16) Nada, A. M. A.; El-Saied, H.; Fadl, M. H.; Nassar, M. *Polym. Degrad. Stab.* **1994**, 43, 55.
- (17) Lin, S. Y.; Dence, C. W. *Methods in lignin chemistry*; Springer: NY, 1992.
- (18) Ragnar, M.; Lindgren, C. T.; Nilvebrant, N.-O. *J. Wood Chem. Technol.* **2000**, 20, 277.
- (19) Ragauskas, A. J.; Williams, C. K.; Davison, B. H.; Britovsek, G.; Cairney, J.; Eckert, C. A.; Jr., W. J. F.; Hallett, J. P.; Leak, D. J.; Liotta, C. L.; Mielenz, J. R.; Murphy, R.; Templer, R.; Tschaplinski, T. *Science* **2006**, 311, 484.
- (20) Chahar, S.; Dastidar, M. G.; Choudhary, V.; Sharma, D. K. *J. Adhesion Sci. Technol.* **2004**, 18, 169.
- (21) Khitrin, K. S.; Fuks, S. L.; Khitrin, S. V.; Kazienkov, S. A.; Meteleva, D. S. *Russ. J. Gen. Chem.* **2012**, 82, 977.
- (22) Feldman, D. In *Chemical Modification, Properties, and Usage of Lignin*; 1st ed.; Hu, T. Q., Ed.; Springer US: New York, 2002, p 81.
- (23) Stewart, D. *Ind. Crops Prod.* **2008**, 27, 202.
- (24) She, X.; Qui, S.; Gu, W.; Pan, X. *J. Chem. Research (S)* **1998**, 436.
- (25) Yue, F.; Lu, F.; Sun, R.; Ralph, J. *Chem. Eur. J.* **2012**, 18, 16402.
- (26) Stanley, J. N. G.; Selva, M.; Masters, A. F.; Maschmeyer, T.; Perosa, A. *Green Chem.* **2013**, 15, 3195.
- (27) Peng, Y.; Song, G. *Green Chem.* **2003**, 5, 704.
- (28) Sinha, A. K.; Sharma, A.; Joshi, B. P. *Tetrahedron* **2007**, 63, 960.
- (29) Simpson, C. J.; Fitzhenry, M. J.; Stamford, N. P. J. *Tetrahedron Lett.* **2005**, 46, 6893.
- (30) Water, R. W. V. D.; Pettus, T. R. R. *Tetrahedron* **2002**, 58, 5367.
- (31) Bouchoux, G. *Chem. Phys. Lett.* **2010**, 495, 192.
- (32) Peng, J.; Li, J.; Qiu, H.; Jiang, J.; Kezhi Jiang; Mao, J.; Lai, G. *J. Mol. Catal. A: Chem.* **2006**, 255, 16.
- (33) Higashimura, T.; Hiza, M.; Hasegawa, H. *Macromolecules* **1979**, 12, 217.
- (34) Jiang, Z.; Sen, A. *Organometallics* **1993**, 12, 1406.
- (35) Lide, D. R. *CRC Handbook of Chemistry and Physics* Boca Raton, 2003-2004.
- (36) Aldabalde, V.; Risso, M.; Derrudi, M. L.; Geymonat, F.; Seoane, G.; Gamnara, D.; Saenz-Méndez, P. *Open J. Phys. Chem.* **2011**, 1, 85.
- (37) Argyropoulos, D. S.; Menachem, S. B. *Adv. Biochem. Eng./Biotechnol.* **1997**, 57, 127.
- (38) Xu, C.; Arancon, R. A.; Labidi, J.; Luque, R. *Chem. Soc. Review* **2014**, 43, 485.
- (39) Kishimoto, T.; Uraki, Y.; Ubukata, M. *Org. Biomol. Chem.* **2008**, 6, 2982.
- (40) Kishimoto, T.; Uraki, Y.; Ubukata, M. *Org. Biomol. Chem.* **2006**, 4, 1343.
- (41) Kishimoto, T.; Uraki, Y.; Ubukata, M. *Org. Biomol. Chem.* **2005**, 3, 1067.
- (42) Ciofi-Baffoni, S.; Banci, L.; Brandi, A. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1998**, 3207.

- (43) Qin, C. X.; Chen, X.; Hughes, R. A.; Williams, S. J.; Woodman, O. L. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 1874.
- (44) Pravast, I. Z., M., Stavber, S. *Green Chem.* **2006**, *8*, 1001.
- (45) Hinklin, R. J.; Kiessling, L. L. *Org. Lett.* **2002**, *4*, 1131.
- (46) Wanga, X.; Li, X.; Xue, J.; Zhao, Y.; Zhang, Y. *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 413.
- (47) Hediger, M. E. *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 4995.
- (48) Zhang, A.; Lu, F.; Sun, R.; Ralph, J. *Planta* **2009**, 229, 1099.
- (49) Ciecholewski, S.; Hammer, E.; Manda, K.; Bose, G.; Nguyen, V. T. H.; Langer, P.; Schauer, F. *Tetrahedron* **2005**, *61*, 4615.
- (50) Amarasekara, A. S.; Wiredu, B.; Razzaq, A. *Green Chem.* **2012**, *14*, 2395.
- (51) Pickel, B.; Constantin, M.-A.; Pfannstiel, J.; Conrad, J.; Beifuss, U.; Schaller, A. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 202.
- (52) Gaménara, D.; Seoane, G. A.; Saenz-Méndez, P.; María, P. D. d. *Redox Biocatalysis: Fundamentals and Applications*; Jhon Wiley and Sons, Inc., 2013.
- (53) Sedai, B.; Díaz-Urrutia, C.; Baker, R. T.; Wu, R.; Silks, L. A. P.; Hanson, S. K. *ACS Catal.* **2011**, *1*, 794.
- (54) Tranchimand, S.; Tron, T.; Gaudin, C.; Iacazio, G. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2006**, *42*, 27.
- (55) Nishimura, R. T.; Giammanco, C. H.; Vosburg, D. A. *J. Chem. Educ.* **2010**, *87*, 526.
- (56) Brown, R. C. D.; Swain, N. A. *Synthesis* **2004**, *6*, 811.
- (57) Syrjänen, K.; Brunow, G. *J. Chem. Soc. Perkin Trans 1* **1998**, 3425.
- (58) Vermes, B.; Seligmann, O.; Wagner, H. *Phytochemistry* **1991**, *30*, 3087.
- (59) Alves, V. L.; Drumond, M. G.; Stefani, G. M.; Cheng, C.-L.; Piló-Veloso, D. *Journal Brazilian Chemical Society* **2000**, *11*, 467.
- (60) Drumond, M. G.; PiloVeloso, D.; Cota, S. D. S.; Morais, S. A. L. d.; Nascimento, E. A. d.; Chen, C.-L. *Holzforchung* **1992**, *46*, 127.
- (61) Berlin, A.; Balakshin, M. In *Bioenergy Research: Advances and Applications*; G. Gupta, M. T., Christian P. Kubicek, Jack Saddler and Feng Xu Ed.; Elsevier: CA, USA, 2014, p 315.
- (62) Hu, J.; Xiao, R.; Shen, D.; Zhang, H. *Bioresour. Technol.* **2013**, *128*, 633.
- (63) Río, J. C. d.; Rencoret, J.; Prinsen, P.; Martínez, Á. T.; Ralph, J.; Gutierrez, A. *J. Agric. Food Chem.* **2012**, *60*, 5922.
- (64) Ibarra, D.; Río, J. C. d.; Gutiérrez, A.; Rodríguez, I. M.; Romero, J.; Martínez, M. a. J.; Martínez, Á. T. *J. Anal. Appl. Pyrolysis* **2005**, *74*, 116.
- (65) Rencoret, J.; Gutiérrez, A.; Nieto, L.; Jiménez-Barbero, J.; Faulds, C. B.; Kim, H.; Ralph, J.; Martínez, Á. T.; Río, J. C. d. *Plant Physiology* **2011**, *155*, 667.
- (66) Gierer, J. *Wood Sci. Technol.* **1980**, *14*, 241.
- (67) Koshijima, T.; Watanabe, T. In *Association Between Lignin and Carbohydrates in Wood and Other Plant Tissues*; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, 2003, p 131.
- (68) Rencoret, J.; Marques, G.; Gutiérrez, A.; Santos, J. I.; Jiménez-Barbero, J.; Martínez, A. T.; C. del Río, J. *Holzforchung* **2009**, *63*, 691.
- (69) Mbachu, D.; Manley, J. *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem* **1981**, *19*, 2053.
- (70) Xin-ping, O.; You-dan, T.; Xue-qing, Q. *J. Fuel. Chem. Technol.* **2014**, *42*, 677.
- (71) Moldoveanu, S. C. *Analytical pyrolysis of natural organic polymers*; Elsevier: Macon, GA, USA, 1998; Vol. 20.
- (72) Liu, C.; Wang, H.; Karim, A. M.; Suna, J.; Wang, Y. *Chem. Soc. Review* **2014**, *43*, 7494.
- (73) Rajic, N.; Logar, N. Z.; Recňnik, A.; El-Roz, M.; Thibault-Starzyk, F.; Sprenger, P.; Hannevold, L.; Andersen, A.; Stöcker, M. *Microporous Mesoporous Mater.* **2013**, *176*, 162.
- (74) Ohra-aho, T.; Gomes, F. J. B.; Colodette, J. L.; Tamminena, T. *J. Anal. Appl. Pyrolysis* **2013**, *101*
- (75) Reina, L.; Galetta, A.; Vinciguerra, V.; Resquin, F.; Menéndez, P. *J. Anal. Appl. Pyrolysis* **2014**, *107*, 284.

(76) Moldoveanu, S. C. *TECHNIQUES AND INSTRUMENTATION IN ANALYTICAL CHEMISTRY*; Elsevier Science B.V.: Amsterdam, 1998; Vol. 20.

## **Capítulo 5**

# **Conclusiones y perspectivas**

## 5.1. **CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS**

### 5.1.1. **Extracción y fraccionamiento de lignina Kraft**

Se logró extraer la lignina presente en distintos LNs de forma eficiente, mediante una metodología que involucra reactivos de bajo costo y un procedimiento de manipulación sencillo. La lignina Kraft extraída se obtuvo con una buena pureza, libre de carbohidratos y de otros componentes presentes en el LN.

Se fraccionó la lignina extraída, utilizando dos procedimientos que involucran disolventes orgánicos de distinta polaridad. El fraccionamiento resultó efectivo, obteniendo mezclas de distinta composición, que se diferencian por la polaridad de sus componentes. De esta forma se obtuvieron un total de 25 fracciones, a las cuales se les realizó un estudio estructural de los fragmentos de lignina que las componen. Asimismo, se lograron aislar de forma pura tres compuestos, dos monómeros y un dímero, que fueron completamente caracterizados.

Para obtener distintas fracciones de lignina pueden realizarse otros procedimientos de fraccionamiento. Se pueden utilizar otro conjunto de disolventes o mezclas de los mismos con el fin de realizar un fraccionamiento selectivo, distinto al obtenido mediante los procedimientos aplicados durante esta tesis. Como perspectivas de trabajo, se plantea entonces ensayar otros disolventes y elaborar nuevos procedimientos de extracción para evaluar los distintos resultados obtenidos.

### 5.1.2. **Análisis estructural de lignina Kraft y fracciones aisladas**

Las distintas ligninas Kraft fueron identificadas y analizadas mediante IR, RMN bidimensional (HSQC) y UV. Se logró un conocimiento del promedio de las unidades (S, G y H) presentes en cada una de las mismas, así como una relación entre las proporciones de los grupos hidroxilo y carbonilo. En todos los casos se determinó que las unidades S son más abundantes que las unidades G, mientras que prácticamente no se registra la presencia de unidades H. Este resultado está de acuerdo con el origen de las ligninas, las cuales provienen de maderas duras (*Eucalyptus spp.*).

Por otro lado, también se analizaron las distintas fracciones mediante las diferentes técnicas analíticas anteriormente mencionadas. De esta forma, se logró determinar que las fracciones obtenidas con disolventes polares cuentan con un mayor contenido de grupos hidroxilo (mayoritariamente fenoles), mientras que las aisladas con disolventes menos polares, tienen un mayor contenido en grupos carbonilo (aldehído, cetona y ácido). De esta forma, el fraccionamiento de lignina mediante esta metodología permitió obtener mezclas ricas en distintos grupos funcionales, lo que resulta de interés para la preparación de distintos tipos de polímeros.<sup>1</sup>

Se logró aislar y elucidar completamente siringol, etilsiringol y un dímero con enlace 4-O-4' no descrito hasta el momento. Este resultado es interesante, ya que se trata de un nuevo tipo de enlace que no se encuentra en ligninas nativas, lo que corrobora reacciones de repolimerización durante el proceso de deslignificación.

El porcentaje de recuperación de compuestos de bajo peso molecular fue bajo, lo que demuestra que el grado de despolimerización de lignina no es significativo, y que como resultado del proceso Kraft se obtiene una mezcla compleja de polímeros y oligómeros.

Mediante el uso de Py-GC/MS se logró confirmar la abundancia relativa entre unidades S y G en ligninas Kraft provenientes de LN de UPM. Se concluye que las fracciones aisladas mediante Isopropanol y EtOH poseen el mayor contenido de unidades S, mientras que las

fracciones obtenidas con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y MeOH contienen un porcentaje menor. Por su parte, la lignina Kraft registró una relación S/G levemente mayor a los resultados descritos hasta el momento por otros autores,<sup>2</sup> lo que indica un alto contenido de unidades S en las maderas de *Eucalyptus* presentes en nuestro país.

El uso de Py-GC/MS sobre modelos de lignina dio resultados difíciles de procesar en la mayoría de los casos. Se plantea realizar la síntesis de los posibles compuestos que pueden formarse durante la pirólisis de estos modelos, logrando de esta manera confirmar su estructura mediante el estudio por GC/MS. Por otro lado, realizar nuevos ensayos de pirólisis sobre otros modelos que puedan brindar información sobre las posibles reacciones que se dan durante la misma, puede complementar el estudio sobre la elucidación de los fragmentos formados.

Debido al grado de despolimerización poco significativo, encontrado en las distintas ligninas Kraft, se propone realizar ensayos de cromatografía de exclusión molecular y la aplicación de otras técnicas, que permitan conocer el peso molecular promedio de las distintas fracciones aisladas durante esta tesis.

### 5.1.3. Degradación de lignina Kraft

Se realizó la ozonólisis de lignina Kraft proveniente de UPM obteniendo un grado de despolimerización bajo y la identificación de 9 productos, mediante GC/MS. Se concluye que la lignina puede contener un alto grado de fracciones de alto peso molecular, con un ordenamiento espacial complejo que no permite el acceso de ozono a los dobles enlaces presentes, o una baja proporción de dobles enlaces en las estructuras que la componen. Sin embargo, restan ensayar otros tiempos de ozonólisis para confirmar los resultados obtenidos hasta el momento.

Se propone realizar otros ensayos de degradación, utilizando otros reactivos y metodologías conocidas. Entre las metodologías más utilizadas se plantea el uso de enzimas, tanto lacasas como peroxidasas, que logren degradar la lignina en fracciones de menor peso molecular. Un estudio de la capacidad de estas enzimas para degradar las distintas muestras de lignina, ofrecerá mayor información sobre la composición estructural de esta última.

### 5.1.4. Síntesis de derivados fenilpropanoides

Se realizó el estudio de la reacción de Knoevenagel-Doebner con distintos disolventes y proporciones de piperidina y piridina. Se logró obtener el ácido  $\alpha,\beta$ -insaturado en la mayoría de los casos con rendimientos buenos a excelentes. En las condiciones clásicas de reacción (19 eq. de piridina), cuando el benzaldehído de partida se encontró sustituido por un grupo hidroxilo en posición *para*, se obtuvo como producto el vinilfenol en lugar del ácido correspondiente. Es así que se elaboró una estrategia para obtener vinilfenoles en buenos rendimientos, a partir de 4-hidroxibenzaldehídos.

Cuando los benzaldehídos se encontraron sustituidos en posición *orto* del anillo, se obtuvo una mezcla de la cumarina correspondiente, vinilfenol y un nuevo compuesto, a partir de 2-hidroxibenzaldehído, que fue identificado como el producto resultante de la reacción de dos moléculas de piperidina con un intermedio de reacción metiluroquinónico. La formación de este compuesto mediante la condensación de Knoevenagel es un resultado novedoso. Complementariamente se realizó difracción de RX, confirmando la estructura previamente elucidada por RMN, encontrando que la misma no se encuentra descrita hasta el momento mediante esta técnica.

Por otro lado, cuando la reacción se llevó a cabo en condiciones distintas a la de los métodos convencionales, utilizando, por ejemplo, agua como disolvente, se obtuvo el dímero derivado del vinilfenol correspondiente.<sup>3</sup>

Los estudios realizados durante esta tesis, permitieron formular un mecanismo alternativo para la reacción de Knoevenagel-Doebner, diferente al planteado hasta el momento, basado en evidencias experimentales sobre el papel del catalizador y del disolvente.<sup>3,4</sup>

### 5.1.5. Síntesis de modelos de lignina

Se sintetizaron un total de 6 modelos de lignina que contienen los enlaces del tipo:  $\beta$ -O-4,  $\beta$ - $\beta$  resinol,  $\beta$ -5 ( $\alpha$ -O-4) y 5-5'.

Se utilizaron estrategias alternativas, incorporando pasos de reacción de "química verde", para la síntesis del modelo  $\beta$ -O-4, obteniendo buenos resultados.

Se obtuvo el modelo  $\beta$ -5 partiendo de ferulato de etilo (**20**) con un rendimiento de 17% de producto aislado, no registrado hasta el momento mediante el uso de HRPO.

Se analizó la estructura del dímero 5-5' de divainillina obtenido a los 15 min. mediante difracción de rayos X de polvo, determinando un cambio de solubilidad debido a la formación de una triple red interpenetrante sostenida por interacciones  $\pi$ - $\pi$ , y una compleja red de enlaces de hidrógeno C=O $\cdots$ H-O que vuelven al sólido insoluble en las condiciones ensayadas.

La estructura de los compuestos sintetizados se elucidó mediante espectroscopía de RMN, obteniendo tablas de acoplamiento para los distintos HSQC, que sirvieron como base de datos para comparar con los acoplamientos obtenidos de las distintas fracciones de lignina aisladas. Mediante la comparación de las señales en el HSQC, se lograron identificar acoplamientos del tipo C-H aromático formando parte de una estructura bifenilo, y un acoplamiento característico de CH=CH conjugado a un anillo aromático.

Como trabajo futuro se plantea la preparación de otros modelos que contengan otros tipos de enlace presente en la lignina, o los mismos tipos de enlace con diferentes patrones de sustitución. La síntesis de los mismos permite ampliar la biblioteca de señales registradas mediante RMN, tanto uni- como bidimensional, permitiendo ampliar la base de datos de acoplamientos  $\delta_C/\delta_H$  para el estudio de estas y otras ligninas.

## 5.2. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) Stewart, D. *Ind. Crops Prod.* **2008**, *27*, 202.
- (2) Ibarra, D.; Río, J. C. d.; Gutiérrez, A.; Rodríguez, I. M.; Romero, J.; Martínez, M. a. J.; Martínez, Á. T. *J. Anal. Appl. Pyrolysis* **2005**, *74*, 116.
- (3) Aldabalde, V.; Risso, M.; Derrudi, M. L.; Geymonat, F.; Seoane, G.; Gaménara, D.; Saenz-Méndez, P. *Open J. Phys. Chem.* **2011**, *1*, 85.
- (4) Bermúdez, E.; Ventura, O. N.; Méndez, P. S. *J. Phys. Chem.* **2010**, *114*, 13086.

## **Capítulo 6**

### **Parte Experimental**

## 6. PARTE EXPERIMENTAL

### 6.1. GENERALIDADES

Los reactivos utilizados fueron de procedencia comercial (Aldrich, Fluka, Across y Baker). En los casos en que el material de partida fue lignina Kraft, ésta fue extraída del Licor Negro (LN) suministrado por las tres empresas de procesamiento de pulpa de celulosa instaladas en Uruguay: Fanapel, Pamer y UPM.

Los disolventes fueron previamente destilados. El tetrahidrofurano, dietiléter y tolueno anhidros son destilados sobre sodio en presencia de benzofenona. El diclorometano anhidro es destilado sobre pentóxido de fósforo. Otros disolventes anhidros fueron secados y purificados según bibliografía especializada.<sup>1</sup>

Todas las reacciones en condiciones anhidras fueron llevadas a cabo en atmósfera de nitrógeno utilizando las técnicas estándar de eliminación de aire y humedad.

Los avances de reacción fueron examinados por cromatografía en capa fina, utilizando como fase estacionaria Sílica-gel 60, Merck o Fluka, con indicador fluorescente (254 nm) en placas comerciales de 0,20 mm de espesor (Kieselgel HF254). Se utilizaron como métodos de revelado: i) exposición a la luz ultravioleta (254 nm); ii) exposición a vapores de yodo; iii) asperjado y posterior quemado de la placa con reveladores como anisaldehído y ácido fosfomolibdico.

La purificación de los productos fue realizada por cromatografía en columna utilizando como fase estacionaria Sílica Gel para cromatografía "flash" (Merck, grado 60, 230-400 mesh; Scientific Adsorbents, grado 60, 32-63 mesh).

Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de protón y de carbono 13 de los compuestos fueron realizados en un equipo Bruker Avance DPX-400 (a 400 y 100 MHz, respectivamente). Los desplazamientos químicos de  $^1\text{H}$  ( $\delta$ ) se expresan en ppm utilizando tetrametilsilano como referencia interna (0,00 ppm). Los desplazamientos químicos de  $^{13}\text{C}$  ( $\delta$ ) se expresan en ppm y son referidos a la línea central del triplete correspondiente al  $\text{CDCl}_3$  (77,0 ppm). Los experimentos fueron realizados a 30 °C, utilizando  $\text{CDCl}_3$ , Acetona- $\text{d}_6$  o  $\text{DMSO-d}_6$ ; como disolventes, cuando no se indican otras condiciones de temperatura o disolvente.

Los experimentos de HSQC de las ligninas fueron llevados a cabo en un espectrómetro Bruker AVANCE III 400 equipado con una sonda BBO(F) Plus operando a frecuencias de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  de 400.13 y 100.62 MHz, respectivamente, o en un espectrómetro Bruker AVANCE III 500 equipado con una sonda TXI operando a frecuencias de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  de 500.13 y 125.62 MHz, respectivamente. Todas las medidas se realizaron a 25 °C utilizando secuencias de pulso estándar y  $\text{DMSO-d}_6$  como disolvente.

Los espectros de infrarrojo (IR) fueron realizados en dos equipos: i) un espectrofotómetro Shimadzu FT-IR 8101<sup>a</sup> y ii) un espectrofotómetro Shimadzu FT-IR modelo IR prestige-21, en film sobre pastillas de bromuro de potasio comerciales o en celdas para líquidos, con el disolvente indicado. Las frecuencias de absorción se indican en  $\text{cm}^{-1}$ .

Los espectros de masa de inyección directa (ID-MS) y GC-MS se realizaron en un equipo Shimadzu GC-MS-QP2010 ultra, con una columna HP-5MS. Los programas utilizados se describen para cada caso.

Los espectros de ultravioleta (UV) se realizaron en un espectrofotómetro de UV visible Thermocientific Evolution 60s. El programa utilizado tuvo un barrido de 200-500 nm y un ancho de banda de 2 nm.

Se utilizó lacasa comercial aislada desde *Trametes versicolor* (EC 1.10.3.2), proveniente de Sigma. La actividad enzimática fue determinada mediante la oxidación de 2,2'-bis(ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS) como sustrato. La mezcla de reacción contenía 1.0mL de solución de ABTS 0.5 mM en buffer acetato (pH 4.7) 0.1 M, y la cantidad necesaria de enzima. La oxidación de ABTS se siguió mediante el incremento de la absorbancia a 420 nm, en un espectrofotómetro Shimadzu UV-VIS 160. La actividad de la enzima fue expresada como la cantidad de enzima necesaria para oxidar 1  $\mu\text{mol}$  de ABTS por minuto.

Se utilizó peroxidasa comercial aislada de raíces de rábano picante (*Armoracia rusticana*, HRP del inglés horseradish peroxidase) proveniente de Sigma (HRPO, tipo VI-A, EC 1.11.1.7). La actividad enzimática se determinó según método de Shannon et al. (1966) usando *o*-dianisidina como sustrato.<sup>2</sup> Para ello la muestra sólida comercial se disolvió en buffer 50 mM fosfato pH 6.0 (buffer de actividad) y la medida de actividad se siguió mediante registro continuo durante 2 minutos a 460 nm en espectrofotómetro Shimadzu UV-VIS 160. Se definió la unidad de enzima (UE) como la cantidad de enzima capaz de oxidar 1  $\mu\text{mol}$  de sustrato por minuto en las condiciones de reacción. Se usó un coeficiente de extinción molar de  $1,13 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  para la *o*-dianisidina oxidada.

Para las pirólisis se utilizó Py-GC/MS. Pirolizador: PYROJECTOR II (SGE), temperatura de las pirólisis 450°C. GC: Hewlett-Packard 5890 II plus conectado a un espectrómetro de masas (Hewlett-Packard 5971 massselective detector). Temperatura del inyector 250°C, temperatura del detector 290°C. Programa de temperatura del GC: Ti=45°C/ 4min, 45-240°C a 4°C/min, 240-280°C a 25°C/min, y se mantiene la temperatura por 5min.

La medida de difracción de rayos X fue realizada en un Difractómetro Bruker D8 Venture a temperatura ambiente controlado por el software APEX2. La resolución estructural se realizó utilizando el programa SHELXT,<sup>3</sup> y el refinamiento se realizó utilizando el programa SHELXL en el entorno gráfico SHELXLE.<sup>4,5</sup>

## **6.2. PROCEDIMIENTOS DE EXTRACCIÓN DE LIGNINA KRAFT A PARTIR DE LICOR NEGRO (LN)**

### **6.2.1. Procedimiento 1: Extracción de lignina Kraft a pH=2**

A 50 g de LN concentrado se le agregó agua hasta obtener una disolución tratable, y la misma se llevó a pH 7 mediante el agregado de HCl 6M. Luego de la neutralización, se agregó 4 veces en volumen EtOH 95% y se precipitaron productos de degradación de polisacáridos y cenizas. La suspensión se filtró a vacío, se evaporó el EtOH por destilación a presión reducida, y a la solución acuosa resultante se le agregó HCl 6M hasta pH 2. La lignina precipitada se filtró a vacío, se lavó con agua acidulada a pH 2 y por último se extrajo con

hexanos en Soxhlet durante 6h para quitar residuos apolares, obteniendo lignina Kraft (ver esquema 1 de capítulo 4).

### 6.2.2. Procedimiento 2: Extracción de lignina Kraft a distintos valores de pH

A 50g de LN concentrado se le agregó agua hasta obtener una solución tratable, y la solución resultante se llevó a pH 7 mediante el agregado de HCl 6M. Luego de la neutralización, se agregó 4 veces en volumen EtOH 95% y se precipitaron productos de degradación de polisacáridos y cenizas. La suspensión se filtró a vacío, se evaporó el EtOH por destilación a presión reducida y a la solución acuosa resultante se le agregó HCl 6M disminuyendo el pH a 6, 4 y 2 respectivamente, con filtraciones sucesivas entre cada disminución de pH. Las distintas fracciones de lignina precipitada se filtraron a vacío, se lavaron con agua acidulada a pH 2 y por último se extrajeron con hexanos en Soxhlet durante 6h para quitar residuos apolares, obteniendo tres fracciones de lignina Kraft precipitada a distintos pH (F1, F2 y F3) (ver esquema 2 capítulo 4).

#### Fracción F1

**IR**<sub>vmax</sub> (KBr)/cm<sup>-1</sup>: 833; 1034; 1115; 1219; 1331; 1426; 1458; 1518; 1611; 2347; 2843; 2940; 3440.

**UV** (25 °C, MeOH): λ=214 nm (Abs=0.64); 274 nm (Abs=0.19).

#### Fracción F2

**IR**<sub>vmax</sub> (KBr)/cm<sup>-1</sup>: 1035; 1115; 1217; 1329; 1426; 1458; 1518; 1610; 2840; 2930; 3400.

**UV** (25 °C, MeOH): λ=215 nm (Abs=0.518).

#### Fracción F3

**IR**<sub>vmax</sub> (KBr)/cm<sup>-1</sup>: 829; 1032; 1111; 1213; 1327; 1424; 1456; 1514; 1603; 2348; 3566.

**UV** (25 °C, MeOH): 210 nm (Abs=0.77); 274 (Abs=0.18).

### 6.3. ANÁLISIS Y EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS DE BAJO PESO MOLECULAR A PARTIR DE LIGNINA KRAFT

#### 6.3.1. Extracción de lignina Kraft con distintos disolventes orgánicos y posterior fraccionamiento mediante columna cromatográfica

2,5 g de la lignina Kraft aislada se colocaron en un balón con 30 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> o AcOEt, y se dejó agitando durante 24h. La solución resultante se filtró a vacío en Büchner y el disolvente se destiló a presión reducida. Al crudo obtenido se purificó por columna cromatográfica (Silica gel flash, distintas fases móviles Hex:AOEt). Los compuestos aislados y las mezclas obtenidas (fracciones 1-4 para CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y fracciones 1-3 para AcOEt) se analizaron mediante RMN.

#### Siringol

**<sup>1</sup>H-RMN** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ= 3.89 (s, 6H); 5.50 (sa, 1H); 6.59 (d, *J*=8.3 Hz, 2H); 6.80 (dd, *J*<sub>1</sub>=7.9 *J*<sub>2</sub>=8.7 Hz, 1H).

**<sup>13</sup>C-RMN** (100MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ= 56.4 (OMe); 105.1 (Ar); 119.2 (Ar); 135.1 (Ar); 147.4 (Ar).

### Etilsiringol

**<sup>1</sup>H-RMN** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ=1.23 (t, *J*=7.6 Hz, 3H); 2.58 (c, *J*=7.6 Hz 2H); 3.88 (s, 6H); 5.34 (sa, 1H); 6.43 (s, 2H).

### 4-(4-acetil-2,6-dimetoxifenoxi)-3,5-dimetoxibenzaldehído

**<sup>1</sup>H-RMN** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ= 2.57 (s, 3H); 3.96 (s, 3H); 3.97 (s, 3H); 7.15 (s, 2H); 7.25 (s, 2H); 9.82 (s, 1H).

**<sup>13</sup>C-RMN** (100MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ= 26.3 (CH<sub>3</sub>); 56.5 (OMe); 105.7 (Ar); 106.7 (Ar); 128.4 (Ar); 128.8 (Ar); 139.7 (Ar); 140/8 (Ar); 146.7 (Ar); 147.3 (Ar); 190.8 (CHO); 196.6 (CO).

**GC:** t<sub>r</sub>=2.193 min. **EM** (IE, 70eV) *m/z* (%): 196 (43, M+); 182 (49, M+); 181 (100, M+); 167 (6, M+); 153 (19, M+); 139 (7, M+); 123 (6, M+); 111 (7, M+); 93 (12, M+); 79 (8, M+); 65 (14, M+).

### Fracciones de extracción con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>

**HSQC fracción 1** δ<sub>C</sub>/δ<sub>H</sub>: 9.7/1.28; 29.7/1.27; 26.4/2.58; 56.5/3.90; 56.5/3.97; 76.9/7.27; 104.0/6.74; 105.3/6.61; 107.9/7.04; 108.9/7.45; 109.7/7.56; 114.4/7.06; 113.7/6.97; 114.0/6.91; 119.1/6.83; 120.2/7.01; 124.2/7.56; 126.8/6.90; 128.2/7.45; 191.2/9.85; 192.3/3.98; 191.9/3.39 ppm.

**HSQC fracción 2** δ<sub>C</sub>/δ<sub>H</sub>: 22.8/1.60; 25.9/2.59; 29.6/1.27; 56.5/3.96; 56.9/3.85; 103.1/6.75; 104.5/6.44; 106.0/7.26; 106.9/7.17; 107.5/5.86; 108.2/7.03; 110.8/6.72; 114.3/6.90; 114.8/6.91; 127.3/6.90; 128.6/7.34; 191.2/9.83; 193.3/3.99; 119.9/7.00 ppm.

**HSQC fracción 3** δ<sub>C</sub>/δ<sub>H</sub>: 21.3/2.07; 53.8/3.12; 56.5/3.90; 60.6/4.13; 69.9/3.35; 71.0/4.16; 71.8/3.91; 71.4/4.30; 82.3/4.87; 86.4/4.75; 88.2/4.44; 102.8/6.61; 103.6/6.78; 104.3/6.85; 104.7/6.49; 114.4/6.90 ppm.

**HSQC fracción 4** δ<sub>C</sub>/δ<sub>H</sub>: 13.4/1.25; 20.7/2.07; 29.1/1.27; 56.3/3.90; 56.5/3.96; 60.2/4.13; 77.0/7.29; 102.6/6.60; 103.8/6.85; 104.5/6.85; 104.5/6.41; 104.9/6.49; 106.7/7.24; 113.9/6.86; 126.7/7.85 ppm.

### Fracciones de extracción con AcOEt

**HSQC fracción 1** δ<sub>C</sub>/δ<sub>H</sub>: 3.7/3.97; 9.6/1.27; 22.3/1.59; 24.6/1.23; 25.7/2.59; 29.3/1.28; 56.5/3.85; 56.7/3.97; 103.2/6.75; 104.6/6.44; 105.1/6.60; 106.0/7.26; 106.7/7.17; 107.5/5.87; 108.1/7.03; 108.9/7.44; 109.9/7.55; 114.4/7.06; 114.6/6.92; 119.2/6.81; 120.2/7.01; 124.3/7.55; 126.7/6.89; 128.3/7.43; 189.5/1.27; 192.5/2.59; 191.2/3.96; 195.5/4.00; 191.4/9.84 ppm.

**HSQC fracción 2** δ<sub>C</sub>/δ<sub>H</sub>: 7.4/2.60; 10.2/1.33; 113.4/1.25; 16.6/2.41; 21.0/2.06; 22.0/1.59; 25.4/2.59; 29.1/1.27; 35.9/2.45; 53.4/3.94; 55.9/3.92; 59.7/3.94; 60.1/4.13; 70.5/3.88; 82.0/34.87; 87.5/4.44; 102.3/6.60; 103.0/6.77; 104.2/6.44; 105.5; 7.26; 105.6/6.71; 106.6/7.16; 108.4/6.91; 110.3/6.76; 114.1/6.90; 119.6/7.00; 111.6/6.45; 120.0/6.77; 125.4/7.24; 126.7/6.89; 127.8/7.42; 128.6/7.32; 191.0/9.82 ppm.

**HSQC fracción 3  $\delta_c/\delta_H$ :** 13.6/1.25; 20.6/2.03; 35.8/2.46; 53.3/3.87; 56.1/3.88; 59.6/3.88; 59.7/4.11; 71.0/3.88; 71.4/4.28; 81.8/4.85; 86.2/4.74; 87.8/4.42; 102.5/6.60; 104.2/6.85; 104.6/6.45; 106.9/7.14; 107.8/7.22; 114.1/6.83; 126.6/7.83; 129.1/7.86 ppm.

### 6.3.2. Extracción de lignina Kraft con disolventes orgánicos de polaridad creciente

3.0 g de lignina Kraft se colocaron en un equipo Soxhlet y se extrajo durante 6h con un volumen de 150 mL de Et<sub>2</sub>O. El extracto se concentró por destilación del disolvente a presión reducida y fue analizado mediante IR y RMN. El residuo resultante de la extracción se volvió a colocar en un equipo Soxhlet con 150 mL del siguiente disolvente y el procedimiento se repitió con cada uno de los disolventes elegidos (ver esquema 21 capítulo 4). A los extractos obtenidos se los analizó por RMN (HSQC), IR, y Py-GC/MS (sólo para el caso de lignina Kraft de UPM).

Dicho procedimiento se realizó sobre 3 ligninas Kraft:

- Lignina proveniente de UPM
- Lignina proveniente de Pamer
- Lignina proveniente de Fanapel

Los disolventes utilizados en cada extracción fueron:

- Et<sub>2</sub>O (extracto 1)
- CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (extracto 2)
- Isopropanol (extracto 3)
- EtOH (extracto 4)
- MeOH (extracto 5)

#### **Extractos 1 a 5, obtenidos a partir de lignina Kraft UPM.**

**HSQC lignina sin extraer,  $\delta_c/\delta_H$ :** 10.0/0.86; 19.2/1.06; 21.2/1.19; 21.6/1.92; 26.8/2.52; 29.1/1.27; 36.5/2.47; 40.1/2.50; 56.3/3.74; 59.1/3.27; 60.3/3.77; 60.6/3.40; 66.5/3.47; 71.1/3.77; 104.4/6.61; 106.0/6.52; 105.8/6.69; 107.0/7.23; 115.6/6.73 ppm.

**IR<sub>vmax</sub> (KBr)/cm<sup>-1</sup>:** 829; 912; 1032; 1115; 1215; 1329; 1425; 1518; 1611; 2841; 2938; 3327; 3370; 3385; 3404; 3422.

**HSQC extracto 1,  $\delta_c/\delta_H$ :** 9.9/0.89; 14.4/0.85; 14.6/1.18; 20.9/1.25; 21.4/1.92; 24.9/1.49; 26.8/2.53; 27.0/2.00; 27.4/1.55; 27.5/1.66; 29.2/2.43; 29.2/1.22; 30.8/1.36; 31.1/2.09; 31.8/1.23; 33.9/2.19; 36.1/2.45; 40.1/2.50; 48.9/3.19; 52.7/4.61; 56.3/3.75; 56.3/3.83; 59.9/3.93; 60.5/3.74; 60.5/3.64; 60.7/3.40; 63.0/3.45; 63.3/3.59; 65.3/4.27; 66.1/4.06; 66.5/3.47; 71.1/3.89; 71.5/4.16; 71.5/3.78; 74.4/4.45; 77.6/4.41; 81.8/4.77; 85.7/4.62; 87.5/4.33; 104.3/6.81; 105.2/7.02; 105.8/6.43; 106.1/6.59; 107.0/7.22; 111.1/7.39; 111.6/7.44; 112.7/6.90; 115.8/6.74; 116.2/7.39; 118.7/6.69; 121.1/6.74; 122.5/7.78; 122.9/7.98; 123.6/7.50; 126.5/7.42; 128.2/7.95; 129.0/7.53; 131.1/7.93; 131.8/7.54; 132.1/7.59; 132.1/8.25; 143.2/7.74 ppm.

**IR<sub>v</sub>max** (KBr)/cm<sup>-1</sup>: 824; 1032; 1115; 1215; 1283; 1329; 1425; 1462; 1518; 1607; 1665; 1717; 2849; 2938; 3337.

**HSQC extracto 2, δ<sub>C</sub>/δ<sub>H</sub>**: 10.0/0.88; 14.9/1.15; 21.4/1.92; 21.4/1.24; 22.6/1.51; 26.7/2.52; 28.9/1.24; 35.0/2.37; 35.9/2.01; 35.6/1.75; 39.5/3.31; 40.3/2.51; 45.7/2.28; 46.8/2.56; 47.9/3.90; 49.1/3.17; 49.8/3.36; 52.7/4.60; 53.5/3.75; 55.8/2.84; 56.4/3.75; 60.7/3.74; 66.7/3.46; 70.7/3.76; 71.5/4.16; 74.5/4.44; 81.7/4.76; 85.7/4.62; 87.6/4.32; 105.2/7.00; 105.5/6.60; 106.9/7.23; 111.6/7.43; 112.6/6.90; 115.7/6.72; 120.4/6.59; 123.6/7.51; 125.7/7.80; 126.6/7.28; 126.4/6.97; 128.5/8.05; 146.2/8.80 ppm.

**IR<sub>v</sub>max** (KBr)/cm<sup>-1</sup>: 829; 912; 1032; 1113; 1213; 1329; 1425; 1452; 1518; 1611; 2372; 2841; 2936; 3422.

**HSQC extracto 3, δ<sub>C</sub>/δ<sub>H</sub>**: 9.9/0.87; 20.8/1.24; 25.9/1.04; 26.1/1.24; 27.6/1.54; 27.6/1.65; 29.4/2.42; 29.4/1.24; 33.9/2.21; 35.4/1.97; 35.7/2.44; 36.7/2.21; 40.3/2.51; 40.2/2.66; 40.4/2.85; 39.7/3.31; 46.6/2.55; 48.8/3.15; 52.7/4.60; 56.4/3.74; 58.7/3.74; 60.0/3.91; 60.8/3.38; 62.5/3.78; 63.2/3.57; 63.2/3.45; 66.0/3.56; 66.3/3.43; 66.3/4.04; 70.0/3.93; 71.0/3.88; 71.6/4.12; 74.4/4.44; 77.7/4.40; 105.0/6.92; 105.2/6.98; 105.8/6.42; 107.0/7.21; 112.5/6.77; 115.6/6.70; 120.6/6.64 ppm.

**IR<sub>v</sub>max** (KBr)/cm<sup>-1</sup>: 829; 1034; 1115; 1213; 1329; 1458; 1518; 1611; 1707; 2372; 2843; 2936; 3422.

**HSQC extracto 4, δ<sub>C</sub>/δ<sub>H</sub>**: 14.6/1.16; 19.0/1.06; 21.1/1.21; 29.3/1.23; 34.0/2.17; 35.6/1.99; 36.3/2.24; 36.3/2.46; 37.8/2.65; 40.2/2.51; 46.8/2.56; 48.9/3.17; 52.9/4.61; 56.3/3.73; 59.6/3.33; 60.3/3.68; 62.3/3.72; 66.4/3.45; 70.7/4.01; 71.4/4.17; 71.6/3.81; 72.4/4.85; 74.3/4.44; 85.5/4.62; 105.8/6.50; 106.5/7.22; 108.9/7.02; 108.9/6.94; 109.6/6.81; 111.7/7.26; 114.2/6.91; 115.7/6.71; 119.7/6.91; 120.7/6.62; 120.8/6.36; 123.1/7.62; 123.3/7.53; 126.3/7.53; 129.3/7.55; 132.1/7.63 ppm.

**IR<sub>v</sub>max** (KBr)/cm<sup>-1</sup>: 829; 1035; 1115; 1217; 1329; 1325; 1452; 1518; 1611; 2372; 2841; 2938; 3422.

**HSQC extracto 5, δ<sub>C</sub>/δ<sub>H</sub>**: 29.4/1.23; 36.8/2.22; 40.1/2.51; 48.7/3.27; 49.0/3.18; 51.8/3.56; 56.3/3.72; 59.6/3.23; 60.5/3.63; 63.8/3.44; 64.0/3.26; 71.4/4.18; 71.7/3.80; 85.8/4.63; 104.5/6.65; 105.8/6.35; 106.7/7.22; 111.4/6.87; 112.5/6.70; 115.6/6.68; 119.3/6.79; 120.3/6.67; 122.7/7.79; 128.2/7.97; 128.8/7.53; 131.9/7.54 ppm.

**IR<sub>v</sub>max** (KBr)/cm<sup>-1</sup>: 1036; 1115; 1217; 1329; 1329; 1458; 1508; 1604; 2372; 2934; 3422.

### ***Extractos 1 a 5, obtenidos a partir de lignina Kraft Fanapel.***

**HSQC lignina sin extraer, δ<sub>C</sub>/δ<sub>H</sub>**: 26.6/2.53; 29.5/1.23; 33.9/2.22; 40.0/2.50; 56.3/3.73; 59.3/3.26; 60.4/3.68; 71.1/3.77; 71.5/4.15; 85.9/4.62; 104.0/6.62; 105.9/6.53; 106.7/7.24; 112.6/6.83; 115.6/6.73 ppm.

**IR<sub>v</sub>max** (KBr)/cm<sup>-1</sup>: 829; 912; 1033; 1115; 1155; 1215; 1329; 1425; 1460; 1518; 1572; 1611; 1719; 1841; 2937; 3003; 3246; 3267; 3387; 3404.

**HSQC extracto 1, δ<sub>C</sub>/δ<sub>H</sub>**: 7.8/1.30; 9.9/0.88; 14.3/0.85; 19.2/0.93; 19.9/0.88; 20.9/1.23; 21.4/2.18; 21.5/1.91; 22.4/1.51; 25.0/1.48; 26.5/1.31; 26.7/2.53; 26.7/2.48; 26.9/1.99; 27.8/1.61; 28.0/1.40; 28.8/1.49; 29.3/1.23; 29.2/2.42; 30.8/1.35; 31.1/2.08; 31.7/1.23;

34.2/2.18; 40.1/2.50; 52.3/3.15; 54.1/3.05; 56.4/3.74; 56.4/3.83; 59.3/3.29; 59.9/3.91; 60.9/3.38; 63.0/3.57; 63.1/3.45; 66.2/4.04; 70.1/3.50; 70.8/4.09; 71.1/3.88; 71.2/3.76; 71.5/4.01; 81.8/4.75; 85.8/4.61; 87.5/4.31; 104.0/6.60; 104.4/6.81; 104.9/6.92; 105.1/7.00; 105.4/6.52; 105.7/6.43; 105.9/6.59; 106.2/6.17; 106.9/7.22; 107.2/6.75; 107.8/7.14; 108.1/7.04; 111.1/7.39; 111.5/7.43; 115.5/6.85; 115.5/6.70; 123.7/7.50; 125.4/6.86; 126.4/7.42 ppm.

$IR_{v_{max}}$  (KBr)/ $cm^{-1}$ : 829; 1034; 1115; 1215; 1329; 1452; 1516; 1611; 1719; 2845; 2928; 3424.

**HSQC extracto 2,  $\delta_C/\delta_H$ :** 9.1/1.17; 14.3/0.85; 21.1/1.24; 21.5/1.91; 22.4/1.51; 22.4/1.24; 24.9/1.48; 26.8/2.52; 26.7/2.49; 27.1/1.99; 29.4/1.22; 31.3/2.08; 34.0/2.18; 40.0/2.50; 49.8/3.36; 51.8/3.62; 54.1/3.74; 54.2/3.06; 54.3/2.83; 56.3/3.74; 56.6/3.83; 59.3/3.28; 60.1/3.40; 60.3/3.62; 68.3/3.46; 69.3/3.10; 70.3/3.50; 71.4/3.76; 71.5/4.16; 72.7/3.41; 74.4/4.44; 81.9/4.76; 85.7/4.61; 87.6/4.32; 103.9/6.61; 105.0/6.39; 105.2/7.00; 105.6/6.52; 105.9/6.60; 106.9/7.23; 107.1/7.44; 111.1/7.39; 111.5/7.44; 112.5/6.90; 112.5/6.80; 112.9/6.73; 115.4/6.86; 115.6/6.72; 115.9/6.95; 118.5/6.69; 120.0/6.69; 120.6/6.54; 121.1/6.73; 123.8/7.50; 125.7/7.80; 126.5/7.42; 126.5/7.26 ppm.

$IR_{v_{max}}$  (KBr)/ $cm^{-1}$ : 827; 1034; 1115; 1215; 1281; 1329; 1423; 1462; 1516; 1611; 1672; 1720; 2841; 2936; 3387.

**HSQC extracto 3,  $\delta_C/\delta_H$ :** 14.5/1.16; 21.1/1.98; 21.5/1.90; 21.8/1.16; 21.8/1.12; 23.6/1.11; 25.8/1.03; 26.8/2.52; 29.3/1.22; 40.2/2.50; 56.3/3.74; 56.4/3.83; 59.3/3.28; 60.2/4.03; 85.8/4.61; 103.9/6.61; 104.9/7.00; 105.7/6.52; 105.8/6.60; 106.5/7.24; 106.5/7.43; 115.5/6.73; 115.6/6.88 ppm.

$IR_{v_{max}}$  (KBr)/ $cm^{-1}$ : 1036; 1113; 1213; 1329; 1423; 1466; 1512; 1611; 2372; 2843; 2936; 3422.

**HSQC extracto 4,  $\delta_C/\delta_H$ :** 14.6/1.15; 19.1/1.05; 21.4/1.44; 21.9/1.16; 22.0/1.31; 26.8/2.52; 29.0/2.23; 29.4/1.23; 34.0/2.15; 40.0/2.50; 54.3/3.05; 54.9/3.11; 56.2/3.75; 59.3/3.25; 60.0/3.39; 60.5/4.04; 60.5/3.61; 63.5/3.36; 71.3/4.16; 71.7/4.22; 85.7/4.61; 104.3/6.62; 105.2/7.00; 106.0/6.49; 106.2/7.39; 106.9/7.44; 106.9/7.23; 112.3/6.75; 112.3/6.80; 112.7/6.88; 115.5/6.67; 116.1/6.89; 120.1/6.96 ppm.

$IR_{v_{max}}$  (KBr)/ $cm^{-1}$ : 1036; 1113; 1213; 1329; 1449; 1605; 2345; 2372; 2853; 3422.

### ***Extractos 1 a 5, obtenidos a partir de lignina Kraft Pamer.***

**HSQC lignina sin extraer,  $\delta_C/\delta_H$ :** 14.4/0.85; 14.7/1.17; 19.2/0.91; 19.9/0.81; 21.2/2.00; 22.4/1.51; 22.6/1.86; 22.7/1.25; 25.0/1.48; 26.8/2.52; 29.4/1.24; 30.9/2.02; 31.7/1.23; 34.9/2.52; 29.4/1.24; 30.9/2.02; 31.7/1.23; 34.9/2.14; 40.3/2.50; 49.0/3.17; 49.6/3.06; 49.7/3.37; 54.2/3.05; 56.3/3.72; 59.4/3.28; 60.1/3.66; 60.5/4.03; 70.2/3.51; 71.4/3.77; 71.6/4.16; 82.0/4.77; 85.8/4.62; 87.5/4.32; 93.7/6.04; 104.1/6.61; 105.3/6.98; 105.7/6.51; 106.8/7.22; 108.2/7.15; 115.7/6.73; 119.7/6.70; 125.7/7.76 ppm.

$IR_{v_{max}}$  (KBr)/ $cm^{-1}$ : 1034; 1082; 1148; 1217; 1271; 1375; 1460; 1512; 1597; 1707; 2372; 2853; 2934; 3350; 3368; 3385; 3404; 3422 ppm.

**HSQC extracto 1,  $\delta_C/\delta_H$ :** 14.4/0.73; 14.3/0.82; 17.0/1.13; 18.2/1.46; 21.2/0.94; 21.5/0.80; 21.5/1.41; 22.0/1.73; 22.8/1.23; 24.3/1.11; 35.0/1.48; 25.4/2.71; 26.9/1.97; 29.4/1.22; 30.0/2.79; 30.8/2.05; 31.7/1.20; 33.3/2.73; 34.1/2.15; 36.7/1.53; 36.9/1.67; 38.1/2.24; 38.5/1.76; 38.3/1.02; 45.1/2.03; 55.7/3.72; 56.0/3.83; 110.0/4.85; 110.0/4.91; 111.0/7.38;

111.2/7.43; 112.4/6.77; 112.6/6.87; 115.6/6.96; 115.6/6.86; 115.6/6.68; 119.6/6.71; 119.9/6.63; 120.9/5.30; 122.8/5.69; 123.8/7.49; 124.0/6.93; 124.3/7.10; 126.5/7.40; 126.5/7.40; 126.7/6.80; 128.2/5.29; 130.0/5.31; 134.7/7.90 ppm.

**IR<sub>vmax</sub>** (KBr)/cm<sup>-1</sup>: 822; 1032; 1124; 1155; 1211; 1271; 1431; 1464; 1593; 1701; 2855; 2926.

**HSQC extracto 2, δ<sub>C</sub>/δ<sub>H</sub>**: 14.4/0.75; 14.9/0.85; 16.9/1.15; 18.0/1.49; 21.5/1.43; 21.5/0.98; 24.5/1.16; 26.8/2.50; 31.1/2.08; 31.7/2.51; 34.3/2.48; 34.3/2.18; 35.3/1.67; 36.7/4.36; 36.9/1.55; 40.1/2.50; 42.8/1.84; 54.0/3.05; 56.0/3.75; 60.6/3.39; 61.9/4.11; 70.9/3.72; 71.4/4.14; 85.5/4.62; 109.4/7.41; 111.4/7.42; 112.4/6.76; 115.5/6.67; 119.1/6.75; 120.6/6.61; 124.0/6.97; 124.3/7.15; 126.4/7.43; 126.8/6.84 ppm.

**IR<sub>vmax</sub>** (KBr)/cm<sup>-1</sup>: 1032; 1088; 1153; 1231; 1272; 1362; 1429; 1454; 1514; 1599; 1705; 2351; 2936; 3418.

**HSQC extracto 3, δ<sub>C</sub>/δ<sub>H</sub>**: 8.9/1.74; 11.5/1.16; 14.3/0.85; 14.5/1.17; 19.8/0.80; 20.8/1.17; 20.9/1.23; 21.2/1.98; 21.5/1.44; 23.5/1.11; 24.9/1.49; 25.6/1.27; 29.0/2.42; 29.3/1.23; 30.6/2.14; 30.7/2.10; 31.7/1.23; 33.9/2.20; 35.2/2.43; 35.2/1.96; 38.2/2.34; 40.1/2.50; 41.8/2.90; 43.4/3.28; 46.1/3.08; 56.0/3.75; 59.8/3.92; 60.2/4.02; 60.7/3.49; 60.8/3.39; 63.2/3.58; 63.1/3.45; 63.3/3.34; 66.0/3.56; 66.0/3.42; 66.2/4.05; 67.8/4.45; 70.1/3.50; 72.7/3.42; 77.5/4.39; 78.2/4.54; 111.0/6.90; 111.1/7.39; 112.6/6.79; 115.6/6.68; 119.4/6.75; 120.5/6.65; 126.4/7.42 ppm.

**HSQC extracto 4, δ<sub>C</sub>/δ<sub>H</sub>**: 19.0/1.06; 21.6/1.44; 21.2/1.19; 22.2/1.11; 26.0/1.04; 29.3/1.24; 31.7/2.50; 34.0/2.15; 34.4/2.47; 34.9/1.66; 40.1/2.50; 40.0/2.05; 40.5/2.24; 43.1/1.85; 45.7/3.06; 56.0/3.73; 56.0/2.24; 60.0/3.91; 60.5/3.38; 63.2/3.60; 63.4/3.34; 66.0/3.42; 71.1/3.71; 71.4/4.12; 71.5/4.76; 84.7/4.27; 85.7/4.62; 112.4/6.76; 115.5/6.65; 120.4/6.69; 122.2/6.93 ppm.

**IR<sub>vmax</sub>** (KBr)/cm<sup>-1</sup>: 1030; 1084; 1148; 1219; 1271; 1418; 1465; 1521; 1617; 2842; 2958; 3462.

**HSQC extracto 5, δ<sub>C</sub>/δ<sub>H</sub>**: 14.5/1.13; 21.1/1.02; 21.5/1.42; 21.5/1.50; 21.7/1.36; 22.2/1.29; 22.4/1.26; 22.3/1.12; 25.8/1.03; 29.4/1.23; 31.7/2.51; 34.3/2.45; 34.3/2.54; 35.0/1.67; 40.1/2.50; 40.2/2.74; 56.0/3.74; 60.1/3.65; 60.5/3.39; 62.9/3.44; 63.5/3.59; 71.7/4.75; 71.6/4.11; 111.5/7.21; 113.8/6.94; 115.5/6.68; 115.8/7.11; 119.2/6.86; 120.7/6.55; 122.5/6.86 ppm.

**IR<sub>vmax</sub>** (KBr)/cm<sup>-1</sup>: 1036; 1059; 1082; 1125; 1144; 1209; 1449; 2345; 2371; 2853; 2931; 2953; 2970; 3431.

**HSQC residuo final, δ<sub>C</sub>/δ<sub>H</sub>**: 14.4/1.13; 21.2/1.51; 21.7/1.42; 21.7/1.30; 22.1/1.16; 25.8/1.04; 31.5/2.50; 34.3/2.47; 34.8/1.67; 40.1/2.50; 51.7/3.57; 56.0/3.72; 60.4/3.57; 60.6/3.39; 62.9/3.48; 63.2/3.71; 71.6/4.76; 111.3/6.85; 114.0/6.71; 115.0/6.28; 115.4/6.64; 117.7/6.81; 120.7/6.57; 120.8/6.37 ppm.

**IR<sub>vmax</sub>** (KBr)/cm<sup>-1</sup>: 855; 1030; 1082; 1144; 1213; 1269; 1366; 1427; 1464; 1512; 1599; 2845; 2928; 3404.

#### 6.4. OZONÓLISIS DE LIGNINA KRAFT

En un balón se colocaron 2.80 g de lignina Kraft en 50 mL de MeOH a temperatura ambiente. A la mezcla se le hizo burbujear un flujo de O<sub>3</sub> durante 30 minutos, y luego se agregó 5.0 mL de Me<sub>2</sub>S. El disolvente se destiló bajo presión reducida y los productos obtenidos se purificaron mediante columna cromatográfica (silica gel flash y distintas mezclas de Hex:AcOEt en orden creciente de polaridad 9:1; 7:3; 1:1; 3:7 y 1:9). Las mezclas de productos obtenidas se analizaron mediante GC-MS y la fragmentación de los productos fueron comparados con la base de datos de m/z.

Programa CG: Temp. Columna 60 °C; temp. Inyector 250 °C; rampa: 5 min./60 °C; 8 °C/min hasta 300 °C; 5 min./300 °C.

##### 2,6-dimetoxifenol (siringol) (37)

**CG:** t<sub>r</sub>=16.53 min. **EM** (IE, 70eV) *m/z* (%): 154 (100, M+); 140 (4, M+); 139 (57, M+); 124 (3, M+); 111 (25, M+); 96 (25, M+); 93 (36, M+); 79 (9, M+); 65 (21, M+); 51 (9, M+); 39 (12, M+).

##### 4-hidroxi-3-metoxibenzaldehído (vainillina) (38)

**CG:** t<sub>r</sub> =17.42 min. **EM** (IE, 70eV) *m/z* (%): 152 (97, M+, +1); 151 (100, M+); 137 (5, M+, +2); 123 (24, M+, -CHO); 109 (20, M+); 93 (6, M+); 81 (25, M+); 65 (12, M+); 53 (13, M+); 39 (8, M+).

##### 4-hidroxi-3-metoxiacetofenona (39)

**CG:** t<sub>r</sub> =18.94 min. **EM** (IE, 70eV) *m/z* (%): 166 (46, M+); 151 (100, M+, -CH<sub>3</sub>); 136 (3, M+); 123 (33, M+); 108 (9, M+); 93 (4, M+); 77 (7, M+); 65 (8, M+); 43 (9, M+); 39 (3, M+).

##### 4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzaldehído (siringaldehído) (40)

**CG:** t<sub>r</sub> =21.73 min. **EM** (IE, 70eV) *m/z* (%): 182 (100, M+); 181 (58, M+, -1); 167 (12, M+); 153 (8, M+); 139 (14, M+); 123 (4, M+), 111 (14, M+); 93 (17, M+); 79 (9, M+); 65 (14, M+); 51 (8, M+); 39 (9, M+).

##### 4-hidroxi-3,5-dimetoxiacetofenona (41)

**CG:** t<sub>r</sub> =22.83 min. **EM** (IE, 70eV) *m/z* (%): 196 (56, M+); 182 (11, M+); 181 (100, M+); 154 (2, M+); 153 (20, M+); 138 (5, M+); 123 (5, M+); 108 (5, M+); 93 (6, M+); 79 (4, M+); 65 (9, M+); 43 (14, M+); 39 (4, M+).

##### 4-((4-hidroxi-3-metoxibenzil)oxi)-3-metoxibenzaldehído (42)

**CG:** t<sub>r</sub> =32.19 min. **EM** (IE, 70eV) *m/z* (%): 289 (100, M+); 270 (4, M+); 259 (6, M+); 243 (4, M+); 227 (6, M+); 213 (3, M+); 197 (4, M+); 183 (2, M+); 169 (3, M+); 151 (4, M+); 137 (4, M+); 115 (4, M+); 106 (3, M+); 97 (7, M+); 77 (3, M+); 65 (2, M+); 55 (3, M+); 39 (2, M+).

##### 3-metoxi-4-((2-metoxifenoxi)metil)benzaldehído (43)

**CG:**  $t_r$  =33.69 min. **EM** (IE, 70eV)  $m/z$  (%): 272 (100, M+, -2H); 255 (2, M+); 235 (6, M+); 229 (3, M+); 211 (15, M+); 207 (9, M+); 185 (2, M+); 169 (7, M+); 165 (3, M+); 139 (4, M+); 115 (5, M+); 106 (3, M+); 84 (4, M+); 77 (3, M+); 63 (2, M+); 55 (3, M+); 39 (1, M+).

#### 4-(1-(2,6-dimetoxifenoxi)-3-hidroxiopropan-2-il)-2-metoxifenol (44)

**CG:**  $t_r$  =34.31 min. **EM** (IE, 70eV)  $m/z$  (%):334 (44, M+); 320 (28, M+); 319 (100, M+, -CH<sub>3</sub>); 303 (2, M+); 289 (6, M+); 273 (3, M+); 257 (4, M+); 243 (2, M+); 229 (5, M+); 213 (2, M+); 199 (2, M+); 181 (4, M+); 167 (5, M+); 151 (12, M+); 135 (3, M+); 123 (3, M+); 107 (3, M+); 91 (3, M+); 77 (3, M+); 65 (2, M+); 53 (1, M+); 39 (1, M+).

#### 4-(2,6-dimetoxifenoxi)-3,5-dimetoxibenzaldehido (45)

**CG:**  $t_r$  =36.23 min. **EM** (IE, 70eV)  $m/z$  (%):319 (7, M+, +1); 303 (20, M+); 302 (100, M+, -CH<sub>3</sub>); 269 (3, M+); 255 (3, M+); 241 (6, M+); 227 (8, M+); 213 (4, M+); 198 (5, M+); 184 (4, M+); 169 (2, M+); 153 (2, M+); 128 (4, M+); 115 (4, M+); 105 (2, M+); 91 (3, M+); 77 (2, M+); 64 (2, M+); 51 (1, M+).

### 6.5. HIDRÓLISIS DE MALONATO DE ETILO<sup>6</sup>

#### Ácido 2-etoxicarboniletanóico (Mono-malonato de etilo) (19)

En un balón, se colocaron 4.0 g de malonato de dietilo (0.025 mmol) y 16 mL de EtOH absoluto. Se colocó un embudo con ecualizador conteniendo una disolución de KOH (1.4 g, 0.025 mmol) disuelto en 16 mL de EtOH absoluto. Luego se agregó gota a gota la disolución básica al balón de reacción, durante un período de 90 minutos (se formó un precipitado abundante). La suspensión se agitó durante otras 2 horas y luego se dejó sin agitación durante toda la noche.

Luego de este tiempo, se incorporó un refrigerante y la reacción se calentó a reflujo durante 1 hora para dar una disolución homogénea. La disolución caliente se filtró rápidamente en un Büchner caliente y el precipitado se lavó con 10 mL de EtOH absoluto, también en caliente. El volumen del filtrado y del lavado combinados se redujeron a aproximadamente 30 mL y la disolución se enfrió en un baño de hielo. Los cristales se colectaron por filtración y se lavaron con Et<sub>2</sub>O (2x5 mL), y las aguas madres se concentraron a aproximadamente 16 mL para una segunda cosecha. Los cristales se secaron en desecador conteniendo sílica gel como agente desecante.

La sal de potasio obtenida se disolvió en agua (agitación magnética), se enfrió a 0 °C y se agregó HCl concentrado (1 eq.) de a gotas durante 40 minutos, manteniendo la temperatura de la disolución siempre por debajo de los 5 °C.

Luego de agitar durante otros 20 minutos, la suspensión se filtró y la sal retenida se lavó con Et<sub>2</sub>O. El filtrado (H<sub>2</sub>O + Et<sub>2</sub>O) se separó y la capa acuosa se extrajo con Et<sub>2</sub>O. Las fases orgánicas combinadas se lavaron con disolución saturada de NaCl, se secaron con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se evaporó el disolvente a presión reducida. El producto se obtuvo puro (aceite incoloro), con un rendimiento de 60%.

**<sup>1</sup>H RMN** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ=1.30 (t, *J*=7.1 Hz, 3H); 3.44 (s, 2H); 4.24 (c, *J*=7.2 Hz, 2H); 7.97 (sa, 1H).

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz): δ=13.8 (CH<sub>3</sub>); 40.7 (CH<sub>2</sub>); 61.8 (CH<sub>2</sub>); 166.8 (COOEt); 171.0 (COOH).

## **6.6. OBTENCIÓN DE DERIVADOS DE ÁCIDO CINÁMICO**

### **Ácido (*E*)-4-hidroxi-3-metoxicinámico (ácido ferúlico) (2f)**

Se disolvió 1.0 g de ácido malónico (9.6 mmol) en 10 mL de THF. Se agregaron 0.56 mL de piridina (7.0 mmoles), 0.97 g de 4-hidroxi-3-metoxibenzaldehído (6.4 mmoles) y 0.24 mL de piperidina (2.4 mmoles). La mezcla se calentó a reflujo durante 2 horas. Luego de enfriar, la disolución se vertió en agua-hielo y se añadió HCl concentrado hasta pH 3. La disolución acuosa se extrajo con acetato de etilo (3 x 20 mL). Las fases orgánicas combinadas se secaron con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y el disolvente se destiló bajo presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna (sílica gel flash, Hex:AcOEt 7:3). Rendimiento: 80 %

**<sup>1</sup>H-RMN** (400 Hz, Acetona-d<sub>6</sub>): δ=3.92 (s, 1H); 6.37 (d, *J*=15.9 Hz, 1H); 6.87 (d, *J*=8.1 Hz, 1H); 7.14 (dd, *J*<sub>1</sub>=1.9 *J*<sub>2</sub>=8.2 Hz, 1H); 7.32 (d, *J*=2.0 Hz, 1H); 7.60 (d, *J*=15.9 Hz, 1H).

**<sup>13</sup>C-RMN** (100MHz, Acetona-d<sub>6</sub>): δ=56.3 (OCH<sub>3</sub>); 111.3 (CH=CH); 116.0 (Ar); 116.1 (Ar); 123.8 (Ar); 127.4 (Ar); 145.9 (Ar); 148.7 (CH=CH); 150.0 (Ar); 168.4 (COOH).

### **Procedimiento general para la condensación de Knoevenagel-Doebner**

Se disolvió 1.0 g de ácido malónico (9.6 mmol) en 10 mL de piridina seca (124 mmol). Luego se agregó el aldehído correspondiente (6.4 mmol) y 0.24 mL (2.4 mmol) de piperidina y se dejó refluja durante 2 horas. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente, se vertió sobre hielo/agua y luego se agregó HCl concentrado hasta pH 3. La fase acuosa se extrajo con acetato de etilo, las fases orgánicas se combinaron, se secaron con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y el disolvente se destiló bajo presión reducida. El producto se purificó por columna cromatográfica (sílica gel flash, mezclas Hex:AcOEt).

### **Ácido cinámico (2a)**

Rendimiento 54%.

**<sup>1</sup>H-RMN** (400 Hz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ=6.56 (d, *J*=16.0 Hz, 1H); 7.43 (m, 3H); 7.62 (d, *J*=16.0 Hz, 1H); 7.43 (dd, *J*<sub>1</sub>=2.9 *J*<sub>2</sub>=6.5 Hz, 3H); 7.70 (dd, *J*<sub>1</sub>=3.0 *J*<sub>2</sub>=6.5 Hz, 2H); 12.46 (s, 1H).

**<sup>13</sup>C-RMN** (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ=119.7 (CH=CH); 128.7 (Ar); 129.4 (Ar); 130.7 (Ar); 134.7 (Ar); 144.4 (CH=CH); 168.1 (COOH).

### **Ácido (*E*)-4-metoxicinámico (2b)**

Rendimiento 59%.

**<sup>1</sup>H-RMN** (400 Hz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ=3.80 (s, 1H); 6.39 (d, *J*=16.0 Hz, 1H); 6.98 (d, *J*=8.8 Hz, 2H); 7.56 (d, *J*=16.0 Hz, 1H); 7.65 (d, *J*=8.8 Hz, 2H); 12.26 (sa, 1H).

**<sup>13</sup>C-RMN** (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ=55.8 (OCH<sub>3</sub>); 114.8 (2xAr); 117.0 (CH=CH); 127.3 (Ar); 130.4 (2xAr); 144.2 (CH=CH); 161.4 (Ar); 168.2 (COOH).

### Ácido (*E*)-2-nitrocínámico (2c).

Rendimiento 66%.

**<sup>1</sup>H-RMN** (400 Hz, Acetona-d<sub>6</sub>): δ=3.39 (sa, 1H); 6.55 (d, *J*=15.8 Hz, 1H); 7.68 (ddd, *J*<sub>1</sub>=8.5 *J*<sub>2</sub>=7.5 *J*<sub>3</sub>=1.4 Hz, 1H); 7.78 (m, 1H); 7.87 (d, *J*=15.8 Hz, 1H); 7.95 (dd, *J*<sub>1</sub>=7.6 *J*<sub>2</sub>=1.4 Hz, 1H); 8.08 (dd, *J*<sub>1</sub>=8.3 *J*<sub>2</sub>=1.3 Hz, 1H); 12.8 (sa, 1H).

**<sup>13</sup>C-RMN** (100 MHz, Acetona-d<sub>6</sub>): δ=124.3 (CH=CH); 125.1 (Ar); 129.7 (Ar); 129.8 (Ar); 131.3 (Ar); 134.3 (Ar); 139.3 (Ar); 148.7 (CH=CH); 167.3 (COOH).

### Ácido (*E*)-3-nitrocínámico (2d).

Rendimiento 78%.

**<sup>1</sup>H-RMN** (400 Hz, Acetona-d<sub>6</sub>): δ=6.75 (d, *J*=16.1 Hz, 1H); 7.75 (t, *J*=8.0 Hz, 1H); 7.80 (d, *J*=16.1 Hz, 1H); 8.15 (dd, *J*<sub>1</sub>=7.8 *J*<sub>2</sub>=1.4 Hz, 1H); 8.27 (ddd, *J*<sub>1</sub>=8.3 *J*<sub>2</sub>=2.3 *J*<sub>3</sub>=1.0 Hz, 1H); 8.52 (dd, *J*<sub>1</sub>=1.7 *J*<sub>2</sub>=2.4 Hz, 1H).

**<sup>13</sup>C-RMN** (100 MHz, Acetona-d<sub>6</sub>): δ=122.4 (CH=CH); 123.5 (Ar); 125.2 (Ar); 131.2 (Ar); 134.7 (Ar); 137.4 (Ar); 142.8 (CH=CH); 149.7 (Ar); 167.2 (COOH).

### Ácido (*E*)-2-bromocínámico (2e)

Rendimiento 79%.

**<sup>1</sup>H-RMN** (400 Hz, Acetona-d<sub>6</sub>): δ=6.59 (d, *J*=15.9 Hz, 1H); 7.36 (td, *J*<sub>1</sub>=1.7 *J*<sub>2</sub>=7.6 Hz, 1H); 7.44 (t, *J*=6.8 Hz, 1H); 7.72 (dd, *J*<sub>1</sub>=8.0 *J*<sub>2</sub>=1.3 Hz, 1H); 7.86 (d, *J*=15.9 Hz, 1H); 7.92 (dd, *J*<sub>1</sub>=1.7 *J*<sub>2</sub>=7.8 Hz, 1H), 12.70 (s, 1H).

**<sup>13</sup>C-RMN** (100 MHz, Acetona-d<sub>6</sub>): δ=122.8 (CH=CH); 125.0 (Ar); 128.7 (Ar); 128.8 (Ar); 132.3 (Ar); 133.6 (Ar); 134.0 (Ar); 141.8 (CH=CH); 167.6 (COOH).

### 2-metoxi-4-vinilfenol (3f).

Rendimiento 80%.

**<sup>1</sup>H-RMN** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ=3.94 (s, 3H); 5.15 (dd, *J*<sub>1</sub>=0.9 *J*<sub>2</sub>=10.8 Hz, 1H); 5.62 (dd, *J*<sub>1</sub>=0.9 *J*<sub>2</sub>=17.5 Hz, 1H); 5.71 (sa, 1H); 6.67 (dd, *J*<sub>1</sub>=10.8 *J*<sub>2</sub>=17.5 Hz, 1H); 6.90 (d, *J*=8.1 Hz, 1H); 6.91 (dd, *J*<sub>1</sub>=1.9 *J*<sub>2</sub>=8.0 Hz, 1H); 6.93 (d, *J*=8.0 Hz, 1H).

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz): δ=55.9 (OCH<sub>3</sub>); 108.0 (Ar); 111.5 (CH=CH<sub>2</sub>); 114.4 (Ar); 120.61 (Ar); 130.3 (Ar); 136.6 (CH=CH<sub>2</sub>); 145.6 (Ar); 146.6 (Ar).

**4-vinilbenceno-1,2-diol (3g).**

Rendimiento 60%.

**<sup>1</sup>H-RMN** (400 MHz, Acetona-d<sub>6</sub>): δ=5.02 (dd,  $J_1 = 10.9$  Hz,  $J_2 = 1.1$  Hz 1H); 5.55 (dd,  $J_1 = 17.6$  Hz,  $J_2 = 1.1$  Hz, 1H); 6.60 (dd,  $J_1 = 17.6$  Hz,  $J_2 = 10.9$  Hz, 1H); 6.80 (d,  $J = 1.2$  Hz, 2H); 6.99 (m, 1H), 7.99 (sa, 1H).

**<sup>13</sup>C-RMN** (100 MHz, Acetona-d<sub>6</sub>): δ=110.1 (CH=CH<sub>2</sub>); 112.6 (Ar); 115.2 (Ar); 118.7 (Ar); 130.1 (Ar); 136.9 (CH=CH<sub>2</sub>); 145.1 (Ar); 145.2 (Ar).

**4-vinilfenol (3h)**

Rendimiento 60%.

**<sup>1</sup>H-RMN** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ=5.04 (dd,  $J_1 = 10.9$  Hz,  $J_2 = 1.1$  Hz 1H); 5.59 (dd,  $J_1 = 17.6$  Hz,  $J_2 = 1.1$  Hz, 1H); 6.65 (dd,  $J_1 = 17.6$  Hz,  $J_2 = 10.9$  Hz, 1H); 6.81 (d,  $J = 6.7$  Hz, 2H); 7.31 (d,  $J = 6.6$  Hz, 2H); 8.43 (sa, 1H).

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz): δ=110.0 (Ar); 115.3 (CH=CH<sub>2</sub>); 127.4 (Ar); 129.3 (Ar); 136.6 (CH=CH<sub>2</sub>); 157.4 (Ar).

**2-metoxi-6-vinilfenol (3i)**

Rendimiento 1,2%

**<sup>1</sup>H-RMN** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ= 3.91(s, 3H); 5.32(dd,  $J_1=1.5$   $J_2=11.2$  Hz, 1H); 5.82(dd,  $J_1=1.7$   $J_2=17.8$  Hz, 1H); 5.92(s, 1H); 6.79(dd,  $J_1=1.7$   $J_2=8.0$  Hz, 1H); 6.84(t,  $J=8.0$  Hz, 1H); 7.03(dd,  $J_1=11.2$   $J_2=17.8$  Hz, 1H); 7.09(dd,  $J_1=1.7$   $J_2=8.0$  Hz, 1H).

**8-metoxi-2H-cromen-2-ona (4i)**

Rendimiento 20%

**<sup>1</sup>H-RMN** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ=3.97 (s, 3H); 6.44 (d,  $J=9.6$  Hz, 1H); 7.10 (dd,  $J_1=1.6$   $J_2=8.0$  Hz, 1H); 7.07(dd,  $J_1=1.4$   $J_2=8.0$  Hz, 1H); 7.22 (t,  $J=8.0$  Hz, 1H); 7.71 (d,  $J=9.6$  Hz, 1H)

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz) δ=56.2(OCH<sub>3</sub>); 113.7 (Ar); 116.9 (CH=CH); 119.3 (Ar); 124.3(Ar); 143.7 (CH=CH); 160.3 (Ar); 191.0 (C=O).

**(E)-4-hidroxi-3-metoxicinamato de etilo (ferulato de etilo) (20)**

Se disolvió 1.0 g de ácido 2-etoxicarboniletanoico (7.6 mmoles) en 10 mL de piridina (124 mmoles). Se agregó 0.76 g de vainillina (5.0 mmoles) y 0.20 mL de piperidina (2.0 mmoles). La mezcla se calentó a reflujo durante 2 horas. Luego de enfriar, la disolución se vertió en agua-hielo y se añadió HCl concentrado hasta pH~6. La disolución acuosa se extrajo con acetato de etilo (3 x 20 mL). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con disolución saturada de CuSO<sub>4</sub> y con disolución saturada de NaCl, se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y el disolvente se destiló a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna (sílica gel flash, Hex:AcOEt 7:3). Rendimiento 78%.

**<sup>1</sup>H-RMN** (400 Hz, CDCl<sub>3</sub>): δ=1.33 (t, *J*=7.1 Hz, 3H); 3.91 (s, 3H); 4.26 (c, *J*=7.1 Hz, 2H); 6.01 (s, 1H); 6.29 (d, *J*=15.9 Hz, 1H); 6.92 (d, *J*=8.1 Hz, 1H); 7.03 (d, *J*=1.9 Hz, 1H); 7.07 (dd, *J*<sub>1</sub>=2.0 *J*<sub>2</sub>=8.1 Hz, 1H); 7.26 (d, *J*=15.9 Hz, 1H).

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz): δ=14.5 (CH<sub>3</sub>); 56.0 (OCH<sub>3</sub>); 60.5 (OCH<sub>2</sub>); 109.4 (Ar); 114.8 (Ar); 115.7 (CH=CH); 123.1 (Ar); 127.1 (Ar); 144.8 (CH=CH); 146.9 (Ar); 148.0 (Ar); 167.5 (COOEt)

### **(E)-4-(3-(3-hidroxi-4-metoxifenil)but-1-en-1-il)-2-metoxifenol (6f)**

Se disolvió 1.0 g de ácido malónico (9.6 mmol) en 10 mL H<sub>2</sub>O, y se agregó 0.56 mL de piridina (7.0 mmoles), 0.97 g de vainillina (6.4 mmoles) y 0.24 mL de piperidina (2.4 mmoles). La mezcla se calentó a reflujo durante 20 h. Luego se dejó enfriar, y la disolución se vertió en agua-hielo y se añadió HCl concentrado hasta pH~3. La disolución resultante se extrajo con AcOEt (3 x 20 mL), la fase orgánica se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se destiló el disolvente bajo presión reducida. El producto se purificó por columna cromatográfica (silica flash, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:AcOEt 98:2). Rendimiento 2.5%.

**<sup>1</sup>H-RMN** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ=1.43 (d, *J*=7.0 Hz, 3H); 3.58 (q, *J*=7.0, 1H); 3.91 (s, 6H); 5.52 (s, 1H); 5.59 (s, 1H); 6.19 (dd, *J*<sub>1</sub>=15.9, *J*<sub>2</sub>=6.5 Hz, 1H); 6.31 (dd, *J*<sub>1</sub>=15.9, *J*<sub>2</sub>=1.04 Hz, 1H); 6.75 (d *J*=1.9 1H); 6.78 (dd, *J*<sub>1</sub>=1.9, *J*<sub>2</sub>=8.0 Hz, 1H); 6.87 (m, 4H).

**<sup>13</sup>C-RMN** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ=21.37 (CH<sub>3</sub>); 42.1 (CH<sub>2</sub>); 55.9 (OCH<sub>3</sub>); 108.0 (CH Ar); 109.9 (CH Ar); 114.3 (CH Ar); 119.8 (CH Ar); 128.02 (C=C); 130.2 (C); 133.3 (C); 143.96 (C=C); 137.8 (C); 143.9(C); 145.0 (C), 146.4 (C) ppm.

### **3-(2-hidroxifenil)-1,5-di(piperidin-1-il)pentano-1,5-diona (5f)**

Se disolvió 1.0 g de ácido malónico (9.6 mmol) en 10 mL de piridina seca (124 mmol). Luego se agregó 0.78 g de 2-hidroxibenzaldehído (6.4 mmol) y 0.24 mL de piperidina (2.4 mmol) y se mantuvo a reflujo durante 3 horas. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente, se vertió sobre hielo/agua, y por último se agregó HCl concentrado hasta pH~3. La disolución resultante se extrajo con AcOEt (3 x 20 mL), las fases orgánicas se combinaron, se secaron con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se destiló el disolvente bajo presión reducida. El producto se purificó mediante columna cromatográfica (silica flash, FM1=Hex:AcOEt 1:1, FM2=AcOEt). Rendimiento 44%.

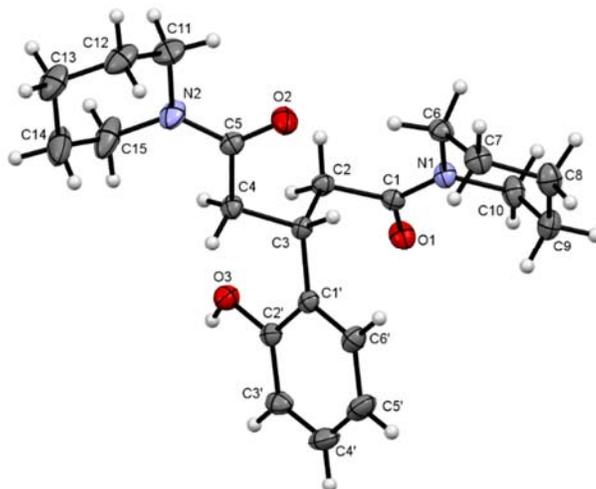
**<sup>1</sup>H-RMN** (400 Hz, Acetona-d<sub>6</sub>): δ=1.54 (m, 12H); 2.67 (dd, *J*<sub>1</sub>=6.8 *J*<sub>2</sub>=15.6 Hz, 2H); 2.92 (dd, *J*<sub>1</sub>=15.6 *J*<sub>2</sub>=6.9 Hz, 2H); 3.37 (m, 4H); 3.51 (dtd, *J*<sub>1</sub>=5.5 *J*<sub>2</sub>=13.1 *J*<sub>3</sub>=18.5 Hz, 4H); 3.86 (q, *J*=6.8 Hz, 1H); 6.88 (td, *J*<sub>1</sub>=1.4, *J*<sub>2</sub>=7.5 Hz, 1H); 6.94 (dd, *J*<sub>1</sub>=1.3, *J*<sub>2</sub>=8.1 Hz, 1H); 7.08 (dd, *J*<sub>1</sub>=1.7, *J*<sub>2</sub>=7.6 Hz 1H); 7.11 (dd, *J*<sub>1</sub>=1, *J*<sub>2</sub>=1.7 1H).

**<sup>13</sup>C-RMN** (100 MHz, Acetona-d<sub>6</sub>): δ=24.4 (CH<sub>2</sub>); 25.5 (CH<sub>2</sub>); 26.3 (CH<sub>2</sub>); 30.8 (CH); 39.8 (CH<sub>2</sub>N); 42.9 (CH<sub>2</sub>N); 46.7 (CH<sub>2</sub>N ciclo); 118.6 (Ar); 120.5 (Ar); 126.8 (Ar); 127.8 (Ar); 132.0 (Ar); 154.8 (Ar); 170.6 (CON).

### **Difracción de RX**

Un cristal incoloro del compuesto **5f** con forma de bloque fue utilizado para realizar la determinación estructural por difracción de rayos X. Se colectaron un total de 720 imágenes de difracción con un tiempo total de exposición de 12 h utilizando radiación de MoK $\alpha$  de tubo sellado. Los datos de difracción utilizados para la resolución y refinamiento estructural fueron

obtenidos con el mismo software. Todos los átomos distintos de hidrógeno fueron identificados por el programa SHELXT y refinados anisotrópicamente en el modelo final. Los átomos de hidrógeno fueron colocados en posiciones geoméricamente adecuadas y refinados ligados a los átomos de C u O respectivos. Las figuras fueron obtenidas con el programa Mercury 3.5.



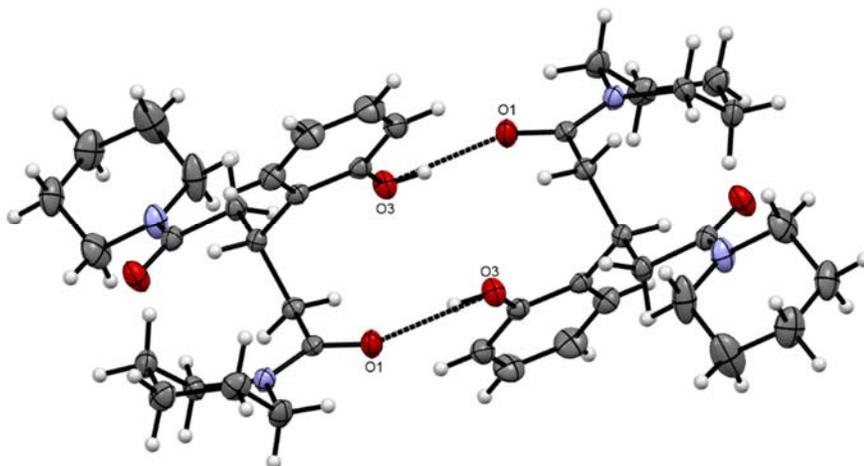
**Figura 1:** Estructura de **5f**, resultante de la difracción de RX de un monocristal.

Datos del Cristal	
<b>Fórmula</b>	C <sub>21</sub> H <sub>30</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>
<b>Peso Fórmula</b>	358.47 g/mol
<b>Sistema Cristalino</b>	Monoclínico
<b>Grupo Espacial</b>	P2 <sub>1</sub> /c (#14)
<b>Parámetros de Celda</b>	a=9.3923(4) b=17.1397(7) c=12.6203(5) Å, β=107.394 °
<b>Volumen de celda</b>	1938.73(14) Å <sup>3</sup>
<b>Z</b>	4
<b>ρ(calc)</b>	1.228 g/cm <sup>3</sup>
<b>μ(MoKα)</b>	0.082 mm <sup>-1</sup>
<b>F(000)</b>	776
<b>Dimensiones cristalinas</b>	0.13 x 0.17 x 0.22 mm
Colección de Datos	
<b>Temperatura</b>	293 K
<b>Radiación</b>	MoKα, λ=0.71073 Å
<b>θ<sub>min</sub> - θ<sub>max</sub></b>	2.92 – 25.07 °
<b>Rango de hkl</b>	-11-11, -20-20, -14-15
<b>Reflexiones totales/únicas</b>	22085/3414
<b>R<sub>int</sub></b>	0.022
<b>Reflexiones observadas (I&gt;2σ)</b>	3025
Refinamiento	
<b># datos/ # parámetros</b>	3414/236
<b>R, wR2, S</b>	0.0447, 0.1243, 1.06 (w=1/[σ <sup>2</sup> (F <sub>o</sub> <sup>2</sup> )+(0.0646P) <sup>2</sup> +0.5861P] con P=(F <sub>o</sub> <sup>2</sup> +2F <sub>c</sub> <sup>2</sup> )/3
<b>Δs/s max/medio</b>	0.00/0.00
<b>Δρ min/max</b>	-0.22/0.43

**Tabla 1:** Datos cristalinos y de la determinación estructural.

Átomo	X	y	z	$U_{iso/eq}$ (Å <sup>2</sup> )
C1	-0.23108(15)	0.46261(8)	0.15674(11)	0.0338(3)
O1	-0.26018(12)	0.49913(7)	0.06832(9)	0.0489(3)
C2	-0.09249(16)	0.41334(8)	0.19447(12)	0.0355(3)
C3	0.03463(15)	0.45356(8)	0.28497(11)	0.0320(3)
C4	0.16783(16)	0.39807(9)	0.32180(12)	0.0381(3)
C5	0.14913(17)	0.33674(9)	0.40376(12)	0.0388(3)
O2	0.04998(14)	0.34251(8)	0.44757(11)	0.0584(4)
N1	-0.32033(14)	0.46752(8)	0.22176(10)	0.0385(3)
C6	-0.30207(18)	0.42529(9)	0.32552(12)	0.0418(4)
C7	-0.29695(19)	0.48098(11)	0.41954(13)	0.0496(4)
C8	-0.4292(2)	0.53656(12)	0.38954(15)	0.0563(5)
C9	-0.4415(2)	0.57712(11)	0.28134(15)	0.0541(4)
C10	-0.45128(18)	0.51844(11)	0.19083(14)	0.0499(4)
N2	0.24729(18)	0.27756(9)	0.42758(12)	0.0553(4)
C11	0.2332(3)	0.21465(12)	0.50260(19)	0.0711(6)
C12	0.3777(3)	0.20352(12)	0.59284(16)	0.0665(6)
C13	0.5061(3)	0.19052(13)	0.54815(19)	0.0761(6)
C14	0.5147(3)	0.25517(17)	0.4692(2)	0.0919(9)
C15	0.3688(3)	0.26544(15)	0.38052(18)	0.0827(8)
C1'	0.07443(15)	0.53271(8)	0.24890(11)	0.0330(3)
C2'	0.13156(15)	0.54239(8)	0.15944(12)	0.0351(3)
O3	0.15297(13)	0.47721(6)	0.10417(9)	0.0462(3)
C3'	0.16541(18)	0.61640(9)	0.12940(14)	0.0468(4)
C4'	0.1438(2)	0.68094(10)	0.18736(17)	0.0586(5)
C5'	0.0883(2)	0.67263(10)	0.27570(17)	0.0603(5)
C6'	0.05346(19)	0.59895(9)	0.30576(14)	0.0459(4)

**Tabla 2:** Coordenadas atómicas fraccionarias y factores de temperatura.



**Figura 2:** Dímeros formados por de enlaces de hidrógeno centrosimétricos entre O1 y O3 de dos moléculas de **5f**.

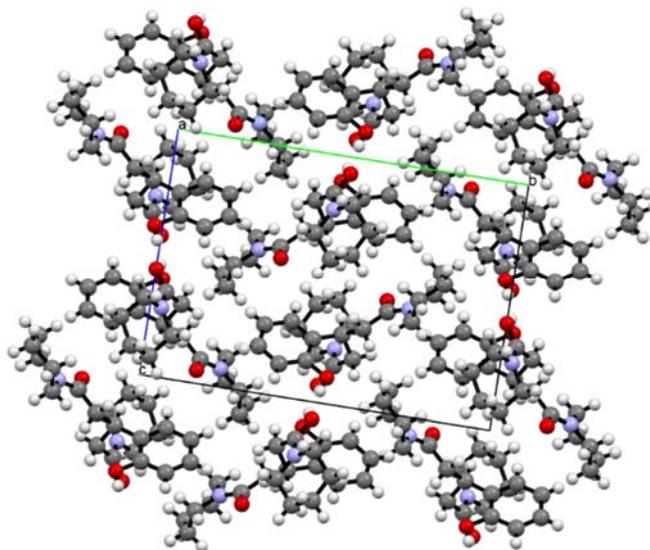


Figura 3: Empaquetamiento de 5f.

### 6.7. SÍNTESIS DE MODELO DE LIGNINA CON ENLACE $\beta$ -O-4

#### 4-(benziloxi)-3-metoxibenzaldehído (7)

Se disolvieron 0.76 g de vainillina (5.0 mmol) y 0.76 g de  $K_2CO_3$  (0.89 g 5.5 mmol) en 5 mL de EtOH absoluto. Se agregó 0.89 g de bromuro de bencilo (BnBr, 5.2 mmol) a la solución y la mezcla se agitó, bajo corriente de  $N_2$ , durante 24 horas a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se filtró mediante celite, se lavó con  $CH_2Cl_2$  (3 x 5 mL) y se destiló el disolvente bajo presión reducida. El producto se purificó mediante columna cromatográfica (sílica gel flash, Hex:AcOEt 7:3). Rendimiento 98%.

$^1H$ -RMN (400 Hz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$ =3.97 (s, 3H); 5.27 (s, 2H); 7.01 (d,  $J$ =8.2 Hz, 1H); 7.39 (m, 1H); 7.42 (m, 3H); 7.46 (m, 3H); 9.58 (s, 1H)

$^{13}C$ -RMN ( $CDCl_3$ , 100 MHz):  $\delta$ =56.07 (OMe); 70.86 (OCH<sub>2</sub>Ph); 109.28 (Ar); 112.35 (Ar); 126.67 (Ar); 127.23 (Ar); 128.24 (Ar); 128.76 (Ar); 130.28 (C); 136.00 (C); 150.05 (C); 153.59 (C).

#### 3-metoxi-4-((4-metoxibenzil)oxi)benzaldehído (14)

En un balón se disolvieron 2.76 g de  $K_2CO_3$  (20 mmol) y 1.52 g vainillina (10 mmol) en 20 mL de DMF. A la disolución resultante se le agregaron 1.57 g de Cl-PMB (10 mmol) y se agitó durante 6 horas. La mezcla de reacción se diluyó con agua y se extrajo con  $CH_2Cl_2$  (3 x 20 mL). Las fases orgánicas se secaron con  $Na_2SO_4$  y se destiló el disolvente a presión reducida. El crudo de reacción se purificó por columna cromatográfica (Silica flash Hex:AcOEt 7:3). Rendimiento 86%.

$^1H$ -RMN (400 Hz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  =3.81 (s,3H); 3.93 (s, 3H);5.17 (s, 2H); 6.92 (dd,  $J_1$ =8.6,  $J_2$ =2.1 Hz, 2H); 7.01 (d,  $J$ =8.1 1H); 7.38 (dd,  $J_1$ =8.6,  $J_2$ =2.1 Hz 3H); 7.40 (dd,  $J_1$ =8.1  $J_2$ =1.8 Hz 1H); 7.42 (d,  $J$ =1.8 Hz, 1H); 9.83 (s, 1H)

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz): δ=55.7 (OMe); 56.5 (OMe); 71.1 (OCH<sub>2</sub>Ar); 109.6 (Ar); 112.4 (Ar); 114.5 (Ar); 127.1 (Ar); 128.4 (Ar); 129.5 (Ar); 130.6 (Ar); 150.5 (Ar); 154.1 (Ar); 160.0 (Ar); 191.4 (CHO).

### **Procedimiento general para la reacción aldólica con AcOEt**

En un balón a 0°C, se colocaron 4.0 mL de THF seco, 0.39 ml de diisopropilamina (9.48 mmoles) y 8.0 mL (9.48 mmoles) de una solución 1.19 M de BuLi en THF. La mezcla se agitó durante 20 minutos a 0°C y luego se disminuyó la temperatura a -78°C. A dicha temperatura se agregó 1.07 mL de AcOEt (7.5 mmoles) y se agitó durante 10 minutos. Por último, disolvió el aldehído correspondiente (6.3 mmol) en THF seco y la disolución se agregó a la mezcla de reacción. La reacción se siguió por TLC hasta desaparición de reactivo. Una vez finalizada la reacción, se agregaron 20 mL de una disolución saturada de NHCl<sub>4</sub> y se dejó llegar a temperatura ambiente. La solución se extrajo con Et<sub>2</sub>O (3 x 10 mL), las fases orgánicas se destilaron a presión reducida y se purificó mediante columna cromatográfica (sílica gel flash, Hex:AcOEt).

### ***3-(4-(benziloxi)-3-metoxifenil)-3-hidroxiopropanoato de etilo (8)***<sup>7</sup>

Rendimiento 98%.

**<sup>1</sup>H-RMN**: (400 Hz, CDCl<sub>3</sub>): δ =1.26 (t, *J*=7.1 Hz, 3H); 2.67 (dd, *J*<sub>1</sub>=3.7, *J*<sub>2</sub>=16.3 Hz 1H); 2.75 (dd, *J*<sub>1</sub>=9.2 *J*<sub>2</sub>=16.3 Hz, 1H); 3.24 (d, *J*=3.3 Hz, 1H); 3.98 (s, 3H); 5.06 (dt, *J*<sub>1</sub>=3.4, *J*<sub>2</sub>=9.2 Hz, 1H); 5.14 (s, 2H); 6.80 (dd, *J*<sub>1</sub>=1.8 *J*<sub>2</sub>=8.2 Hz, 1H); 6.84 (d, *J*=8.2, 1H); 6.96 (d, *J*=1.8 Hz, 1H); 7.28 (m, 1H); 7.36 (m, 2H); 7.43 (m, 2H)

**<sup>13</sup>C-RMN** (100MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ=14.2 (CH<sub>3</sub>); 43.4 (CH<sub>2</sub>); 56.0 (OCH<sub>3</sub>); 60.9 (CH<sub>2</sub>); 70.2 (CHOH); 71.0 (OCH<sub>2</sub>Ph); 109.3 (Ar); 113.8 (Ar); 117.9 (Ar); 127.2 (Ar); 128.5 (Ar); 135.7 (Ar); 137.1 (Ar); 147.7 (Ar); 149.7 (Ar); 172.5 (CO).

### ***3-(4-(benciloxi) 3-metoxifenil)-3-hidroxiopropanoato de etilo (15)***<sup>8</sup>

Rendimiento 96%.

**<sup>1</sup>H-RMN** (400 Hz, CDCl<sub>3</sub>): δ =1.28 (t, *J*=7.1 Hz 3H); 2.69 (dd, *J*<sub>1</sub>=3.7 *J*<sub>2</sub>=16.3 Hz 1H); 2.77 (dd, *J*<sub>1</sub>=9.2 *J*<sub>2</sub>=16.3 Hz, 1H); 3.82 (s, 3H); 3.90 (s, 3H); 4.20 (c, *J*=7.1 Hz 2H); 5.08 (m, 3H); 6.83 (dd, *J*<sub>1</sub>=1.8 *J*<sub>2</sub>=8.3 Hz, 1H); 6.88 (d, *J*=8.3 Hz 1H); 6.91 (dd, *J*<sub>1</sub>=2.1 *J*<sub>2</sub>=8.8 Hz 2H); 6.97 (d, *J*=1.8 Hz 1H); 7.37 (dd, *J*<sub>1</sub>=2.1 *J*<sub>2</sub>=8.8 Hz, 2H).

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz): δ=14.19 (CH<sub>3</sub>); 43.38 (CH<sub>2</sub>); 55.28 (OCH<sub>3</sub>); 55.95 (OCH<sub>3</sub>); 70.18 (CHOH); 70.80 (OCH<sub>2</sub>Ar); 109.26 (Ar); 113.92 (Ar); 117.83 (Ar); 129.0 (Ar); 129.11 (Ar); 135.65 (Ar); 147.48 (Ar); 149.75 (Ar); 159.31 (Ar); 172.49 (CO).

### ***3-(4-(benziloxi)-3-metoxifenil)-3-oxopropanoato de etilo (9)***

A una solución de 3-(4-(benziloxi)-3-metoxifenil)-3-hidroxiopropanoato de etilo (2.8 g, 8.0 mmol) a 0°C en 20 mLCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> seco, se le agregó 1.0 g de tamices moleculares 4Å, y se adicionó PCC (8.6 g, 40 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 4h, luego se diluyó con Et<sub>2</sub>O, se filtró mediante celite y se lavó con Et<sub>2</sub>O. El disolvente se destiló bajo presión

reducida y el crudo se purificó por columna cromatográfica (sílica gel flash, Hex:AcOEt 1:1). Rendimiento 98%.

**<sup>1</sup>H-RMN** (400Hz, CDCl<sub>3</sub>): δ=1.25 (t, J=7.1Hz, 3H); 3.94 (s, 1H); 4.27 (c, J=7.1Hz, 2H); 5.25 (s, 2H); 5.62 (s, 2H); 6.91 (d, J=8.3 Hz 1H); 7.40 (m, 5H); 7.54 (dd, J<sub>1</sub>=2.1; J<sub>2</sub>=8.4 Hz 1H); 7.57 (d, J=2.1Hz 1H)

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz): δ=13.9 (CH<sub>3</sub>); 46.2 (CH<sub>2</sub>); 56.1 (OCH<sub>3</sub>); 63.3 (OCH<sub>2</sub>); 70.9 (OCH<sub>2</sub>Ph); 111.6 (Ar); 112.1 (Ar); 123.9 (Ar); 126.5 (Ar); 127.2 (Ar); 1288.3 (Ar); 128.8 (Ar); 135.9 (Ar); 149.7 (Ar); 153.4 (Ar); 165.4 (COOEt); 186.7(CO)

### **3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-3-oxopropanoato de etilo (10)**

En un balón se disolvió 0.1 g de 3-(4-(benziloxi)-3-metoxifenil)-3-oxopropanoato de etilo (0.30 mmol) en 10 mL de EtOH absoluto. A la mezcla se le agregó 0,01 g de Pd-C 5% y se burbujeó H<sub>2</sub>, desde un globo a presión atmosférica. La reacción se monitoreó mediante TLC hasta desaparición del reactivo. Una vez finalizada la reacción, la mezcla se filtró con papel de filtro, se destiló el disolvente bajo presión reducida y el producto se purificó mediante columna cromatográfica (sílica gel flash, Hex:AcOEt 7:3). Rendimiento 67%.

**<sup>1</sup>H-RMN** (400 Hz, CDCl<sub>3</sub>): δ=1.26 (t, J=7.16 Hz, 3H); 3.93 (s, 3H); 3.95 (s, 2H); 4.21 (c, J=7.16 Hz, 2H); 6.30 (sa, 1H); 6.94 (d, J=8.28 Hz, 1H); 7.94 (dd, J<sub>1</sub>=2.0 J<sub>2</sub>=8.28 Hz, 1H); 7.53 (d, J=2.0 Hz, 1H)

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz): δ=14.1 (CH<sub>3</sub>); 45.7 (CH<sub>2</sub>); 56.1 (OCH<sub>3</sub>); 61.5 (OCH<sub>2</sub>); 110.1 (Ar); 124.2 (Ar); 129.0 (Ar); 146.8 (Ar); 151.0 (Ar); 167.8 (COOEt); 191.1 (CHO).

### **3-(3-metoxi-4-((4-metoxibenzil)oxi)fenil)-3-oxopropanoato de etilo (16)**

**Preparación del MnO<sub>2</sub>.** Se preparó mezclando dos soluciones acuosas equimolares de KMnO<sub>4</sub> y MnSO<sub>4</sub>. El precipitado oscuro obtenido se filtró a vacío y se lavó con agua hasta remover el exceso de permanganato de potasio (las aguas de lavado son incoloras o rosa tenue). Se secó en desecador a vacío sobre pentóxido de fósforo, o pistola de secado.

En un balón de dos bocas, se disolvió 1.0 g de 3-(4-(benziloxi) 3-metoxifenil)-3-hidroxiopropanoato de etilo (2.9 mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> seco. A la mezcla se le agregó 0.26 g de MnO<sub>2</sub> (2.9mmol) recientemente preparado. La mezcla de reacción se agitó durante 78 horas a temperatura ambiente. Una vez finalizada la reacción, la mezcla se filtró mediante celite, y se lavó con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. El filtrado se concentró bajo presión reducida y el crudo de reacción se purificó mediante columna cromatográfica (sílica gel flash, Hex:AcOEt 6:4). Rendimiento 88%.

**<sup>1</sup>H-RMN** (400 Hz, CDCl<sub>3</sub>): δ=1.25 (t, J=7.1 Hz, 3H); 3.80 (s, 3H); 3.92 (s, 3H); 3.94 (s, 2H); 4.20 (c, J=7.1 Hz, 2H); 5.15 (s, 2H); 6.91 (m, 3H); 7.36 (dd, J<sub>1</sub>=2.1 J<sub>2</sub>=8.6 Hz, 2H); 7.48 (dd, J<sub>1</sub>=8.4 J<sub>2</sub>=2.1 Hz, 1H); 7.54 (d, J=2.0 Hz).

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz): δ=14.1(CH<sub>3</sub>); 45.8(CH<sub>2</sub>); 55.3(OCH<sub>3</sub>); 61.5(CH<sub>2</sub>); 70.7(CH<sub>2</sub>O); 110.6(Ar); 112.1(Ar); 114.1(Ar); 123.3(Ar); 128.0(Ar); 129.0(Ar); 129.3(Ar); 149.6(Ar); 153.0(Ar); 159.6(Ar); 167.8(COOEt); 191.1(CO).

**2-bromo-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-3-oxopropanoato de etilo (11)**

En un balón se disolvieron 0.13 g de 2-bromo-3-(3-metoxi-4-((4-metoxibenzil)oxi)fenil)-3-oxopropanoato de etilo (1,34 mmol) en 10 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> seco. A la solución se le agregó 0.57 g de TsNH<sub>2</sub> (0.74 mmol) y por último se agregó a la mezcla 0.13 g de MeSO<sub>3</sub>H (1.34mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 1 hora. Una vez finalizada la reacción, se diluyó en 5 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, se agregó una solución saturada de NaHCO<sub>3</sub> y se extrajo con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 x 20 mL). Las fases orgánicas combinadas se secaron con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se destiló el disolvente a presión reducida. El crudo resultante se purificó mediante columna cromatográfica (sílica gel flash Hex:AcOEt, 7:3). Rendimiento 43%.

**<sup>1</sup>H-RMN** (400 Hz, CDCl<sub>3</sub>): δ=1.27 (t, *J*=7.1 Hz, 3H); 3.97 (s, 3H); 4.29 (c, *J*=7.1 Hz 2H); 5.64 (s, 1H); 6.97 (d, *J*=8.9 Hz, 1H); 7.56 (d, *J*=2.0 Hz, 1H); 7.58 (dd, *J*<sub>1</sub>=2.0 *J*<sub>2</sub>=8.9 Hz 1H).

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 100M Hz): δ=13.9 (CH<sub>3</sub>); 46.2 (CHBr); 56.2 (OCH<sub>3</sub>); 63.3 (CH<sub>2</sub>); 111.0 (Ar); 114.1 (Ar); 124.7 (Ar); 126.1 (Ar); 146.9 (Ar); 151.1 (Ar); 165.4 (COOEt); 186.7 (CO).

**Procedimiento general de halogenación**

En un mortero se mezcló en seco, el éster correspondiente (3.0 mmol) con 0.54 g de NBS (3.0 mmol) durante 15 min. La mezcla sólida se dejó reposar por 1h y luego se agregó AcOEt (~50 mL) hasta retirar completamente la misma del mortero. La fase orgánica de AcOEt se lavó con agua (2 x 20 mL) en un embudo de decantación. Las fases orgánicas combinadas se secaron con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se destiló el disolvente a presión reducida. El producto se purificó mediante columna cromatográfica (sílica gel flash Hex:AcOEt 7:3).

**2-bromo-3-(3-metoxi-4-((4-metoxibenzil)oxi)fenil)-3-oxopropanoato de etilo (13)<sup>9</sup>**

Rendimiento 96%

**<sup>1</sup>H-RMN** (400 Hz, CDCl<sub>3</sub>): δ=1.25 (t, *J*=7.1 Hz, 3H); 3.80 (s, 3H); 3.92 (s, 3H); 4.27 (c, *J*=7.1 Hz, 2H); 5.15 (s, 2H); 5.64 (s, 1H); 6.91 (m, 3H); 7.36 (dd, *J*<sub>1</sub>=2.1 *J*<sub>2</sub>=8.6 Hz, 2H); 7.48 (dd, *J*<sub>1</sub>=8.4 *J*<sub>2</sub>=2.1 Hz, 1H); 7.54 (d, *J*=2.0 Hz).

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 100M Hz): δ=13.9 (CH<sub>3</sub>); 46.2 (CHBr); 55.3 (OCH<sub>3</sub>); 56.1 (OCH<sub>3</sub>); 63.3 (CH<sub>2</sub>); 70.7 (OCH<sub>2</sub>); 111.5 (Ar); 112.1 (Ar); 114.0 (Ar); 114.1 (Ar); 123.9 (Ar); 126.4 (Ar); 127.9 (Ar); 129.0 (Ar); 129.1 (Ar); 149.7 (Ar); 153.5 (Ar); 159.6 (Ar); 165.4 (COOEt); 186.7 (CO).

**3-(4-(benziloxi)-3-metoxifenil)-2-bromo-3-oxopropanoato de etilo (17)<sup>9</sup>**

Rendimiento 89%.

**<sup>1</sup>H-RMN** (400 Hz, CDCl<sub>3</sub>): δ=1.25 (t, *J*=7.1 Hz, 3H); 3.94 (s, 3H); 4.27 (c, *J*=7.1 Hz, 2H); 5.25 (s, 2H); 5.62 (s, 1H); 6.91 (d, *J*=8.3 Hz, 1H); 7.39 (m, 5H); 5.54 (dd, *J*<sub>1</sub>=2.1 *J*<sub>2</sub>=8.3 Hz, 1H); 7.57 (d, *J*=2.1 Hz, 1H)

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz): δ=13.9(CH<sub>3</sub>); 46.2 (CHBr); 56.1 (OCH<sub>3</sub>); 63.3 (OCH<sub>2</sub>); 70.9 (OCH<sub>2</sub>Ph); 111.5 (Ar); 1121 (Ar); 123.9 (Ar); 126.5 (Ar); 127.2 (Ar); 128.3 (Ar); 128.8 (Ar); 135.9 (Ar); 149.7 (Ar); 153.4 (Ar); 165.4 (COOEt); 186.7 (CO).

**Polímero A<sup>10</sup>**

En un balón se colocaron 0.83 g de Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (2.36 mmol), 0.50 g de 2-bromo-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-3-oxopropanoato de etilo (1.57 mmol) en 2.5 mL de DMF seco. La solución se dejó con agitación bajo atmósfera de N<sub>2</sub> a temperatura ambiente durante 24h. La mezcla de reacción se vertió en un baño de agua-hielo (100 mL) y el pH se llevó a 2 con HCl 2M. El polímero precipitado se filtró, se lavó con agua y se secó en desecador a vacío con P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>.

**Polímero B<sup>10-12</sup>**

A una suspensión de 0.10 g del polímero A en 2.0 mL de MeOH, se le agregaron 0.13 g de NaBH<sub>4</sub> (1.0 mmol) a 0°C. La mezcla de reacción se llevó a temperatura ambiente y se dejó con agitación durante 24h. Se agregó a la mezcla ácido acético gota a gota para eliminar los restos de NaBH<sub>4</sub>. La mezcla resultante se vertió sobre agua acidificada a pH 2 (30 mL) y se agregó AcOEt, observando la formación de un precipitado amarillento. El sólido formado se filtró, se lavó con agua y se colocó en un desecador con P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>.

**6.8. SÍNTESIS DE MODELOS CON ENLACE β-5****Alcohol 4-hidroxi-3-metoxcinamil (21)<sup>13</sup>**

En un balón bajo atmósfera de nitrógeno se colocaron 0.04 g de LiAlH<sub>4</sub> (1.0mmol) y 4 mL de Et<sub>2</sub>O seco. A dicha solución se le agregó una solución de 0.05 mL de BnBr (1,0 mmol) en 1.0 mL de Et<sub>2</sub>O seco, gota a gota desde un eculizador a temperatura ambiente. Una vez finalizado el agregado, la mezcla se dejó agitando por 15 min. y luego se le agregó una disolución de (*E*)-4-hidroxi-3-metoxcinamato de etilo (0.22 g; 1 mmol, en 1 mL de Et<sub>2</sub>O seco) gota a gota desde un embudo con eculizador. La reacción se agitó durante 1.5h y luego se agregó agua hasta destrucción de hidruros. La mezcla de reacción se filtró por celite con AcOEt para quitar los haluros formados, se agregó Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se destiló el disolvente a presión reducida. El producto se purificó por columna cromatográfica (sílica gel flash, FM: Hex 1:1 AcOEt). Rendimiento 66%.

<sup>1</sup>H-RMN (400Hz, CDCl<sub>3</sub>): δ=1.90 (sa, 1H); 3.87 (s, 1H); 4.29 (d, *J*=6.0 Hz 2H); 5.86 (sa, 1H); 6.21 (dt, *J*<sub>1</sub>=6.0, *J*<sub>2</sub>=15.8 Hz, 1H); 6,51 (d, *J*=15.8 Hz 1H); 6,87 (m, 3H).

<sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz): δ=55.9 (OCH<sub>3</sub>); 63.8 (CH<sub>2</sub>OH); 108.4 (Ar); 114.5 (Ar); 120.3 (Ar); 126.1 (CH); 129.2 (Ar); 131.4 (CH); 145.6 (Ar); 146.7 (Ar).

**(*E*)-5-(3-etoxi-3-oxoprop-1-en-1-il)-2-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-7-metoxi-2,3-dihidrobenzofuran-3-carboxilato de etilo (22)<sup>14</sup>**

Se disolvieron 0.22 g de (*E*)-4-hidroxi-3-metoxcinamato de etilo (1.0mmol) en 20 mL de acetona. La disolución se agregó a un matraz de 250 mL, conteniendo 150 mL de buffer fosfato pH 6.0. Luego se agregaron 0.55 eq (51.7 mg relativo a fenoles) de UHP (complejo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-urea), y por último se agregó peroxidasa de rábano picante (HRPO tipo VI-A, 2.0 mg de enzima en 2.0 mL de buffer). La mezcla se agitó durante 45 min., y luego se agregó HCl 3% hasta pH 3. La solución final se extrajo con AcOEt (3 x 70 mL), se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se destiló el disolvente bajo presión reducida. El producto se purificó mediante columna cromatográfica (sílica gel flash, Hex:AcOEt 6:4). Rendimiento 17%.

**<sup>1</sup>H-RMN** (400 Hz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 1.34 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H); 3.87 (s, 3H); 3.92 (s, 3H); 4.29 (m, 5H); 5.70 (s, 1H); 6.11 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H); 6.31 (d, *J* = 15.9 Hz 1H); 6.91 (m, 3H); 7.03 (d, *J* = 1,1 Hz 1H); 7.19 (t, *J* = 1.4 Hz, 1H); 7.64 (d, *J* = 15.9 Hz, 1H).

**<sup>13</sup>C-RMN** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 14.3 (CH<sub>3</sub>); 14.4 (CH<sub>3</sub>); 55.6 (OCH<sub>3</sub>); 56.0 (CH<sub>3</sub>O); 56.1 (CHCO); 60.5 (OCH<sub>2</sub>); 61.9 (OCH<sub>2</sub>); 87.5 (CH); 108.8 (Ar); 111.9 (Ar); 114.5 (Ar); 115.9 (CH=CH); 117.9 (Ar); 119.5 (Ar); 125.9 (Ar); 128.6 (Ar); 131.5 (Ar); 144.6 (CH=CH); 144.7 (Ar); 146.0 (Ar); 146.7 (Ar); 149.9 (Ar); 167.2 (COOEt); 170.2 (COOEt).

***(E)-4-(3-(hidroximetil)-5-(3-hidroxi-1-en-1-il)-7-metoxi-2,3-dihidrobenzofuran-2-il)-2-metoxifenol (23)***

Se disolvieron 0.18 g de alcohol 4-hidroxi-3-metoxcinámico (1.0 mmol) en 20 mL de acetona. La disolución se agregó en un matraz de 250 mL, conteniendo 150 mL de buffer fosfato pH 6.0. Luego se agregaron 0,55 eq (51,7 mg relativo a fenoles) de UHP, y por último se agregó peroxidasa de rábano picante (HRPO tipo VI-A, 2.0 mg de enzima en 2.0 mL de buffer). La mezcla se agitó durante 45 minutos y se agregó HCl 3% hasta pH 3. La mezcla final se extrajo con AcOEt (3 x 70 mL), se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se destiló el disolvente bajo presión reducida. El producto se purificó mediante columna cromatográfica (sílica gel flash, Hex:AcOEt 1:9). Rendimiento 7%.

**<sup>1</sup>H-RMN** (400 Hz, Acetona-d<sub>6</sub>): δ = 2.90 (sa, 2H); 3.54 (c, *J* = 6.4 Hz 1H); 3.82 (s, 3H); 3.87 (s, 3H); 3.88 (d, *J* = 5.7 Hz, 12H); 4.20 (dd, *J*<sub>1</sub> = 5.6 *J*<sub>2</sub> = 1.6 Hz, 2H); 5.57 (d, *J* = 6.6 Hz 1H); 6.25 (dt, *J*<sub>1</sub> = 5.6 *J*<sub>2</sub> = 15.8 Hz 1H); 6.53 (dt, *J*<sub>1</sub> = 1.6 *J*<sub>2</sub> = 15.9 Hz 1H); 6.81 (d, *J* = 8.1 Hz 1H); 6.89 (dd, *J*<sub>1</sub> = 8.1 *J*<sub>2</sub> = 2.0 Hz 1H); 6.95 (d, *J* = 1.6 Hz 1H); 6.98 (t, *J* = 1.2 Hz 1H); 7.04 (d, *J* = 2.0 Hz 1H).

**<sup>13</sup>C-RMN** (100 MHz, Acetona-d<sub>6</sub>): δ = 53.9 (CH); 55.4 (OCH<sub>3</sub>); 55.5 (OCH<sub>3</sub>); 62.5 (CH<sub>2</sub>OH); 63.7 (CH<sub>2</sub>OH); 87.6 (CH); 109.6 (Ar); 110.8 (Ar); 114.7 (Ar); 115.2 (Ar); 118.7 (Ar); 127.5 (CH=CH); 129.5 (CH=CH); 129.6 (Ar); 131.0 (Ar); 133.5 (Ar); 144.3 (Ar); 146,4 (Ar); 147.5 (Ar); 148.1 (Ar).

**6.9. SÍNTESIS DE MODELO CON ENLACE 5-5' Y β-O-4**

**6,6'-dihidroxi-5,5'-dimetoxi-[1,1'-bifenil]-3,3'-dicarbaldehído (24)<sup>15</sup>**

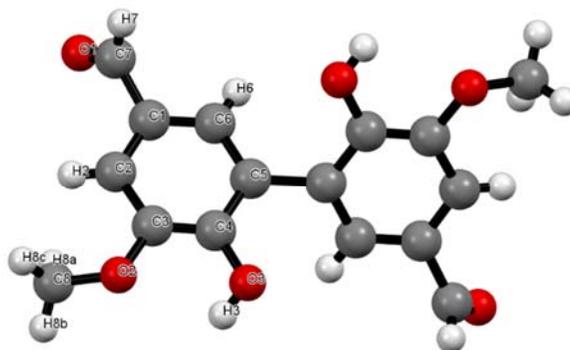
En un matraz erlenmeyer de 250 mL se colocaron 100 mL de agua desionizada y 1.0 g de vainillina (6.6 mmol). La mezcla se calentó bajo agitación constante hasta disolución total de reactivo. El matraz se retiró de la fuente calentamiento y se agregó AcOH 0.010 M (~2.20 mL, 0.02mmol), hasta disminuir el pH a 4. La mezcla se dejó enfriar hasta 40°C y se agrega la enzima de rábano picante (HRPO tipo VI-A, 1000 unidades, 1.00 mL de una solución de enzima de 1 mL/mg) y por último H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3% (7.5 mL, 6.6 mmol) con agitación constante. La mezcla se dejó agitando durante 5 min., y luego se filtró el sólido resultante mediante embudo Büchner, lavando el sólido con agua desionizada. El producto se secó en desecador con P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. Rendimiento 65%.

**<sup>1</sup>H-RMN** (400Hz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ = 3.93 (s, 6H); 7.43 (s, 4H); 9.81 (s, 1H).

$^{13}\text{C}$ -RMN (DMSO- $d_6$ , 100 MHz):  $\delta$ =56.0 (CH<sub>3</sub>O); 56.5 (CH<sub>3</sub>O); 109.5 (Ar); 111.1 (Ar); 115.8 (Ar); 125.0 (Ar); 126.6 (Ar); 128.1 (Ar); 128.7 (Ar); 129.1 (Ar); 148.7 (Ar); 151.0 (Ar); 153.5 (Ar); 191.1 (CHO); 191.2 (CHO).

### Difracción de RX

El polvo insoluble de la reacción de obtención de divainilina se colocó en el difractor Rigaku ULTIMA IV del CADifRaX y se colectaron datos de DRX de polvo. Los datos fueron procesados, se determinaron posiciones de picos con Winplotr<sup>16</sup> y se realizaron intentos de autoindizado utilizando los programas DICVOL,<sup>17</sup> TREOR<sup>18</sup> e ITO.<sup>19</sup> Los tres programas proporcionaron celdas unidades consistentes por lo que se realizó un ajuste de Le Bail<sup>20</sup> usando el programa GSAS/EXPGUI<sup>21</sup> para confirmar la celda unidad ortorrómbica y determinar el grupo espacial. Se determinaron las extinciones sistemáticas consistentes con los grupos Pba2(#32) y Pbam (#55). Luego se utilizó el programa de resolución de estructuras por difracción de polvo EXPO2013<sup>22</sup> que obtuvo la misma celda unidad, ajustó el diagrama para extraer las intensidades de difracción y determinar el grupo espacial y resolvió la estructura utilizando Métodos Directos.



**Figura 4:** Estructura de divainilina (**24**), mediante difracción de RX de polvo.

Datos cristalográficos		
Fórmula química	<b>C<sub>16</sub>H<sub>14</sub>O<sub>6</sub></b>	
Tipo de celda	Ortorrómbica	
Grupo Espacial	Pba2 (# 32)	
Z, Z'	4, 2	
Tamaño de celda,	a	12.30721(72) Å
	b	13.99374 (81) Å
	c	3.9368(14) Å
Volumen de celda	678.02(8) Å <sup>3</sup>	
ρ (calc.)	1.481 g/cm <sup>3</sup>	
F(000)	316	
Datos de difracción		
Fuente/cond. operación	CuKa/40kV, 30mA	
Rango 2θ (°)/resol (Å)	8-105/0.798	
Paso (°)/tiempo paso (s)	0.01/20	
N(obs)	1068	
Resultados del refinamiento		
Parám./Restr.	25/41	
c <sup>2</sup>	33.9	
R <sub>p</sub> /R <sub>wp</sub> (%)	<b>8.20/12,15</b>	
R <sub>B</sub>	<b>27.2</b>	

**Tabla 3:** Datos cristalinis y de la determinación estructural.

### Acetilación de divainillina<sup>15</sup>

En un balón se disolvieron 0.20 g de 6,6'-dihidroxi-5,5'-dimetoxi-[1,1'-bifenil]-3,3'-dicarbaldéhid 0,66 mmol) en una mezcla de 0.06 mL de Ac<sub>2</sub>O (0.07 g, 0.66 mmol) y 1.01 mL de piridina (0.99 g, 12.5 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 45 min. La solución resultante se vertió sobre agua y se obtuvo un precipitado de color gris. El sólido se filtró a vacío mediante embudo Büchner y se lavó con HCl 0.1 N y agua. El sólido se secó en desecador con P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>.

### **Acetato de 5,5'-diformil-2'-hidroxi-3,3'-dimetoxi-[1,1'-bifenil]-2-il (29)**

Rendimiento 40%.

<sup>1</sup>H-RMN (400Hz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ=2.04 (s, 3H); 3.90 (s, 3H); 3.94 (s, 3H); 7.32 (d, J=1.8 Hz, 1H); 7.48 (d, J=1.8 Hz, 1H); 7.58 (d, J=1.8 Hz, 1H); 7.62 (d, J=1.8 Hz, 1H); 9.80 (s, 1H); 9.99 (s, 1H).

<sup>13</sup>C-RMN (DMSO-d<sub>6</sub>, 100 MHz): δ=20.2 (CH<sub>3</sub>); 56.2 (OCH<sub>3</sub>); 56.4 (OCH<sub>3</sub>); 110.0 (Ar); 110.7 (Ar); 123.0 (Ar); 125.9 (Ar); 127.0 (Ar); 128.0 (Ar); 132.2 (Ar); 134.3 (Ar); 142.3 (Ar); 148.2 (Ar); 150.3 (Ar); 152.1 (Ar); 167.5 (CO); 191.1 (CHO); 191.2 (CHO).

**Diacetato de 5,5'-diformil-2'-hidroxi-3,3'-dimetoxi-[1,1'-bifenil]-2-il (30)**

Rendimiento 32%

**<sup>1</sup>H-RMN** (400Hz, CDCl<sub>3</sub>): δ=2.13 (s, 6H); 3.95 (s, 6H); 7.41 (d, *J*=1.8 Hz, 2H); 7.56 (d, *J*=1.8 Hz, 2H); 9.95 (s, 2H).

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz): δ=20.5 (CH<sub>3</sub>); 56.5 (OCH<sub>3</sub>); 110.4 (Ar); 126.6 (Ar); 131.3 (Ar); 134.8 (Ar); 142.9 (Ar); 152.5 (Ar); 167.9 (CO); 190.8 (CHO).

**2-bromo-1-(3,4-dimetoxifenil)etanona<sup>23</sup> (32)**

En un balón se disolvió 1.0 g de 3',4'-acetofenona (**31**) (5.55 mmol) en 16.0 mL de CHCl<sub>3</sub>. A la disolución se le agregó 0.34 mL de Br<sub>2</sub> (1.06 g, 6,66 mmol), se agitó durante 30 min. a temperatura ambiente y luego se calentó a reflujo por 24h. El disolvente se destiló a presión reducida y el producto se purificó mediante columna cromatográfica (sílica gel flash, Hex:AcOEt 6:4). Rendimiento 50%.

**<sup>1</sup>H-RMN** (400Hz, CDCl<sub>3</sub>): δ=3.95 (s, 3H); 3.97 (s, 3H); 4.42 (CH<sub>2</sub>Br); 6.92 (d, *J*=8.4 Hz, 1H); 7.55 (d, *J*=2.1 Hz, 1H); 7.62 (dd, *J*<sub>1</sub>=2.1 *J*<sub>2</sub>=8.4 Hz, 1H).

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz): δ=30.4 (CH<sub>2</sub>Br); 56.1 (OCH<sub>3</sub>); 56.2 (OCH<sub>3</sub>); 110.1 (Ar); 110.8 (Ar); 123.9 (Ar); 127.0 (Ar); 149.3 (Ar); 154.0 (Ar); 190.1 (CO).

**Acetato de 2'-(2-(3,4-dimetoxifenil)-2-oxoetoxi)-5,5'-diformil-3,3'-dimetoxi-[1,1'-bifenil]-2-il (33)<sup>24</sup>**

A una solución de 0.18 g de α-bromo-3,4-dimetoxiacetofenona (0.71 mmol) y 0.29 g de acetato de 5,5'-diformil-2'-hidroxi-3,3'-dimetoxi-[1,1'-bifenil]-2-il (0.84 mmol) en 12 mL de acetona seca, se le adicionaron 0.18 g de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> anhidro (1.3 mmol). La mezcla se reflujo durante 1 hora. La solución se filtró para quitar los restos insolubles y el disolvente se destiló bajo presión reducida, dando un residuo que se disolvió en CHCl<sub>3</sub> y se lavó con una solución 0.5M de NaOH en embudo de decantación. La capa orgánica se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, y el disolvente se destiló bajo presión reducida. El producto se purificó por columna cromatográfica (sílica gel flash, Hex:AcOEt 1:1) Rendimiento 61%.

**<sup>1</sup>H-RMN:** (400Hz, CDCl<sub>3</sub>): δ=2.14 (s, 3H); 3.89 (s, 3H); 3.89 (s, 3H); 3.91 (s, 3H); 3.93 (s, 3H); 5.19 (s, 2H); 6.79 (d, *J*=8.2 Hz, 1H); 7.38 (d, *J*=1.9 Hz, 1H); 7.39 (d, *J*=1.9 Hz, 1H); 7.41 (dd, *J*<sub>1</sub>=2.0 *J*<sub>2</sub>=8.2 Hz, 1H); 7.43 (d, *J*=1.8 Hz, 1H); 7.50 (d, *J*=1.9 Hz, 1H); 7.51 (d, *J*=1.8 Hz, 1H); 9.89 (s, 1H); 9.90 (s, 1H).

**<sup>13</sup>C-RMN:**(CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz): δ= 20.5 (CH<sub>3</sub>); 55.9 (OCH<sub>3</sub>); 56.0 (OCH<sub>3</sub>); 56.1 (OCH<sub>3</sub>); 56.2 (OCH<sub>3</sub>); 74.6 (OCH<sub>2</sub>CO); 109.5 (Ar); 109.9 (Ar); 110.2 (Ar); 110.5 (Ar); 122.6 (Ar); 127.4 (Ar); 127.5 (Ar); 127.6 (Ar); 129.8 (Ar); 132.0 (Ar); 132.1 (Ar); 134.4 (Ar); 142.7 (Ar); 148.9 (Ar); 150.4 (Ar); 152.2 (Ar); 152.4 (Ar); 153.5 (Ar); 168.0 (COCH<sub>3</sub>); 190.7 (CHO); 191.0 (CHO); 192.4 (COCH<sub>2</sub>O).

### 6.10. SÍNTESIS DE MODELO CON ENLACE $\beta$ - $\beta$

#### Ácido (*E*)-4-hidroxi-3,5-dimetoxicinámico (27)

Se disolvió 1.0 g de ácido malónico (9.6 mmol) en 10 mL de THF. Se agregó 0.56 mL de piridina (7.0 mmoles), 1.16 g de 4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzaldehído (6.4 mmoles) y 0.24 mL de piperidina (2.4 mmoles). La mezcla se calentó a reflujo durante 3h. Luego de enfriar, la disolución se vertió en agua-hielo y se añadió HCl concentrado hasta pH 3. La disolución acuosa se extrajo con acetato de etilo (3 x 20 mL). Las fases orgánicas combinadas se secaron con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y el disolvente se destiló bajo presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna (sílica gel flash, Hex:AcOEt 1:1). Rendimiento: 75 %.

<sup>1</sup>H-RMN: (400Hz, Acetona-d<sub>6</sub>):  $\delta$ =3.88 (s, 6H); 6.37 (d, *J*=15.9 Hz, 1H); 6.99 (s, 2H); 7.56 (d, *J*=15.9, 1H).

#### 3-(4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil)-6-(3,4,5-trimetoxifenil)tetrahidrofuro[3,4-c]furan-1,4-diona (28)

Se disolvió 20x10<sup>-3</sup> g de ABTS en 2.0 mL de buffer acetato pH=4.6. Luego de disuelto el ABTS, se agregó 8.0 mL de AcOEt, formando un sistema bifásico. A éste se le agregó 8x10<sup>-3</sup> g de ácido (*E*)-4-hidroxi-3,5-dimetoxicinámico, y por último la lacasa correspondiente (*T. versicolor*, 3.35 UE/mL). Luego de 20 min de reacción se extrajo la fase acuosa con AcOEt (3 x 0.5 mL), las fases orgánicas se combinaron junto con la fase de AcOEt presente en la reacción, se secaron con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, y el disolvente se destiló a presión reducida. El crudo de reacción se purificó por columna cromatográfica (sílica gel flash, Hex:AcOEt 4:6). Rendimiento 63%.

<sup>1</sup>H-RMN (400Hz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$ =3,83 (s, 12H); 4.13 (d, *J*=1.0 Hz, 2H); 5.76 (d, *J*=1.0 Hz, 2H); 6.73 (s, 4H).

<sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz):  $\delta$ =48.8 (CH); 49.1 (CH); 56.7 (OMe); 83.4 (CH<sub>2</sub>); 104.2 (Ar); 129.8 (Ar); 137.3 (Ar); 149.0 (Ar); 176.2 (CO).

### 6.11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) Perrin, D. D. *Purification of Laboratory Chemicals* 3<sup>o</sup> ed.; Pergamon Press Ltd, Headington Hill Hall: Oxford, 1988.
- (2) Shannon, L. M.; Kay, E.; Lew, J. Y. *J.Biol.Chem.* **1966**, *241*, 2166.
- (3) Sheldrick, G. M. *Acta Cryst.* **2015**, *A71*, 3.
- (4) Sheldrick, G. M. *Acta Cryst.* **2015**, *C71*, 3.
- (5) Hübschle, C. B.; Sheldrick, G. M.; Dittrich, B. *J. Appl. Cryst.* **2011**, *44*, 1281.
- (6) Hediger, M. E. *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 4995.
- (7) Ciofi-Baffoni, S.; Banci, L.; Brandi, A. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1998**, 3207.
- (8) Toikka, M.; Sipilä, J.; Teleman, A.; Brunow, G. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1998**, 3813.
- (9) Pravast, I. Z., M., Stavber, S. *Green Chem.* **2006**, *8*, 1001.
- (10) Kishimoto, T.; Uraki, Y.; Ubukata, M. *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 2982.
- (11) Kishimoto, T.; Uraki, Y.; Ubukata, M. *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3*, 1067.

- (12) Kishimoto, T.; Uraki, Y.; Ubukata, M. *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 1343.
- (13) Wanga, X.; Li, X.; Xue, J.; Zhao, Y.; Zhang, Y. *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 413.
- (14) Zhang, A.; Lu, F.; Sun, R.; Ralph, J. *Planta* **2009**, *229*, 1099.
- (15) Nishimura, R. T.; Giammanco, C. H.; Vosburg, D. A. *J. Chem. Educ.* **2010**, *87*, 526.
- (16) Roisnel, T.; Rodríguez-Carvajal, J. In *EPDIC 7: Proceedings of the Seventh European Powder Diffraction Conference* Delhez, R., Mittenmeijer, E. J., Eds.; Trans Tech Publications: Switzerland, 2000, p 118.
- (17) Boultif, A.; Louer, D. *J. Appl. Cryst.* **2004**, *37*, 724.
- (18) Werner, P.-E.; Eriksson, L.; Westdahl, M. *J. Appl. Cryst.* **1995**, *18*, 367.
- (19) Visser, J. W. *J. Appl. Cryst.* **1969**, *2*, 89.
- (20) Bail, A. L.; Duroy, H.; Fourquet, J. L. *Mat. Res. Bull.* **1988**, *23*, 447.
- (21) Toby, B. H. *J. Appl. Cryst.* **2000**, *34*, 210.
- (22) Altomare, A.; Cuocci, C.; Giacovazzo, C.; Moliterni, A.; Rizzi, R.; Corriero, N.; Falcicchio, A. *J. Appl. Cryst.* **2013**, *46*, 1231.
- (23) Skoumbourdis, A. P.; Huang, R. S., N.; Leister, W. G., V.; Cho, M. I., J.; Nirenberg, M. A.; C. P.; Xia, M. T., C.J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 1297.
- (24) Alves, V. L.; Drumond, M. G.; Stefani, G. M.; Cheng, C.-L.; Piló-Veloso, D. *Journal Brazilian Chemical Society* **2000**, *11*, 467.

# **Capítulo 7**

## **Producción científica**

## 7.1. PUBLICACIONES

“Organocatalyzed Decarboxylation of Naturally Occurring Cinnamic Acids: Potential Role in Flavoring Chemicals Production”. Aldabalde, V.; Risso, M.; Derrudi, M. L.; Geymonat, F.; Seoane, G.; Gamenara, D.; Saenz Méndez, P. *Open Journal of Physical Chemistry* 1, 85-93, 2011.

DOI:10.4236/ojpc.2011.13012.

## 7.2. PRESENTACIÓN EN CONGRESOS

### 1. **Fraccionamiento de lignina kraft. Identificación y caracterización mediante RMN de $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ y HSQC.**

Virginia Aldabalde, Daniela Gamenara, Gustavo Seoane, Patricia Saenz Méndez  
Tercer Encuentro Nacional de Ciencias Químicas, 4-6 noviembre 2013, Montevideo, Uruguay.

Tipo de presentación: Oral

### 2. **Kraft lignin as renewable source of high added-value chemicals.**

Virginia Aldabalde, Daniela Gamenara, Gustavo Seoane, Patricia Saenz Méndez  
4th International IUPAC Conference on GREEN CHEMISTRY, 25-29 agosto 2012, Foz do Iguaçu, Brazil.

Tipo de presentación: Póster.

### 3. **Síntesis de modelos de lignina.**

Virginia Aldabalde, Laura Franco Fraguas, Daniela Gamenara, Gustavo Seoane, Patricia Saenz Méndez  
XVIII Simposio Nacional de Química Orgánica, 13-16 noviembre 2011. Villa Carlos Paz, Córdoba, Argentina.

Tipo de presentación: Póster.

### 4. **Síntesis de modelos de lignina y estructuras relacionadas con potencial sintético.**

Virginia Aldabalde, Laura Franco Fraguas, Daniela Gamenara, Gustavo Seoane, Patricia Saenz Méndez  
*Segundo Encuentro Nacional de Ciencias Químicas, 24-26 de octubre 2011, Montevideo, Uruguay*

Tipo de presentación: Póster.

### 5. **Síntesis de modelos de lignina utilizando peroxidasas y laccasas.**

Virginia Aldabalde, Laura Franco Fraguas, Daniela Gamenara, Gustavo Seoane, Patricia Saenz Méndez  
IV Encuentro Regional de Biotransformaciones, 8-10 de diciembre de 2010. Montevideo, Uruguay.

Tipo de presentación: Póster

### 6. **Recuperación de productos químicos de alto valor agregado a partir de lignina Kraft. Preparación de modelos de lignina y estructuras relacionadas con potencial sintético.**

Virginia Aldabalde, Lucía Derrudi, Gustavo Seoane, Daniela Gamenara, Patricia Saenz Méndez

*Primer Encuentro Nacional de Ciencias Químicas, 3-4 de diciembre 2009, Montevideo, Uruguay*

Tipo de presentación: Póster.

**7. Lignina Kraft: purificación, caracterización y recuperación de productos de alto valor agregado.**

Virginia Aldabalde, Lucía Derrudi, Gustavo Seoane, Daniela Gamnara, Patricia Saenz Méndez

XVII Simposio Nacional de Química Orgánica, 15-18 noviembre 2009. Mendoza, Argentina.

Tipo de presentación: Póster.

**8. Efecto de las condiciones en el curso de la reacción descarboxilativa de Knoevenagel.**

Federico Geymonat, Virginia Aldabalde, María Lucía Derrudi, Daniela Gamnara, Gustavo Seoane, Patricia Saenz Méndez

XVII Simposio Nacional de Química Orgánica, 15-18 noviembre 2009. Mendoza, Argentina.

Tipo de presentación: Póster.

**9. Recovery of high value-added chemicals products from Kraft lignin.**

Virginia Aldabalde, Daniela Gamnara, Patricia Saenz Méndez

ACS Summer School on Green Chemistry, Golden, Colorado, julio-agosto de 2009, Colorado, EEUU.

Tipo de presentación: Póster.

**10. Estudio experimental y computacional de reacciones químicas del ácido peroxocarbónico con subproductos de descomposición de la lignina en CO<sub>2</sub> supercrítico.**

Patricia Saenz-Méndez, Virginia Aldabalde, Oscar N. Ventura

QUITEL XXXV, Setiembre de 2009, San Andrés, Colombia

Tipo de presentación: Póster.

**7.3. DIFUSIÓN EN PRENSA ESCRITA**

Título del artículo: Licor Dulce

Medio de prensa: La diara/Suplemento de cultura científica, v: 2 , p: 77 , 2011

[http://media.ladiaria.com/editions/20110527/la\\_diaria-20110527-\\_cultura\\_cientifica\\_3.pdf](http://media.ladiaria.com/editions/20110527/la_diaria-20110527-_cultura_cientifica_3.pdf)