



UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO EN ALIMENTOS

Programa de Posgrado en Ciencias y Tecnología de Alimentos

**Extracción y Caracterización de Lignina de Paja de Trigo (*Triticum durum*)
y Uso para Mejorar las Propiedades Funcionales de Películas de Almidón**

TESIS

Como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS

Presenta

M. C. José Luis Espinoza Acosta

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

APROBACIÓN

Extracción y Caracterización de Lignina de Paja de Trigo (*Triticum durum*) y Uso para Mejorar las Propiedades Funcionales de Películas de Almidón

M. C. José Luis Espinoza Acosta

Autor

Dra. Patricia Isabel Torres Chávez

Director de tesis

Dr. Benjamín Ramírez Wong

Miembro del Comité de tesis

Dr. Luis Arturo Bello Pérez

Miembro del Comité de tesis

Dra. Maribel Plascencia Jatomea

Miembro del Comité de tesis

Dra. Elizabeth Carvajal Millán

Miembro del Comité de tesis

DERECHOS DE AUTOR

El presente trabajo de tesis se presenta como uno de los requisitos parciales para la obtención del grado de **Doctor en Ciencias de los Alimentos** de la Universidad de Sonora.

Se deposita en la biblioteca del Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos para ponerla a disposición de los interesados. Se permiten citas breves del material contenido en la tesis sin permiso del autor, siempre y cuando se otorgue el crédito correspondiente. Para reproducir, o en su caso referirse a este documento en forma parcial o total, se deberá solicitar la autorización al Coordinador del Programa del Posgrado.

Bajo cualquier otra circunstancia se debe solicitar permiso directamente al autor.

Atentamente

M.C. José Luis Espinoza Acosta

Dr. Enrique Márquez Ríos
Coordinador del Programa de Posgrado

AGRADECIMIENTOS

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)** por el apoyo al proyecto No. 181185 “**Caracterización Estructural de la Lignina de Paja de Trigo**”. Del cual forma parte este trabajo y por el apoyo recibido para llevar a cabo mis estudios.

A la **Universidad de Sonora**, en especial al **Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos**, mi segunda casa por permitirme desarrollar la investigación en sus instalaciones. A los maestros, administrativos y amigos que estuvimos ocupando el mismo espacio estos últimos 4 años, todos y cada uno de ellos han aportado algo a mi formación.

A mi **directora de tesis la Dra. Patricia Torres** por su infinita paciencia, su ayuda incondicional, por apoyarme siempre en los momentos buenos y malos. Le agradezco por proporcionarme un espacio de trabajo y todo lo necesario para realizar el doctorado. Le estaré enormemente agradecido.

A los miembros de mi comité de tesis doctoral, **Dra. Elizabeth Carvajal**, **Dr. Luis Arturo Bello** y a la **Dra. Maribel Plascencia** por sus valiosas aportaciones y consejos. Especialmente agradezco al **Dr. Benjamín Ramírez Wong** por su amistad y por facilitarme sus equipos de laboratorio. Al **Dr. Francisco Rodríguez Félix** y a la **Dra. Beatriz Montaña Leyva** agradezco su disponibilidad, sus consejos y apoyo cada vez que los necesite.

Al **Centro de Investigación en Materiales Avanzados (CIMAV)**, Chihuahua, Chihuahua especialmente al **Departamento de Integridad y Diseño de Materiales Compuestos** por permitirme realizar parte de la investigación en sus instalaciones.

DEDICATORIAS

A mi **Abuelo Daniel Espinoza** que en paz descansa, quien se nos adelantó en el camino, le dedico este logro.

A mi esposa **Carmen Alicia** por todo su amor, apoyo, comprensión, por aguantarme y alentarme todos los días. Porqué siempre tuvo fe en mí. **Ella y mis hijos Luis Ángel y Vanessa Sofía** fueron el motor que me impulsaron a seguir adelante cada día

A mis Padres **Luis Manuel y Nora Elba**, por apoyarme en las buenas y malas, por confiar en mí, todos mis logros son suyos también.

A mis **hermanos** Juan Pablo, Dulce María, Fernando y Jesús Enrique por ser los mejores hermanos.

A mis **amigos** por soportarme, apoyarme y animarme en todo momento. Especialmente a Marina Rosas, Tayde Neftali Calvario, Edgar Enrique Baldenegro y a la maestra Carmen Molina Maldonado.

RESUMEN

Los residuos agrícolas como la paja de trigo son una buena opción para obtener múltiples productos de base biológica sin poner en peligro la seguridad alimentaria. Los residuos agrícolas son una fuente abundante y accesible de polímeros naturales (celulosa, hemicelulosa y lignina). Estos polímeros pueden ser extraídos de la paja y convertidos en biocombustibles, energía, compuestos químicos y biomateriales. Los biomateriales generalmente presentan desventajas como fragilidad y poca resistencia a la humedad comparado con materiales obtenidos con polímero sintéticos. Estas desventajas pueden ser superadas mediante la preparación de mezclas con polímeros hidrófobos como la lignina. Debido a su estructura aromática y la presencia de residuos fenólicos, la lignina tiene múltiples funcionalidades siendo capaz de actuar como compatibilizante, plastificante, agente hidrofóbico, retardante de flamas, o estabilizante de biomateriales. Las propiedades finales del biomaterial dependerán del tipo de lignina y de la forma en que se adicione. El objetivo de esta investigación fue extraer y caracterizar la lignina de paja de trigo (*Triticum durum*) para preparar películas de almidón y lignina con propiedades funcionales mejoradas. Por lo que el estudio fue dividido en 3 etapas. La etapa I consistió en evaluar el efecto del tamaño de partícula y el desgrasado en el rendimiento de extracción de la lignina, así como en la caracterización de la lignina. En la etapa II se evaluaron métodos enzimáticos para la modificación de la lignina extraída de la paja de trigo. Por último, la etapa III consistió en preparar y evaluar películas de almidón adicionando varias concentraciones de la fracción soluble en metanol de lignina. En la etapa I la lignina fue extraída de la paja de trigo usando una mezcla de solventes orgánicos y agua, debido a que esta metodología permite separar los principales polímeros de la paja de trigo y obtener lignina relativamente más pura que con otros métodos. Bajo las condiciones establecidas el tamaño de

partícula no tuvo efecto en el rendimiento de extracción de la lignina, no obstante, la remoción de compuestos extraíbles disminuyó el rendimiento de extracción de la lignina. La cual fue altamente soluble en ácido acético y ácido fórmico, así como en la mezcla de solventes utilizados para su extracción. La lignina presentó una alta estabilidad térmica, una pureza mayor al 90% con pequeñas cantidades de carbohidratos (0.11%) y cenizas (1.7%).

En la etapa II, la lignina fue sometida a varios tratamientos enzimáticos usando dos enzimas lacasa; una lacasa obtenida del hongo *Trametes versicolor* y una lacasa obtenida del árbol de laca (*Rhus vernicifera*). La lacasa de *R. vernicifera* bajo diferentes temperaturas y concentración de la enzima, no ocasionó cambios en el peso molecular de la lignina, mientras que la lacasa de *T. versicolor* produjo cambios en el peso molecular de la lignina solo a 40°C, que se confirmó por análisis cromatográficos de exclusión.

Finalmente en la etapa III se elaboraron películas de almidón de trigo cristalino por el método de evaporación de solventes y se evaluó el efecto de la adición de diferentes concentraciones de lignina soluble en metanol. Las películas obtenidas fueron evaluadas por medio de análisis de color (L a y b), análisis termogravimétricos (TGA, por sus siglas en inglés), ensayos mecánicos, actividad antioxidante, así como pruebas de solubilidad en agua. Además las películas fueron caracterizadas por microscopía electrónica de barrido (SEM, por sus siglas en inglés), espectroscopía de infrarrojo (FTIR, por sus siglas en inglés). La superficie de las películas fue homogénea en todos los tratamientos, no se encontraron cavidades, aglomeraciones o partículas de lignina a nivel microscópico. La incorporación de lignina soluble en metanol disminuyó la luminosidad de las películas y a concentraciones altas se obtuvieron películas con coloraciones rojizas. La incorporación de lignina retardó la degradación térmica de las películas,

especialmente en concentraciones altas. Estas películas se degradaron en su totalidad a temperaturas cercanas a los 900°C. Los espectros de infrarrojo exhibieron señales específicas de cada componente (almidón y lignina como las bandas de vibración de los enlaces glucosídicos del almidón (1200 a 800 cm^{-1}) y las vibraciones de los anillos aromáticos de la lignina (1590 y 1420 cm^{-1}). Además se detectaron interacciones electrostáticas débiles en la región alrededor de los 3000 cm^{-1} . La incorporación de la lignina soluble en metanol disminuyó el esfuerzo de tensión y el módulo de Young de las películas e incrementó el porcentaje de elongación. Además, las películas presentaron actividad antioxidante contra el radical DPPH, la cual aumentó a medida que incrementó la concentración de lignina, asimismo, la solubilidad en agua aumentó con la incorporación de la fracción de lignina soluble en metanol.

ABSTRACT

The main objective of this research was to extract and characterize the lignin from wheat straw (*Triticum durum*) to prepare films with improved functional properties. The work was divided into three parts. In part I the effect of particle size and the dewaxed treatment in the performance of lignin extraction was evaluated. In addition, the molecular weight, thermal behavior and purity of lignin was analyzed. In part II enzymatic methods for modifying the extracted lignin from wheat straw were evaluated. Finally, in the part III composites from blends of starch and the soluble-alcohol lignin were prepared and evaluated. The alternative use of agricultural byproducts in development of biomaterials may help the production of wheat in Sonora State. In part I, lignin was extracted from wheat straw using a mixture of organic solvents and water, because this method allows both separate the main polymer wheat straw and obtain relatively pure lignin. Under the conditions established for this part of the work, particle size had no effect on the extraction yield of lignin removal however; extractable compounds adversely affect the extraction yield of lignin. Lignin was highly soluble in acetic acid and formic acid, as well as in the mixture of solvents used for its extraction, lignin showed a slow thermal degradation and small amounts of impurities such as carbohydrates and ash. In part II, the extracted lignin from wheat straw was subjected to various enzymatic treatments using two enzymes laccases from *Trametes versicolor* and *Rhus vernicifera*. The treatment of lignin with laccase from *R. vernicifera* under different temperatures and enzyme concentration, no change in molecular weight of the lignin was obtained. While treatment of lignin with laccase from *Trametes versicolor* produced changes in the molecular weight of the lignin at 40°C, which was confirmed by size exclusion high performance liquid chromatography.

Finally, in part III films from durum wheat starch were prepared by casting method, and the effect of addition of different concentrations of alcohol-soluble lignin was evaluated. The mechanical properties, thermal degradation (TGA), water solubility, color parameters (L, a y b), and antioxidant activity of the resulting films were evaluated, and the starch-lignin films were also characterized by scanning electron microscopy (SEM) and infrared spectroscopy (ATR-IR). The surface of the films obtained was homogeneous in all treatments, agglomerations or undissolved particles of lignin were not observed in the starch matrix at microscopic level. The addition of the alcohol-soluble lignin decreased the lightness of the films. High concentrations of alcohol-soluble lignin gave reddish coloring at the films. The incorporation of lignin delay thermal degradation of the starch-lignin films, especially at high concentrations, these films were degraded totally at temperatures near 900°C. Infrared spectra of the films exhibited signals of each specific component starch and lignin, vibration bands of glycosidic bonds of starch ($1200-800\text{ cm}^{-1}$) and vibration of the aromatic rings of lignin (1590 and 1420 cm^{-1}). Furthermore weak electrostatic interactions were found in the region around 3000 cm^{-1} . The incorporation of the lignin in the starch matrix had negative effect on the mechanical properties of the films decreased the tensile strength and elastic modulus, but increased the elongation at break. Furthermore, the films obtained showed antioxidant activity against the radical DPPH that increased as increasing lignin concentration. Finally, the water solubility of the films composed increased with the addition of lignin.

CONTENIDO

	Página
DERECHOS DE AUTOR	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
DEDICATORIAS	v
RESUMEN	vi
ABSTRACT	ix
LISTA DE FIGURAS	xv
LISTA DE TABLAS	xvii
NOMENCLATURA	xviii
INTRODUCCIÓN	1
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	4
El Trigo	4
Generalidades	4
La Paja de Trigo.....	5
Estructura de la Paja de Trigo	6
Composición Química.....	6
Celulosa.....	9
Hemicelulosa.....	9
Lignina	11
Características Químicas y Biosíntesis de la Lignina.....	13
Tipos de Lignina y Métodos de Extracción	18
Lignina Tipo Sulfito	19
Lignina Tipo Kraft	22
Lignina Tipo Organosolv	22
Aplicaciones Generales de los Diferentes Tipos de Ligninas	25
Modificación de Lignina.....	26
Métodos de Modificación de la Lignina	27
Métodos químicos y termoquímicos.....	27

Métodos enzimáticos.....	29
Materiales a Base de Polímeros Renovables	34
Efecto de la Incorporación de Lignina en las Propiedades de Materiales de Almidón	36
HIPÓTESIS.....	40
OBJETIVOS	41
General	41
Particulares	41
MATERIALES Y MÉTODOS	42
Materia Prima	42
Molienda de la Paja de Trigo	42
Separación de Fracciones	42
Caracterización de la Paja de Trigo Cristalino	43
Separación de Compuestos Extraíbles	43
Cuantificación de Celulosa y Hemicelulosa.....	43
Cuantificación de Lignina	44
Extracción de Lignina.....	45
Caracterización de la Lignina	46
Solubilidad	46
Masa Molecular.....	46
Carbohidratos Totales	47
Cenizas	48
Espectroscopía de Infrarrojo con Transformada de Fourier (FT-IR).....	48
Diseño de Experimentos y Análisis Estadístico	49
Modificación de Lignina	50
Materia Prima	50
Enzimas	50
Reacción de Polimerización	50
Caracterización de la Lignina Modificada.....	51
Masa Molecular.....	51
Preparación y Caracterización de las Películas de almidón y Lignina.....	52
Materia Prima	52
Extracción y Purificación del Almidón.....	52

Preparación de las Películas de Almidón-Lignina.....	54
Caracterización de las Películas.....	55
Espesor.....	55
Color.....	55
Microscopía Electrónica de Barrido (SEM).....	56
Propiedades Mecánicas.....	56
Espectroscopía Infrarroja con Reflectancia Total Atenuada.....	56
Caracterización Térmica.....	57
Actividad Antioxidante.....	57
Solubilidad en Agua.....	58
Diseño de Experimentos y Análisis Estadístico.....	58
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	60
Composición de la Paja de Trigo.....	59
Efecto del Tamaño de Partícula y la Separación de Compuestos Extraíbles en la Recuperación de Lignina.....	59
Solubilidad de la Lignina.....	63
Masa Molecular.....	66
Carbohidratos Totales y Ceniza.....	68
Espectroscopía de Infrarrojo con Transformada de Fourier (FT-IR).....	72
Propiedades Térmicas.....	72
Polimerización Enzimática de Lignina.....	76
Peso Molecular de la Lignina Tratada con Enzimas Lacasas.....	76
Caracterización de las Películas.....	83
Espesor y Propiedades de Color.....	83
Características Físicas y Microscopía Electrónica de Barrido (SEM).....	85
Pruebas Mecánicas.....	85
Espectro Infrarrojo.....	90
Propiedades Térmicas.....	92
Actividad Antioxidante.....	94
Solubilidad.....	96
CONCLUSIONES.....	97
RECOMENDACIONES.....	99

REFERENCIAS	100
ANEXO 1. Artículo de Revisión Aceptado.....	120
ANEXO 2. Artículo Experimental Aceptado	121

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Corte transversal del tallo de trigo (A) esclerénquima subepidérmico, (B) islotes de colénquima.....	7
2	Estructura química de la celulosa (A) unidad de celobiosa y (B) enlaces intermoleculares de hidrógeno.	10
3	Representación esquemática de la estructura química de la hemicelulosa.....	12
4	Diagrama esquemático de las paredes celulares de las gramíneas.....	14
5	Unidades monoméricas de la lignina (A) monolignoles y (B) estructuras aromáticas en el polímero de lignina	15
6	Estructura química representativa del polímero de lignina y sus enlaces principales.....	17
7	Estructura química de la lignina (A) Kraft y (B) lignosulfonato.....	20
8	Diagrama de flujo de la molienda húmeda de trigo cristalino.....	53
9	Distribución de peso molecular de la lignina solubilizada en DMF y THF (A1) DMF, (A2) DMF con LiCl 0.2 M, (B1) THF y (B2) THF con LiCl 0.2 M.....	69
10	Espectro de infrarrojo para la lignina extraída con ácidos orgánicos.....	73
11	Termograma de la lignina de paja de trigo extraída por el proceso organosolv.....	75
12	Efecto de la concentración de la enzima en la polimerización de lignina (<i>R. vernicifera</i> , actividad de 100 y 200 U).....	77
13	Efecto de la temperatura en la polimerización de lignina (<i>R. vernicifera</i> , actividad de 200 U).....	78
14	Efecto de la concentración de la enzima en la polimerización de lignina (<i>T. versicolor</i> , actividad de 100 y 200).....	80

Figura	LISTA DE FIGURAS (Cont...)	Página
15	Efecto de la temperatura en la polimerización de lignina (<i>T. versicolor</i> y actividad de 100 U).....	82
16	Micrografías de película de almidón de trigo duro (A) Control, (B) 95:5, (C) 90:10, y (D) 80: 20% de almidón y lignina. Ampliación de 5.000x.....	86
17	Gráficas de esfuerzo-deformación de las películas de almidón y lignina.....	87
18	Espectros ATR-IR de (A) almidón de trigo duro, (B) lignina paja de trigo y (C) película de almidón y lignina (20%).....	91
19	Termogramas para TGA de las películas de almidón con diferentes concentraciones de lignina soluble en alcohol.....	93

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1	Valores normales de la composición de la paja de trigo.....	8
2	Propiedades de los diferentes tipos de ligninas.....	21
3	Pureza y propiedades fisicoquímicas de la lignina tipo organosolv.....	24
4	Enzimas lignolíticas y sus principales reacciones	31
5	Composición química de la paja de trigo (<i>Triticum durum</i>).....	60
6	Efecto del tamaño de partícula y desgrasado en la recuperación de los principales polímeros de la paja de trigo usando solventes orgánicos.....	61
7	Solubilidad de lignina de paja de trigo.....	64
8	Peso molecular promedio en peso, peso molecular promedio en número y polidispersidad de lignina organosolv.....	67
9	Carbohidratos totales y ceniza en lignina de paja de trigo obtenida a través de proceso organosolv.....	70
10	Parámetros de color de las películas de almidón y lignina.....	84
11	Propiedades mecánicas de las películas de almidón y lignina.....	88
12	Capacidad antioxidante de las películas de almidón-lignina y el porcentaje de solubilidad en agua.....	95

NOMENCLATURA

Abreviatura	Significado
PT	Paja de trigo
LiP	Lignina peroxidasa
VP	Peroxidasa versátil
MnP	Manganeso peroxidasa
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMF	Dimetilformamida
LiCl	Cloruro de litio
THF	Tetrahidrofurano
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazilo
LSA	Lignina soluble en alcohol
SEM	Microscopia electrónica de barrido
TGA	Análisis termogravimétricos
FTIR	Espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier

INTRODUCCIÓN

En años recientes, debido a los problemas ecológicos asociados con el mal uso de materiales fabricados de derivados del petróleo y la inestabilidad de los precios de este recurso fósil, existe un fuerte interés en el desarrollo de nuevos materiales utilizando materia prima renovable obtenida de residuos agrícolas. En México los residuos agrícolas, entre ellos la paja de trigo cristalino y sus subproductos constituyen una fuente importante de materia prima para la elaboración de nuevos materiales. Sonora es el principal productor de trigo cristalino con aproximadamente 1.8 millones de toneladas anuales (SIAP, 2013). Existen reportes que indican que en un cultivo de trigo por cada kilogramo de grano se producen aproximadamente 1.6 kg de paja (Yuan et al. 2010). Anualmente se generan cerca de 3.2 millones de toneladas de residuos de trigo cristalino. La mayoría de estos residuos son quemados a cielo abierto en el campo generando gran cantidad de contaminantes al aire, que se ha relacionado con problemas de salud y daños al ambiente (Li et al. 2008). Por estos problemas es importante buscar alternativas para valorizar la paja de trigo y sus subproductos.

La paja de trigo es un material heterogéneo compuesto de tres polímeros fuertemente entrelazados: celulosa, hemicelulosa y lignina. La lignina es un polímero aromático con un peso molecular aproximado de entre 500 y 10000 Da unido a través de enlaces covalentes a xilanos que confiere rigidez y un alto nivel de compactación a la pared celular de la planta (Mielenz, 2001). El polímero de lignina está formado por unidades de fenilpropano y sus precursores son tres alcoholes aromáticos llamados monolignoles; el alcohol *p*-cumarílico, alcohol coniferílico y alcohol sinapílico. Los compuestos aromáticos en el polímero de lignina son: *p*-hidroxifenilo (H), guaiacilo (G) y siringilo (S) (Lewis et al., 1990).

El uso de la lignina ha ganado renovado interés debido a que es obtenida en grandes cantidades en la producción de pulpa de celulosas y papel, así como por el desarrollo de biorefinerías lignocelulósicas y la producción de biocombustibles de segunda generación. Para la obtención de combustibles celulósicos la separación de lignina de las fibras de celulosa es un paso ineludible. La lignina es extraída por métodos químicos, termo-químicos, enzimáticos o combinación de métodos (Uju et al., 2012). Sin embargo, de todos estos métodos destaca el uso de solventes orgánicos ya que ha demostrado ser favorable para separar y recuperar la celulosa, la hemicelulosa, así como lignina con propiedades fisicoquímicas útiles (Espinoza-Acosta et al., 2014).

La lignina obtenida a través del tratamiento con solventes orgánicos es conocida como lignina organosolv. Comparado con otros métodos, el uso de solventes orgánicos tiene la ventaja que se pueden obtener rendimientos de hasta un 94% de lignina, además, los solventes utilizados pueden recuperarse y reutilizarse. A diferencia de otras ligninas, la lignina organosolv se caracteriza por tener alta pureza, bajo peso molecular (500–5000Da), baja polidispersidad (1.5–2.5), temperatura de transición vítrea baja (90–110°C) y es insoluble en agua (Lora 2008). Químicamente tiene una variedad de grupos funcionales como hidroxilos, metoxilo, carbonilo y grupos carboxilos, los cuales pueden modificarse (Laurichesse & Averous, 2014). Por esta razón, varias investigaciones han modificado la estructura de la lignina por métodos químicos y enzimáticos para aumentar sus aplicaciones (Laurichesse & Averous, 2014). De esta manera se pueden incorporar macromonómeros en la molécula (Gandini et al., 2002), remover ciertos grupos funcionales, simplificar su estructura química (Hu et al., 2011) o mejorar la solubilidad (Lora et al., 2002; Silva et al., 2009).

La lignina se ha utilizado en productos alimenticios, cosméticos y materiales biomédicos (Stewart, 2008), aunque las aplicaciones más encontradas en la literatura tienen que ver con la elaboración de materiales, espumas de poliuretano, resinas fenólicas y adhesivos para madera se han obtenido reemplazando el fenol químico por fenoles obtenidos de la lignina. Investigaciones recientes han demostrado que la lignina puede ser mezclada con otros polímeros sintéticos y biológicos dando como resultado materiales con características únicas (Bhat et al., 2013; Chen et al., 2009).

Por otro lado, el almidón derivado de una variedad de fuentes ha sido investigado como un candidato para la obtención de nuevos materiales biodegradables y por sus características físicas deseables como nula toxicidad, olor, sabor y color (Bertuzzi et al., 2007). Sin embargo, los materiales a base de almidón presentan deficiencias que limitan su aplicación como propiedades mecánicas pobres y su poca resistencia a la humedad (Avérous, 2004). Estas deficiencias pueden ser superadas mediante la preparación de mezclas de almidón con polímeros hidrofóbicos como la lignina (Baumberger et al., 1998b; Baumberger et al., 1997). La lignina se ha propuesto para reducir el carácter hidrofílico de películas de almidón y como un relleno que refuerza las películas. Sin embargo, los efectos de la lignina en una matriz de almidón dependen de su peso molecular, la fuente botánica y procedimiento de extracción. La elaboración de biomateriales a base de almidón y lignina involucra la adaptación de tecnologías comúnmente utilizadas a nivel industrial en la producción de materiales sintéticos. Así mismo, la aplicación de los subproductos de la paja de trigo en la elaboración de biomateriales representa un uso integral de este cereal.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

El Trigo

Generalidades

Trigo (*Triticum spp*) es el término que se designa al conjunto de cereales tanto cultivados como silvestres, que pertenecen al género *Triticum*. Pertenecen a una variedad de plantas anuales de la familia de las gramíneas ampliamente cultivadas en todo el mundo. La palabra trigo se usa para referirse a la planta así como a sus semillas comestibles.

Las condiciones de clima y suelo que necesita el trigo para su cultivo, no son específicas, pues se adapta a circunstancias diversas y las condiciones para su desarrollo dependen de la etapa fenológica, la variedad y del tipo de trigo. Sin embargo, existen reportes que indican crece en ambientes con temperaturas mínimas de 3°C y máximas de 30 a 33°C, siendo una temperatura óptima entre 10 y 25°C (www.infoagro.com, 2014).

Existen diferentes variedades de trigo en el mundo los cuales pueden clasificarse de acuerdo a su fecha de siembra. Se conoce como trigo de otoño-invierno (O-I), al grano que se siembra en la época otoñal, en donde las plántulas emergen y amacollan antes del invierno y crecen lentamente hasta cosecharse en la primavera. El trigo de primavera-verano (P-V) presenta un crecimiento continuo, germina mucho más rápido y se cosecha en el verano.

Existen diferentes tipos y variedades de trigos y las principales diferencias entre los granos son dadas por la dureza, así, tenemos los muy duros (durum o cristalinos), los duros (hard) y los suaves o blandos (soft). También existen dentro de estos grupos los definidos como ambarinos, rojos o blancos.

En el año 2013, la producción de trigo en México fue 3'357,306 Ton donde los estados de Sonora, Baja California, Sinaloa, Chihuahua y algunos estados del bajío aportaron el 87% de la producción nacional (<http://www.siap.gob.mx/2013>). Sonora se destaca por ser un gran productor de trigo cristalino (*Triticum durum*) arrojando una producción de 1'844,753 Ton en el año 2013 (<http://www.siap.gob.mx/2013>).

El trigo cristalino (*Trirucum durum*) se caracteriza por ser una variedad muy resistente a la sequía y a las enfermedades, aunque presenta menor rendimiento que otros tipos de trigo. El trigo cristalino es utilizado principalmente en la elaboración pastas, no obstante, los granos de este cereal también han sido utilizado para elaborar productos no alimenticios como materiales (Montano-Leyva et al., 2008).

En las últimas décadas los residuos del trigo y otros cereales como el arroz (Binod et al., 2010), el maíz (Li et al., 2011) y la caña de azúcar (Rabelo et al., 2011) se han utilizado para obtener polímeros para la síntesis de materiales y compuestos químicos de interés industrial. Debido a su gran abundancia, renovabilidad y uso limitado, la paja de trigo se ha convertido en una de las materias primas preferidas para la producción de numerosos compuestos químicos en un esquema de biorrefinería (Kaparaju et al., 2009).

La Paja de Trigo

Paja es el nombre que reciben los tallos secos de algunas gramíneas, que tienen la apariencia de una caña hueca. La paja de trigo (PT) es el residuo agrícola que queda después de haber separado la planta del grano mediante la trilla (Xu 2010). Es un material heterogéneo formado por tres componentes químicos los cuales son esenciales para la fuerza física y la estructura química de la planta; la celulosa, la hemicelulosa y la lignina (Sun et al. 1997). Aunque también

contiene componentes minoritarios como pectinas, minerales y ceras, los cuales son de vital importancia para algunos procesos fisiológicos de la planta (Xu 2010).

Estructura de la Paja de Trigo

En la Figura 1 se muestra un corte transversal de la paja de trigo donde se observa una franja con abundante esclerénquima subepidérmico interrumpido por islotes de colénquima. Como en muchas gramíneas los haces se disponen en dos círculos o anillos bien definidos: el externo con haces pequeños, incluidos en la capa subepidérmica de esclerénquima, y el interno con haces mayores incluidos en parénquima. En el caso del trigo, la porción central del tallo se destruye durante el crecimiento del mismo, dejando una cavidad medular hueca conocida también como laguna protoxilemática (Weiter et al., 1991).

Composición Química

El análisis químico de la PT muestra que esta es rica en carbohidratos, compuestos fenólicos y en menor proporción proteínas, cenizas, ceras y pectinas, además de compuestos bioactivos y vitaminas (Slavin, 2003). Los valores normales de la composición de la paja de trigo se muestran en la Tabla 1. La composición precisa de macro y micronutrientes puede variar de cultivar a cultivar, etapas de crecimiento de la planta, la naturaleza del suelo y las condiciones climáticas (Yasin, 2010).

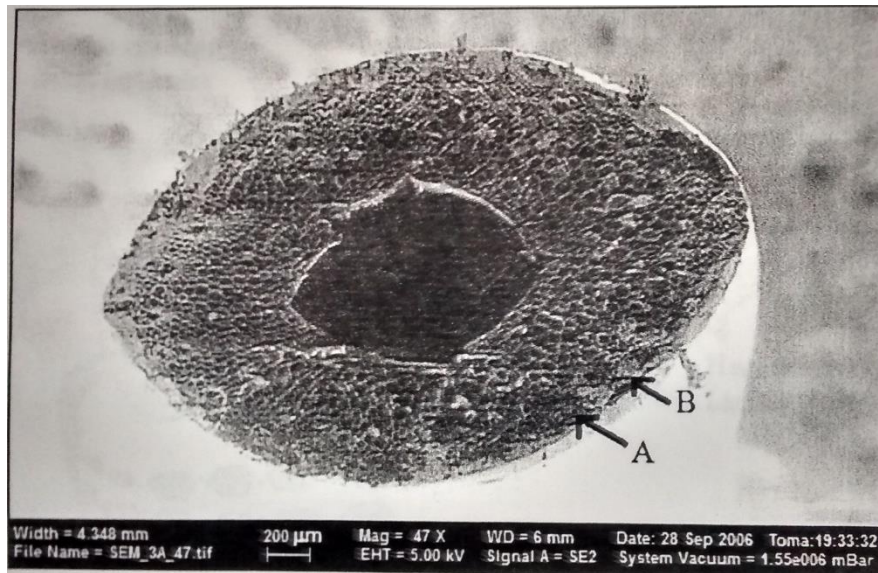


Figura 1. Corte transversal del tallo de trigo. (A) esclerénquima subepidérmico, (B) islotes de colénquima.

Fuente: adaptado de Bouasker et al. (2014).

Tabla 1. Valores normales de la composición de la paja de trigo.

Componente	Jiménez et al. (2002)	Sun & Sun (2001)	Pan & Sano (2005)	Alemdar & Sain (2008)	Petersena et al. (2009)
Celulosa (%)	39.7	38.9	n/d	43.2	35.0
Hemicelulosa (%)	36.5	38.2	n/d	34.2	22.3
Lignina (%)	17.3	17.2	n/d	22.0	15.6
Xilanos (%)	n/d	n/d	34.6	n/d	19.6
Extraíbles (%)	4.0	n/d	5.3	n/d	n/d
Cenizas (%)	6.4	n/d	9.6	n/d	6.5

n/d = No determinado

Celulosa

La celulosa es el polímero dominante en las plantas herbáceas así como en las plantas superiores. Químicamente la celulosa consiste en cadenas lineales de celobiosa unidas por enlaces glucosídicos β -(1 \rightarrow 4) (Hendriks & Zeeman, 2009). En la naturaleza, las cadenas de celulosa están unidas de una manera ordenada formando microfibras empaquetadas muy densamente que se estabilizan a través de enlaces de hidrógeno inter e intramoleculares (Figura 2). Estas microfibras tienen un diámetro aproximado de 80-10 nm y longitudes de unos pocos micrómetros (Alemdar & Sain, 2008).

Simultáneamente, las fibras de celulosa están organizadas en regiones cristalinas y amorfas. Las regiones cristalinas tienen enlaces de hidrógeno intermoleculares bien organizados, mientras que en las regiones amorfas existen menos organización de enlaces de hidrógeno (Kondo et al., 1996). Comúnmente las zonas amorfas son más reactivas que las zonas cristalinas debido a que los grupos hidroxilo se encuentran más accesibles (Kondo, 1997a; 1997b; Kondo and Sawatari, 1996).

Hemicelulosa

Las hemicelulosas son el segundo polímero más abundante en la paja de los cereales (Xu 2010). Son polímeros ramificados de bajo peso molecular con un grado de polimerización de 20-800. La hemicelulosa de la pared celular de las gramíneas normalmente contiene una cadena principal de β -(1 \rightarrow 4) xilopiranosil con pequeñas ramificaciones (Saha, 2003). Las ramificaciones consisten en oligosacáridos, una cadena típica entre 1 y 4 unidades de D-galactosa, D-manosa, L-arabinosa, D-xilosa, L-fucosa, L-ramnosa o D-ácido glucurónico (Gírio et al., 2010; Scheller & Ulvskov 2010).

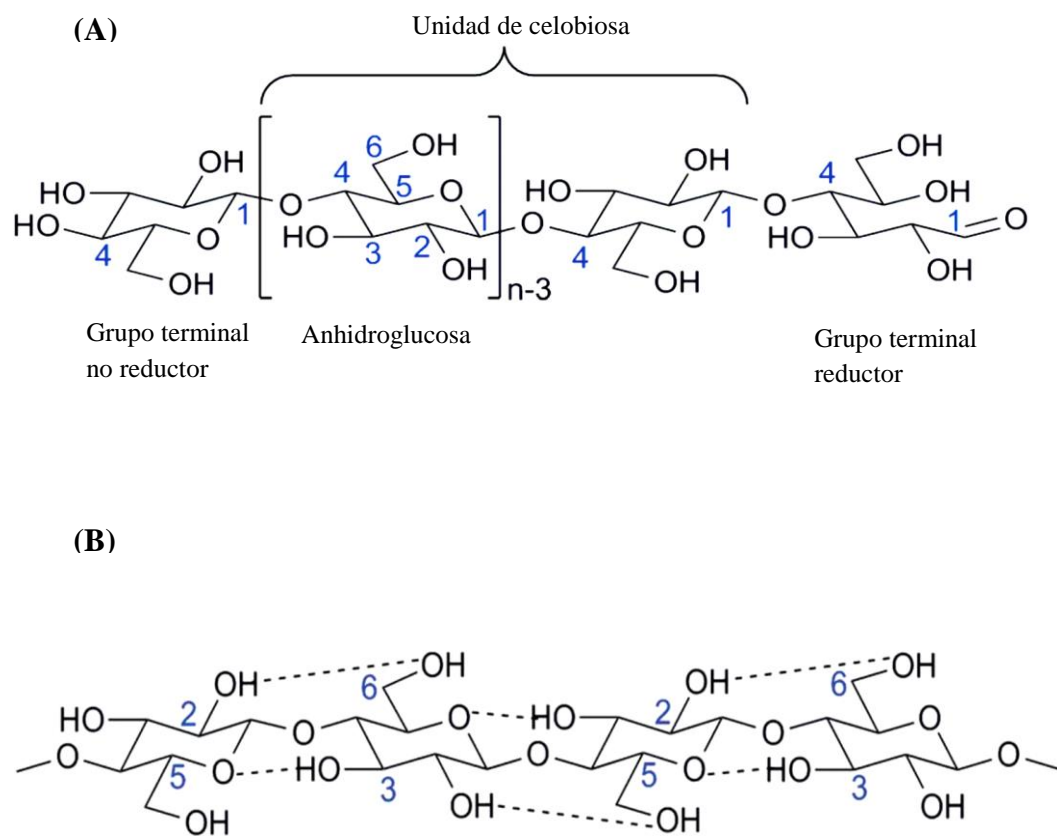


Figura 2. Estructura química de la celulosa (A) unidad de celobiosa y (B) enlaces intermoleculares de hidrógeno.

Fuente: adaptado de Credou et al. (2014)

Los componentes dominantes de la hemicelulosa de cultivos herbáceos son los xilanos (Saha, 2003). Son heteropolímeros formados por una cadena de xilas unidas por medio de enlaces glucosídicos β -(1 \rightarrow 4), uniéndose a pequeñas cadenas de carbohidratos. Los xilanos son el componente principal de la hemicelulosa de las paredes celulares secundarias que constituyen aproximadamente el 20-30% de la biomasa de las plantas herbáceas. En algunos tejidos de plantas gramíneas y cereales los xilanos pueden representar hasta el 50% (Ebringerová et al., 2005). En general, las hemicelulosas forman una matriz para las microfibras de celulosa involucrando interacciones moleculares como puentes de hidrogeno y fuerzas de Van der Waals. En la Figura 3 se muestra una representación esquemática de la estructura química de la hemicelulosa.

Lignina

Lignina es el término genérico con que se conoce a un grupo de polímeros aromáticos resultantes del acoplamiento oxidativo de unidades de fenilpropano (Boerjan et al., 2003; Ralph et al., 2004). Estos polímeros se depositan principalmente en las paredes secundarias de las células de las plantas en una proporción de 14-15%.

La lignina le confiere rigidez a los tallos, brinda protección contra ataques de microorganismos y participa en el transporte de agua y nutrientes a través del sistema vascular de las plantas (Buranov & Mazza, 2008). Su hidrofobicidad junto con el nivel de entrecruzamiento con los polisacáridos es importante para la permeabilidad de los poros entre las células vegetales.

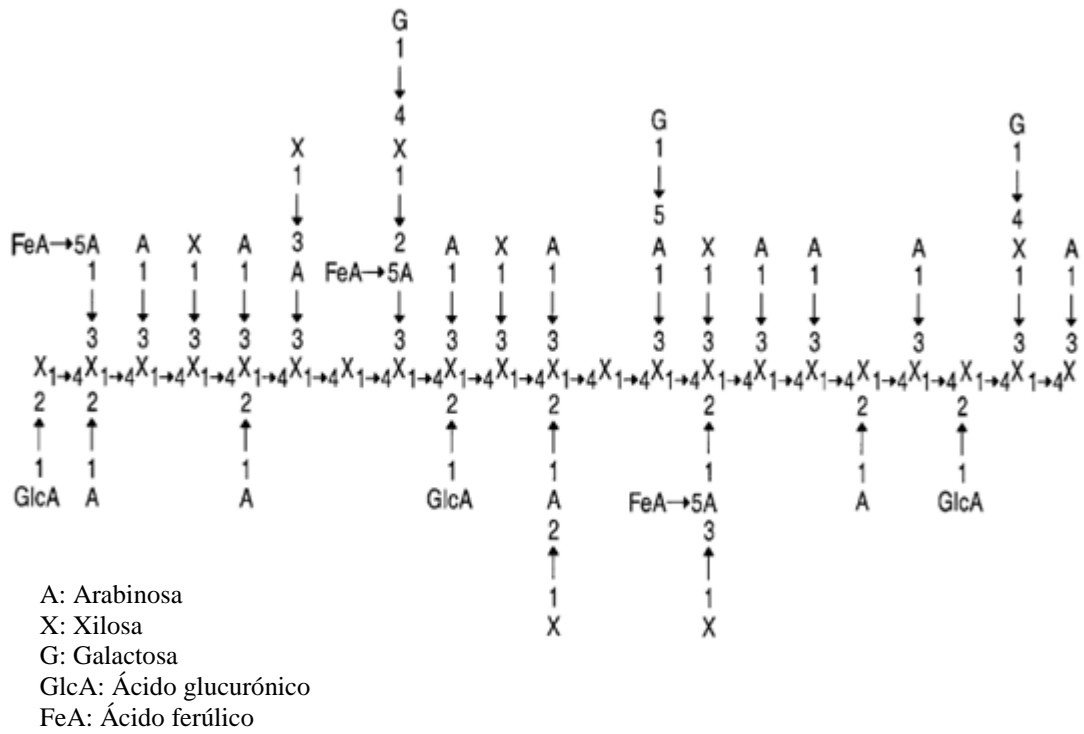


Figura 3. Representación esquemática de la estructura química de la hemicelulosa.
Fuente: adaptado de Saha (2003)

Durante la síntesis de la pared celular de las plantas, los polisacáridos como la celulosa y la hemicelulosa son en primer lugar establecidos, la lignina, llena los espacios entre las fibras de los polisacáridos uniéndolos y haciéndolos fuertes (Figura 4).

Características Químicas y Biosíntesis de la Lignina

La definición de la lignina nunca ha sido tan clara como la de otros polímeros naturales tales como celulosa o las proteínas, debido a la complejidad que afecta su aislamiento, análisis de su composición y la caracterización estructural (Sun, 1997). El problema de una definición precisa para la lignina se asocia con la naturaleza de sus múltiples unidades estructurales, las cuales no suelen repetirse de forma regular, dado que la composición y estructura de la lignina varían dependiendo de su origen y el método de extracción o aislamiento utilizado (Buranov & Mazza, 2008). La definición estructural de lignina que es la más aceptada tienen las siguientes características: (1) son polímeros vegetales contruidos a base de unidades de fenilpropano; (2) presentan gran cantidad de grupos metoxilo; (3) son resistentes a la hidrólisis ácida, fácilmente oxidables, solubles en bisulfito o álcalis caliente y fácilmente condensables con fenoles o tioles (Lu et al., 2010).

Los principales bloques de construcción de la lignina son tres alcoholes hidroxicinámicos (o monolignoles): el alcohol coniferílico, alcohol sinapílico y el alcohol p-cumarílico (Figura 5). Los monolignoles se sintetizan a partir de fenilalanina a través de vías específicas. La fenilalanina se deriva de la ruta biosintética del shikimato en el plástido.

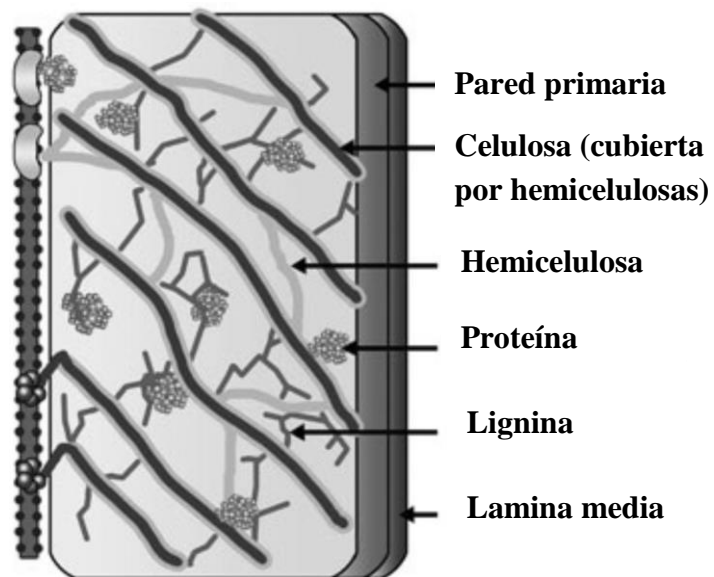


Figura 4. Diagrama esquemático de las paredes celulares de las gramíneas.
Fuente: adaptado de Zhao et al. (2012)

Monolignoles

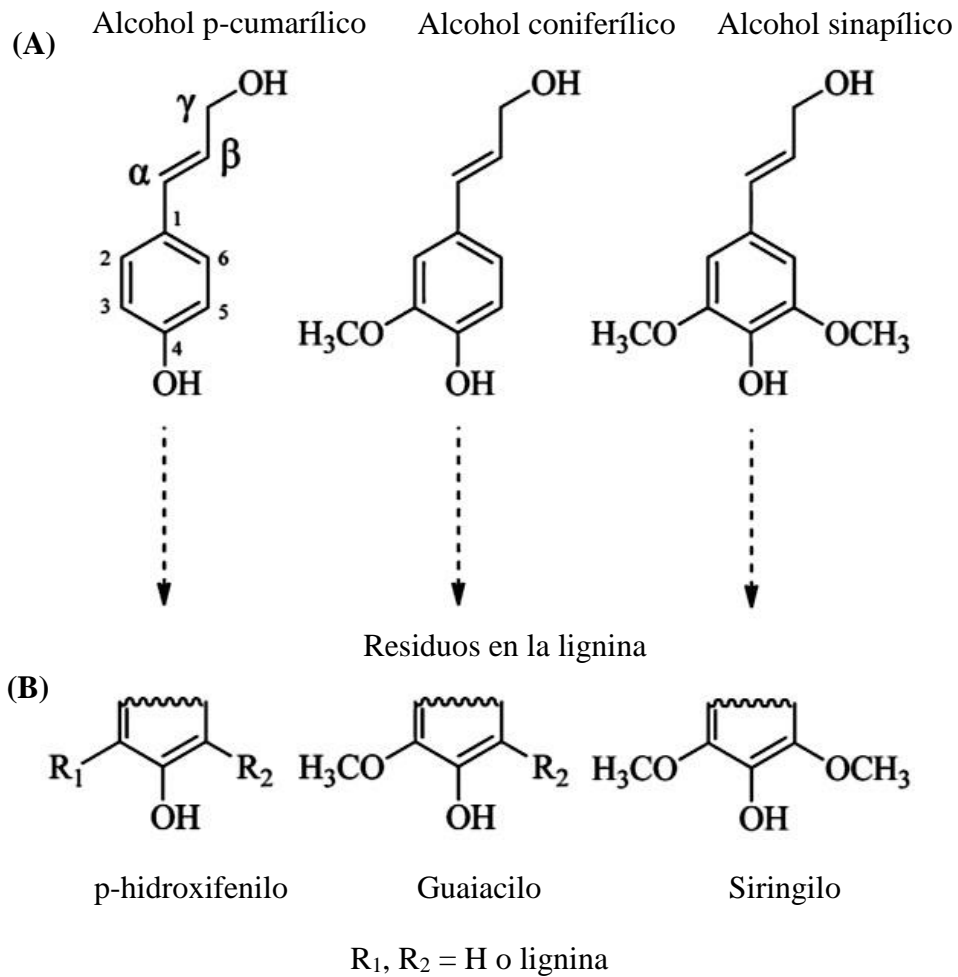


Figura 5. Unidades monoméricas de la lignina: (A) monolignoles y (B) estructuras aromáticas en el polímero de lignina.

Fuente: Adaptada de Laurichesse y Avérous 2014.

Las unidades resultantes de los monolignoles, incorporados en el polímero de lignina son llamadas; unidad guaiacil (G) (originado del alcohol coniferílico), unidad siringil (S) (originado del alcohol sinapílico) y unidad p-hidroxifenil (H) (originado del alcohol *p*-cumarílico) (Lewis & Yamamoto, 1990; Vanholme et al., 2010). Los monolignoles se generan mediante reacciones de desaminación, hidroxilación, reducción y metilación catalizadas por diversas enzimas. Estos monolignoles interaccionan en la pared celular, a través de reacciones de oxidación catalizadas por enzimas oxidorreductasas para formar el polímeros de lignina (Liu et al., 2011). En cultivos herbáceos como el trigo, la lignina contiene los tres monolignoles (H, G y S) en una proporción de 5, 49 y 46 %, respectivamente, mientras que en plantas leñosas, las unidades G y S son las predominantes (Billa et al., 1998; Lapierre et al., 1995).

Durante el proceso de lignificación, las unidades monoméricas producen un polímero complejo, unido por enlaces β -O-4, α -O-4, β -5, β -1, 5-5, 4-O-5 y β - β (Figura 6) (Boerjan, et al., 2003). Los enlaces más abundantes en la lignina son los β -aril éter (β -O-4). La lignina se encuentra siempre asociada con carbohidratos (en particular con hemicelulosas) a través de enlaces covalentes en dos sitios: el carbono alfa y el carbono 4 en el anillo bencénico y a esta asociación se conoce como complejos lignina-carbohidratos (Buranov & Mazza, 2008; Xu, 2010). En las plantas herbáceas, los ácidos hidroxicinámicos (*p*-cumárico y ferúlico) se unen a la lignina y hemicelulosas mediante enlaces de tipo éster y éter formando complejos lignina-fenólicos-carbohidratos (Baucher et al., 1998; Sun et al., 2002).

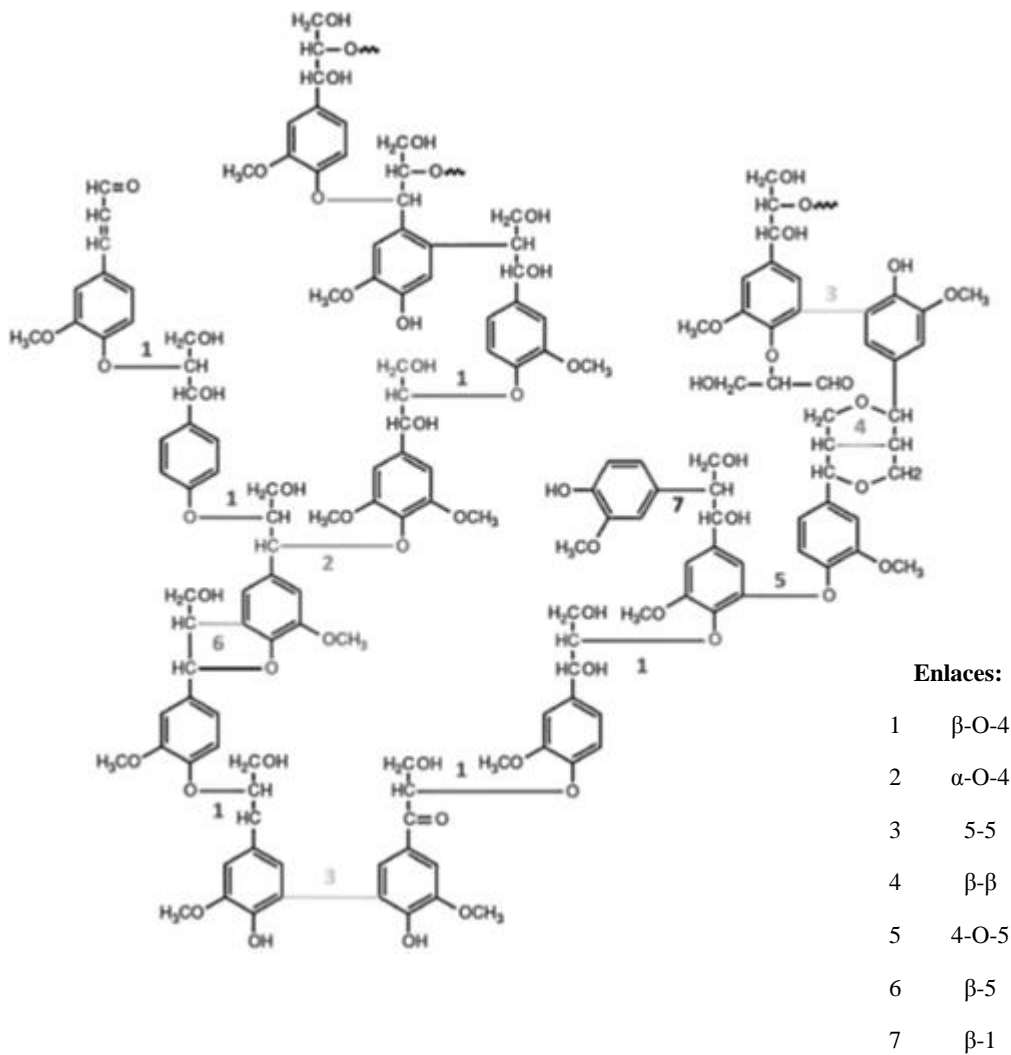


Figura 6. Estructura química representativa del polímero de lignina y sus enlaces principales.
 Fuente: Adaptada de Laurichesse y Avérous 2014.

Tipos de Lignina y Métodos de Extracción

La lignina puede ser aislada del material lignocelulósico mediante una variedad de métodos que implican diferentes procesos mecánicos y/o químicos. Estos métodos se pueden agrupar en dos vías principales. El primer grupo incluye métodos en los que se libera la celulosa y la hemicelulosa mediante solubilización, dejando la lignina como residuo insoluble; mientras que el segundo grupo incluye métodos que implican la disolución de la lignina, dejando como residuos insolubles la celulosa y la hemicelulosa, seguido de la recuperación de lignina a partir de la fase líquida (Hatfield et al., 2005).

Debido a la naturaleza heterogénea de las materias primas (madera y residuos agrícolas), no hay ningún método disponible actualmente para el aislamiento cuantitativo de lignina natural o residual, sin el riesgo de modificarla estructuralmente durante el proceso. Sin embargo, la información obtenida sobre la reactividad química y la estructura de la lignina aislada es valiosa. Existen tres tipos de ligninas que corresponden a los tres procesos químicos mayoritarios para la fabricación de pasta de celulosa: del tipo sulfito, kraft y soda (Lora, 2008; Vishtal & Kraslawski, A., 2011). Sin embargo, también existen métodos alternativos para la extracción de lignina que incluyen el uso de solventes orgánicos, métodos termoquímicos o líquidos iónicos. Estos métodos han surgido como alternativos para el tratamiento de residuos agrícolas y han ganado atención debido a que son utilizados en la obtención de combustibles de materiales lignocelulósicos, en un concepto de biorrefinería. Además de combustibles, estos métodos son capaces de liberar fracciones de lignina con propiedades útiles.

Lignina Tipo Sulfito

La lignina sulfito es obtenida como un subproducto de la fabricación de pasta de celulosa por el proceso sulfito y éste fue históricamente el tipo de lignina industrial más abundante disponible comercialmente durante muchos años. El uso de bisulfito de calcio era importante porque era un producto químico barato para la fabricación de pasta. La tecnología de fabricación de pasta tipo sulfito ha evolucionado hasta incorporar otros sulfitos y bisulfitos, como sulfitos de magnesio, amonio y sodio. Así, los lignosulfonatos resultantes han encontrado aplicaciones en algunos casos especialmente adaptados para un tipo de catión específico (Laurichesse & Averous, 2014). Los lignosulfonatos contienen cantidades considerables de azufre en forma de grupos sulfonato presentes en la cadena lateral alifática (Figura 7). Los lignosulfonatos son solubles en agua y estos tienen una masa molecular promedio y un índice de polidispersidad amplio (Vishtal & Kraslawski 2011). Las propiedades más importantes de los diferentes tipos de ligninas incluyendo los lignosulfonatos se muestran en la Tabla 2. Los lignosulfonatos son utilizados en aplicaciones industriales como por ejemplo; dispersantes, adhesivos y aditivos para cemento. La reactividad de los lignosulfonatos depende en algún grado del catión, los productos a base de calcio y amonio exhiben la reactividad más alta, mientras lignosulfonatos a base de sodio y magnesio muestra una reactividad media (Finch, 1984).

Con el tiempo, el proceso de fabricación de pasta por sulfito comenzó a perder terreno frente a su competidor, el método Kraft, proceso que es más versátil al producir pastas más sólidas y además, permite una mejor recuperación de productos (residuos sólidos).

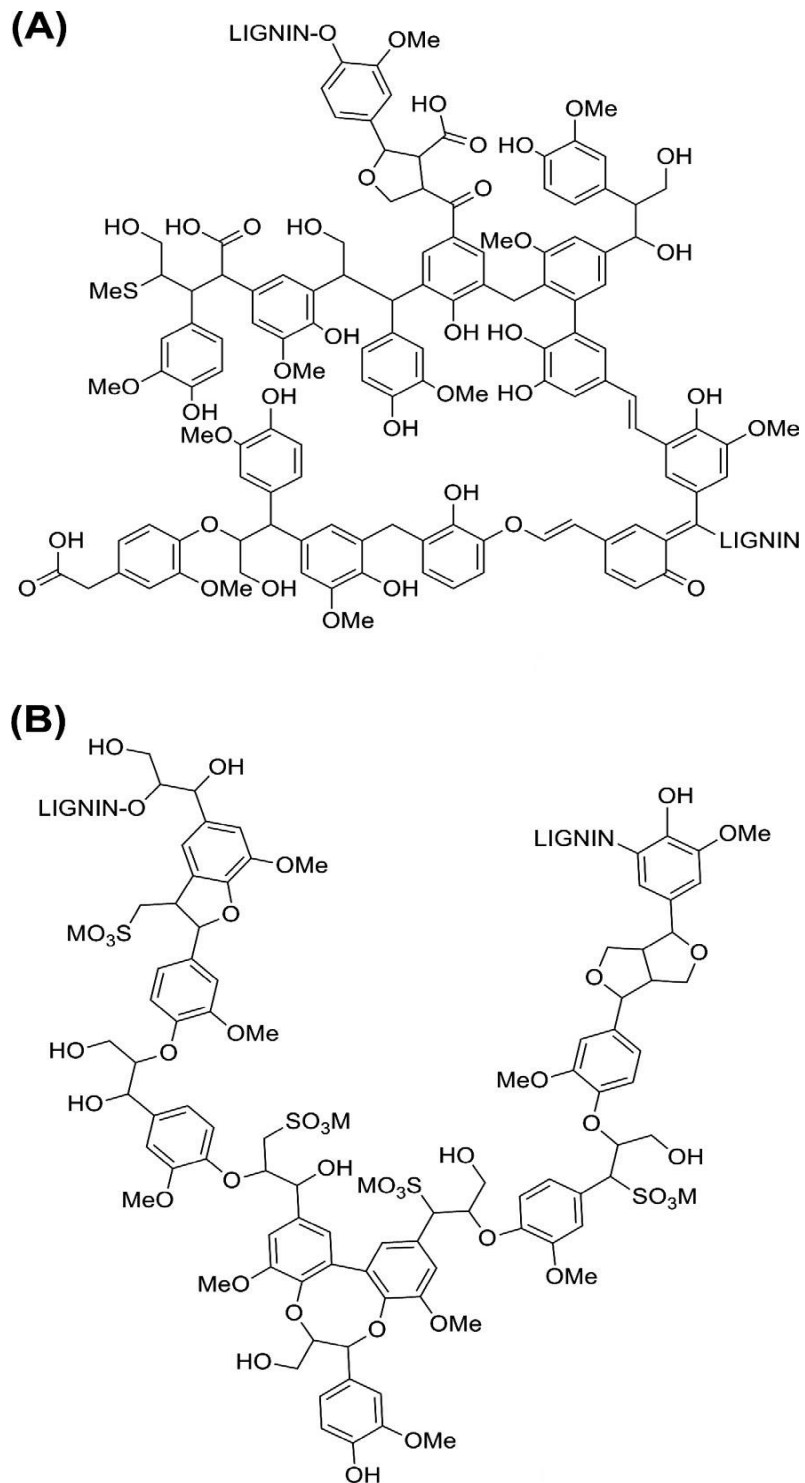


Figura 7. Estructura química de la lignina (A) Kraft y (B) lignosulfonato.
Fuente: Adaptada de Laurichesse y Avérous 2014.

Tabla 2. Propiedades de los diferentes tipos de ligninas.

Tipo de lignina	Materia prima	Solubilidad	Peso molecular promedio	Polidispersidad	Tg ^a(°C)
Kraft	Madera	Soluciones alcalinas	1000–3000	2.5–3.5	140–150
Lignosulfonatos	Madera	Agua	15,000–50,000	6–8	130
Soda	Plantas anuales	Soluciones alcalinas	800–3000	2.5–3.5	140
Organosolv	Madera y plantas anuales	Solventes orgánicos	500–5000	1.5–2.5	90–110

^aTg = Temperatura de transición vítrea

Fuente: Adaptada de Laurichesse y Avérous (2014) y Espinoza-Acosta et al (2014).

A pesar de esto la producción de lignina tipo sulfito ha logrado mantenerse relativamente estable, atendiendo a una demanda mundial, donde la reciente disminución en el consumo de Europa Occidental, América del Norte y Japón se ha visto compensada por aumentos en la demanda por parte de China, India y otras partes del mundo.

Lignina Tipo Kraft

En el proceso kraft la materia prima se somete a una digestión con una mezcla de hidróxido de sodio y sulfuro de sodio aproximadamente a 170°C. Durante la digestión de la materia prima ocurren varias reacciones, incluyendo la ruptura de enlaces entre lignina y los carbohidratos, la despolimerización de la lignina, su reacción con iones hidrosulfuro y su recondensación. La despolimerización de lignina mediante el proceso kraft se produce principalmente a través de la ruptura de los enlaces α y β -aril éter (C-O), primeramente en las unidades fenólicas y en una fase posterior sobre las unidades no fenólicas. Estas reacciones generan fragmentos con grupos fenólicos solubles en el medio alcalino predominante durante la digestión.

Lignina Tipo Organosolv

Los procesos tradicionales de fabricación de pasta de donde se obtiene las ligninas kraft y sulfitos producen grandes cantidades de aguas residuales altamente contaminantes. La creciente demanda de papel, pulpa de celulosa y ligninas debe conciliarse con las crecientes preocupaciones ambientales, lo que significa que la investigación debe centrarse tanto en el uso de materias primas no convencionales (por ejemplo, residuos agrícolas) y el desarrollo de procesos que utilicen reactivos menos contaminantes, como el proceso organosolv. El proceso organosolv implica el tratamiento de biomasa lignocelulósica con solventes orgánicos y pequeña

cantidades de agua a temperaturas entre 180-210°C. El proceso de deslignificación con solventes orgánicos puede catalizarse agregando pequeñas cantidades de hidróxido de sodio (NaOH), ácido sulfúrico o clorhídrico (H₂SO₄ o HCl), aunque puede también llevarse a cabo en ausencia de catalizadores, pero requiere de temperaturas más elevadas.

Se han reportado varias ventajas del proceso organosolv comparado con otros procesos de extracción (Ruiz et al., 2011). El proceso organosolv utiliza solventes de bajo punto de ebullición (por ejemplo, acetona, metanol, etanol, acetato de etilo, dioxano, etc.), que puede ser fácilmente recuperada por destilación (Rodriguez et al., 2008a; Rodriguez et al., 2008b; Rodriguez et al., 2008c). Tal proceso se puede implementar en pequeñas plantas industriales que requieren sólo una modesta inversión con el fin de obtener productos de calidad con bajos costos de producción y la transformación eficiente de las materias primas en altos rendimiento de pulpa de celulosa e interesante subproductos (Delmas et al., 2011).

La lignina organosolv presenta varias diferencias químicas comparada con las ligninas obtenidas por el proceso sulfito y kraft. La principal característica de la lignina de tipo organosolv es la ausencia de azufre. La lignina organosolv es parcialmente soluble en los solventes utilizados para su extracción, es insoluble en agua, tienen un peso molecular entre 500–5000, una temperatura de transición vítrea baja entre 90 y 180°C y un alto contenido de compuestos fenólicos e hidroxilos alifáticos (Lora, et al., 1989; Laurichesse & Averous, 2014). Otras características importantes son su homogeneidad y la ausencia de olores (Vallejos et al., 2011). En la Tabla 3 se muestran las características fisicoquímicas más relevantes de la lignina organosolv.

Tabla 3. Pureza y propiedades fisicoquímicas de la lignina tipo organosolv.

Impurezas y propiedades		Referencias
Cenizas (%)	1.13-4.9	Toledano <i>et al.</i> (2012) Cybulska <i>et al.</i> (2012)
Carbohidratos (%)	0.32-9.0	Cybulska <i>et al.</i> (2012), Gosselink <i>et al.</i> (2004)
Lignina soluble en ácido (%)	1.86-3.89	Montiel-Rivera <i>et al.</i> (2013)
Temperatura de transición vítrea Tg (°C) ^a	90-180	Shukry <i>et al.</i> (2008), Alriols <i>et al.</i> (2010),
Peso molecular	500-4000	Nevárez <i>et al.</i> (2011), Vishtal and Kraslaski (2011)
Polidispersidad	1.3-4.0	Zhang <i>et al.</i> (2010), Delmas <i>et al.</i> (2011)

^a Tg = Temperatura de transición vítrea

Aplicaciones Generales de los Diferentes Tipos de Ligninas

Algunas investigaciones han demostrado que los diferentes tipos de lignina tienen un enorme potencial que va más allá del uso como combustible barato para generar energía en los procesos de elaboración de papel, pulpa de celulosa o biocombustibles. La lignina kraft tiene aplicación como soportes para fertilizantes y pesticidas (Ramírez et al., 1997; Zhang, 2008), fibras y nanofibras de carbono (Kadla et al., 2002; Kubo et al., 1998), mezclas con polímeros termoplásticos (Cazacu et al., 2004), aglutinantes y resinas (Alonso et al., 2004; Tejado et al., 2007; Turunen et al., 2003), resinas de intercambio iónico (Dizhbite et al., 1999; Zoumpoulakis et al., 2001) y carbones activados (Fierro et al., 2006). Adicionalmente a estas aplicaciones, la lignina kraft se puede utilizar para la producción de compuestos bajo peso molecular tales como la vainillina, aromáticos hidroxilados, quininas, aldehídos y ácidos alifáticos (Yuan, et al., 2013).

Los lignosulfonatos tienen una variedad de grupos funcionales entre ellos grupos hidroxilo fenólicos, grupos carboxílicos y grupos que contienen azufre (Areskogh et al., 2010a; 2010b). La variedad de grupos funcionales y otras características estructurales proporcionan propiedades coloidales únicas (Areskogh et al., 2010a; 2010b; Areskogh et al., 2011). Estas propiedades permiten aplicaciones como: estabilizadores en suspensiones coloidales, agentes dispersantes (Byman-Fagerholm et al., 1999), aglutinantes (Zhang, et al., 2002), detergentes, pegamentos y alimentos para animales (Lora, 2008), agentes tensoactivos (Palmqvist et al., 2006), adhesivos (Alonso, et al., 2004) y aditivos para cemento (Ansari et al., 2007; Grierson et al., 2005).

Las propiedades de la lignina organosolv difieren en gran medida de otros tipos de ligninas. La mayor característica de este tipo de lignina es su peso molecular y su pureza química. La lignina

organosolv es más hidrofóbica que otras ligninas y muestra muy poca solubilidad en agua (Lora, et al., 2002). El proceso organosolv produce lignina que contiene una gran cantidad de cadenas laterales reactivas disponibles para otras reacciones químicas (Meister, 2002). Debido a sus características químicas este tipo de lignina se ha utilizado como relleno en la formulación de tintas, barnices y pinturas (Belgacem et al., 2003) y se puede utilizar en aplicaciones similares que kraft y lignina soda si esta es modificada. Sin embargo, debido a su bajo peso molecular, su utilización en adhesivos y aglutinantes es bastante limitado. Recientemente la lignina organosolv ha sido utilizada como aditivo para elaborar materiales compuestos con propiedades únicas haciendo mezclas de lignina con otros polímeros orgánicos (Doherty et al., 2011; Johnston et al., 2012; Stewart, 2008). Además, esta lignina ha sido utilizada sustituyendo el fenol químico en la fabricación de resinas de fenol-formaldehído y la elaboración de espumas rígidas de poliuretano (Cetin et al., 2002a; 2002b; Pan et al., 2013).

La lignina es considerada la fuente principal de compuestos aromáticos renovables. A pesar de su complejidad química, es una excelente alternativa como polímero, la cual representa una fuente inagotable de materia prima para la elaboración de compuestos químicos. La extracción de lignina de fuentes lignocelulósicas han ganado interés en los últimos años debido a que los procesos que se utilizan para su extracción libera moléculas con propiedades superiores a las ligninas tradicionales, esto representa un punto clave para incrementar su uso en aplicaciones industriales (Laurichesse & Averous 2014).

Modificación de Lignina

El enorme potencial de la lignina da varias oportunidades para tomar ventaja de su versatilidad para múltiples aplicaciones. Los métodos más importantes para modificar la lignina pueden ser

divididos en dos enfoques: el primero es la disminución del peso molecular, rompiendo totalmente la estructura de lignina para obtener oligómeros o monómeros que sirvan de material de partida para la síntesis de nuevos compuestos. El segundo enfoque es la introducción de sitios reactivos o la unión de diferentes moléculas como aminoácidos directamente en la lignina (Matsushita et al., 2009). En ambos casos la modificación puede ser de forma química, termoquímica, enzimática o por mezclas de procesos (Lange et al., 2013). A continuación se describen los principales métodos químicos y enzimáticos para la modificación de lignina.

Métodos de Modificación de la Lignina

Métodos químicos y termoquímicos. La modificación parece ser la mejor forma para usar este producto renovable como material de partida para polímeros y síntesis químicas. La modificación química de la lignina puede ser clasificada dentro de tres categorías principales:

- (1) La fragmentación o despolimerización de lignina como fuente de carbono a través del rompimiento de la estructura de lignina en monómeros aromáticos.
- (2) La modificación para crear nuevos sitios activos.
- (3) Funcionalizar los grupos hidroxilo.

La lignina es una materia prima apropiada para producir compuestos de bajo peso molecular como ácido vinílico, compuestos aromáticos simples o hidroxilados, aldehídos, ácidos alifáticos y muchos otros compuestos químicos (Amen-Chen et al., 2001; Erdocia, 2012). Un gran número de métodos de conversión termoquímicas han sido propuestos para despolimerizar o fragmentar la molécula. Sin embargo, la despolimerización catalizada por bases, la pirólisis, gasificación y solvólisis catalizada por un ácido de Lewis son los métodos considerados más

importantes (Brebu et al., 2009; Hamaguchi et al., 2012; McKendry, 2002; Zakzeski et al., 2010; Zakzeski et al., 2011). La fragmentación de lignina tiene dos objetivos: (i) elucidar la composición estructural y (ii) producir materiales útiles a partir de monómeros u oligómeros. Con la llegada de las biorefinerías, la fragmentación de lignina ha ganado renovado interés como un recurso químico abundante y que se puede obtener de fuentes renovables (Nowakowski et al., 2010).

Laurichesse y Avérous (2014) discuten que aunque la fragmentación de lignina es una buena opción para ampliar sus aplicaciones, esta puede ser vista como un proceso negativo con un alto gasto de energía destinado a deshacer lo que la naturaleza ha hecho durante la biosíntesis. Por esta razón, varias investigaciones se han centrado en desarrollar métodos para mejorar el uso de la lignina intentando valorizarla a través de la modificación de su estructura química.

Las principales reacciones para la síntesis de nuevos sitios activos químicos en lignina son: la alquilación, desalquilación, hidroxialquilación, sulfometilación, aminación y nitración (Hu, et al., 2011; Laurichesse & Averous, 2014). El tratamiento de la lignina a través de estas metodologías ha facilitado la obtención de productos químicos importantes como el dimetilsulfóxido (DMSO), agentes tensoactivos, materiales compuesto, resinas fenólicas, adhesivos para madera, entre otros (Gonçalves et al., 2001; Huang, et al., 2002; Li & Sarkannen, 2002; Shah et al., 2005; Zhang, et al., 2001).

Otra estrategia para extender las aplicaciones es funcionalizar sus grupos hidroxilo. Las ligninas tienen grupos hidroxilo fenólicos y grupos hidroxilos alifáticos en las posiciones C- α y C- β en la cadena lateral. Los grupos hidroxilo fenólicos son los grupos funcionales más reactivos, funcionalizar los grupos hidroxilo puede por ejemplo, mejorar la solubilidad.

Después de la modificación, la mayoría de los grupos hidroxilo fenólicos se convierten en grupos hidroxilos alifáticos, los cuales son más reactivos y están disponibles para otras reacciones. Las reacciones químicas principales para funcionalizar los grupos hidroxilo de lignina son: la esterificación, la fenolación, eterificación y la uretanización (Effendi et al., 2008; Thielemans et al., 2005). Al funcionalizar los grupos hidroxilos se pueden incorporar macromonómeros como el polietilenglicol (PEG) en la molécula de lignina (Gandini, et al., 2002), remover los grupos hidroxilo o simplificar la estructura de algunos lignosulfonatos (Hu, et al., 2011), transformar la lignina sólida e insoluble en un poliol altamente soluble en varios solventes (Lora & Glasser, 2002; Silva et al., 2009).

Métodos enzimáticos. Actualmente muchas industrias están buscando el desarrollo de tecnologías dirigidas hacia el diseño de productos y procesos que impliquen la reducción o eliminación de compuestos químicos. Esto se debe principalmente a las crecientes preocupaciones ambientales que representan las metodologías o procedimientos que utilizan grandes cantidades de compuestos químicos. Por tal motivo la atención se ha centrado en el uso de herramientas biotecnológicas como es el caso de enzimas específicas. El uso de enzimas para la modificación de lignina se ha centrado en dos direcciones principales: (i) la modificación selectiva con el fin de mejorar su compatibilidad y desempeño en materiales compuestos y (ii) en su despolimerización oxidativa para obtener compuestos monoméricos polifuncionales para ser utilizados como materia prima para la industria de polímeros (Crestini et al., 2010; Lange, et al., 2013).

El desarrollo y la aplicación de nuevas tecnologías basadas en la catálisis y modificación enzimática de la lignina traen numerosas ventajas a los procesos químicos industriales que resultan en procesos amigables con el ambiente. Esto se debe principalmente a la alta

especificidad y la eficiencia que presentan los catalizadores enzimáticos y a las condiciones de operación menos agresivas que las utilizadas en métodos químicos.

La lignina es de naturaleza amorfa, carece de regularidad y no es susceptible al ataque hidrolítico. A pesar de su naturaleza resistente está puede ser degradada o modificada por diversos microorganismos, en particular por los metabolitos secundarios de los hongos de la pudrición blanca. Estos hongos son capaces de producir enzimas extracelulares que pueden oxidar sustratos fenólicos y no fenólicos. Las enzimas principales asociadas con la degradación de la lignina son: la lignina peroxidasa (LiP), manganeso peroxidasa (MnP), peroxidasa versátil (VP) y la lacasa (Tabla 4). La estructura y mecanismos de acción de estas enzimas lignolíticas ha sido ampliamente estudiadas (Wong, 2009). De estas cuatro enzimas, las lacasas ocupan el lugar más importante en la degradación y modificación de la lignina.

Las lacasas (EC 1.10.3.2) son enzimas pertenecientes al grupo de las oxidasas de cobre azul (Morozova et al., 2007; Riva, 2006; Rodríguez, et al., 2006). Estas enzimas catalizan la oxidación de sustratos orgánico o inorgánico y la reducción de oxígeno molecular a agua, por medio de un mecanismo de transferencia de un electrón (Mayer & Staples, 2002). La enzima lacasa se ha detectado en una gran variedad de organismos como bacterias, hongos, plantas, e insectos (Dwivedi et al., 2011; Mayer and Staples, 2002).

Tabla 4. Enzimas lignolíticas y sus principales reacciones.

Enzima y abreviatura	Cofactor	Sustrato y mediador	Reacción	Referencia
Lignina peroxidasa (LiP)	H ₂ O ₂	alcohol veratrílico	Oxidación de anillos aromáticos a radicales cationes	(Haemmerli et al., 1987; Khindaria et al., 1995)
Manganeso peroxidasa (MnP)	H ₂ O ₂	Mn, ácidos orgánicos como quelantes, tioles y ácidos grasos insaturados	Oxidación de Mn (I) a Mn (II), oxidación de compuestos fenólicos a radicales fenoxi	(Fujii et al., 2013; Hofrichter, 2002; Janusz et al., 2013; Wariishi et al., 1992)
Peroxidasa versátil (VP)	H ₂ O ₂	Mn, alcohol veratrílico y compuesto similares a LiP y MnP	Oxidación de Mn (II) a Mn (III), oxidación de compuestos fenólicos y no fenólicos	Wong (2009)
Lacasa	O ₂	Fenoles, mediadores (hidroxibenzotriazol y ABTS)	Oxidación de fenoles a radicales fenoxi, otras reacciones en presencia de mediadores	(Kunamneni Adinarayana et al., 2008; Kunamneni A. et al., 2008)

Aunque las de mayor importancia industrial son las lacasas provenientes de hongos y en menor medida las que se obtienen de plantas (Morozova, et al., 2007). Las lacasas son proteínas extracelulares, no obstante también se han detectado lacasas intracelulares en algunos hongos e insectos (Dwivedi, et al., 2011). Las lacasas mejor caracterizadas son las de los hongos y en menor medida las que provienen de plantas (Wong, 2009). Las lacasas fúngicas desempeñan una variedad de funciones como la morfogénesis, la patogénesis y la degradación de la lignina (Singh, et al., 2010).

Algunas especies de lacasas ha sido utilizadas en diferentes industrias como la agrícola, textil, alimenticia, farmacéutica, la purificación de efluentes y la remediación de suelos (Brijwani et al., 2010; Kunamneni et al. 2007; Madhavi et al., 2009; Osma et al., 2010; Shraddha et al., 2011). Las enzimas lignolíticas, principalmente las lacasas proporcionan un medio atractivo para modificar las propiedades químicas de la lignina, por ejemplo la solubilidad, su peso molecular, algunas propiedades de superficie o la hidrofobicidad del polímero a través de la oxidación (Munk et al., 2015). El tratamiento de la lignina con enzimas lacasas puede impartir funcionalidades clave o lograr la unión de moléculas directamente a la lignina, aumentando de este modo su versatilidad. En este sentido se ha logrado unir ácido ferúlico a lignanos mediante la descarboxilación mediada por la enzima lacasa de *Trametes hirsuta* (Mattinen, et al., 2009). Adicionalmente se ha logrado la modificación de la lignina kraft con diversos aminoácidos utilizando lacasa (Witayakran et al., 2009). También se ha proporcionado evidencia de la polimerización de diferentes ligninas utilizando lacasa de *Trametes hirsuta* (Mattinen, et al., 2008). Los resultados mostraron que todas las ligninas probadas podían ser activadas y polimerizar en diferentes grados por la enzima lacasa. La polimerización de los lignosulfonatos usando varias lacasas también ha sido reportada (Areskog, et al., 2010a). Además, la capacidad

oxidativa de la enzima lacasa ha sido probada en condiciones alcalinas y utilizando mezclas de acetona y agua (Fitigau et al., 2013; Moya et al., 2011; Weihua et al., 2008). La capacidad de la lacasa para promover la polimerización oxidativa de la lignina kraft ha sido evaluada en varias condiciones de pH, temperatura, dosis de enzima y tiempo de tratamiento (Gouveia et al., 2012; 2013; van de Pas et al., 2011). Los resultados proporcionaron evidencia notable de la modificación de la lignina después de la incubación con lacasa. La oxidación estructural y un aumento en el peso molecular se lograron obteniendo un polímero 69 veces más grande que su peso molecular inicial. Varias técnicas analíticas como la resonancia magnética nuclear (RMN), espectroscopía de infrarrojo (FTIR) y la cromatografía de exclusión por tamaño (SEC), son utilizadas para evaluar cuantitativa y cualitativamente los cambios de la lignina por efecto de la acción enzimática (Nugroho, et al., 2010).

Como se mencionó anteriormente, la lignina es un polímero importante en la preparación de materiales de ingeniería siendo probablemente la aplicación más frecuente encontrada en la literatura. La modificación enzimática puede ayudar a obtener materiales de base biológica con una mayor biodegradabilidad, mayor fuerza, menos hidrofóbicos o como agente acoplante o compatibilizante (Sena-Martins et al., 2008; Thakur et al., 2014). La copolimerización de diferentes ligninas con compuestos químicos como el ácido vanílico, isocianatos o acrilamidas catalizada por lacasas ofrecen un gran potencial para preparar nuevo materiales (Milstein et al., 1994).

Materiales a Base de Polímeros Renovables

Al inicio de la producción petrolera, los plásticos basados en petróleo fueron enormemente impulsados debido a su gran número de aplicaciones y su bajo precio. Hoy el constante incremento en el precio del petróleo y la asociación de estos materiales con la contaminación ambiental, han dado lugar a un creciente interés en obtención de materiales ecológicamente amigables fabricados a partir de polímeros renovables (Gandini et al., 2008). Los empaques y contenedores de alimentos son los principales contribuyentes a este problema, a pesar de que algunos materiales a base de polímeros sintéticos pueden ser recuperados y reciclados estos acaban en vertederos donde tardan años para incorporarse al medio ambiente. Para hacer frente a los problemas ocasionado por los residuos de plástico, se ha llevado a cabo investigaciones para obtener materiales ecológicamente amigables utilizando polímeros naturales (Janjarasskul et al., 2010).

Una gran cantidad de polímeros renovables de origen natural incluyendo celulosa, polisacáridos, proteínas y lípidos han sido procesados y modificados con el fin de obtener películas de empaque y contenedores (Gandini, 2008; 2011). Entre estos polímeros naturales destaca el almidón porque tienen buena capacidad para formar película debido a sus propiedades coloidales únicas, lo hacen particularmente atractivo. El almidón de fuentes agrícolas como el trigo o tubérculos como la papa son la materia prima más utilizada para este fin debido a su costo relativamente bajo, amplia disponibilidad y su facilidad de manejo (Ban et al., 2005; Pagella et al., 2002; Pushpadass et al., 2009). Además, se ha demostrado que el almidón puede ser completamente biodegradable en el suelo y agua, que es de gran ventaja desde el punto de vista ambiental (Funke et al., 1998; Jiménez et al., 2012).

El almidón puede ser procesado en una fase continua, llamado almidón termoplástico a través de la gelatinización en presencia del calor y agua (Ma, et al., 2007; Mathew, et al., 2002). Sin embargo, las aplicaciones tecnológicas de los materiales a base de almidón termoplástico presentan varias desventajas como resultado de su carácter fuertemente hidrofílico y sus pobres propiedades mecánicas comparadas con polímeros sintéticos convencionales (Thuwall et al., 2006; Xu, et al., 2004). Estas desventajas limitan su aplicación aunque sus propiedades mecánicas pueden mejorarse con la adición de un plastificante (Pelissari et al., 2009). El glicerol es el plastificante más utilizado ya que es compatible con el almidón y logra disminuir las fuerzas intermoleculares de las películas mejorando así sus propiedades mecánicas. Sin embargo, el uso de plastificantes aumenta el carácter hidrofílico de las películas lo que a su vez promueve la permeabilidad de vapor de agua (Pranoto et al., 2005). Algunas estrategias que se han utilizado para combatir las deficiencias que presentan las películas a base de almidón es el uso de nuevos plastificantes (Xiaofei et al., 2004), la modificación del almidón (Spiridon et al., 2011), la combinación de almidón con polímeros sintéticos y biodegradables (Chen, et al., 1997) y la combinación de almidón con fibras de celulosa obtenidas a partir de residuos agrícolas (Dufresne et al., 2000; López-Rubio et al., 2007).

El uso de nuevos plastificantes debe justificar claramente aspectos de toxicidad si el material obtenido será usado como empaque de alimentos. La combinación de almidón con polímeros sintéticos permite disminuir la afinidad a la humedad del material obtenido aunque esto puede comprometer su biodegradabilidad (Huang, et al., 2006). Otra alternativa es la adición de nanorellenos como reforzantes como por ejemplo silicatos, nanotubos de carbono, nanopartículas de carbono y metales (Avella et al., 2005; Chivrac et al., 2008; Famá et al., 2011; Manno et al., 2008). Recientemente, se ha prestado mucha atención a la preparación de materiales

compuestos haciendo mezclas de polímeros naturales (Avérous, 2004; Kuciel et al., 2009; Mohanty et al., 2002).

En un intento de combinar las propiedades de dos polímeros de bajo costo manteniendo la biodegradabilidad de los materiales finales, se han hecho mezclas de almidón y ligninas. La lignina tienen la ventaja de ser capaz de jugar un papel importante como un agente hidrofóbico y está disponible en gran cantidad a bajo costo como subproductos de la industria del papel y en la obtención de combustibles lignocelulósicos. Sus propiedades hidrofóbicas han sido aprovechadas para reducir el carácter hidrofílico de películas de almidón (Baumberger, et al., 1998a; Baumberger, et al., 1997) y como reforzante que puede cambiar las propiedades mecánicas de los materiales a base de almidón (Baumberger, et al., 1998b; Huang, et al., 2003a; Huang, et al., 2003b).

Efecto de la Incorporación de Lignina en las Propiedades de Materiales de Almidón

Se ha reportado que la incorporación de la lignina en una matriz de almidón tiene un efecto positivo en sus propiedades de mecánicas, térmicas y de barrera (Bhat, et al., 2013; Vengal & Srikumar, 2005). La incorporación de lignina ha logrado aumentar la fuerza y la rigidez del material al mismo tiempo que reduce su afinidad al agua. Sin embargo, el efecto que la lignina puede impartir depende del procedimiento de extracción de la lignina, su peso molecular y el procedimiento preparación del material.

Baumberger y colaboradores han sido pioneros en la preparación y caracterización de materiales elaborados de almidón y lignina. Ellos han trabajado con varios tipos de lignina, almidones y procesos para la preparación de películas. Una de sus primeras investigaciones en este campo fue la preparación y caracterización de mezclas de lignosulfonatos y almidón preparados por

moldeo térmico. La evaluación de los materiales obtenidos por ensayos mecánicos revelaron que la incorporación de 10% lignosulfonatos modificó el esfuerzo de tensión de las películas independientemente de la composición del lignosulfonato (Baumberger, et al., 1997). El efecto de la incorporación de lignina ha sido evaluado a diferente humedad relativa. Los materiales fueron preparados utilizando mezclas de almidón y lignina kraft de 0-30% y fueron obtenidas por extrusión y moldeo térmico (Baumberger, et al., 1998c). La influencia del contenido de lignina en las propiedades mecánicas de las películas se evaluó mediante pruebas de esfuerzo-deformación a dos niveles de humedad relativa. A humedad relativa del 58% y 20% de lignina, se observó un ligero aumento en la elongación y resistencia al quiebre mientras que a una humedad relativa 71% y 30% de lignina, la elongación aumentó. Además, isothermas de adsorción de agua mostraron que la lignina redujo la afinidad al agua de las películas. Los autores reportaron la preparación de un material de dos fases que consistía en una matriz de almidón hidrofílico relleno de agregados de lignina. Para incrementar la reactividad de la lignina dentro de películas de almidón se han usado técnicas como la radiación por un haz de electrones (Lepifre et al., 2004). El tratamiento de materiales de almidón y lignina con un haz de electrones promueve reacciones de condensación y oligomerización que modula las propiedades del material final.

Por otra parte el efecto de la estructura de la lignina en las propiedades mecánicas de materiales a base de almidón y lignina también ha sido investigado. Los resultados de estas investigaciones coinciden en que las fracciones con bajo peso molecular tienen un papel clave en las propiedades mecánicas de las películas, principalmente como plastificante del almidón (Baumberger, et al., 1998c). La incorporación de fracciones de lignina de distintos pesos moleculares permite obtener materiales más elásticos. Debido a que la lignina posee múltiples grupos funcionales la

incorporación en materiales a base de almidón puede modificar propiedades como la permeabilidad al vapor de agua y la solubilidad al agua. La nula o mínima permeabilidad al vapor de agua se considera importante cuando se producen materiales para el empaque de alimentos que no requieran transferencia de humedad entre el alimentación y el medio ambiente (Voon et al., 2012). La solubilidad de películas elaboradas de polímeros biológicos es de suma importancia para determinar su biodegradabilidad (Rotta et al., 2009). Sin embargo, la obtención de materiales insolubles en agua también es importante en ciertas aplicaciones donde se desea mejorar la integridad de los productos (Tongdeesoontorn et al., 2011). Bhat et al. (2013) reportaron que la permeabilidad al vapor de agua y la solubilidad de películas de almidón de palma (*Metroxylon sagu*) y lignina de palma de aceite fueron modificadas y los resultados obtenidos fueron más favorables en estas películas que en las obtenidas al incorporar una lignina comercial. Esto demostró que independientemente de la materia prima de donde provenga la lignina y el almidón ambos polímeros tiene la capacidad para obtener materiales con propiedades interesantes. La disminución en la permeabilidad de vapor de agua en películas de almidón y lignina se ha atribuido a las fuertes interacciones intermoleculares que ocurren entre almidón y las moléculas de lignina (Baumberger, 2002). Según Lepifre et al. (2004), los polisacáridos son capaces de formar enlaces con compuestos fenólico (radicales) a través de enlaces C-O, C-C y O-H. Esto puede mejorar la compatibilidad y la hidrofobicidad de combinaciones de almidón/lignina resultando en una reducción en la difusión del vapor de agua a través de las películas.

Otra propiedad importante en materiales compuestos es la estabilidad térmica. La investigación de las propiedades térmicas a materiales hechos de polímero naturales es importante para conocer su temperatura de descomposición térmica. La adición de lignina en las películas de

almidón puede mejorar la estabilidad térmica y esto ha sido demostrado. Bhat et al (2013) reportaron que la adición de lignina aumentó ligeramente la estabilidad térmica y la temperatura de descomposición de películas de almidón de palma. Esto se puede atribuir a la formación de múltiples enlaces O-H entre la lignina y el almidón (Spiridon, et al., 2011).

HIPÓTESIS

El tratamiento de la paja de trigo con mezclas de solventes orgánicos y agua permiten extraer lignina con alta pureza, la cual puede ser utilizada para modificar las propiedades funcionales de películas de almidón.

OBJETIVOS

General

Extraer y caracterizar la lignina de paja de trigo (*Triticum durum*) para mejorar las propiedades funcionales de películas de almidón.

Particulares

1. Seleccionar un procedimiento para extraer lignina de paja de trigo (*Triticum durum*) con un alto grado de pureza.
2. Caracterizar las propiedades fisicoquímicas de la lignina, peso molecular, estructura y propiedades térmicas.
3. Modificar la lignina de trigo cristalino por métodos enzimáticos.
4. Elaborar películas de almidón y lignina y evaluar sus propiedades funcionales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materia Prima

Se utilizó paja de trigo cristalino (*Triticum durum*) de la variedad Patronato Oro C2008, la cual se obtuvo de un campo agrícola en ciudad Obregón, Sonora, el año 2011.

Molienda de la Paja de Trigo

Primeramente se llevó a cabo una pre-molienda utilizando una desintegradora de granos y forrajes (Multiplex, a 3000 rpm). Para obtener un tamaño de partícula fino la paja se molió en un molino de cuchillas con una malla de 0.8 mm (Pulvex, Modelo 200, S.A. de C.V., México).

Una vez molida la paja se guardó en bolsas de polietileno para sus posteriores análisis.

Separación de Fracciones

La paja de trigo cristalino molida se separó por tamaños de partícula utilizando un tamizador con movimiento orbital (Marca Retsch As 200, Haan, Alemania). El tamizador estaba equipado con una serie de tamices con tamaños de malla de 600, 425, 180, 63 y 45 μm apilados de mayor a menor tamaño de malla. Aproximadamente 5 g de paja de trigo se colocaron en el primer tamiz (600 μm) y la paja se hizo pasar a través de los tamices durante 5 minutos a una velocidad de ajuste de 5 en el equipo, con intervalos de agitación. Finalmente se recolectó cada fracción y se pesó para determinar la distribución del tamaño de partícula.

Caracterización de la Paja de Trigo Cristalino

Separación de Compuestos Extraíbles

Para remover los compuestos extraíbles de la paja de trigo se utilizaron los métodos estándares (T264 om-82 y T204 os-76) reportado por la Asociación Técnica de la Industria del Papel y la Pulpa (TAPPI, por sus siglas en inglés). Se pesaron 15 g de paja de trigo (425-63 μm), se colocaron dentro de un dedal. La muestra se colocó en un equipo Soxhlet y la extracción se realizó 3 veces, la primera utilizando hexano-etanol (2:1 v/v) durante 6 horas. La segunda extracción fue con etanol al 100% durante 4 horas. La extracción final se hizo con agua caliente utilizando un sistema de filtrado que consistía en papel filtro, un matraz Kitasato y una bomba de vacío. Finalmente la paja tratada se dejó secar a 60°C durante 24 horas.

Cuantificación de Celulosa y Hemicelulosa

La cuantificación de celulosa y hemicelulosa se determinó de acuerdo al procedimiento reportado por (Zobel et al., 1966). Primeramente se obtuvo el contenido total de las fibras, llamada holocelulosa (holocelulosa = celulosa + hemicelulosa) y se realizó como se describe a continuación. Se pesaron 0.7 g de paja en un matraz Erlenmeyer, se agregaron 10 ml de la solución A (Ácido Acético 1.049 M y NaOH 0.5 M), 1 ml de la solución B (NaClO_2 al 20% m/v) y se agitó vigorosamente hasta que toda la paja estuvo en contacto con las soluciones agregadas. Inmediatamente se llevó a un baño de agua manteniendo a una temperatura de 70°C y cada 30 minutos el matraz fue agitado. 1 ml de la solución B fue agregada a los 45, 90, 150 y 210 minutos del experimento. La digestión se mantuvo durante 4 horas, después la holocelulosa se filtró a través de filtros de vidrio previamente pesados y se lavó con 100 ml de ácido acético

al 1% (v/v), después con 10 ml de acetona y los filtros con la holocelulosa se colocaron en una estufa a 105°C durante 12 horas. La holocelulosa fue calculada como porcentaje en peso.

Después de calcular el porcentaje de la holocelulosa, se determinó el contenido de celulosa. A la holocelulosa contenida en cada filtro se agregaron 3 ml de NaOH al 17.5% (p/v). Después de 5 minutos se adicionaron nuevamente 3 ml de NaOH, después de 35 minutos de la segunda adición de NaOH se agregaron 15 ml de agua para detener la reacción y se filtró con 60 ml de agua, 5 ml de ácido acético y 60 ml de agua otra vez. Para finalizar se agregaron 20 ml de acetona y la muestra se secó a 105°C. La celulosa fue determinada en base al porcentaje en peso. El contenido de hemicelulosa se calculó por diferencia de contenido entre la holocelulosa y la celulosa.

Cuantificación de Lignina

La determinación del contenido de lignina fue realizada independientemente de las determinaciones anteriores y se obtuvo usando los métodos estándares T222 om-83 y 250 UM-85 1991 y 2006 (TAPPI). Este método se basa en la cuantificación del residuo que queda después de la sacarificación de celulosa y otros polisacáridos de la pared celular, con ácido sulfúrico al 72%. Como primer paso, 1 g de paja desgrasada se colocó en un tubo de vidrio, se le agregaron 15 ml de ácido sulfúrico al 72% y se mantuvo a 20°C durante 2 horas. Posteriormente se agregaron 10 ml de agua y se colocó una canica en el borde del tubo para permitir reflujo durante 2 horas en un baño de agua hirviendo. Después de ese lapso de tiempo, la muestra se pasó a través de filtros de vidrio previamente pesados, se lavó con agua y se secó en la estufa. La cantidad de lignina se determinó por diferencia de peso.

Extracción de Lignina

Para remover la lignina de la paja de trigo se utilizó la metodología reportada por Xu et al. (2006). Se colocaron 10 g de paja en matraces de vidrio, a los cuales se les agregó una mezcla de ácido fórmico, ácido acético y agua (30:60:10,v/v/v) con una relación solido/liquido 20:1 (ml/g). Los recipientes se colocaron en un baño de agua a 85 °C y la reacción se llevó a cabo durante 4 horas con agitación constante. Una fase sólida y otra líquida se separaron usando una tela de nylon como filtro dando dos lavados, uno con agua acidificada (pH 2.5) y otro con agua destilada caliente. La fase sólida se tomó como celulosa y esta se llevó a sequedad en una estufa a 80°C durante 12 horas. El licor de cocimiento (fase líquida que contenía restos de los solventes, hemicelulosas y la lignina) se concentró utilizando un rotaevaporador (Rotary Evaporator, Marca Yamato, Modelo RE301). Después de concentrar el licor de cocimiento se agregaron 3 volúmenes de etanol al 95% y se dejó reposar (12 h a temperatura ambiente) para precipitar los carbohidratos, este paso se repitió 3 veces. Los carbohidratos precipitados se removieron usando filtros (Marca watman de 47 mm), y lo retenido en el filtro se consideró como hemicelulosa la cual se llevó a sequedad durante 12 horas a 60°C. El líquido color café oscuro que se obtuvo después del filtrado se concentró utilizando el rotaevaporador (Rotary Evaporator, Marca Yamato, Modelo RE301) y se consideró como lignina. Seguido, la lignina se lavó con agua acidificada (pH 2.5), se centrifugó y se llevó a sequedad utilizando liofilización. La lignina seca se molió con un molino de mortero (RM 200 Han, Alemania) y se tamizó a través de una malla de 250 µm para obtener un tamaño de partícula homogéneo.

Caracterización de la Lignina

Solubilidad

La solubilidad de lignina fue determinada por el método de Shruky et al. (2008) con ligeras modificaciones. La modificación consistió en reducir la cantidad de muestra y probar solventes mezclados con cloruro de litio (LiCl). La metodología se describe a continuación, se colocaron 100 mg de lignina en microtubos y a cada microtubo se le agregó 1 ml de solvente (ácido acético, dimetilformamida, dioxano, etanol, metanol, dimetilsulfóxido, ácido fórmico, dimetilformamida/LiCl 0.2 M, tetrahidrofurano/LiCl 0.2 M, acetona, tetrahidrofurano y una mezcla de ácido acético, ácido fórmico y agua 60:30:10 v/v/v), las muestras se agitaron 60 segundos para homogenizar, seguido otros 30 min en vortex a velocidad intensa y centrifugación a 10,000 g por 15 min (Thermo scientific heraeus biofuge primo R by Thermo Scientific). La parte soluble se decantó en platillos de aluminio pre-pesados y lo que quedó en fondo del microtubo se agregó nuevamente 1 ml de solvente este paso se repitió una vez más. Las fracciones de lignina soluble se recuperaron y llevaron a sequedad en una estufa a 110°C durante 12 horas. El porcentaje de solubilidad de lignina se determinó por diferencia de peso. Cada solvente se probó por triplicado.

Masa Molecular

La masa molecular de la lignina fue estimada utilizando cromatografía líquida de alta resolución de exclusión por tamaño (HPLC-SEC) en un equipo Agilent 1260 Infinity Quaternary LC System, (modelo 240, EE.UU.) con un detector de índice de refracción (Agilent 1260 Infinity) y una columna TSK-GEL Alpha-300 (Stuttgart, Alemania). Dimetilformamida con cloruro de litio 0.1 M se usó como fase móvil, a una velocidad de flujo de 1 ml/min. La temperatura de la

columna se mantuvo a 40°C y la longitud de onda de detección fue de 280 nm. Además, se utilizaron estándares de poliestireno (Sigma-Aldrich) con un peso molecular desde 70,000 a 266 g/mol para calibrar el equipo.

La preparación de las muestras para el análisis por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés) se realizó colocando 100 mg de lignina en un microtubo a la cual se agregó 1 ml de cada solvente utilizado en la prueba de solubilidad. Posteriormente las 12 soluciones de lignina se pusieron en agitación en vortex durante 30 min, se centrifugaron a 10,000 g por 15 min (Marca Thermo scientific heraeus biofuge primo R by Thermo Scientific), la parte soluble se decantó en microtubos los cuales se centrifugaron nuevamente a 15,000 g por 20 min. Muestras de 20 µl de lignina soluble se inyectaron en el sistema de HPLC (Marca Agilent 1260 Infinity Quaternary LC System, modelo 240, EE.UU).

Carbohidratos Totales

La cantidad de carbohidratos totales se cuantifico debido a que durante la extracción de la lignina restos de la hemicelulosa que se degradaron por efecto del tratamiento ácido pueden unirse químicamente a la lignina (de Wild et al., 2012). La cantidad de carbohidratos totales en lignina se determinó según la metodología reportada por DuBois et al. (1956). Se preparó un estándar de glucosa y se hizo una curva de calibración como se describe a continuación. A 100 mg de glucosa se le agregaron 100 ml de dimetilsulfóxido (DMSO) de esa solución se tomaron 10 ml y se aforaron a 100 ml con DMSO, seguido se tomaron 250, 500, 750, 1000 y 1250 µl y se colocaron en tubos de vidrio a los cuales se les agregaron 5 ml de ácido sulfúrico concentrado y se obtuvo una concentración de 10, 20, 30, 40 y 50 µg de glucosa. Finalmente, de cada concentración se tomaron 2 ml para preparar la curva de calibración, agregando 1 ml de fenol

al 5%, 5 ml de ácido sulfúrico, se dejó reposar por 10 min a temperatura ambiente y 30 min en un baño de agua con sonicación a 60°C. Para finalizar los tubos se agitaron en un vortex para homogenizar y la absorbancia se midió a 490 nm en un espectrofotómetro (Varian Cary 50 Bio UV/Visible, Modelo Cary 50 Conc– 10069600, Varian Australia). Se preparó un blanco donde la glucosa se sustituyó con agua destilada.

Para la determinación de carbohidratos en lignina, a 100 mg de lignina se le agregaron 100 ml de dimetilsulfóxido (DMSO), se tomaron 250 µl, se agregó 1 ml de fenol al 5%, se aforó a 5 ml con ácido sulfúrico concentrado, se dejó reposar por 10 min a temperatura ambiente, 30 min en un baño de agua con sonicación a 60°C y la absorbancia se midió a 490 nm en el espectrofotómetro (Varian Cary 50 Bio UV/Visible, Modelo: Cary 50 Conc – 10069600, Varian Australia). Las muestras se realizaron por triplicado.

Cenizas

El contenido de cenizas en la lignina se determinó utilizando el método estándar T 413 de la TAPPI. Este método es adecuado para determinar las cenizas de madera, pasta de papel, papel, cartón y residuos agrícolas. Se pesaron 700 mg de lignina y se colocaron en crisoles previamente pesados y se pusieron en una mufla a 900°C durante 6 h. El contenido de cenizas se determinó por diferencia de peso. Todos los análisis se realizaron por duplicado.

Espectroscopía de Infrarrojo con Transformada de Fourier (FT-IR)

La espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR por sus siglas en inglés) fue utilizada como un método para la identificación molecular de la lignina extraída con la mezcla de solventes orgánicos. Para obtener los espectros de lignina se usó un espectrómetro (Marca Perkin-Elmer spectrum GX, Perkin-Elmer Life, y Analytical Sciences Inc., Waltham, MA).

Muestras de 1 mg de lignina fueron mezcladas con KBr (Aldrich Chemicals, Milwaukee, WI) y se prensaron hasta obtener pellets delgados y transparentes. Las señales de FT-IR se recolectaron en un rango de 4000 y 400 cm^{-1} y se registraron en el modo de transmitancia como función del número de onda.

Diseño de Experimentos y Análisis Estadístico

Se utilizó un diseño de experimentos completamente al azar de dos factores, los cuales son el tamaño de partícula de la paja con tres niveles (tamaño grueso, mediano o fino) y la extracción de los compuestos lipofílicos (muestra con grasa o muestra sin grasa). A los datos se les realizó un análisis de varianza y una comparación de medias por el método de Tuckey con un nivel de confiabilidad del 95%, utilizando el paquete estadístico XLstat.

Modificación de Lignina

Materia Prima

Se utilizó lignina de paja de trigo cristalino la cual se extrajo utilizando una mezcla de solventes orgánicos (ver apartado extracción de lignina).

Enzimas

Dos enzimas lacasas, una obtenida del hongo *Trametes versicolor* y otra obtenida de la planta de laca *Rhus vernicifera* (Sigma-Aldrich) se utilizaron para llevar a cabo la modificación de lignina. Las enzimas se mantuvieron almacenadas a -20°C antes de los experimentos de polimerización.

Reacción de Polimerización

La reacción se llevó a cabo en tubos de 15 ml, siendo el volumen final 5 ml en todos los casos. Se prepararon 5 ml de una solución reguladora-enzima, solución reguladora de acetato de sodio 0.2 M, pH 5.0 para *Trametes versicolor* y una solución reguladora Tris 0.2 M, pH 7.5 para *Rhus vernicifera*. Muestras de 100 mg de lignina se utilizaron como sustrato, dos concentraciones de la enzima (correspondientes a 100 y 200 U/5ml) y dos temperaturas 40°C y 25°C se pusieron a prueba. En el experimento se usó un control, el cual fue preparado en condiciones idénticas a las descritas, con la diferencia que no se añadió la enzima.

Caracterización de la Lignina Modificada

Masa Molecular

La lignina tratada enzimáticamente fue analizada usando técnicas de cromatografía de alta resolución (HPLC). La masa molecular de la lignina tratada con las enzimas fue estimada utilizando cromatografía líquida de alta presión HPLC-SEC (por sus siglas en inglés). Para esto se utilizó un equipo (Marca Agilent 1260 Infinity Quaternary LC System, modelo 240, EE.UU), con un detector de arreglo de diodos (Agilent 1260 Infinity) y una columna (Marca TSK-GEL Alpha-400, Stuttgart, Alemania). Como fase móvil se usó dimetilformamida con cloruro de litio 0.1 M, a una velocidad de flujo de 1 ml/min. La temperatura de la columna se mantuvo a 40°C durante toda la corrida y la longitud de onda de detección fue de 280 nm. Además, se utilizaron estándares de poliestireno (Sigma-Aldrich) con un peso molecular desde 70,000 a 266 g/mol para calibrar el equipo.

La preparación de las muestras para el análisis cromatográfico se realizó colocando 50 mg de lignina en microtubos a la cual se agregó 1 ml de dimetilformamida/LiCl 0.1 M. Posteriormente las muestras se agitaron durante 30 min, se centrifugaron a 10,000 g por 15 min (Marca Thermo scientific heraeus biofuge primo R by Thermo Scientific), la parte soluble se decantó en microtubos los cuales se centrifugaron nuevamente a 15,000 g por 20 min. La fracción soluble de la lignina se colocó en viales para su análisis en el sistema de HPLC-SEC.

Preparación y Caracterización de las Películas de almidón y Lignina

Materia Prima

Para la preparación de las películas se utilizó almidón de trigo cristalino (*Triticum durum*), variedad Jupare, cultivado en el valle del Yaqui, en el estado de Sonora, ciclo 2008-2009.

Extracción y Purificación del Almidón

En la Figura 8 se presenta el diagrama de flujo de la molienda húmeda de trigo cristalino (*Triticum durum*). La extracción y purificación del almidón, se realizó por el método reportado por Vansteeland & Delcour (1999) con modificaciones. Las modificaciones se realizaron para aumentar el rendimiento de la obtención de almidón y disminuir el tiempo de extracción. 1 kg de trigo limpio y colocó en un vaso de precipitado, se le agregó una solución de bisulfito de sodio (NaHSO_3) al 0.24% (p/v) en una proporción de 1:3 y se dejó reposar 12 h a 25°C. Después la solución de bisulfito se decantó y el grano se maceró en un molino de piedras (Marca Hermanos Nolasco, Puebla).

Las medidas de las piedras fueron 12.5 cm de diámetro y 7 cm de ancho, se usó una abertura entre piedras de 19 cuerdas (vueltas al tornillo). La mezcla de fracciones resultante de la molienda se separó por tamizado en húmedo empleando un tamizador con movimiento orbital (Marca Retsch As 200, Haan, Alemania), con 4 tamaños de malla 425, 180, 63 y 45 μm .

El almidón se obtuvo en una solución acuosa debido a los lavados con agua destilada que se realizaron en el tamizado en húmedo. La solución de almidón se dejó sedimentar durante 24 h agregando 10% de metanol.

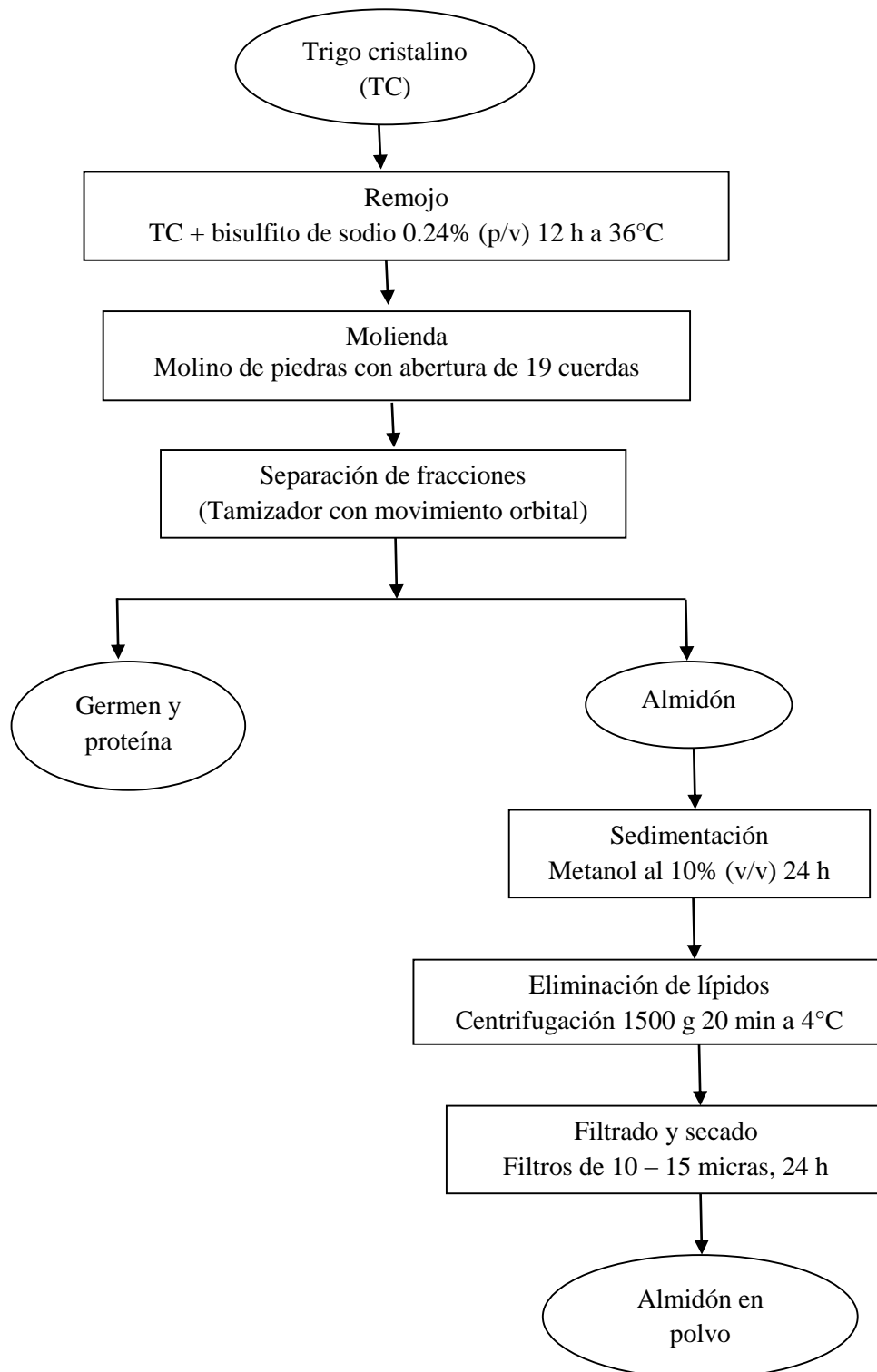


Figura 8. Diagrama de flujo de la molienda húmeda de trigo cristalino.

Para la purificación del almidón, la solución que se obtuvo por tamizado en húmedo se centrifugó a 1500 g durante 20 min a 4°C, el sobrenadante se descartó y este paso se repitió hasta que el sobrenadante no fue visible. Después el almidón fue suspendido en una solución de metanol al 80%, agitándose por 2 h en un agitador orbital (Marca Stovall, Modelo BDRAA1158, E.U.A). Posteriormente el almidón se lavó 3 veces con metanol al 80% y se recuperó usando filtros de 10-15 µm, se llevó a sequedad a temperatura ambiente durante 24 h. Finalmente el almidón en polvo, se guardó en frascos de polietileno para evitar el contacto con la humedad del ambiente.

Preparación de las Películas de Almidón-Lignina

Las películas se prepararon por el método de evaporación de solventes reportado por Chung & Lai (2005). Se preparó una solución acuosa de almidón de trigo (3%, p/v) y se calentó a 80°C durante 1 h en un baño de agua con agitación. La solución se colocó en una olla de presión a 120°C durante 20 min y después se enfrió hasta 60°C. Como plastificante se utilizó glicerol en un peso equivalente al 40% (p/p, con base en el contenido de almidón). La mezcla se homogeneizó inmediatamente por agitación durante 10 minutos. Aproximadamente 6 g de la solución formadora de las películas se vertió en una placa de Petri (6 cm de diámetro). Cada solución se distribuyó uniformemente en las placas de Petri y se llevaron a sequedad a 60°C durante 8 horas. Después del secado, las películas se acondicionaron a una humedad relativa del 57% (HR) durante 72 horas a temperatura ambiente, el porcentaje de HR se obtuvo con una solución de bromuro de sodio saturada.

Para incorporar la lignina en la solución formadora de película muestras de 100 mg de lignina en polvo se disolvieron en metanol a temperatura ambiente, se agitaron en un vortex durante 30 min y se centrifugaron a 15,000 g durante 15 minutos. La lignina soluble en alcohol (LSA) se separó de la lignina insoluble por decantación y se incorporó en la solución formadora de película en proporciones de 5, 10, y 20% (p/v, basado en el contenido de almidón). La LSA fue incorporada en forma de una solución en la que el metanol actuó como un compatibilizante del almidón y la lignina. Después de la distribución homogénea, alcohol se evaporó bajo altas temperaturas.

Caracterización de las Películas

Espesor

El espesor de las películas se midió usando un micrómetro de mano (Dial 7305; Co Mitutoyo, Tokio, Japón). El espesor se midió en cada película en lugares seleccionados al azar ($n = 10$) y se registraron los valores promedios.

Color

El color de las películas se midió utilizando un colorímetro Hunter Lab (Espectrofotómetro Minolta CM-3500d, Minolta Co. Ltd, Osaka, Japón). Antes del análisis el colorímetro fue calibrado con dos estándares (blanco y negro). Las mediciones de color se obtuvieron por en tres posiciones aleatorias, incluyendo el centro de las películas. Se utilizó la escala de color de L a y b, donde los valores máximos y mínimos de L^* son 100 y 0, respectivamente. Para los parámetros de cromaticidad, valores positivo de a^* indican rojo, valores negativo de a^* indican verde, mientras valores positivo de b^* indican amarillo y valores negativo de b^* indican azul.

Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

La morfología de las películas fue observada utilizando un microscopio electrónico de barrido (JEOL JSM-5800 LV, Tokio, Japón) equipado con un detector para electrones secundarios y retrodispersos a una aceleración del voltaje de 15 kV. Antes de la evaluación las películas fueron recubiertas con oro.

Propiedades Mecánicas

Las mediciones de las propiedades mecánicas de las películas se llevaron a cabo en un analizador mecánico dinámico (DMA) RSA III de TA Instruments. Las películas se mantuvieron a una humedad relativa de 57% durante 48 horas antes de ser sometidas a pruebas de esfuerzo-deformación. Las pruebas se realizaron a una temperatura constante de 25°C y las dimensiones de las muestras fueron 7 mm de ancho x 5 cm de largo. Se registraron los valores promedio de al menos tres muestras de cada tipo de película. Las propiedades mecánicas evaluadas fueron el esfuerzo a la tensión, la elongación al quiebre y el módulo de Young.

Espectroscopía Infrarroja con Reflectancia Total Atenuada

La espectroscopía IR se realizó utilizando un espectrómetro (Perkin Elmer® Spectrum Sistem GX FTIR). Los espectros fueron obtenidos usando un accesorio de reflectancia total atenuada (ATR) (Smiths, modelo de Quest) con una ventana de diamantes de rebote. El análisis de ATR se realizó entre 4000 y 400 cm^{-1} . Un total de 10 exploraciones acumulativas se obtuvieron a una resolución de 4 cm^{-1} .

Caracterización Térmica

El análisis termogravimétricos (TGA, por sus siglas en inglés) se llevó a cabo para estudiar las características de degradación de las películas de almidón y lignina. Estas determinaciones se realizaron en un equipo TGA (TA STD Q500 New Castle, DE EE.UU.). Las muestras (10 mg) fueron calentadas a 800°C a una velocidad de 5°C/min y como gas de purga se utilizó aire a una velocidad de flujo de 60 ml/min.

Actividad Antioxidante

La actividad antioxidante de las películas se determinó usando un método espectroscópico el cual se basa en la desaparición de la banda de absorción de radical libre (DPPH) tras la reducción por un compuesto antiradical (Brandwilliams et al., 1995). Este método es adecuado para determinar la actividad antioxidante de muestras alimenticias, por este motivo se adaptaron las modificaciones hechas para el análisis de películas reportada por Domerek et al. (2013). Muestras de 500 mg de películas que contenían 5, 10, y 20% de lignina soluble en metanol se colocaron en 10 ml de metanol acuoso, se agitaron durante 2 horas a temperatura ambiente y se almacenaron en la oscuridad durante 12 horas a -20°C. Después la parte soluble se separó de lo insoluble en metanol, utilizando la parte soluble (extracto) para determinar la actividad antioxidante. Los extractos obtenidos se centrifugaron a 2790 g durante 10 min. Se añadieron 10 ml de metanol a cada muestra y se agitaron durante 10 min a temperatura ambiente y centrifugación a 2790 g durante 10 min. Los extractos se obtenidos en la primera y segunda extracción se combinaron. Finalmente, se añadieron 3,900 µl de solución de 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH, por sus siglas en inglés) recién preparada a 100 µl de cada extracto, se mezclaron y se incubaron durante 60 min en la oscuridad. De las muestras resultantes se colocaron 100 µl en microplacas y se midió la absorbancia a 515 nm utilizando un

espectrofotómetro de microplacas XMark TM (Bio-Rad Hercules, CA, EE.UU.). Todas las pruebas se realizaron por triplicado y la actividad antioxidante se expresó como el porcentaje de inhibición radical libre de la muestra.

Solubilidad en Agua

La solubilidad en agua de las películas se determinó siguiendo el procedimiento de Laohakunjit y Noomhorn (2004). Muestras de aproximadamente 60 mg de cada película se colocaron en 6 ml de agua destilada y se agitaron durante 30 min a temperatura ambiente. Después la solución se centrifugó a 3000 g (Clay Adams DYNAC 420101, Maryland, EE.UU.) durante 15 min. El sobrenadante se extrajo y se secó en una estufa a 80°C durante 8 horas. El peso de la materia seca solubilizada se calculó como el porcentaje de solubilidad en el agua de las películas.

Diseño de Experimentos y Análisis Estadístico

Se utilizó un diseño de experimentos completamente al azar con tres niveles (5%, 10% y 20% de lignina), y a los datos se les realizó un análisis de varianza y una comparación de medias por el método de Tuckey con un nivel de confiabilidad del 95%, utilizando el paquete estadístico SAS.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Composición de la Paja de Trigo

La composición obtenida de la paja de trigo cristalino utilizada en este estudio se muestra en la Tabla 5. El contenido de celulosa, hemicelulosa y lignina estuvo dentro de los rangos reportados anteriormente en investigaciones sobre paja de trigo (Tabla 1).

Efecto del Tamaño de Partícula y la Separación de Compuestos Extraíbles en la Recuperación de Lignina

Los compuestos extraíbles, son un grupo heterogéneo de sustancias que pueden ser extraídas con solventes como acetona, diclorometano, hexano y etanol. Los principales compuestos extraíbles son resinas ácidas, triglicéridos, ácidos grasos, compuestos neutrales como alcoholes ácidos, esteroides y una variedad de compuestos fenólicos (Sithole 1992). Las plantas gramíneas y pajas tienen sus hojas y tallos cubiertas con partículas cerosas semicristalinas. Estas ceras son alcanos de cadena larga, ésteres y alcoholes cerosos, junto con una considerable cantidad de ácidos grasos libres. Además, existen estudios donde se ha publicado que la composición química de compuestos extraíbles de la paja de trigo contiene compuestos fenólicos (Juniper 1979). Para la extracción de lignina se ha reportado que dar un tratamiento de desgrasado para remover los compuestos extraíbles de la paja es importante para obtenerla con pureza alta. El efecto del tamaño de partícula y la remoción de compuestos extraíbles en la recuperación de los principales polímeros de paja de trigo usando solventes orgánicos se muestra en la Tabla 6.

Tabla 5. Composición química de la paja de trigo (*Triticum durum*).

Componente	Contenido (%)
Extraíbles	1.92±0.55 ^A
Celulosa	38.2±0.02
Hemicelulosa	35.5±0.03
Lignina	14.1±0.08
Cenizas	5.9±0.23

^ALos valores corresponden a las medias ± la desviación estándar de tres mediciones, n=3, base seca.

Tabla 6. Efecto del tamaño de partícula y desgrasado en la recuperación de los principales polímeros de la paja de trigo usando solventes orgánicos.

Tamaño de partícula (µm)	No desgrasado			Desgrasado		
	Celulosa (%)	Hemicelulosa (%)	Lignina (%)	Celulosa (%)	Hemicelulosa (%)	Lignina (%)
425	73.6±0.45 ^{aAB}	2.1±0.17 ^b	23.5±0.12 ^a	73.8±0.07 ^a	1.9±0.023 ^a	11.4±0.11 ^a
180	71.8±0.02 ^a	2.0±0.14 ^b	25.8±0.10 ^b	72.3±0.02 ^a	2.5±0.006 ^{ab}	11.5±0.11 ^a
63	70.6±0.22 ^a	4.3±0.32 ^a	21.9±0.10 ^a	71.8±0.09 ^a	2.9±0.006 ^b	11.0±0.23 ^a

^A Medias ± la desviación estándar; n=3, base seca.

^B Letras diferentes dentro de cada columna y para cada tratamiento, indican diferencias significativas ($P \leq 0.05$).

No se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de celulosa recuperada al variar el tamaño de partícula y tampoco por el tratamientos de desgrasado de la paja de trigo. Para la hemicelulosa en la fracción de tamaño de partícula más fino (63 μm) aumentó la recuperación de este polímero. En el caso de la lignina tuvo un rendimiento de recuperación general variando desde 21.9-23.5%.

Los resultados de la recuperación de celulosa nos indican que bajo las condiciones de este experimento no hubo degradación significativa este polímero, que es algo que caracteriza al método organosolv. En la hemicelulosa, no se observaron diferencias significativas en los tamaños de partícula de 425 y 180 μm , sin embargo, en la paja con tamaño de partícula de 63 μm se duplicó el porcentaje de recuperación de este polímero; podría asumirse que tamaños de partícula más finos liberan más fácilmente a este heteropolímero.

Para la lignina, el tamaño de partícula no tuvo efecto en el porcentaje de extracción, mientras que el tratamiento de desgrasado disminuyó significativamente su extracción. Ha sido reportado que la partes exteriores de los tallos y hojas de las pajas de cereales son un diseño de estructura de múltiples capas. En la capa superior contienen una cutícula, la cual es una membrana no celular continua que cubre las paredes epidérmicas. Esta cutícula es generalmente de 1 micra de grosor y contiene una capa de cera en forma de película delgada. En esta cutícula se encuentran los compuestos extraíbles, combinados con compuestos fenólicos como el ácido ferúlico y el ácido *p*-cumárico, ambos pueden ser liberados durante la extracción con Soxhlet. La disminución de la cantidad de lignina obtenida de la paja que fue desgrasada puede ser atribuida a que el tratamiento para remover los compuestos extraíbles fue exhaustivo, removiendo también cantidades considerables de compuesto fenólicos.

Solubilidad de la Lignina

La heterogeneidad química de la lignina, incluyendo las diferencias en la estructura química de la macromolécula de lignina y la funcionalidad dada por la distribución de la masa molecular (Bikova, et al. 2004), disminuyen drásticamente su aplicabilidad.

Recientemente se demostró que la separación de la lignina de paja de trigo con solventes orgánicos de polaridad diferentes produce la separación de los productos más homogéneos (Arshanitsa et al 2013; Ma et al 2013). El fraccionar la lignina con solventes orgánicos es muy atractivo debido a la oportunidad de obtener fracciones de lignina con diferentes polaridades, más homogénea y más soluble (Ropponen et al. 2011), que son los principales inconveniente de la mayoría de aplicaciones de lignina (Pouteau et al., 2005; Brodin et al. 2010).

La solubilidad de la lignina organosolv extraída de paja de trigo con una mezcla de solventes orgánicos se muestran en la Tabla 7. De manera general todos los solventes utilizados en este estudio tuvieron la capacidad de solubilizar una cierta cantidad de la lignina a temperatura ambiente. La lignina tuvo mayor solubilidad en la mezcla de ácido acético-ácido fórmico-agua, así como el ácido acético y el ácido fórmico de manera separada, con valores de solubilidad 87.7, 79.7 y 76%. Por el contrario, la lignina fue menos soluble en acetona, el tetrahidrofurano (THF) y el 1-4 dioxano, mostrando valores de solubilidad de 7.1, 5.2 y 3.0% respectivamente. Se ha reportado que la dimetilformamida (DMF) como solvente de lignina puede causar agregación molecular; sin embargo, pequeñas concentraciones de cloruro de litio (LiCl) o bromuro de litio (LiBr), en solventes moderadamente polares puede mejorar la solubilidad de la lignina (Connors et al. 1980).

Tabla 7. Solubilidad de lignina de paja de trigo.

Solvente	Solubilidad (%)
Ácido acético/ácido fórmico/agua ^b	87.7±0.4 ^A
Ácido acético	79.7±0.2
Ácido fórmico	76.0± 0.6
DMF/LiCl 0.2 M	75.4± 0.4
DMSO ^c	62.7± 0.6
Metanol	48.6± 0.8
DMF	35.0±0.001
Etanol	26.9± 0.4
THF/LiCl0.2 M	19.3± 0.3
Acetona	7.1±0.2
THF	5.2± 0.04
1-4 Dioxano	3.0±0.001

^ALos valores corresponden a las medias ± la desviación estándar de tres mediciones. ^bConcentración de ácido acético, ácido fórmico y agua (60:30:10 v/v/v). ^cAbreviaturas.

En nuestro estudio, la adición de cloruro de litio aumentó ligeramente la solubilidad de la lignina en DMF y THF. Este comportamiento sugiere que el cloruro de litio puede actuar como un moderador de la polaridad de ciertos solventes por el aumento de la capacidad para formar enlaces de hidrógeno con solventes moderadamente polares como el tetrahidrofurano (Quesada-Medina et al. 2010). Además, el ion litio reduce las fuerzas de asociación entre las moléculas de lignina en dimetilformamida.

Majcherczyk y Hüttermann (1997) reportaron que la diferencia en la solubilidad de la lignina puede verse afectada por factores como la fuente botánica, el proceso de extracción, los grupos funcionales y la masa molecular. Además, estos autores mencionaron que una mezcla de solventes es más eficaz para solubilizar la lignina que un solo solvente. Los solventes que fueron utilizados para solubilizar la lignina organosolv de paja de trigo estaban en una escala de polaridad de moderadamente polar (acetona, 1-4 dioxano y THF) a altamente polar (DMF LiCl 0.2 M, acético, y ácido fórmico). Los solventes muy polares como los ácidos carboxílicos y amidas fueron capaces de solubilizar gran porcentaje de la lignina, mientras solventes como el THF y 1-4 dioxano fueron menos eficaces. De acuerdo a Evstigneev (2011) la solubilidad de la lignina en solventes orgánicos se determina por la relación entre el número de grupos hidroxilos fenólicos y el número de unidades de fenilpropano en la macromolécula. La capacidad de solubilización de la lignina se rige por las interacciones en las que los enlaces de hidrógeno están involucradas.

Masa Molecular

La ligninas de tipo organosolv tienen una masa molecular y polidispersidad generalmente baja en comparación con otros tipos de lignina (Gosselink et al., 2004). Para la lignina, la cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) proporciona principalmente valores de masa molar relativa, ya que la masa molar absoluta de la lignina determinada por SEC depende de la configuración utilizada (Gosselink et al., 2004), la forma en que esta empacada la columna, así como en los métodos de calibración y los cálculo aplicados (Montiel-Rivera et al. 2013).

La lignina está compuesta por polímeros de diversos tamaños moleculares. Estos polímeros o u oligómeros pueden separarse de acuerdo a su solubilidad en ciertos solventes. El peso molecular de esas fracciones determina en gran medida la aplicación de la lignina. La distribución molecular relativa de la lignina organosolv se muestra en la Tabla 8. La lignina presentó un peso molecular promedio de 1057 hasta 9065 g mol⁻¹ y una polidispersidad amplia. Las ligninas solubilizadas usando ácido acético y DMF con LiCl presentaron el mayor peso molecular y polidispersidad, por el contrario la lignina solubilizada en acetona, THF tuvieron los valores de peso molecular y polidispersidad bajos.

La lignina disuelta con 1-4 dioxano y la mezcla de disolventes orgánicos presentó polidispersidad baja, esto podría deberse a que las cadenas del polímero de lignina tienen longitudes uniformes en estos disolventes. En contraste, los ácidos orgánicos y amida fueron capaces de solubilizar una gama amplia de tamaños moleculares de lignina. La discrepancia entre la solubilidad y peso molecular se pueden justificar debido a que el análisis de solubilidad de lignina se llevó a cabo a temperatura ambiente (25°C) y la distribución de peso molecular se midió a 40°C.

Tabla 8. Peso molecular promedio en peso, peso molecular promedio en número y polidispersidad de lignina organosolv.

Solvente	Peso molecular promedio (g mol⁻¹)	Peso molecular promedio en número (g mol⁻¹)	Polidispersidad
Ácido acético/ácido fórmico/agua ^a	2296	1274	1.8
Ácido acético	9065	1594	5.6
Acido fórmico	2880	1110	2.5
DMSO ^b	2501	839	2.9
Metanol	2813	528	5.3
DMF/LiCl 0.2 M	8699	907	9.5
DMF	5743	1024	5.6
Etanol	1831	247	7.4
THF/LiCl 0.2 M	2093	548	3.7
Acetona	1057	711	1.4
THF	2033	1034	2.0
1-4 Dioxano	2388	1287	1.8

^aConcentración de ácido acético, ácido fórmico y agua (60:30:10 v/v/v). ^bAbreviaturas.

La temperatura puede haber favorecido la ruptura de enlaces de hidrógeno, lo que facilitó la solubilización de la lignina incluso en solventes con polaridad moderada. Basándose en las curvas de la SEC, la lignina que fue solubilizada en DMF y THF mostró diferentes perfiles de distribución de pesos moleculares. El perfil cromatográfico de la lignina disuelta en THF y DMF con y sin LiCl se muestra en la Figura 9. En ambos casos, la adición de LiCl aumenta la solubilidad. El Mw de DMF lignina disuelta era 5743 g mol^{-1} y se observó un ligero aumento cuando se añadió LiCl. Parece que LiCl tenía más efecto en el disolvente polar y permitió la liberación de moléculas de mayor peso molecular. Para THF, se observó el comportamiento apropiado, THF con LiCl liberado fracciones de lignina de peso molecular más bajo, y se observó un aumento en la polidispersidad.

Carbohidratos Totales y Ceniza

El proceso organosolv se caracteriza por la producción de lignina con una pureza mayor a las ligninas obtenidas por otros métodos de extracción (Pye & Lora 1991). Sin embargo, este tipo de lignina conteniente impurezas como carbohidratos y cenizas. El contenido de carbohidratos totales y cenizas en la lignina organosolv de paja de trigo se muestran en la Tabla 9.

La cantidad de carbohidratos totales encontrada en la lignina fue de 0.11%. Los carbohidratos presentes en lignina pueden originarse a partir de polisacáridos unidos covalentemente a la lignina en la paja de trigo. En la literatura, la formación de enlaces covalentes entre la lignina y la hemicelulosa han sido ampliamente discutidos (Monteil-Rivera et al., 2013; Sun, 2010).

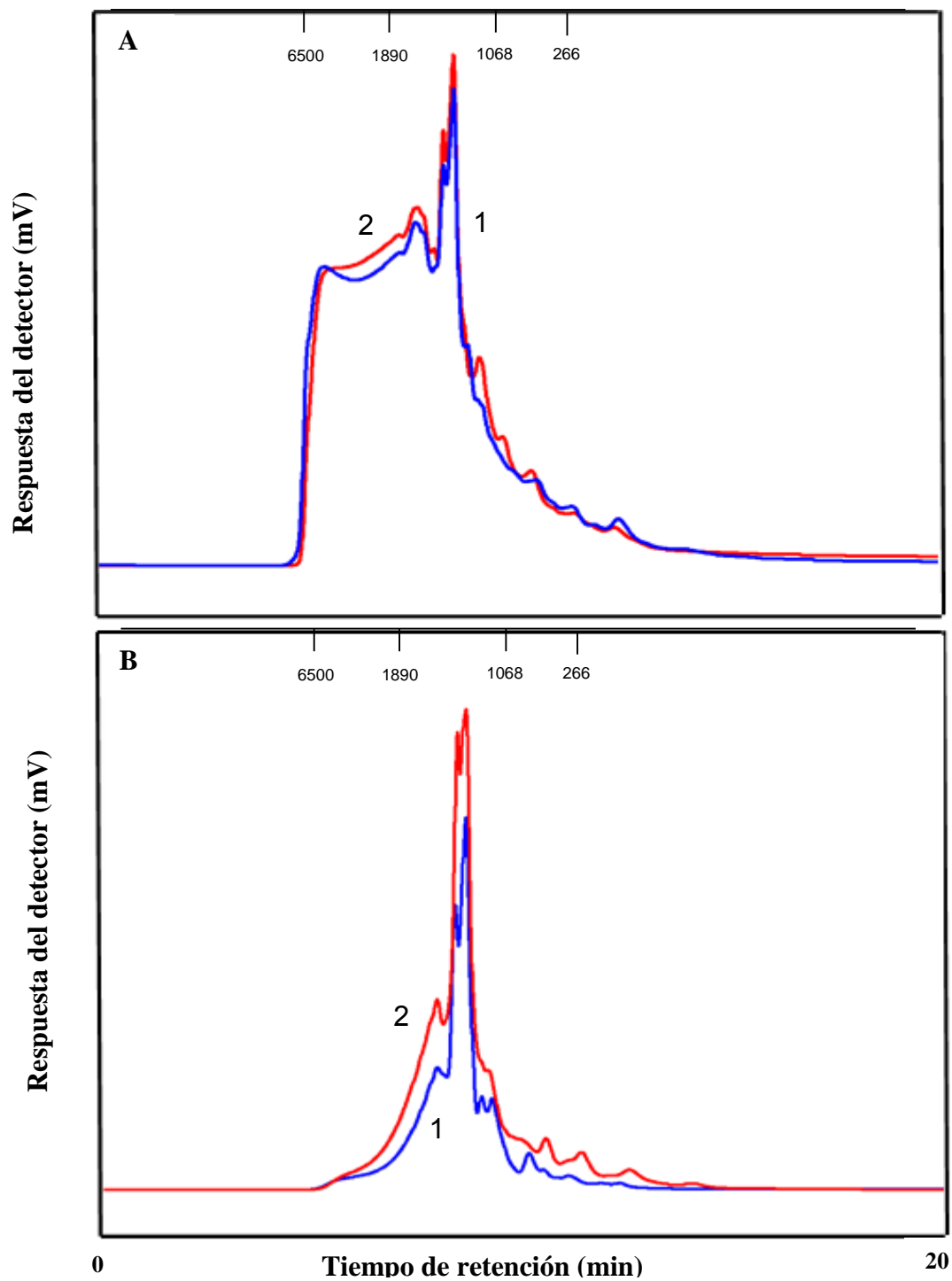


Figura 9. Distribución de peso molecular de la lignina solubilizada en DMF y THF (A1) DMF, (A2) DMF con LiCl 0.2 M, (B1) THF y (B2) THF con LiCl 0.2 M.

Tabla 9. Carbohidratos totales y ceniza en lignina de paja de trigo obtenida a través de proceso organosolv.

Muestra	Carbohidratos Totales (%)	Cenizas (%)
Lignina	0.11±0.01 ^A	1.7±0.006

^ALos valores corresponden a las medias ± la desviación estándar de tres mediciones.

El contenido de carbohidratos en la lignina organosolv de varias materias primas ha sido reportado desde 0.32 hasta 9.0% (Gosselink et al. 2004; Cybulska et al. 2012; Montiel-Rivera et al. 2013). Valores de 1% de carbohidratos fueron reportados por Huijgen et al. (2014) en lignina de paja de trigo extraída usando un proceso organosolv, donde se utilizó etanol como solvente de extracción. En nuestro estudio los carbohidratos fueron removidos por sedimentación en alcohol y separados de la lignina por filtrado. Las impurezas de tipo carbohidrato son producto de la condensación de lignina con derivados de la hemicelulosa formados durante su descomposición térmica como furfural e hidroximetilfurfural.

Por otro lado, los residuos de cultivos agrícolas se caracterizan por contener altas cantidades de ceniza (Eroglu & Deniz 1993). En general, el contenido de cenizas en fibras agrícolas se encuentra entre 1-20% y la paja de trigo contiene aproximadamente 5.9% de cenizas (Sun 2010).

Como se muestra en la Tabla 9, el contenido de cenizas de la lignina organosolv fue del 1.7%. Este valor fue más bajo que el obtenido para lignina organosolv de paja de centeno (2.8%) reportado por Wörmeyer et al. (2011). Los componentes minoritarios, como los carbohidratos, ceniza y compuestos extraíbles deben ser removidos en aplicaciones que demandan alta pureza. Las impurezas en la lignina pueden causar la formación de compuestos indeseables que pueden contribuir al deterioro de las propiedades de los productos obtenidos a base de lignina (Vishtal & Kraslawski 2011). Wörmeyer et al. (2011), menciona que valores menores de hasta un 3% de cenizas en lignina permite su aplicación en la fabricación de materiales

La ultraestructura de la paja de trigo es más complicada que la de la madera y que en ella se pueden observar diferentes tipos de células y elementos, incluyendo fibras de refuerzo, células de parénquima, células epidérmicas y células especiales con depósitos de sílice. Finalmente,

Wörmeyer et al. (2011), menciona que valores menores a 2.8% de cenizas en lignina permite su aplicación en la fabricación de materiales.

Espectroscopía de Infrarrojo con Transformada de Fourier (FT-IR)

La espectroscopía de infrarrojo FT-IR es una técnica no destructiva para estudiar las propiedades fisicoquímicas de los materiales lignocelulósicos (Almedar & Sain, 2008). La Figura 10 exhibe las principales bandas de infrarrojo presentes en la lignina extraída con solventes orgánicos. El espectro de infrarrojo para la lignina mostró varios picos en la región $\sim 1800-1000\text{ cm}^{-1}$. Una banda de baja intensidad $\sim 2800\text{ cm}^{-1}$ fue atribuida al estiramiento de los enlaces C-H en los grupos metilo de la lignina. Las vibraciones del esqueleto aromático aparecieron a 1610, 1510 y 1460 cm^{-1} . La banda a los 1720 cm^{-1} es atribuida al grupo carbonilo, que incluye cetonas no conjugadas y estiramiento de grupos carbonilos.

Una pequeña banda apareció a 1648 cm^{-1} es atribuido al estiramiento de grupos carbonilos conjugados. La aparición de estas bandas indica que existe un grado de oxidación en la estructura de la lignina durante tratamiento con ácidos orgánicos. La intensidad de la banda a 1374 cm^{-1} indica que la oxidación ocurre mayormente en la posición gama en la cadena lateral de lignina durante el tratamiento con ácidos orgánicos (Xu, et al., 2006).

Propiedades Térmicas

La investigación de las propiedades térmicas de la lignina es importante para evaluar su aplicación en el procesamiento de biomateriales en los cuales los procesos alcanzan temperaturas por encima de 200°C . La descomposición térmica y la temperatura de transición vítrea (T_g , por sus siglas en inglés) de la lignina se investigaron utilizando análisis térmicos.

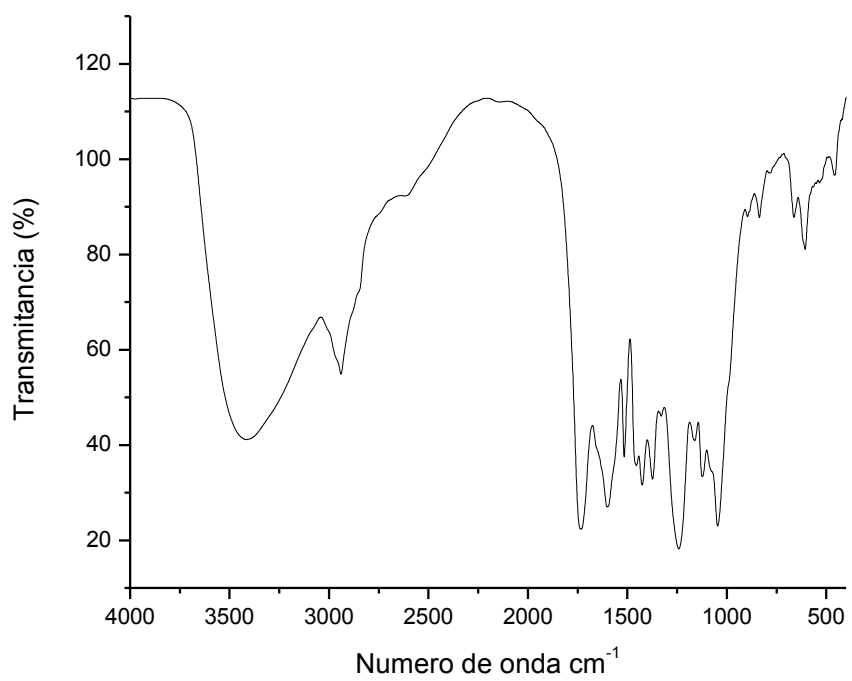


Figura 10. Espectro de infrarrojo para la lignina extraída con ácidos orgánicos.

De todos los componentes de la lignocelulosa, la lignina es el más termoestable debido a su estructura inherente, anillos aromáticos y las numerosas ramificaciones que presenta (Alriols et al. 2010). El estudio termogravimétrico de la lignina se basó en el análisis de la pérdida de peso en función de la temperatura.

Los resultados obtenidos de los análisis termogravimétricos se muestran en la Figura 11. La primera pérdida de peso se registró alrededor de los 80°C, la cual fue atribuida a la evaporación de agua y compuestos volátiles o solventes residuales (Alriols et al. 2010). A 80°C se tuvo una pérdida de un 15% en peso. La segunda pérdida en peso se detectó entre los 150-200°C el cual puede ser atribuido a la descomposición térmica de los restos de hemicelulosa que contenía la muestra. La degradación térmica de los componentes químicos de la lignina inició a los 300°C y la descomposición de los anillos aromáticos de lignina se produjo entre 400 y 600°C (Sun, et al. 2001). Finalmente, cerca de 1000°C, se obtuvo un residuo carbonoso de alrededor de un 3% en peso, el cual pudiera estar asociado con los restos de cenizas. La degradación térmica de la lignina de paja de trigo se produjo lentamente en una amplia gama de temperaturas (desde temperatura ambiente hasta 900°C), con una tasa de pérdida de masa máxima entre 300 y 600°C (García et al. 2011).

La Tg de la lignina refleja la movilidad de los segmentos de las cadenas poliméricas de lignina por el tratamiento térmico y depende de muchos factores, incluyendo la distribución de la masa molar, grado de entrecruzamiento, enlaces de hidrógeno y la presencia de segmentos de lignina de bajo peso molecular que actúan como un plastificante que aumenta el volumen libre de polímero (Dence & Lin 1992; El Mansouri et al. 2011).

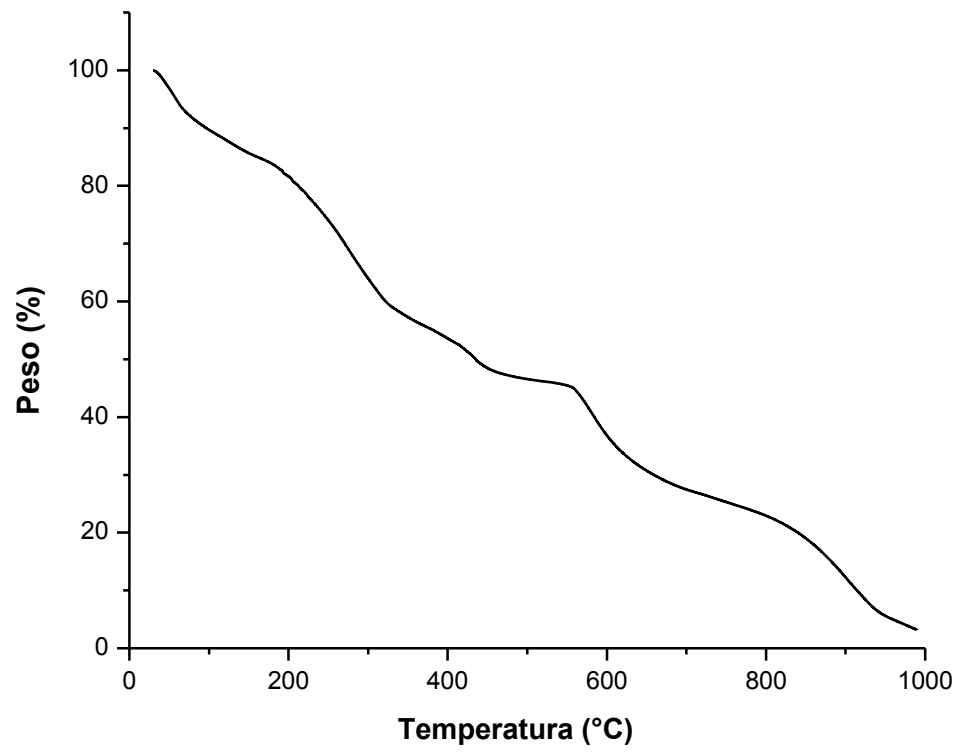


Figura 11. Termograma de la lignina de paja de trigo extraída por el proceso organosolv.

Las condiciones del proceso organosolv aplicadas en ese estudio fueron capaces de producir lignina con una alta estabilidad térmica. Estas características convierten a la lignina en un polímero muy atractivo como material de refuerzo de biocompositos.

En este estudio, la Tg (Tg, temperatura de transición vítrea) de la lignina de paja de trigo se presentó alrededor de los 90°C. De acuerdo con trabajos previos (Glasser, et al., 1993), los valores de Tg son generalmente más altos en ligninas de plantas coníferas y frondosas que para lignina de plantas herbáceas. El valor de Tg obtenidos en este estudio fue de común acuerdo con los reportados para diferentes ligninas con valores de Tg entre 90 y 180°C (Feldman et al., 2001; Tejado et al., 2007).

Polimerización Enzimática de Lignina

Peso Molecular de la Lignina Tratada con Enzimas Lacasas

Los perfiles cromatográficos de la lignina tratada con la enzima lacasa de *R. vernicifera* se muestran en las Figuras 12 y 13. Los resultados muestran perfiles de elución similares tanto para la lignina nativa, el control, como la lignina tratada con actividades de 100 y 200 U de la enzima a 25 y 40°C. Para la enzima lacasa *R. vernicifera* la concentración de la enzima y la temperatura no mostraron efectos en la polimerización de lignina. Varios estudios se han enfocado en analizar la influencia de la temperatura en el desempeño de enzimas oxidoreductasas para catalizar la polimerización de compuestos fenólicos (Aktaş, 2005; Aktaş et al., 2000; Aktaş et al., 2003).

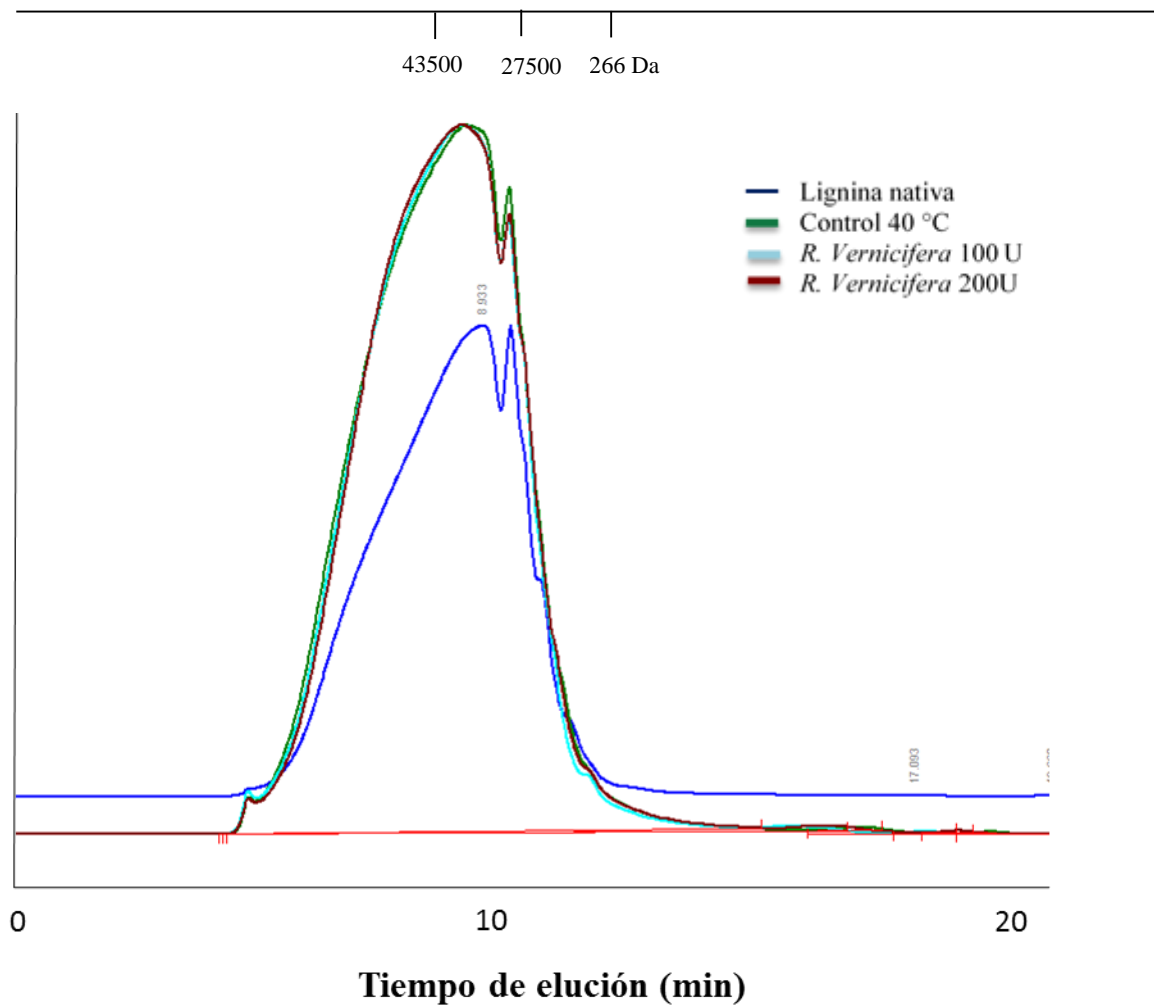


Figura 12. Efecto de la concentración de la enzima en la polimerización de lignina (*R. vernicifera*, actividad de 100 y 200 U).

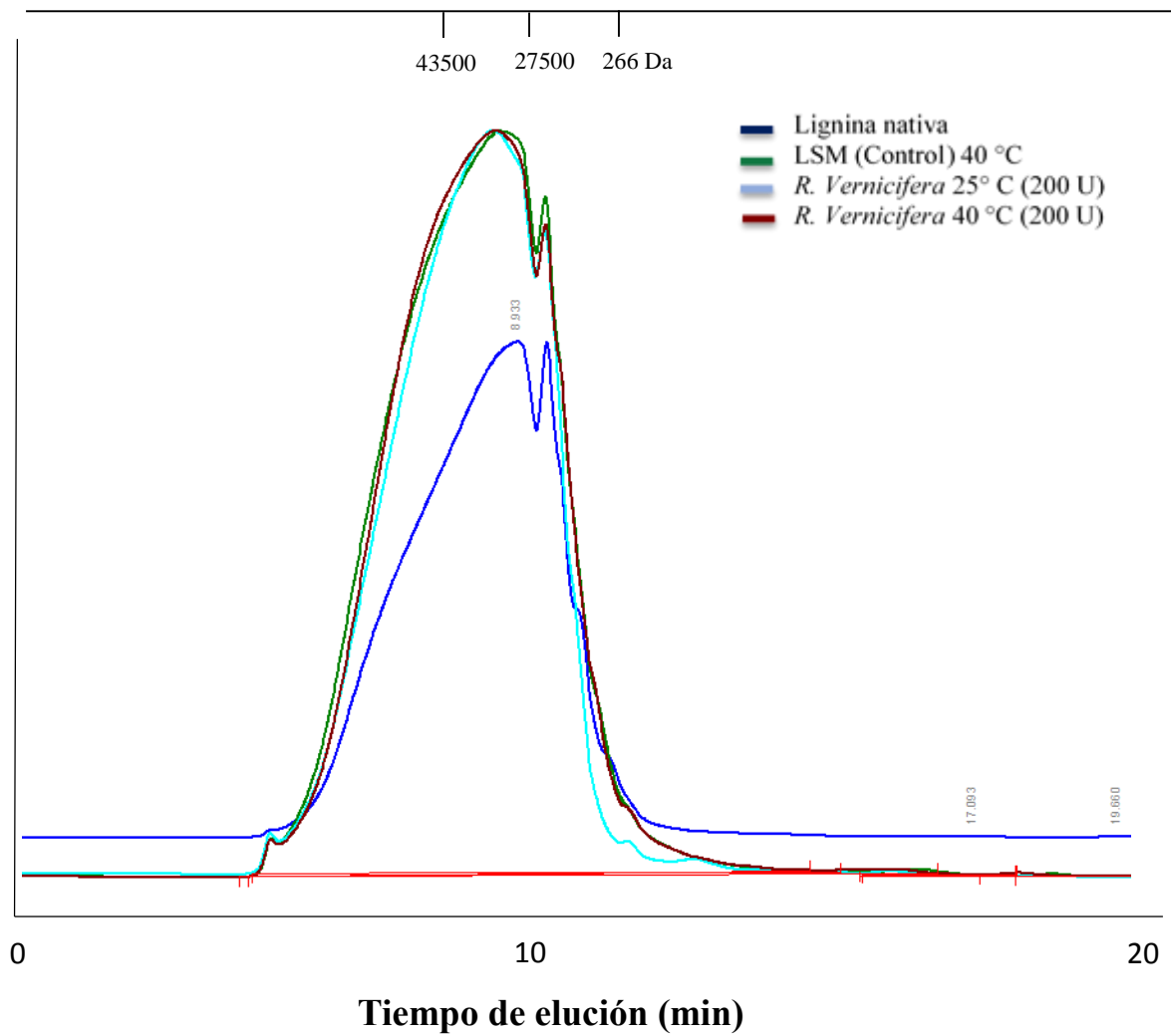


Figura 13. Efecto de la temperatura en la polimerización de lignina (*R. vernicifera*, actividad de 200 U).

A través de esos estudios se ha demostrado que la temperatura afecta la actividad de la enzima lacasa, la velocidad de conversión, la estabilidad y la actividad de los compuestos fenólicos. Además de la temperatura, existen varios factores que juegan un rol importante en la polimerización de lignina por ejemplo la naturaleza de la enzima, la pureza del sustrato, el pH, el solvente, la solubilidad de la muestra y el potencial redox de la enzima (Munk, et al., 2015). Areskog, et al. (2010a) reportaron que el factor más importante para lograr la polimerización enzimática de lignosulfonatos es la concentración del lignosulfonato.

Por otro lado el perfil cromatográfico de la lignina tratada con la enzima lacasa de *T. versicolor* se muestra en la Figura 14. Los resultados muestran que la concentración de la enzima (100 y 200 U/ml) no tuvo efecto en la polimerización de la lignina. En la Figura 15 se puede ver como se sobreponen las líneas que representan la concentración de la enzima. En la Figura 16 se muestra el efecto de la temperatura en la polimerización de la lignina usando la enzima lacasa de *T. versicolor*. En esta figura se observa una disminución del tiempo de retención en el tratamiento donde se usó temperatura de 40 °C. Esto sugiere que la actividad de la enzima *T. versicolor* se ve favorecida por la temperatura, independientemente de la concentración de la enzima. La temperatura óptima para que *T. versicolor* catalice la polimerización oxidativa de compuestos fenólicos se encuentra entre 25 y 50°C (Baldrian, 2006). Gouveia et al. (2013) mencionaron que la temperatura aumenta la actividad de la enzima lacasa pero solo en cierto grado. Por su parte, Moya et al. (2011) reportan que los resultados obtenidos con la enzima lacasas de *Trametes hirsuta* fueron similares a 30 y 50°C.

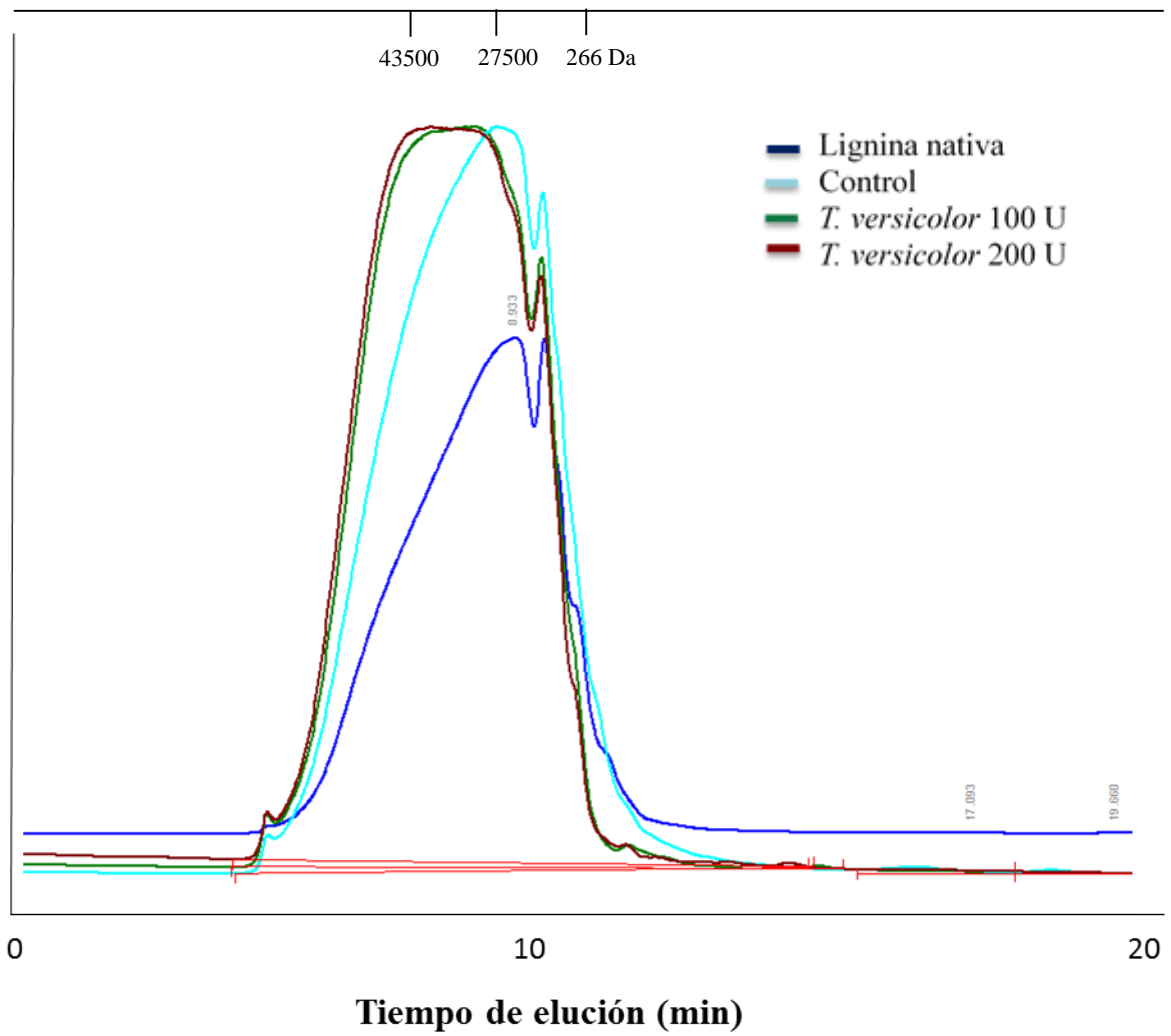


Figura 14. Efecto de la concentración de la enzima en la polimerización de lignina (*T. versicolor*, actividad de 100 y 200 U).

Finalmente, en la Figura 15 se muestra el efecto del tipo de enzima en la polimerización oxidativa de lignina. En esta figura se observa que *T. versicolor* a 40°C sin importar la concentración de la enzima demuestra ser más eficiente para inducir la polimerización oxidativa de lignina que *R. vernicifera*. En este estudio el nulo efecto de *R. vernicifera* en la polimerización de lignina puede ser atribuido a su bajo potencial redox de 430 mV (Alcalde, 2007). Por su parte la enzima lacasa de *T. versicolor* presenta un potencial redox más elevado que *R. vernicifera*, siendo este 790 mv (Alcalde, 2007). Areskog et al. (2010) reportaron que el éxito en la polimerización de lignosulfonatos fue debido a las propiedades catalíticas de la enzima (potencial redox) y no por otros factores como el pH.

Existen varios factores que han sido identificados como claves para lograr un incremento molecular de la lignina. De todos ellos el tiempo de reacción, el potencial redox y el contenido de grupos fenólicos son los más importantes. Con frecuencia, los sustratos de interés no pueden ser oxidados directamente por lacasas, ya sea porque son demasiado grandes para penetrar en el sitio activo de la enzima o porque tienen un potencial redox particularmente bajo (Riva, 2006). Es posible superar esta limitación, con la adición de los mediadores químicos que actúan como un transportador de electrones entre la lacasa y el sustrato (Munk, et al., 2015). Así, el sistema lacasa-mediador se convierte en un catalizador más fuerte que la lacasa sola mediante la expansión de la capacidad de oxidación de la enzima.

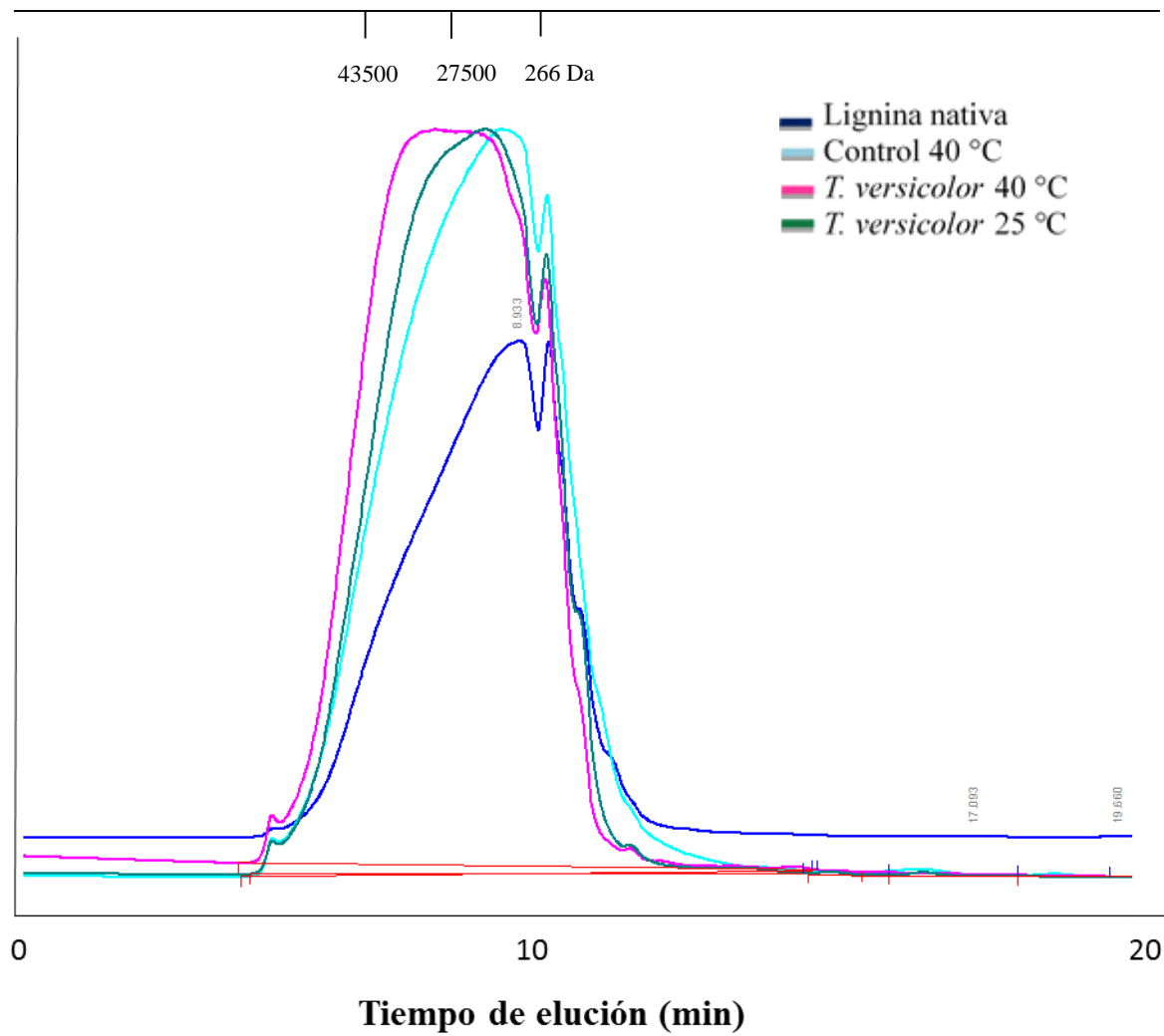


Figura 15. Efecto de la temperatura en la polimerización de lignina (*T. versicolor* y actividad de 100 U).

Caracterización de las Películas

Grosor y Propiedades de Color

Los valores promedio del grosor estuvieron entre 0.07 y 0.09 mm, la incorporación de lignina soluble metanol no afectó el espesor de las películas.

El efecto de la incorporación de distintas cantidades de lignina soluble en metanol sobre los parámetros de color (L, a^* y b^*) se muestran en la Tabla 10. De acuerdo con la Comisión Internacional de Iluminación (CIE) el parámetro L es el componente de la luminosidad, el cual va de 0 (negro) a 100 (blanco) y los parámetros a^* (de verde a rojo) y b^* (de azul a amarillo) son los dos componentes cromáticos que van de -120 a 120 (Yam et al., 2004). En este estudio, las películas de almidón sin lignina soluble en metanol tuvieron los valores más altos de luminosidad (L). La incorporación de lignina disminuyó la luminosidad (L) de todas las películas, aunque el efecto fue más marcado a altas concentraciones de lignina. Resultados similares se reportaron en películas elaboradas de gelatina de pescado y lignina (Nuñez-Flores et al., 2013) y películas de almidón de sagú y lignina (Bhat, et al., 2013). La incorporación de 10% de lignina disminuyó los valores de a^* obteniendo películas con una coloración verdosa, mientras que los valores altos de b^* dieron como resultado películas con coloración amarilla.

La incorporación de un 20% de LSA aumentó los valores de a^* , valores altos de a^* indican películas con una coloración rojiza, esto puede atribuirse a la naturaleza cromófora de la lignina. La lignina contiene un número de grupos funcionales insaturados que absorben luz en el espectro UV ($\lambda=250-400$ nm) o en el visible ($\lambda=400-750$ nm). Estos grupos incluyen; carbonilo, anillos aromáticos y enlaces carbono-carbono.

Tabla 10. Parámetros de color de las películas de almidón y lignina.

	<i>L</i> *	<i>a</i> *	<i>b</i> *
Control	82.31 ± 0.93 ^{aAB}	0.06 ± 0.05 ^b	-1.40 ± 0.05 ^a
95:5	31.04 ± 0.34 ^b	-1.07 ± 0.01 ^d	6.29 ± 0.05 ^b
90:10	27.36 ± 0.27 ^c	-0.11 ± 0.04 ^c	10.94 ± 0.07 ^c
80:20	23.69 ± 0.32 ^d	1.73 ± 0.05 ^a	15.56 ± 0.15 ^d

^ALos valores corresponden a las medias ± la desviación estándar de tres mediciones.

^BLetras diferentes en una misma columna representan diferencias significativas ($P \leq 0.05$).

Cuando los grupos funcionales insaturados se conjugan con otras estructuras insaturadas, las bandas de absorción pueden cambiar en la región visible del espectro (Polcin, et al., 1969a; Polcin, et al., 1969b). Efectos de los sustituyentes y el entorno químico local pueden influir en el máximo de absorción. Un número de estructuras han sido identificadas como fuentes de color en la lignina. Estas estructuras incluyen complejos de metales de transición, sistemas conjugados insaturados, quinonas (para quinona y orto quinona) y complejos de transferencia de carga.

Características Físicas y Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

Las micrografías obtenidas de la superficie de las películas de almidón y lignina se muestran en la Figura 16. En general se observó una superficie homogénea y lisa en las micrografías de las películas control (Fig. 16a). En las películas de almidón y lignina no se observaron separaciones de fases. La incorporación de lignina soluble en metanol no afectó la morfología de las películas ya que no se observaron aglomeraciones, cavidades o partículas disueltas de lignina. Concentraciones de 10 y 20% de lignina provocaron rugosidades en las superficies de las películas pero esto solo se pudo observar a nivel microscópico.

Pruebas Mecánicas

Las gráficas de esfuerzo-deformación de las películas de almidón y lignina se muestran en la Figura 17. Los valores de esfuerzo de tensión máximo, elongación y módulo de Young se calcularon a partir de estas gráficas y los resultados se muestran en la Tabla 11. Las películas preparadas sin lignina mostraron el comportamiento de un material vítreo, con gran resistencia a la tracción y módulo elástico. La incorporación de lignina soluble en metanol redujo la resistencia a la tracción y el módulo elástico, pero aumentó la elongación de las películas.

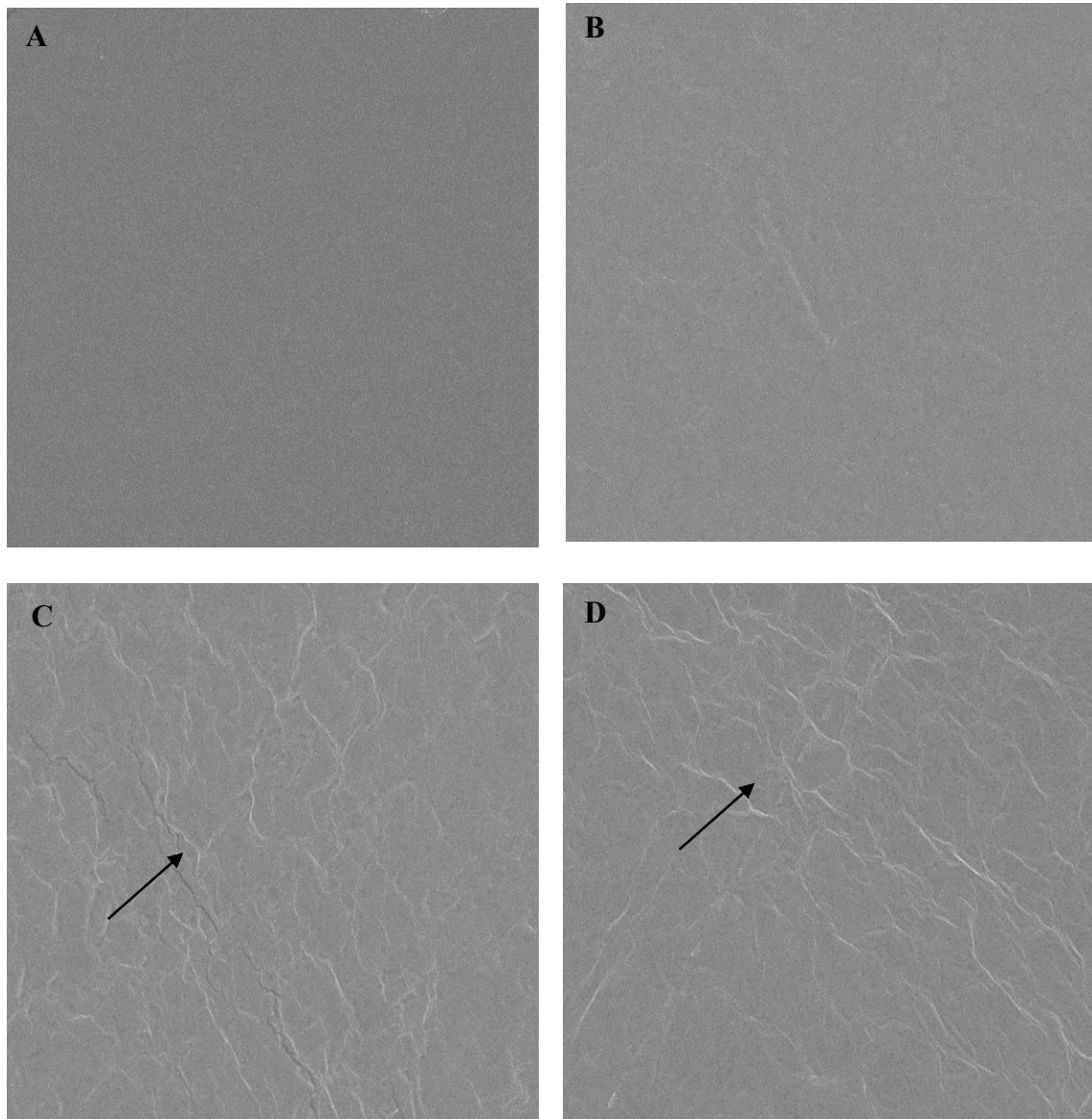


Figura 16. Micrografías de película de almidón de trigo duro (A) control, (B) 95:5, (C) 90:10, y (D) 80: 20% de almidón y lignina. Ampliación de 5.000x

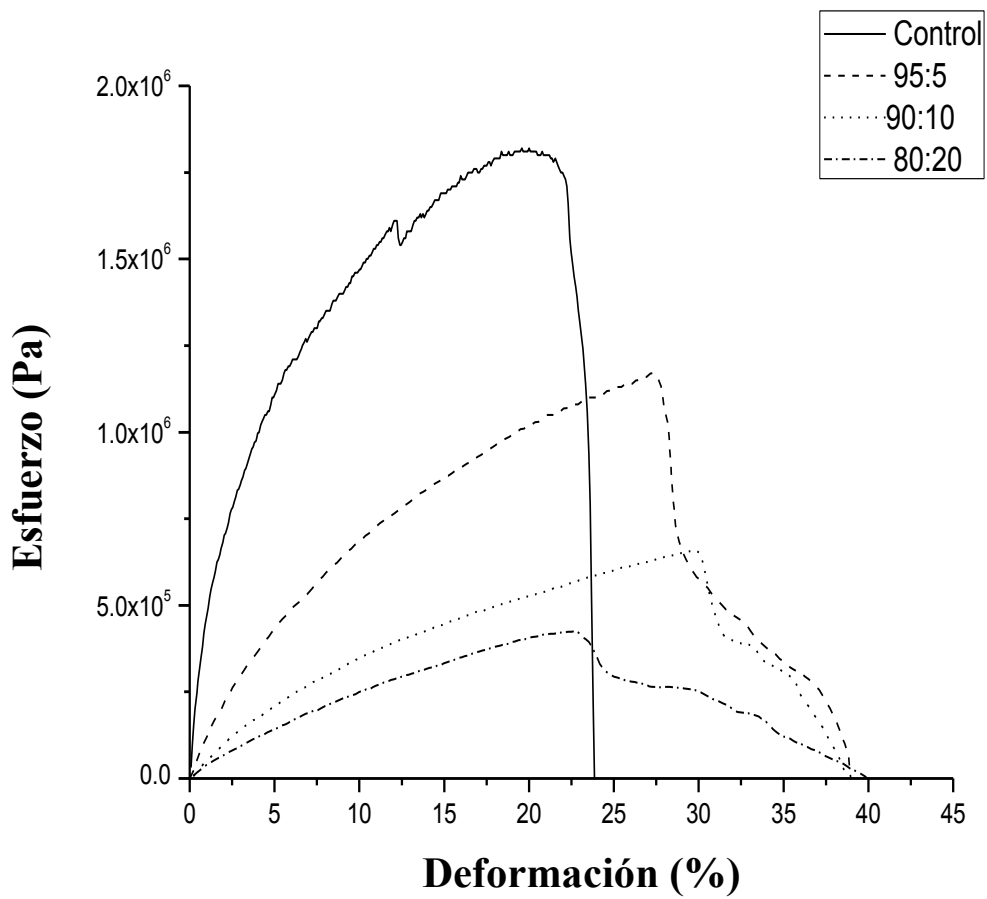


Figura 17. Gráfica de esfuerzo-deformación de las películas de almidón y lignina soluble en alcohol.

Tabla 11. Propiedades mecánicas de las películas de almidón y lignina.

	Esfuerzo de Tensión Máximo (MPa)	Elongación (%)	Módulo Elástico (MPa)
Control	1.8 ± 0.30^{aAB}	24.2 ± 1.0^a	0.60 ± 0.40^a
95:5	1.1 ± 0.01^a	38.1 ± 0.85^b	0.12 ± 0.02^b
90:10	0.55 ± 0.11^b	39.2 ± 1.10^b	0.05 ± 0.01^c
80:20	0.43 ± 0.11^b	39.8 ± 0.28^b	0.04 ± 0.11^c

^ALos valores corresponden a las medias \pm la desviación estándar de tres mediciones.

^BLetras diferentes en una misma columna representan diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

En las películas de almidón y lignina al 20% la resistencia a la tracción disminuyó de 1.5 MPa a 0.43 MPa. En lo que respecta al módulo elástico, este fue significativamente menor en las películas de almidón y lignina a cualquier concentración que la película sin lignina. El módulo elástico de las películas sin lignina fue 0.60 MPa, el cual disminuyó hasta 0.04 MPa en las películas con 20% de lignina. Por otro lado, la elongación aumentó a medida que la concentración de lignina soluble en alcohol aumentaba, obteniéndose valores de elongación de 24% para las películas sin lignina y 39.8% para las películas con 20% de lignina. El aumento en la elongación puede relacionarse con interacciones electrostáticas débiles que pudieron darse entre el almidón y la lignina. La incorporación de lignina soluble en metanol pudo haber actuado como plastificante. Los plastificantes son compuestos que incrementan la movilidad de las cadenas de polímero que hace a las películas más extensibles y flexibles (Ashwar et al., 2014). Como la lignina se considera un macro poliol, las fracciones de bajo peso molecular de la lignina pudieron actuar como un poliol y como resultado incrementan la movilidad de las cadenas del almidón. Resultados similares han sido reportados por Baumberger et al. (1998a) en películas de almidón y lignina de pino donde el aumento en la elongación se atribuyó a la presencia de compuestos fenólicos de bajo peso molecular y ácidos grasos anfifílicos en la lignina.

Por su parte, Chen et al. (2006) reportaron que la resistencia a la tensión de películas de proteína de soya aumentó con la adición de 6% en peso de lignina, pero más allá del 6% de lignina resultó en una disminución en la resistencia a la tracción. Kharade et al. (2009) reportaron que la resistencia a la tracción de materiales de polipropileno disminuyó de 37.7 MPa a 23.3 MPa con la adición de 20% de lignina. Recientemente se ha reportado la combinación de lignina con otros polímeros de origen biológicos como quitosano-lignina (Chen, et al., 2009), gelatina de pescado-lignina (Nuñez-Flores, et al., 2013) y almidón de sagú-lignina (Bhat, et al., 2013), sin

embargo, en estos estudios la lignina fue añadida solubilizada parcialmente en solventes orgánicos fuertes como ácido acético al 80% o DMSO al 90%. En este estudio la lignina se solubilizó en metanol debido a la baja toxicidad, bajo precio, bajo punto de ebullición y la buena solubilidad de la lignina en este solvente.

Espectro infrarrojo

La Figura 18 presenta los espectros de infrarrojo (ATR-IR) del almidón, la lignina y las películas de almidón y lignina. En el almidón se detectó una banda ancha entre 3400 y 3200 cm^{-1} atribuida a la vibración del estiramiento de los grupos -OH. Los picos característicos de los enlaces glucosídicos que se registraron en la región de 1200 a 800 cm^{-1} . En la lignina se detectaron las bandas más importantes apoyados por investigaciones previas (Gosselink et al., 2004; Xu, et al., 2006). Una banda correspondiente a la vibración de estiramiento de grupos O-H (fenólico y alifático) fue detectada en el intervalo de 3400 a 3200 cm^{-1} , mientras el estiramiento de C-H de los grupos CH_3 y CH_2 se detectaron a 2930 cm^{-1} , además se detectó una pequeña banda a 2924 cm^{-1} atribuida a la vibración de grupos OCH_3 . La banda detectada a 1711 cm^{-1} fue atribuida al estiramiento C=O de cetonas no conjugados, grupos carbonilos, grupos éster o aldehídos conjugados y ácidos carboxílicos. Las vibraciones del esqueleto aromático de fenilpropano de la lignina se detectaron entre 1590 y 1420 cm^{-1} . Los espectros de infrarrojo de las películas de almidón y lignina en diferentes concentraciones exhibieron algunas señales específicas de cada componente (almidón y lignina) como las bandas de vibración de los enlaces glucosídicos del almidón y las vibraciones de los anillos aromáticos de la lignina. Además se detectaron interacciones electrostáticas débiles en la región alrededor de los 3000 cm^{-1} en las películas con 20% de LSM.

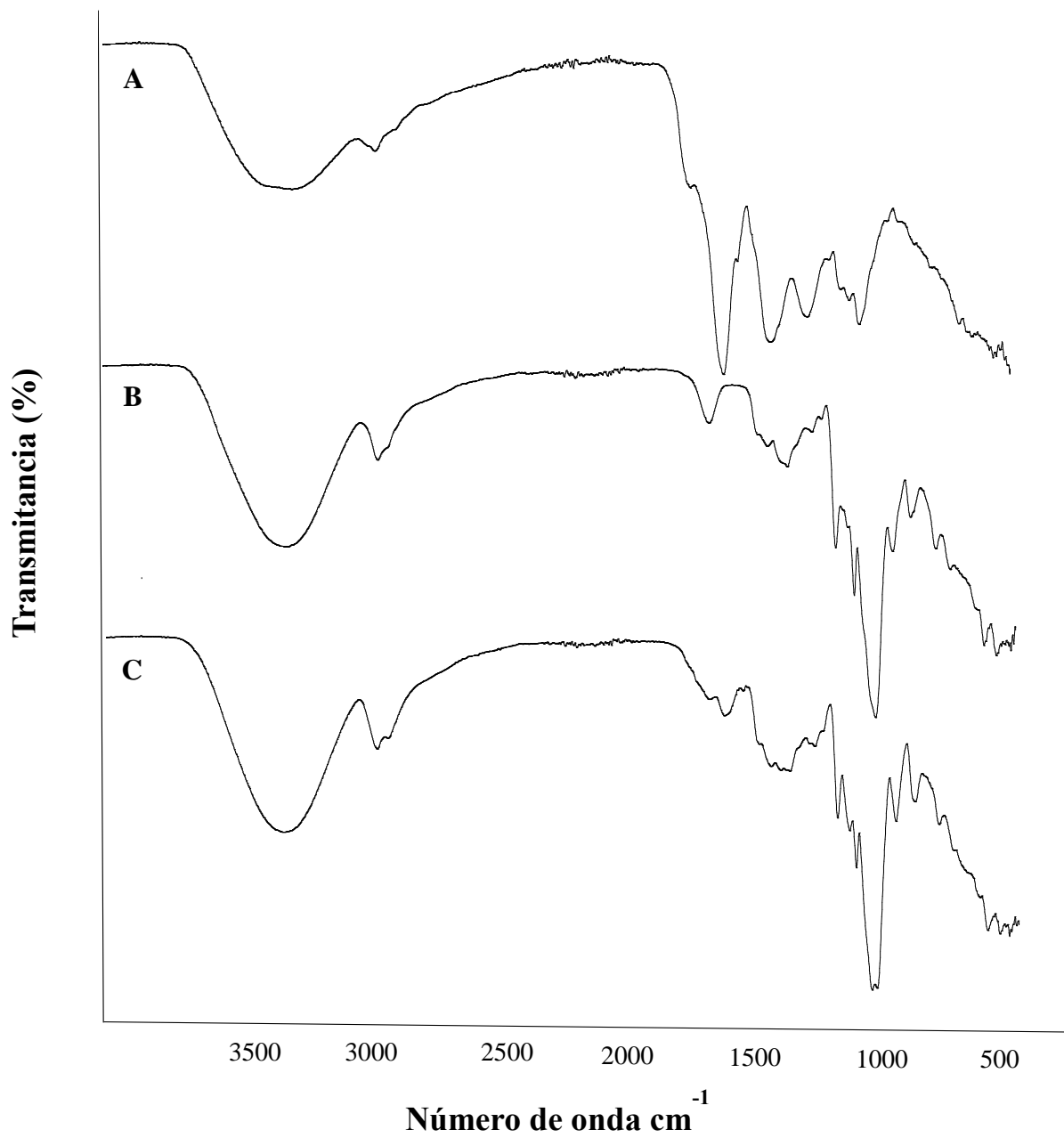


Figura 18. Espectros ATR-IR de (A) almidón, (B) lignina y (C) película de almidón y lignina (20%).

Propiedades Térmicas

El estudio termogravimétrico de las películas se basó en el análisis de la pérdida de peso del material en función de la temperatura. Los termogramas obtenidos por TGA de las películas se muestran en la Figura 19. La primera pérdida de peso se registró alrededor de los 100°C degradándose cerca de un 10% de la muestra. Esto se atribuyó a la pérdida de humedad y a los solventes que fueron adsorbidos por el material durante el proceso de preparación. Las películas control mostraron una pérdida en peso alrededor de los 300°C, la cual también se observó en las películas con lignina soluble en metanol pero a temperaturas más baja. Esto puede atribuirse a que la adición de fracciones de bajo peso molecular de lignina provocó una desestabilización de la matriz de almidón. A 300°C las películas control registraron una pérdida en peso de 28% y contra 35% de pérdida en peso para las películas que contenían lignina. La degradación térmica de lignina inició aproximadamente a 350°C continuando hasta más allá de los 600°C. Se ha reportado que por encima de 300°C comienza la ruptura de enlaces C-C en las cadenas alifáticas de la lignina, provocando la separación de los anillos aromáticos (Ciobanu et al., 2004). Alrededor de 480°C, las películas control y las películas de almidón y 5% de lignina fueron completamente degradadas. Mientras la incorporación de 10% y 20% de lignina disminuyó la degradación térmica de las películas. Las películas con 20% de lignina mostraron una pérdida en peso de 98.23% a 700°C. Este comportamiento indica que la incorporación de lignina soluble en metanol produce materiales con mayor resistencia a la degradación térmica pero solo a concentraciones altas. En este estudio se conjetura que durante el proceso de obtención de las películas, se generó un reacomodo estructural provocando mayor número de interacciones. Por lo tanto se requiere más temperatura para que las cadenas del polímero puedan descomponerse térmicamente.

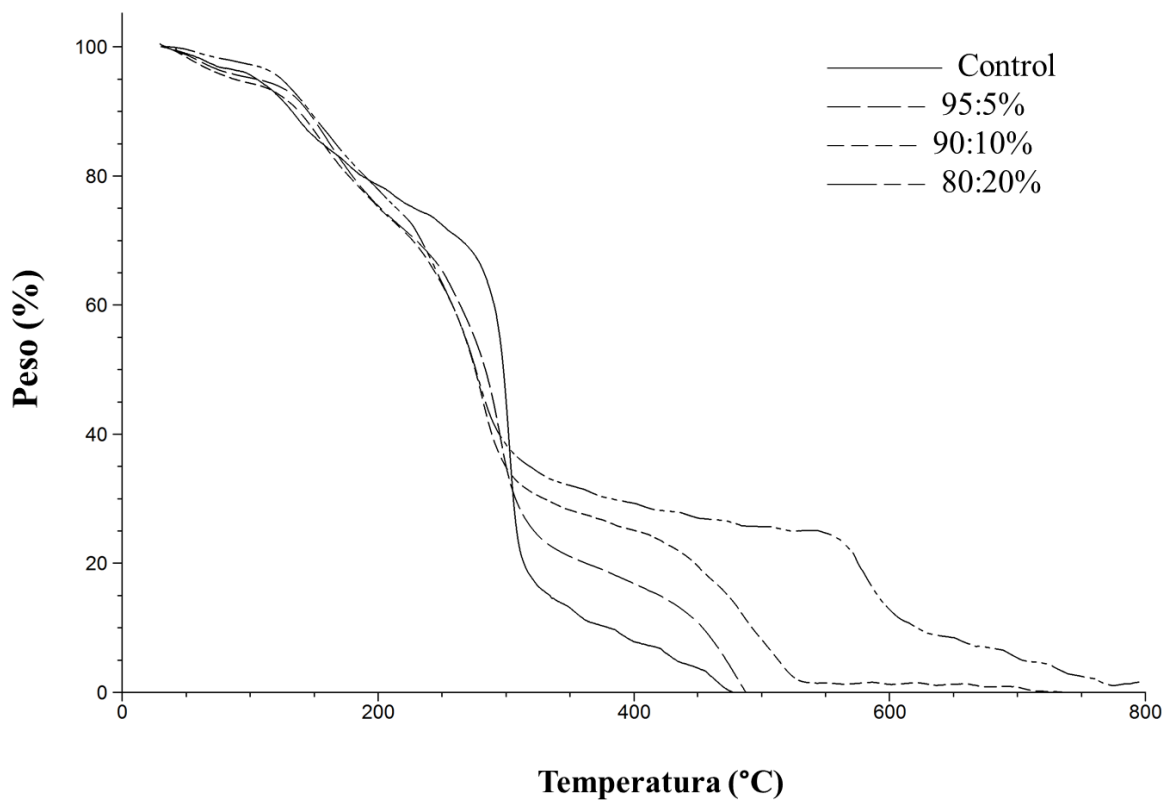


Figura 19. Termogramas para TGA de las películas de almidón con diferentes concentraciones de lignina soluble en alcohol.

Actividad Antioxidante

La lignina así como otros polifenoles tiene la capacidad de inhibir radicales libres (Yuan, et al., 2009). La capacidad para inhibir radicales libres de diferentes tipos de lignina obtenidas de materias primas no leñosas mediante un proceso organosolv ha sido previamente reportado (García et al., 2010; Pan, et al., 2006). La separación de lignina en solventes orgánicos y alcoholes permite obtener fracciones de lignina con mejores propiedades antioxidantes que las que presenta la lignina completa.

La capacidad para inhibir radicales libres de las películas de almidón y lignina se muestra en la Tabla 12. Las películas control no mostraron capacidad para inhibir radicales libres. La incorporación de lignina soluble en metanol afectó significativamente la capacidad para inhibir radicales libres, la cual aumentó a medida que se incrementó la concentración de LSA. En las películas con 5% de LSA, el porcentaje de inhibición del radical DPPH fue 10.79%, el cual incrementó hasta 41.6% en las películas con 20% de LSA. La capacidad de inhibir radicales libres en fracciones de lignina de paja de trigo se ha reportado anteriormente (Ma, P. et al., 2013). Dizhbite et al. (2004), mencionaron que la lignina con masa molecular baja y polidispersidad estrecha presentan mayor actividad antioxidante que ligninas con masa molecular alta y polidispersidad amplia. En este estudio, la capacidad para inhibir radicales libres puede estar relacionado con la masa molecular y la polidispersidad que presentó la lignina que fue soluble en metanol 2813 y 5.3, respectivamente. Aunque otras investigaciones han reportado que los grupos OH fenólicos y los grupos metoxilados (OCH₃) presentes en los anillos aromáticos de la lignina pueden tener gran efecto en la actividad antioxidante (Li & Ge, 2012).

Tabla 12. Capacidad antioxidante de las películas de almidón-lignina y el porcentaje de solubilidad en agua.

	Inhibición de DPPH	Solubilidad
	(%)	(%)
Control	ND	4.75 ± 1.04 ^a
95:5	12.33 ± 1.06 ^{aAB}	7.82 ± 1.09 ^b
90:10	23.37 ± 0.47 ^b	13.37 ± 1.16 ^c
80:20	43.68 ± 0.59 ^c	20.96 ± 1.86 ^d

ND: No detectado.

^ALos valores corresponden a las medias ± la desviación estándar de tres mediciones.

^BLetras diferentes en una misma columna representa diferencias significativos ($P \leq 0.05$).

Solubilidad

La solubilidad en agua de las películas de almidón y lignina se muestra en la Tabla 12. La incorporación de fracciones solubles en metanol aumentó la solubilidad en agua a medida que se incrementó la cantidad de lignina. Las películas donde no se agregó lignina mostraron una solubilidad al agua de 5.67%, mientras la adición de 20% de lignina aumentó la solubilidad en agua hasta 19.77%. La incorporación de lignina produjo un efecto plastificante notable en películas de material compuesto como se dedujo a partir del estudio de las propiedades mecánicas y térmicas. Cuando se introducen grandes cantidades de plastificantes en la formulación de la película, se observan cambios significativos en las propiedades de la película, como el aumento de la extensibilidad y flexibilidad o disminuciones de la resistencia mecánica y la rigidez. Grandes cantidades de plastificantes pueden facilitar la difusión de moléculas de agua a través de las películas, esto resulta en una mayor captación de agua.

En nuestro estudio, la plastificación del almidón por efecto de la incorporación de lignina cambió la solubilidad de las películas. Cuando las películas de almidón y lignina fueron sometidas a las pruebas de solubilidad, la lignina se solubilizó fácilmente en el agua y salió la matriz de almidón que hizo la red de polímero menos denso y por lo tanto más permeable, en consecuencia, las películas tuvieron mayor absorción de agua. Resultados similares fueron reportados en películas de proteínas miofibrilares de pescado (Cuq et al., 1997). La solubilidad de las películas hechas de polímeros biológicos tiene importancia para determinar su integración. En el campo de los alimentos, la migración de lignina de la matriz de almidón puede ser favorable, debido a que los compuestos fenólicos de la lignina podrían proporcionar protección antioxidante a los alimentos que es otra característica importante de las películas de almidón de lignina.

CONCLUSIONES

Organosolv demostró ser un método efectivo para alterar la estructura de la paja de trigo, con el cual se logró la separación de la lignina con gran pureza. El tratamiento de la paja de trigo con una mezcla de solventes orgánicos y agua, provocó la solubilización de la hemicelulosa y la lignina y una fase sólida de celulosa. El rendimiento de extracción de lignina no fue dependiente del tamaño de partícula, pero si del tratamiento aplicado para la remoción de compuestos extraíbles.

La pureza de la lignina obtenida de paja de trigo cristalino fue mayor al 95%, encontrándose bajas cantidades de carbohidratos (0.11%) y cenizas (5.9%). La lignina fue altamente soluble en ácidos orgánicos y poco soluble en solventes cíclicos como el THF y 1-4 dioxano.

El peso molecular promedio de la lignina fue de 2296 Da. La lignina exhibió una temperatura de transición vítrea alrededor de 90°C y una alta estabilidad térmica, degradándose totalmente a temperaturas por encima de los 900°C.

La enzima lacasa de *Trametes versicolor* fue más eficiente para modificar la lignina que la lacasa de *Rhus vernicifera*. La lacasa de *T. versicolor* produjo, a 40 °C un incremento en el peso molecular de lignina.

Se lograron preparar y caracterizar películas de almidón y la fracción soluble en metanol de lignina. A nivel microscópico, las películas mostraron una integración homogénea. La lignina soluble en metanol impartió un efecto plastificante en las películas al alterar su resistencia mecánica, disminuyendo el esfuerzo de tensión y el modulo elástico pero aumentando significativamente la elongación.

La incorporación de 20% de lignina soluble en metanol provocó una mayor resistencia a la degradación térmica en las películas de almidón. Así mismo, esto promovió actividad antioxidante contra el radical DPPH, la cual aumentó al mismo tiempo que se incrementó la cantidad de lignina soluble en metanol.

En este estudio, se desarrolló un método novedoso y sencillo para la incorporación de lignina en la preparación de películas de almidón, lo cual reduce problemas de solubilidad y confiere la capacidad de obtener materiales compuestos con aplicaciones potenciales. Por lo anterior, el uso alternativo de los residuos del cultivo de trigo cristalino, sobre todo los subproductos, pueden beneficiar al sector agrícola de la región.

RECOMENDACIONES

Probar otras alternativas para la extracción de lignina. Los líquidos iónicos, son un tipo de solventes que han cobrado importancia por que poseen una alta estabilidad térmica, un bajo punto de fusión y una miscibilidad controlable. Estos compuestos pueden ser diseñados para obtener una extracción selectiva de la lignina; sin embargo, los efectos en la salud de estos compuestos no han sido estudiados en su totalidad.

Realizar una modificación química que permita aumentar la solubilidad de la lignina en la solución reguladora donde se lleva a cabo la reacción. Además esto permitirá una mejor caracterización de la lignina polimerizada. Otra opción es probar un mediador químico para mejorar la capacidad de la enzima lacasa para polimerizar la lignina.

REFERENCIAS

- Aktaş, N. (2005). Optimization of biopolymerization rate by response surface methodology (RSM). *Enzyme Microb Technol*, 37(4), 441-447
- Aktaş, N., Kibarar, G., & Tanyolaç, A. (2000). Effects of reaction conditions on laccasecatalyzed α -naphthol polymerization. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 75(9), 840-846
- Aktaş, N., & Tanyolaç, A. (2003). Reaction conditions for laccase catalyzed polymerization of catechol. *Bioresour Technol*, 87(3), 209-214
- Alcalde, M. (2007). Laccases: Biological functions, molecular structure and industrial applications. In J. Polaina & A. MacCabe (Eds.), *Industrial Enzymes* (pp. 461-476): Springer Netherlands.
- Alemdar, A., & Sain, M. (2008). Biocomposites from wheat straw nanofibers: Morphology, thermal and mechanical properties. *Composites Science and Technology*, 68(2), 557-565
- Amen-Chen, C., Pakdel, H., and Roy, C. (2001). Production of monomeric phenols by thermochemical conversion of biomass: A review. *Bioresour Technol*, 79(3), 277-299
- Alonso, M. V., Oliet, M., Pérez, J. M., Rodríguez, F., & Echeverría, J. (2004). Determination of curing kinetic parameters of lignin-phenol-formaldehyde resol resins by several dynamic differential scanning calorimetry methods. *Thermochimica Acta*, 419(1-2), 161-167
- Ariols, M. G., Garcia, A., Llano-ponte, R., & Labidi, J. (2010). Combined organosolv and ultrafiltration lignocellulosic biorefinery process. *Chemical Engineering Journal*, 157(1), 113120
- Ansari, A., & Pawlik, M. (2007). Floatability of chalcopyrite and molybdenite in the presence of lignosulfonates. Part II. Hallimond tube flotation. *Minerals Engineering*, 20(6), 609-616
- Areskog, D., & Henriksson, G. (2011). Immobilisation of laccase for polymerisation of commercial lignosulphonates. *Process Biochemistry*, 46(5), 1071-1075
- Areskog, D., Li, J., Gellerstedt, G., & Henriksson, G. (2010a). Investigation of the molecular weight increase of commercial lignosulfonates by laccase catalysis. *Biomacromolecules*, 11(4), 904-910
- Areskog, D., Li, J., Gellerstedt, G., & Henriksson, G. (2010b). Structural modification of commercial lignosulphonates through laccase catalysis and ozonolysis. *Industrial Crops and Products*, 32(3), 458-466

Arshanitsa, A., Ponomarenko, J., Dizhbite, T., Andersone, A., Gosselink, R. J. A., van der Putten, J., Lauberts, M., & Telysheva, G. (2013). Fractionation of technical lignins as a tool for improvement of their antioxidant properties. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 103(0), 78-85

Avella, M., De Vlieger, J. J., Errico, M. E., Fischer, S., Vacca, P., & Volpe, M. G. (2005). Biodegradable starch/clay nanocomposite films for food packaging applications. *Food Chemistry*, 93(3), 467-474

Avérous, L. (2004). Biodegradable Multiphase Systems Based on Plasticized Starch: A Review. *Journal of Macromolecular Science, Part C*, 44(3), 231-274

Baldrian, P. (2006). Fungal laccases - Occurrence and properties. *Fems Microbiology Reviews*, 30(2), 215-242

Ban, W., Song, J., Argyropoulos, D. S., & Lucia, L. A. (2005). Influence of natural biomaterials on the elastic properties of starch-derived films: An optimization study. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 45(2), 627-633

Baucher, M., Monties, B., Van Montagu, M., & Boerjan, W. (1998). Biosynthesis and genetic engineering of lignin. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 17(2), 125-197

Baumberger, S. (2002). Starch-Lignin Films. In T. Hu (Ed.), *Chemical Modification, Properties, and Usage of Lignin* (pp. 1-19): Springer US.

Baumberger, S., Lapierre, C., & Monties, B. (1998a). Utilization of pine kraft lignin in starch composites: Impact of structural heterogeneity. *J Agric Food Chem*, 46(6), 2234-2240

Baumberger, S., Lapierre, C., Monties, B., & Della Valle, G. (1998b). Use of kraft lignin as filler for starch films. *Polymer Degradation and Stability*, 59(1-3), 273-277

Baumberger, S., Lapierre, C., Monties, B., Lourdin, D., & Colonna, P. (1997). Preparation and properties of thermally moulded and cast lignosulfonates starch blends. *Industrial Crops and Products*, 6(3-4), 253-258

Baumberger, S., Lapierre, C., Monties, B., & Valle, G. D. (1998c). Use of kraft lignin as filler for starch films. *Polymer Degradation and Stability*, 59(1-3), 273-277

Belgacem, M. N., Blayo, A., & Gandini, A. (2003). Organosolv lignin as a filler in inks, varnishes and paints. *Industrial Crops and Products*, 18(2), 145-153

Bertuzzi, M. A., Armada, M., & Gottifredi, J. C. (2007). Physicochemical characterization of starch based films. *Journal of Food Engineering*, 82(1), 17-25

- Bhat, R., Abdullah, N., Din, R. H., & Tay, G. S. (2013). Producing novel sago starch based food packaging films by incorporating lignin isolated from oil palm black liquor waste. *Journal of Food Engineering*, 119(4), 707-713
- Billa, E., Koukios, E. G., & Monties, B. (1998). Investigation of lignins structure in cereal crops by chemical degradation methods. *Polymer Degradation and Stability*, 59(1-3), 71-75
- Bikova, T., Treimanis, A., Rossinska, G., & Telysheva, G., (2004). On-line study of lignin behaviour in dilute alkaline solution by the size exclusion chromatography (SEC)-UV method. *Holzforschung* 58, 489-494.
- Binod, P., Sindhu, R., Singhanian, R. R., Vikram, S., Devi, L., Nagalakshmi, S., Kurien, N., Sukumaran, R. K., & Pandey, A. (2010). Bioethanol production from rice straw: An overview. *Bioresour Technol*, 101(13), 4767-4774
- Boerjan, W., Ralph, J., & Baucher, M. (2003). Lignin biosynthesis. *Annu Rev Plant Biol*, 54, 519-546
- Bouasker, M., Belayachi, N., Hoxha, D., & Al-Mukhtar, M. (2014). Physical Characterization of Natural Straw Fibers as Aggregates for Construction Materials Applications. *Materials*, 7(4), 3034-3048
- Brandwilliams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a Free-radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Science and Technology-Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, 28(1), 25-30
- Brebu, M., & Vasile, C. (2009). Thermal degradation of lignin- A review. *Cellulose Chemistry and Technology*, 44(9), 353-363
- Brijwani, K., Rigdon, A., & Vadlani, P. V. (2010). Fungal laccases: Production, function, and applications in food processing. *Enzyme Research*, 10
- Brodin, I., Sjöholm, E., & Gellerstedt, G. (2010). The behavior of kraft lignin during thermal treatment. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 87(1), 70-77
- Buranov, A. U., & Mazza, G. (2008). Lignin in straw of herbaceous crops. *Industrial Crops and Products*, 28(3), 237-259
- Byman-Fagerholm, H., Mikkola, P., Rosenholm, J. B., Lidén, E., & Carlsson, R. (1999). The influence of lignosulphonate on the properties of single and mixed Si₃N₄ and ZrO₂ suspensions. *Journal of the European Ceramic Society*, 19(1), 41-48

Cazacu, G., Pascu, M. C., Profire, L., Kowarski, A. I., Mihaes, M., & Vasile, C. (2004). Lignin role in a complex polyolefin blend. *Industrial Crops and Products*, 20(2), 261-273

Cetin, N. S., & Ozmen, N. (2002a). Use of organosolv lignin in phenol-formaldehyde resins for particleboard production - I. Organosolv lignin modified resins. *International Journal of Adhesion and Adhesives*, 22(6), 477-480

Cetin, N. S., & Ozmen, N. (2002b). Use of organosolv lignin in phenol-formaldehyde resins for particleboard production - II. Particleboard production and properties. *International Journal of Adhesion and Adhesives*, 22(6), 481-486

Cybulska, I., Brudecki, G., Rosentrater, K., Julson, J. L., & Lei, H. (2012). Comparative study of organosolv lignin extracted from prairie cordgrass, switchgrass and corn stover. *Bioresour Technol*, 118, 30-36

Ciobanu, C., Ungureanu, M., Ignat, L., Ungureanu, D., & Popa, V. I. (2004). Properties of lignin-polyurethane films prepared by casting method. *Industrial Crops and Products*, 20(2), 231-241

Crestini, C., Crucianelli, M., Orlandi, M., & Saladino, R. (2010). Oxidative strategies in lignin chemistry: A new environmental friendly approach for the functionalization of lignin and lignocellulosic fibers. *Catalysis Today*, 156(1-2), 8-22

Credou, J., & Berthelot, T. (2014). Cellulose: from biocompatible to bioactive material. *Journal of Materials Chemistry B*, 2(30), 4767-4788

Connors, W. J., Sarkanen, S., & McCarthy, J. L. (1980). Gel chromatography and association complexes of lignin. *Holzforschung*, 34(3), 80-85

Cuq, B., Gontard, N., Cuq, J. L., & Guilbert, S. (1997). Selected functional properties of fish myofibrillar protein-based films as affected by hydrophilic plasticizers. *J Agric Food Chem*, 45(3), 622-626

Chen, L., Tang, C. Y., Ning, N. Y., Wang, C. Y., Fu, Q., & Zhang, Q. (2009). Preparation and properties of chitosan/lignin composite films. *Chinese Journal of Polymer Science*, 27(5), 739-746

Chen, L., Imam, S., Gordon, S., & Greene, R. (1997). Starch- polyvinyl alcohol crosslinked film— performance and biodegradation. *Journal of environmental polymer degradation*, 5(2), 111-117

Chen, P., Zhang, L. N., Peng, S. P., & Liao, B. (2006). Effects of nanoscale hydroxypropyl lignin on properties of soy protein plastics. *Journal of Applied Polymer Science*, 101(1), 334-341

Chivrac, F., Pollet, E., Schmutz, M., & Avérous, L. (2008). New approach to elaborate exfoliated starch-based nanobiocomposites. *Biomacromolecules*, 9(3), 896-900

Chung, Y. L., & Lai, H. M. (2005). Water-barrier property of starch films investigated by magnetic resonance imaging. *Cereal Chemistry*, 82(2), 131-137

De Wild, P. J., Huijgen, W. J. J., & Heeres, H. J. (2012). Pyrolysis of wheat straw-derived organosolv lignin. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 93(0), 95-103

Delmas, G. H., Benjelloun-Mlayah, B., Le Bigot, Y., & Delmas, M. (2011). Functionality of wheat straw lignin extracted in organic acid media. *Journal of Applied Polymer Science*, 121(1), 491-501

Dence, C. W., & Lin, S. Y. (1992). *Methods in Lignin Chemistry*, Springer-Verlag, BerlinHeidelberg. Dzhbite, T., Zakis, G., Kizima, A., Lazareva, E., Rossinskaya, G., Jurkjane, V., Telysheva, G., & Viesturs, U. (1999). Lignin — A useful bioresource for the production of sorption-active materials. *Bioresour Technol*, 67(3), 221-228

Dzhbite, T., Zakis, G., Kizima, A., Lazareva, E., Rossinskaya, G., Jurkjane, V., Telysheva, G., & Viesturs, U. (1999). Lignin — a useful bioresource for the production of sorption-active materials. *Bioresour Technol*, 67(3), 221-228

Doherty, W. O. S., Mousavioun, P., & Fellows, C. M. (2011). Value-adding to cellulosic ethanol: Lignin polymers. *Industrial Crops and Products*, 33(2), 259-276

Domenek, S., Louaifi, A., Guinault, A., & Baumberger, S. (2013). Potential of lignins as antioxidant additive in active biodegradable packaging materials. *Journal of Polymers and the Environment*, 21(3), 692-701

Dufresne, A., Dupeyre, D., & Vignon, M. R. (2000). Cellulose microfibrils from potato tuber cells: Processing and characterization of starch–cellulose microfibril composites. *Journal of Applied Polymer Science*, 76(14), 2080-2092

DuBois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., & Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem*, 28(3), 350-356

Dwivedi, U. N., Singh, P., Pandey, V. P., & Kumar, A. (2011). Structure–function relationship among bacterial, fungal and plant laccases. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 68(2), 117-128

Ebringerová, A., Hromádková, Z., & Heinze, T. (2005). Hemicellulose. In T. Heinze (Ed.), *Polysaccharides I* (Vol. 186, pp. 1-67): Springer Berlin Heidelberg.

- Effendi, A., Gerhauser, H., & Bridgwater, A. V. (2008). Production of renewable phenolic resins by thermochemical conversion of biomass: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 12(8), 2092-2116
- El Mansouri, N. E., Yuan, Q. L., & Huang, F. R. (2011). Synthesis and characterization of Kraft lignin-based epoxy resins, *BioResources* 6(3), 2492-2503.
- Erdocia X, T. A., Corcuera MA, Labidi J. (2012). Organosolv black liquor hydrolysis to obtain low molecular weight phenolic compounds. *Chem Eng Trans*, 29, 535–540
- Eroglu, H., & Deniz, I. (1993). Predesilication of wheat-straw with NaOH. *Papier*, 47(11), 645650
- Espinoza-Acosta, J. L., Torres-Chávez, P. I., Carvajal-Millán, E., Ramírez-Wong, B., Bello-Pérez, L. A., & Montañón-Leyva, B. (2014). Ionic liquids and organic solvents for recovering lignin from lignocellulosic biomass. *Bioresources*, 9(2) 3660-3687
- Evstigneev, E. I. (2011). Factors affecting lignin solubility. *Russian Journal of Applied Chemistry*, 84(6), 1040-1045
- Famá, L. M., Pettarin, V., Goyanes, S. N., & Bernal, C. R. (2011). Starch/multi-walled carbon nanotubes composites with improved mechanical properties. *Carbohydrate Polymers*, 83(3), 1226-1231
- Feldman, D., Banu, D., Campanelli, J., & Zhu, H. (2001). Blends of vinylic copolymer with plasticized lignin: Thermal and mechanical properties. *Journal of Applied Polymer Science*, 81(4), 861-874
- Fierro, V., Torné-Fernández, V., & Celzard, A. (2006). Kraft lignin as a precursor for microporous activated carbons prepared by impregnation with ortho-phosphoric acid: Synthesis and textural characterization. *Microporous and Mesoporous Materials*, 92(1–3), 243-250
- Finch, C. A. (1984). Wood adhesives: Chemistry and technology. Edited by A. Pizzi, Marcel Dekkar, New York and Basel, 1983. ISBN 0814715799. *British Polymer Journal*, 16(4), 324324
- Fitigau, I. F., Peter, F., & Boeriu, C. G. (2013). Oxidative polymerization of lignins by laccase in water-acetone mixture. *Acta Biochim Pol*, 60(4), 817-822
- Fujii, K., Uemura, M., Hayakawa, C., Funakawa, S., & Kosaki, T. (2013). Environmental control of lignin peroxidase, manganese peroxidase, and laccase activities in forest floor layers in humid Asia. *Soil Biology and Biochemistry*, 57(0), 109-115
- Funke, U., Bergthaller, W., & Lindhauer, M. G. (1998). Processing and characterization of biodegradable products based on starch. *Polymer Degradation and Stability*, 59(1–3), 293-296

- Gandini, A. (2008). Polymers from renewable resources: A challenge for the future of macromolecular materials. *Macromolecules*, 41(24), 9491-9504
- Gandini, A. (2011). The irruption of polymers from renewable resources on the scene of macromolecular science and technology. *Green Chemistry*, 13(5), 1061-1083
- Gandini, A., Belgacem, M., Guo, Z.-X., & Montanari, S. (2002). Lignins as macromonomers for polyesters and polyurethanes. In T. Hu (Ed.), *Chemical Modification, Properties, and Usage of Lignin* (pp. 57-80): Springer US.
- Gandini, A., & Belgacem, M. N. (2008). Monomers, polymers and composites from renewable resources. In G. Alessandro & B. M. Naceur (Eds.), *Monomers, Polymers and Composites from Renewable Resources* (pp. 1-154). Amsterdam: Elsevier.
- Garcia, A., Alriols, M. G., Llano-Ponte, R., & Labidi, J. (2011). Ultrasound-assisted fractionation of the lignocellulosic material. *Bioresour Technol*, 102(10), 6326-6330
- Garcia, A., Toledano, A., Andres, M. A., & Labidi, J. (2010). Study of the antioxidant capacity of *Miscanthus sinensis* lignins. *Process Biochemistry*, 45(6), 935-940
- Gírio, F. M., Fonseca, C., Carvalheiro, F., Duarte, L. C., Marques, S., & Bogel-Lukasik, R. (2010). Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. *Bioresour Technol*, 101(13), 4775-4800
- Glasser, W. G., Dave, V., & Frazier, C. E. (1993). Molecular-weight distribution of (semi-) commercial lignin derivatives. *Journal of Wood Chemistry and Technology*, 13(4), 545-559
- Gonçalves, A. R., and Benar, P. (2001). Hydroxymethylation and oxidation of Organosolv lignins and utilization of the products. *Bioresour Technol*, 79(2), 103-111
- Gosselink, R. J. A., Abacherli, A., Semke, H., Malherbe, R., Kauper, P., Nadif, A., & van Dam, J. E. G. (2004). Analytical protocols for characterisation of sulphur-free lignin. *Industrial Crops and Products*, 19(3), 271-281
- Gouveia, S., Fernandez-Costas, C., Sanroman, M. A., & Moldes, D. (2013). Polymerisation of Kraft lignin from black liquors by laccase from *Myceliophthora thermophila*: Effect of operational conditions and black liquor origin. *Bioresour Technol*, 131, 288-294
- Gouveia, S., Fernandez-Costas, C., Sanroman, M. A., & Moldes, D. (2012). Enzymatic polymerisation and effect of fractionation of dissolved lignin from Eucalyptus globulus Kraft liquor. *Bioresour Technol*, 121, 131-138
- Grierson, L. H., Knight, J. C., & Maharaj, R. (2005). The role of calcium ions and lignosulphonate plasticiser in the hydration of cement. *Cement and Concrete Research*, 35(4), 631-636

- Haemmerli, S. D., Schoemaker, H. E., Schmidt, H. W. H., & Leisola, M. S. A. (1987). Oxidation of veratryl alcohol by the lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium* involvement of activated oxygen. *FEBS Lett*, 220(1), 149-154
- Halvarsson, S., Edlund, H., & Norgren, M. (2010). Manufacture of High-Performance RiceStraw Fiberboards. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 49(3), 1428-1435
- Hamaguchi, M., Cardoso, M., & Vakkilainen, E. (2012). Alternative technologies for biofuels production in kraft pulp mills—Potential and prospects. *Energies*, 5(7), 2288-2309
- Hatfield, R., & Fukushima, R. S. (2005). Can lignin be accurately measured? This paper was originally presented at the Lignin and Forage Digestibility Symposium, 2003 CSSA Annual Meeting, Denver, CO. *Crop Sci.*, 45(3), 832-839
- Hendriks, A. T. W. M., & Zeeman, G. (2009). Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresour Technol*, 100(1), 10-18
- Hofrichter, M. (2002). Review: Lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). *Enzyme Microb Technol*, 30(4), 454-466
- Hu, L., Pan, H., Zhou, Y., & Zhang, M. (2011). Methods to improve lignin's reactivity as a phenol substitute and as replacement for other phenolic compounds: A brief review. *Bioresources* 6(3) 3515-3525
- Huang, J., & Zhang, L. (2002). Effects of NCO/OH molar ratio on structure and properties of graft-interpenetrating polymer networks from polyurethane and nitrolignin. *Polymer*, 43(8), 2287-2294
- Huang, J., Zhang, L., & Chen, F. (2003a). Effects of lignin as a filler on properties of soy protein plastics. I. Lignosulfonate. *Journal of Applied Polymer Science*, 88(14), 3284-3290
- Huang, J., Zhang, L., & Chen, P. (2003b). Effects of lignin as a filler on properties of soy protein plastics. II. Alkaline lignin. *Journal of Applied Polymer Science*, 88(14), 3291-3297
- Huang, M., Yu, J., & Ma, X. (2006). High mechanical performance MMT-urea and formamide plasticized thermoplastic corn starch biodegradable nanocomposites. *Carbohydrate Polymers*, 63(3), 393-399
- Huijgen, W. J. J., Reith, J. H., & den Uil, H. (2010). Pretreatment and fractionation of wheat straw by an acetone-based organosolv process. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 49(20), 10132-10140
- Janjarasskul, T., & Krochta, J. M. (2010). Edible Packaging Materials. *Annual Review of Food Science and Technology*, 1(1), 415-448

- Janusz, G., Kucharzyk, K. H., Pawlik, A., Staszczak, M., & Paszczynski, A. J. (2013). Fungal laccase, manganese peroxidase and lignin peroxidase: Gene expression and regulation. *Enzyme Microb Technol*, 52(1), 1-12
- Jiménez, A., Fabra, M. J., Talens, P., & Chiralt, A. (2012). Effect of re-crystallization on tensile, optical and water vapour barrier properties of corn starch films containing fatty acids. *Food Hydrocolloids*, 26(1), 302-310
- Johnston, J. H., & Nilsson, T. (2012). Nanogold and nanosilver composites with lignin containing cellulose fibres. *Journal of Materials Science*, 47(3), 1103-1112
- Juniper, B. E. (1979). The structure and chemistry of straw. *Agric Progress*, 54, 18-27
- Kadla, J. F., Kubo, S., Venditti, R. A., Gilbert, R. D., Compere, A. L., & Griffith, W. (2002). Lignin-based carbon fibers for composite fiber applications. *Carbon*, 40(15), 2913-2920
- Kaparaju, P., Serrano, M., Thomsen, A. B., Kongjan, P., & Angelidaki, I. (2009). Bioethanol, biohydrogen and biogas production from wheat straw in a biorefinery concept. *Bioresour Technol*, 100(9), 2562-2568
- Kharade, A. Y., & Kale, D. D. (1999). Lignin-filled polyolefins. *Journal of Applied Polymer Science*, 72(10), 1321-1326
- Khindaria, A., Yamazaki, I., & Aust, S. D. (1995). Veratryl alcohol oxidation by lignin peroxidase. *Biochemistry*, 34(51), 16860-16869
- Kondo, T. (1997a). The assignment of IR absorption bands due to free hydroxyl groups in cellulose. *Cellulose*, 4(4), 281-292
- Kondo, T. (1997b). The relationship between intramolecular hydrogen bonds and certain physical properties of regioselectively substituted cellulose derivatives. *Journal of Polymer Science Part B-Polymer Physics*, 35(4), 717-723
- Kondo, T., & Sawatari, C. (1996). A Fourier transform infra-red spectroscopic analysis of the character of hydrogen bonds in amorphous cellulose. *Polymer*, 37(3), 393-399
- Kubo, S., Uraki, Y., & Sano, Y. (1998). Preparation of carbon fibers from softwood lignin by atmospheric acetic acid pulping. *Carbon*, 36(7-8), 1119-1124
- Kuciel, S., & Liber-Knec, A. (2009). Biocomposites on the base of thermoplastic starch filled by wood and kenaf fiber. *Journal of Biobased Materials and Bioenergy*, 3(3), 269-274

- Kunamneni, A., Ballesteros, A., Plou, F. J., & Alcalde, M. (2007). Fungal laccase - A versatile enzyme for biotechnological applications. *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*, 223-245
- Kunamneni, A., Camarero, S., Garcia-Burgos, C., Plou, F., Ballesteros, A., & Alcalde, M. (2008). Engineering and Applications of fungal laccases for organic synthesis. *Microbial Cell Factories*, 7(1), 32
- Kunamneni, A., Plou, F. J., Ballesteros, A., & Alcalde, M. (2008). Laccases and their applications: a patent review. *Recent Pat Biotechnol*, 2(1), 10-24
- Lange, H., Decina, S., & Crestini, C. (2013). Oxidative upgrade of lignin – Recent routes reviewed. *European Polymer Journal*, 49(6), 1151-1173
- Laohakunjit, N., & Noomhorm, A. (2004). Effect of plasticizers on mechanical and barrier properties of rice starch film. *Starch - Stärke*, 56(8), 348-356
- Lapierre, C., Pollet, B., & Rolando, C. (1995). New insights into the molecular architecture of hardwood lignins by chemical degradative Methods. *Research on Chemical Intermediates*, 21(3-5), 397-412
- Laurichesse, S., & Averous, L. (2014). Chemical modification of lignins: Towards biobased polymers. *Progress in Polymer Science*, 39(7), 1266-1290
- Lepifre, S., Baumberger, S., Pollet, B., Cazaux, F., Coqueret, X., & Lapierre, C. (2004). Reactivity of sulphur-free alkali lignins within starch films. *Industrial Crops and Products*, 20(2), 219-230
- Lewis, N. G., & Yamamoto, E. (1990). Lignin - Occurrence, biogenesis and biodegradation. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 41, 455-496
- Li, L. J., Wang, Y., Zhang, Q., Li, J. X., Yang, X. G., and Jin, J. (2008). Wheat straw burning and its associated impacts on Beijing air quality. *Science in China Series D-Earth Sciences*, 51(3), 403-414
- Li, C. L., Cheng, G., Balan, V., Kent, M. S., Ong, M., Chundawat, S. P. S., Sousa, L. D., Melnichenko, Y. B., Dale, B. E., Simmons, B. A., & Singh, S. (2011). Influence of physicochemical changes on enzymatic digestibility of ionic liquid and AFEX pretreated corn stover. *Bioresour Technol*, 102(13), 6928-6936
- Li, Z., & Ge, Y. (2012). Antioxidant activities of lignin extracted from sugarcane bagasse via different chemical procedures. *Int J Biol Macromol*, 51(5), 1116-1120

- Li, Y., & Sarkanen, S. (2002). Alkylated kraft lignin-based thermoplastic blends with aliphatic polyesters. *Macromolecules*, 35(26), 9707-9715
- Liu, C. J., Miao, Y. C., & Zhang, K. W. (2011). Sequestration and transport of lignin monomeric precursors. *Molecules*, 16(1), 710-727
- López-Rubio, A., Lagaron, J. M., Ankerfors, M., Lindström, T., Nordqvist, D., Mattozzi, A., & Hedenqvist, M. S. (2007). Enhanced film forming and film properties of amylopectin using micro-fibrillated cellulose. *Carbohydrate Polymers*, 68(4), 718-727
- Lora, J. H., & Glasser, W. G. (2002). Recent industrial applications of lignin: A sustainable alternative to nonrenewable materials. *Journal of polymers and the environment*, 10(1-2), 3948
- Lora J. H. (2008). Industrial commercial lignin: Source, properties and applications. *In: monomer, polymer and composite from renewable sources*. Belgacem M. & Gandini A. (eds), Elsevier, Oxford, UK, pp. 225-241.
- Lora, J. H., Wu, C. F., Pye, E. K., & Balatinecz, J. J. (1989). Characteristics and potential applications of lignin produced by an organosolv pulping process lignin (Vol. 397, pp. 312323): *American Chemical Society*.
- Lu, F., & Ralph, J. (2010). Chapter 6 - Lignin. In R.-C. Sun (Ed.), *Cereal Straw as a Resource for Sustainable Biomaterials and Biofuels* (pp. 169-207). Amsterdam: Elsevier.
- Ma, P., Gao, Y., & Zhai, H. M. (2013). Fractionated wheat straw lignin and its application as antioxidant. *Bioresources*, 8(4), 5581-5595
- Ma, X., Yu, J., & Wang, N. (2007). Production of thermoplastic starch/MMT-sorbitol nanocomposites by dual-melt extrusion processing. *Macromolecular Materials and Engineering*, 292(6), 723-728
- Madhavi, V., & Lele, S. S. (2009). Laccase: properties and applications. *BioResources*, 4(4) 1649-1717
- Majcherczyk, A., & Huttermann, A. (1997). Size-exclusion chromatography of lignin as ion pair complex. *Journal of Chromatography A*, 764(2), 183-191
- Manno, D., Filippo, E., Di Giulio, M., & Serra, A. (2008). Synthesis and characterization of starch-stabilized Ag nanostructures for sensors applications. *Journal of Non-Crystalline Solids*, 354(52-54), 5515-5520
- Matsushita, Y., Inomata, T., Hasegawa, T., & Fukushima, K. (2009). Solubilization and functionalization of sulfuric acid lignin generated during bioethanol production from woody biomass. *Bioresour Technol*, 100(2), 1024-1026

- Mattinen, M.-L., Suortti, T., Gosselink, R., Argyropoulos, D. S., Evtugin, D., Suurnäkki, A., de Jong, E., & Tamminen, T. (2008). Polymerization of different lignins by laccase. *BioResources*, 3(2), 549-565.
- Mattinen, M. L., Struijs, K., Suortti, T., Mattila, I., Kruus, K., Willfor, S., Tamminen, T., & Vincken, J. P. (2009). Modification of lignans by *trametes hirsuta* laccase. *Bioresources*, 4(2), 482-496
- Mathew, A. P., & Dufresne, A. (2002). Plasticized waxy maize starch: effect of polyols and relative humidity on material properties. *Biomacromolecules*, 3(5), 1101-1108
- Mayer, A. M., & Staples, R. C. (2002). Laccase: new functions for an old enzyme. *Phytochemistry*, 60(6), 551-565
- McKendry, P. (2002). Energy production from biomass (part 2): Conversion technologies. *Bioresour Technol*, 83(1), 47-54
- Meister, J. J. (2002). Modification of lignin. *Journal of Macromolecular Science, Part C*, 42(2), 235-289
- Mielenz, J. R. (2001). Ethanol production from biomass: technology and commercialization status. *Current Opinion in Microbiology*, 4(3), 324-329
- Milstein, O., Huttermann, A., Frund, R., & Ludemann, H. D. (1994). Enzymatic copolymerization of lignin with low-molecular-mass compounds. *Appl Microbiol Biotechnol*, 40(5), 760-767
- Mohanty, A. K., Misra, M., & Drzal, L. T. (2002). Sustainable bio-composites from renewable resources: opportunities and challenges in the green materials world. *Journal of Polymers and the Environment*, 10(1-2), 19-26
- Montano-Leyva, B., Torres-Chavez, P., Ramirez-Wong, B., Plascencia-Jatomea, M., & Brown-Bojórquez, F. (2008). Physical and mechanical properties of durum wheat (*triticum durum*) starch films prepared with A- and B-type granules. *Starch-Stärke*, 60(10), 559-567
- Monteil-Rivera, F., Phuong, M., Ye, M. W., Halasz, A., & Hawari, J. (2013). Isolation and characterization of herbaceous lignins for applications in biomaterials. *Industrial Crops and Products*, 41, 356-364
- Morozova, V., Shumakovich, G. P., Gorbacheva, M. A., Shleev, S. V., & Yaropolov, A. I. (2007). "Blue" laccases. *Biochemistry-Moscow*, 72(10), 1136-1150

- Moya, R., Saastamoinen, P., Hernandez, M., Suurnakki, A., Arias, E., & Mattinen, M. L. (2011). Reactivity of bacterial and fungal laccases with lignin under alkaline conditions. *Bioresour Technol*, *102*(21), 10006-10012
- Munk, L., Sitarz, A. K., Kalyani, D. C., Mikkelsen, J. D., & Meyer, A. S. (2015). Can laccases catalyze bond cleavage in lignin? *Biotechnology Advances*. *33*, 13–24
- Nevárez, L. A. M., Casarrubias, L. B., Celzard, A., Fierro, V., Munoz, V. T., Davila, A. C., Lubian, J. R. T., & Sanchez, G. G. (2011). Biopolymer-based nanocomposites: Effect of lignin acetylation in cellulose triacetate films. *Science and Technology of Advanced Materials*, *12*(4), 1-16
- Nowakowski, D. J., Bridgwater, A. V., Elliott, D. C., Meier, D., & de Wild, P. (2010). Lignin fast pyrolysis: Results from an international collaboration. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, *88*(1), 53-72
- Nugroho Prasetyo, E., Kudanga, T., Østergaard, L., Rencoret, J., Gutiérrez, A., del Río, J. C., Ignacio Santos, J., Nieto, L., Jiménez-Barbero, J., Martínez, A. T., Li, J., Gellerstedt, G., Lepifre, S., Silva, C., Kim, S. Y., Cavaco-Paulo, A., Seljebakken Klausen, B., Lutnaes, B. F., Nyanhongo, G. S., & Guebitz, G. M. (2010). Polymerization of lignosulfonates by the laccase HBT (1-hydroxybenzotriazole) system improves dispersibility. *Bioresour Technol*, *101*(14), 5054-5062
- Núñez-Flores, R., Giménez, B., Fernández-Martin, F., López-Caballero, M. E., Montero, M. P., & Gómez-Guillen, M. C. (2013). Physical and functional characterization of active fish gelatin films incorporated with lignin. *Food Hydrocolloids*, *30*(1), 163-172
- Osma, J. F., Toca-Herrera, J. L., & Rodríguez-Couto, S. (2010). Uses of laccases in the food industry. *Enzyme Research*, 1-8.
- Pagella, C., Spigno, G., & De Faveri, D. M. (2002). Characterization of starch based edible coatings. *Food and Bioproducts Processing*, *80*(3), 193-198
- Palmqvist, L., Lyckfeldt, O., Carlström, E., Davoust, P., Kauppi, A., & Holmberg, K. (2006). Dispersion mechanisms in aqueous alumina suspensions at high solids loadings. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, *274*(1–3), 100-109
- Pan, X., & Saddler, J. (2013). Effect of replacing polyol by organosolv and kraft lignin on the property and structure of rigid polyurethane foam. *Biotechnol Biofuels*, *6*(1), 12
- Pan, X., & Sano, Y. (2005). Fractionation of wheat straw by atmospheric acetic acid process. *Bioresour Technol*, *96*(11), 1256-1263

- Pan, X. J., Kadla, J. F., Ehara, K., Gilkes, N., & Saddler, J. N. (2006). Organosolv ethanol lignin from hybrid poplar as a radical scavenger: Relationship between lignin structure, extraction conditions, and antioxidant activity. *J Agric Food Chem*, 54(16), 5806-5813
- Pelissari, F. M., Grossmann, M. V. E., Yamashita, F., & Pineda, E. A. G. (2009). Antimicrobial, mechanical, and barrier properties of cassava starch–chitosan films incorporated with oregano essential oil. *J Agric Food Chem*, 57(16), 7499-7504
- Petersena, M. O., Larsena, J., & Thomsen, M. H. (2009). Optimization of hydrothermal pretreatment of wheat straw for production of bioethanol at low water consumption without addition of chemical. *Biomass & Bioenerg*, 33, 834-840
- Pranoto, Y., Rakshit, S. K., & Salokhe, V. M. (2005). Enhancing antimicrobial activity of chitosan films by incorporating garlic oil, potassium sorbate and nisin. *LWT - Food Science and Technology*, 38(8), 859-865
- Polcin, J., & Rapson, W. H. (1969a). Spectrophotometric study of wood chromophores in situ. Part 1. Differential (K/S) curves related to bleaching and color reversion. *Tappi Journal*, 52(10), 1960-1965
- Polcin, J., & Rapson, W. H. (1969b). Spectrophotometric study of wood chromophores in situ. Part 3. Determination of the spectrum of lignin by the cotton-dilution method. *Tappi Journal*, 52(10), 1970-1974
- Pouteau, C., Cathala, B., Dole, P., Kurek, B., & Monties, B. (2005). Structural modification of Kraft lignin after acid treatment: characterization of the apolar extracts and influence on the antioxidant properties in polypropylene. *Industrial Crops and Products*, 21(1), 101-108
- Pushpadass, H. A., & Hanna, M. A. (2009). Age-Induced changes in the microstructure and selected properties of extruded starch films plasticized with glycerol and stearic acid. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 48(18), 8457-8463
- Pye, E., & Lora, J. (1991). The alcell process - A proven alternative to kraft pulping. *Tappi Journal*, 74, 113 - 118
- Quesada-Medina, J., Lopez-Cremades, F. J., & Olivares-Carrillo, P. (2010). Organosolv extraction of lignin from hydrolyzed almond shells and application of the delta-value theory. *Bioresour Technol*, 101(21), 8252-8260
- Rabelo, S. C., Carrere, H., Filho, R. M., & Costa, A. C. (2011). Production of bioethanol, methane and heat from sugarcane bagasse in a biorefinery concept. *Bioresour Technol*, 102(17), 7887-7895

- Ralph, J., Lundquist, K., Brunow, G., Lu, F., Kim, H., Schatz, P., Marita, J., Hatfield, R., Ralph, S., Christensen, J., & Boerjan, W. (2004). Lignins: Natural polymers from oxidative coupling of 4-hydroxyphenyl- propanoids. *Phytochemistry Reviews*, 3(1-2), 29-60
- Ramírez, F., González, V., Crespo, M., Meier, D., Faix, O., and Zúñiga, V. (1997). Amoxidized kraft lignin as a slow-release fertilizer tested on *Sorghum vulgare*. *Bioresour Technol*, 61(1), 43-46
- Riva, S. (2006). Laccases: Blue enzymes for green chemistry. *Trends in Biotechnology*, 24(5), 219-226
- Rodríguez, A., & Jimenez, L. (2008a). Pulping with organic solvents other than alcohols. *Afinidad*, 65(535), 188-196
- Rodríguez, A., Serrano, L., Moral, A., & Jiménez, L. (2008b). Pulping of rice straw with high boiling point organosolv solvents. *Biochemical Engineering Journal*, 42(3), 243-247
- Rodríguez Couto, S., & Toca Herrera, J. L. (2006). Industrial and biotechnological applications of laccases: A review. *Biotechnology Advances*, 24(5), 500-513
- Rodríguez, A., Serrano, L., Moral, A., Pérez, A., & Jiménez, L. (2008c). Use of high-boiling point organic solvents for pulping oil palm empty fruit bunches. *Bioresour Technol*, 99(6), 1743-1749
- Ropponen, J., Räsänen, L., Rovio, S., Ohra-aho, T., Liitiä, T., Mikkonen, H., van de Pas, D., & Tamminen, T. (2011). Solvent extraction as a means of preparing homogeneous lignin fractions. *Holzforschung*. 65, 543–549.
- Rotta, J., Ozório, R. Á., Kehrwald, A. M., de Oliveira Barra, G. M., de Melo Castanho Amboni, R. D., & Barreto, P. L. M. (2009). Parameters of color, transparency, water solubility, wettability and surface free energy of chitosan/hydroxypropyl methylcellulose (HPMC) films plasticized with sorbitol. *Materials Science and Engineering: C*, 29(2), 619-623
- Ruiz, H., Ruzene, D., Silva, D., da Silva, F. M., Vicente, A., & Teixeira, J. (2011). Development and characterization of an environmentally friendly process sequence (autohydrolysis and organosolv) for wheat straw delignification. *Appl Biochem Biotechnol*, 164(5), 629-641
- Saha, B. C. (2003). Hemicellulose bioconversion. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 30(5), 279-291
- Shah, B. L., Matuana, L. M., & Heiden, P. A. (2005). Novel coupling agents for PVC/wood flour composites. *Journal of Vinyl and Additive Technology*, 11(4), 160-165

Shraddha, Shekher, R., Sehgal, S., Kamthania, M., & Kumar, A. (2011). Laccase: Microbial sources, production, purification, and potential biotechnological applications. *Enzyme Research*, 217861

Sena-Martins, G., Almeida-Vara, E., & Duarte, J. C. (2008). Eco-friendly new products from enzymatically modified industrial lignins. *Industrial Crops and Products*, 27(2), 189-195

Shitole, B. B. (1992). Modern methods for the analysis of extractives from wood and pulp: A review. *Appita*, 45, 260-264

Shukry, N., Fadel, S. M., Agblevor, F. A., & El-Kalyoubi, S. F. (2008). Some physical properties of acetosolv lignins from bagasse. *Journal of Applied Polymer Science*, 109(1), 434444

SIAP, Sistema de Información Agroalimentaria y Pesquera (2014). <http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-cultivo>

Silva, E. A. B. d., Zabkova, M., Araújo, J. D., Cateto, C. A., Barreiro, M. F., Belgacem, M. N., & Rodrigues, A. E. (2009). An integrated process to produce vanillin and lignin-based polyurethanes from Kraft lignin. *Chemical Engineering Research and Design*, 87(9), 1276-1292

Singh Arora, D., & Kumar Sharma, R. (2010). Ligninolytic fungal laccases and their biotechnological applications. *Appl Biochem Biotechnol*, 160(6), 1760-1788

Slavin, J. (2003). Why whole grains are protective: biological mechanisms. *Proceedings of the Nutrition Society*, 62(1), 129-134

Spiridon, I., Teaca, C. A., & Bodirlau, R. (2011). Preparation and characterization of adipic acid-modified starch microparticles/plasticized starch composite films reinforced by lignin. *Journal of Materials Science*, 46(10), 3241-3251

Stewart, D. (2008). Lignin as a base material for materials applications: Chemistry, application and economics. *Industrial Crops and Products*, 27(2), 202-207

Sun, R., Lawther, J. M., & Banks, W. B. (1997). A tentative chemical structure of wheat straw lignin. *Industrial Crops and Products*, 6(1), 1-8

Sun, R.-C. (2010). Preface. In R.-C. Sun (Ed.), *Cereal Straw as a Resource for Sustainable Biomaterials and Biofuels* (pp. ix). Amsterdam: Elsevier.

Sun, R. C., Sun, X. F., Wang, S. Q., Zhu, W., & Wang, X. Y. (2002). Ester and ether linkages between hydroxycinnamic acids and lignins from wheat, rice, rye, and barley straws, maize stems, and fast-growing poplar wood. *Industrial Crops and Products*, 15(3), 179-188

- Sun, X. F., & Sun, R. C. (2001). Comparative study of methyl-tert-butyl ether extractives from rye and rice straw. *Wood and Fiber Science*, 33(3), 386-394
- Tejado, A., Peña, C., Labidi, J., Echeverria, J. M., & Mondragon, I. (2007). Physico-chemical characterization of lignins from different sources for use in phenol–formaldehyde resin synthesis. *Bioresour Technol*, 98(8), 1655-1663
- Thakur, V. K., Thakur, M. K., Raghavan, P., & Kessler, M. R. (2014). Progress in green polymer composites from lignin for multifunctional applications: A review. *Acs Sustainable Chemistry & Engineering*, 2(5), 1072-1092
- Thielemans, W., & Wool, R. P. (2005). Lignin esters for use in unsaturated thermosets: lignin modification and solubility modeling. *Biomacromolecules*, 6(4), 1895-1905
- Toledano, A., Serrano, L., & Labidi, J. (2012). Process for olive tree pruning lignin revalorisation. *Chemical Engineering Journal*, 193, 396-403
- Tongdeesontorn, W., Mauer, L., Wongruong, S., Sriburi, P., & Rachtanapun, P. (2011). Effect of carboxymethyl cellulose concentration on physical properties of biodegradable cassava starch-based films. *Chemistry Central Journal*, 5(1), 6
- Turunen, M., Alvila, L., Pakkanen, T. T., & Rainio, J. (2003). Modification of phenol–formaldehyde resol resins by lignin, starch, and urea. *Journal of Applied Polymer Science*, 88(2), 582-588
- Thuwall, M., Boldizar, A., & Rigdahl, M. (2006). Extrusion processing of high amylose potato starch materials. *Carbohydrate Polymers*, 65(4), 441-446
- Uju, Shoda, Y., Nakamoto, A., Goto, M., Tokuhara, W., Noritake, Y., Katahira, S., Ishida, N., Nakashima, K., Ogino, C., & Kamiya, N. (2012). Short time ionic liquids pretreatment on lignocellulosic biomass to enhance enzymatic saccharification. *Bioresour Technol*, 103(1), 446452
- Scheller H. V., & Ulvskov P. (2010). Hemicelluloses. *Annual Review of Plant Biology*. 61, 263289
- Van de Pas, D., Hickson, A., Donaldson, L., Lloyd-Jones, G., Tamminen, T., Fernyhough, A., & Mattinen, M. L. (2011). Characterization of fractionated lignins polymerized by fungal laccases. *BioResources*, 6(2), 1105-1121
- Vallejos, M. E., Curvelo, A. A. S., Teixeira, E. M., Mendes, F. M., Carvalho, A. J. F., Felissia, F. E., & Area, M. C. (2011). Composite materials of thermoplastic starch and fibers from the ethanol-water fractionation of bagasse. *Industrial Crops and Products*, 33(3), 739-746

- Vanholme, R., Demedts, B., Morreel, K., Ralph, J., & Boerjan, W. (2010). Lignin biosynthesis and structure. *Plant Physiol*, 153(3), 895-905
- Vansteelandt, J., & Delcour, J. A. (1999). Characterization of starch from durum wheat (*Triticum durum*). *Starch - Stärke*, 51(2-3), 73-80
- Vengal J. C. & Srikumar, M. (2005). Processing and study of novel lignin-starch and lignin-gelatin biodegradable polymeric films. *Trends Biomater. Artif. Organs*, 18(2), 237-241
- Vishtal, A., & Kraslawski, A. (2011). Challenges in industrial applications of technical lignins. *BioResources*, 6(3), 3547-3568
- Voon, H., Bhat, R., Easa, A., Liong, M. T., & Karim, A. A. (2012). Effect of addition of halloysite nanoclay and SiO₂ nanoparticles on barrier and mechanical properties of bovine gelatin films. *Food and Bioprocess Technology*, 5(5), 1766-1774
- Wariishi, H., Valli, K., & Gold, M. H. (1992). Manganese (II) oxidation by manganese peroxidase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. Kinetic mechanism and role of chelators. *Journal of Biological Chemistry*, 267(33), 23688-23695
- Weier, T. E., Stocking, C. R., & Barbour, M. G. (1991). Botánica. Quinta edición. Ed. Limusa México. 741 pp.
- Weihua, Q., & Hongzhang, C. (2008). An alkali-stable enzyme with laccase activity from entophytic fungus and the enzymatic modification of alkali lignin. *Bioresour Technol*, 99(13), 5480-5484
- Witayakran, S., & Ragauskas, A. J. (2009). Modification of high-lignin softwood kraft pulp with laccase and amino acids. *Enzyme Microb Technol*, 44(3), 176-181
- Wong, D. S. (2009). Structure and action mechanism of ligninolytic enzymes. *Appl Biochem Biotechnol*, 157(2), 174-209
- Wormeyer, K., Ingram, T., Saake, B., Brunner, G., & Smirnova, I. (2011). Comparison of different pretreatment methods for lignocellulosic materials. Part II: Influence of pretreatment on the properties of rye straw lignin. *Bioresour Technol*, 102(5), 4157-4164
- Xiaofei, M., Jiugao, Y., & Jin, F. (2004). Urea and formamide as a mixed plasticizer for thermoplastic starch. *Polymer International*, 53(11), 1780-1785
- Xu, F. (2010). Chapter 2 - Structure, ultrastructure, and chemical composition. In R.-C. Sun (Ed.), *Cereal Straw as a Resource for Sustainable Biomaterials and Biofuels* (pp. 9-47). Amsterdam: Elsevier.

- Xu, F., Sun, J. X., Sun, R. C., Fowler, P., & Baird, M. S. (2006). Comparative study of organosolv lignins from wheat straw. *Industrial Crops and Products*, 23(2), 180-193
- Xu, Y., Miladinov, V., & Hanna, M. A. (2004). Synthesis and characterization of starch acetates with high substitution. *Cereal Chemistry Journal*, 81(6), 735-740
- Yam, K. L., & Papadakis, S. E. (2004). A simple digital imaging method for measuring and analyzing color of food surfaces. *Journal of Food Engineering*, 61(1), 137-142
- Yuan, T.-Q., Xu, F., & Sun, R.-C. (2013). Role of lignin in a biorefinery: separation characterization and valorization. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 88(3), 346-352
- Yuan, T. Q., He, J., Xu, F., & Sun, R. C. (2009). Fractionation and physico-chemical analysis of degraded lignins from the black liquor of *Eucalyptus pellita* KP-AQ pulping. *Polymer Degradation and Stability*, 94(7), 1142-1150
- Yuan, T. Q., & Sun, R. C. (2010). Chapter 1 - Introduction. In R.-C. Sun (Ed.), *Cereal Straw as a Resource for Sustainable Biomaterials and Biofuels* (pp. 1-7). Amsterdam: Elsevier.
- Yasin, M. A. B., Bazmi A. A. & Karim S. (2010). Efficient Utilization of rice-wheat straw to produce value-added composite products. *International Journal of Chemical and Environmental Engineering*, 1(2), 136-143
- Zakzeski, J., Bruijninx, P. C. A., Jongerius, A. L., & Weckhuysen, B. M. (2010). The catalytic valorization of lignin for the production of renewable chemicals. *Chemical Reviews*, 110(6), 3552-3599
- Zakzeski, J., & Weckhuysen, B. M. (2011). Lignin solubilization and aqueous phase reforming for the production of aromatic chemicals and hydrogen. *ChemSusChem*, 4(3), 369-378
- Zobel, B., & McElvee, R. (1966). Variation of cellulose in loblolly pine. *Tappi Journal*, 49, 383-387
- Zoumpoulakis, L., & Simitzis, J. (2001). Ion exchange resins from phenol/formaldehyde resinmodified lignin. *Polymer International*, 50(3), 277-283
- Zhao, X. Q., Zi, L. H., Bai, F. W., Lin, H. L., Hao, X. M., Yue, G. J., & Ho, N. W. Y. (2012). Bioethanol from Lignocellulosic Biomass. *Biotechnology in China Iii: Biofuels and Bioenergy*, 128, 25-51
- Zhang, L., & Huang, J. (2001). Effects of hard-segment compositions on properties of polyurethane–nitrolignin films. *Journal of Applied Polymer Science*, 81(13), 3251-3259

Zhang, L.-M., & Yin, D.-Y. (2002). Preparation of a new lignosulfonate-based thinner: introduction of ferrous ions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 210(1), 13-21

Zhang, Y. H. P. (2008). Reviving the carbohydrate economy via multi-product lignocellulose biorefineries. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 35(5), 367-375

ANEXO 1

Artículo de Revisión

Espinoza-Acosta, J. L., Torres-Chávez, P. I., Carvajal-Millán, E., Ramírez-Wong, B., Bello-Pérez, L. A., and Montaña-Leyva, B. (2014). Ionic Liquids and Organic Solvents for Recovering Lignin from Lignocellulosic Biomass. *BioResources* 9(2), 3660-3687.

ANEXO 2

Artículo Experimental Aceptado

Mechanical, Thermal and Antioxidant Properties of Composite Films Prepared From Durum Wheat Starch and Lignin

Jose Luis Espinoza Acosta^{1*}, Patricia Isabel Torres Chavez^{1*}, Benjamín Ramírez
Wong¹, Luis Arturo Bello-Pérez², Alejandro Vega Rios³, Elizabeth Carvajal Millan⁴,
Maribel Plascencia Jatomea¹, Ana I. Ledesma Osuna¹