



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
IZTAPALAPA
Posgrado en Biotecnología

OBTENCIÓN Y ESTUDIO DE SUPERFICIES LIGNOCELULÓSICAS MODELO

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE MAESTRO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:

SERGIO ULISES ESPINOSA DOMÍNGUEZ

DIRECTOR:

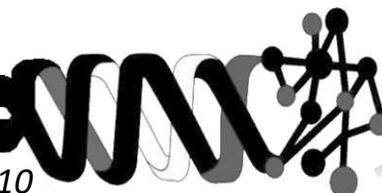
JOSÉ CAMPOS TERÁN

ASESORES:

HIRAM ISAAC BELTRÁN CONDE

SERGIO REVAH MOISEEV

MÉXICO, DISTRITO FEDERAL. 2010



La Maestría en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana – Unidad Iztapalapa, se encuentra inscrita en el Padrón de Programas de Posgrado de Excelencia del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

Beca de Maestría No. 131887

También:

Beca de proyecto de investigación CONACyT, No. de becario: 14687

Apoyo en infraestructura mediante los proyectos:

“Estudio de la Actividad Interfacial de las Proteínas Celulasas y Lacasas en Superficies Lignocelulósicas Modelo” de la convocatoria de Ciencia Básica 2007, CONACyT (No. CB-2007/83535).

“La Biomasa Recurso Sustentable Esencial: el caso de la Producción de Etanol” de la convocatoria de Acuerdos del Rector General 2007 de la UAM.

“Estudio de la Interacción de Glucoconjugados con Monocapas de Fosfolípidos para su Evaluación como Tensoactivos para Formulaciones en la industria Farmacéutica” de la convocatoria 2007 del Programa para el mejoramiento del Profesorado (PROMEP-SEP) (No. UAM-PTC-060)

México D.F. a 21 de Julio de 2010

El jurado designado por la

División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa **APROBÓ** la tesis:

OBTENCIÓN Y ESTUDIO DE SUPERFICIES LIGNOCELULÓSICAS MODELO

que presentó

SERGIO ULISES ESPINOSA DOMÍNGUEZ

Comité Tutoral:

Director: JOSÉ CAMPOS TERÁN

Asesor: SERGIO REVAH MOISEEV

Asesor: HIRAM ISAAC BELTRÁN CONDE

Jurado:

Presidente: SERGIO REVAH MOISEEV

Secretario: HIRAM ISAAC BELTRÁN CONDE

Vocal: EDUARDO TORRES RAMÍREZ

Vocal: MARIBEL HERNÁNDEZ GUERRERO

AGRADECIMIENTOS

A mi Madre y Hermano, por el apoyo y la confianza incondicionales y permanentes durante toda mi vida, en las buenas y en las malas. Siempre recibirán lo mismo de mi parte

Al Dr. Mariano Gutiérrez Rojas, por la enorme confianza que siempre tuvo en mí, y por el apoyo que siempre me brindó. Fue un privilegio haber trabajado con usted

Al Dr. Sergio Revah, por la confianza en mi trabajo, y por la oportunidad de ser parte de la UAM-C

Al Dr. José Campos, por abrir con este proyecto un panorama totalmente nuevo y apasionante para mí. Por el gran aprendizaje que tuve bajo su dirección, por su gran dedicación, y por ser siempre un Director razonable y justo

Al Dr. Hiram Beltrán, por las aportaciones siempre atinadas y oportunas al proyecto, y por la gran pasión que tiene por la Química, misma que resulta contagiosa

A la Dra. Maribel Hernández, por su amistad, y por su gran dedicación hacia este trabajo

Ha sido una gran experiencia trabajar en este grupo; GRACIAS A TODOS

Al Posgrado en Biotecnología, por los apoyos recibidos para la asistencia a congresos

También, a los miembros del Departamento de Física Química, del Instituto de Física de la UNAM (IFUNAM):

M. en C. Salvador Ramos, por el apoyo para realizar los estudios en la Palangana de Langmuir con Microscopía de Ángulo de Brewster

M. en C. Cristina Garza, por el apoyo para realizar los estudios de Microscopía de Fuerza Atómica

A toda persona que antes, ahora o después, trabaje para fomentar y permitir que haya educación de calidad en México, porque es la única salida que tiene este país

TODO ESTÁ ENCRIPADO, 1 VIDA NO ES SUFICIENTE

Sergio e Domínguez

09/17/2018

義 勇氣 礼 忠義

PREFACIO

Este trabajo es el primero en su tipo dentro del Posgrado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, porque utiliza un enfoque y herramientas de la ciencia de materiales para abordar un problema biotecnológico.

También, es la primer tesis de posgrado producida en el Laboratorio de Biosistemas de la División de Ciencias Naturales e Ingeniería, de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Cuajimalpa. El trabajo experimental fue realizado de Octubre de 2008 a Enero de 2010, en el Laboratorio de Biosistemas (UAM-C), y parcialmente en los laboratorios del Grupo de Fluidos Complejos (IFUNAM).

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	3
1. INTRODUCCIÓN	5
2. JUSTIFICACIÓN	7
3. OBJETIVOS	8
4. HIPÓTESIS	9
5. ANTECEDENTES	10
5.1. Superficies modelo	10
5.2. Biomasa	11
5.3. Pretratamientos a la biomasa	12
5.4. Celulosa	13
5.5. Lignina	14
5.6. Investigación con materiales lignocelulósicos en interfases	16
5.7. Estudios con celulosa en interfases y superficies	17
5.8. Estudios con lignina en interfases y superficies	19
5.9. Estudios con mezclas lignocelulósicas	19
6. EXPERIMENTAL	20
6.1. Materiales	20
6.2. Métodos	21
6.2.1. Solubilización de biopolímeros	21
6.2.2. Películas de Langmuir	22
6.2.2.1. Tensiometría	23
6.2.2.2. Palangana de Langmuir	24
6.2.2.3. Microscopía de Ángulo de Brewster	29
6.2.3. Producción de superficies hidrofóbicas	31
6.2.3.1. Limpieza y activación de superficie de sílica	31
6.2.3.2. Funcionalización de superficie de sílica	32
6.2.4. Producción de superficies modelo	34
6.2.5. Caracterización de superficies modelo	37
6.2.5.1. Microscopía de fuerza atómica	37
6.2.5.2. Microbalanza de cuarzo con disipación	40
6.2.6. Espectroscopías	44
6.2.6.1. De infrarrojo por Transformada de Fourier	44
6.2.6.2. Ultravioleta visible	45

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	46
7.1. Producción de superficies hidrofóbicas	46
7.1.1. Microscopía de Fuerza Atómica	46
7.1.2. Microgravimetría	47
7.2. Solubilización de biopolímeros	53
7.2.1. Comportamiento de la solución en el bulto	53
7.2.1.1. Celulosa	53
7.2.1.2. Lignina	56
7.2.2. Formación de películas de Langmuir	58
7.2.2.1. Celulosa	58
7.2.2.2. Lignina	60
7.3. Estudios en la interfase aire-agua	61
7.3.1. Isotherma Π -A y morfología de la película de celulosa	62
7.3.1.1. Reversibilidad de la isoterma Π -A de celulosa	65
7.3.2. Isotherma Π -A y morfología de la película de lignina	67
7.3.2.1. Reversibilidad de la isoterma Π -A de lignina	70
7.3.3. Isotherma Π -A y morfología de la película lignocelulósica	72
7.3.3.1. Reversibilidad de la isoterma Π -A de mezcla lignocelulósica ---	74
7.3.4. Miscibilidad de los biopolímeros	74
7.3.5. Estabilidad dinámica de las películas de Langmuir	78
7.4. Superficies lignocelulósicas modelo	79
7.4.1. Microscopía de Fuerza Atómica	80
7.4.1.1. Superficie modelo de celulosa	80
7.4.1.2. Superficie modelo de lignina	82
7.4.1.3. Superficie lignocelulósica modelo	83
7.4.2. Microbalanza de cuarzo con disipación	85
7.4.2.1. Superficie modelo de celulosa	85
7.4.2.2. Superficie modelo de lignina	91
7.4.2.3. Superficie lignocelulósica modelo	95
8. CONCLUSIONES	98
9. PERSPECTIVAS	100
10. DIVULGACIÓN	102
11. REFERENCIAS	103

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ordenamiento típico de una película delgada -----	10
Figura 2. Disposición de los tres biopolímeros en los tejidos vegetales -----	11
Figura 3. Estructura lineal de la celulosa -----	13
Figura 4. Polimorfos supramoleculares de celulosa -----	14
Figura 5. Monómeros fenilpropano de la lignina -----	15
Figura 6. Posible estructura de la lignina -----	16
Figura 7. Estructuras químicas de los solventes utilizados -----	20
Figura 8. Estructura química del agente acoplante utilizado -----	20
Figura 9. Substratos sólidos inertes utilizados -----	21
Figura 10. Estrategias de solubilización de biopolímeros -----	22
Figura 11. Sensor de tensión superficial en la interfase gas-líquido -----	23
Figura 12. Componentes de una palangana de Langmuir -----	25
Figura 13. Isotermas Π -A -----	27
Figura 14. Palangana de Langmuir Minimicro, KSV -----	28
Figura 15. Principio de MAB -----	30
Figura 16. Palangana de Langmuir con microscopio BAM1 -----	30
Figura 17. Activación de la superficie de sílica -----	32
Figura 18. Procedimiento de limpieza/activación de las superficies de sílica -----	32
Figura 19. Mecanismos en la silanización de la superficie de sílica -----	33
Figura 20. Procedimiento de silanización de superficie de sílica -----	34
Figura 21. Depósito vertical Langmuir-Blodgett -----	35
Figura 22. Deposito horizontal Langmuir-Schaefer -----	36
Figura 23. Depósitos horizontales (LS) con distintos substratos -----	37
Figura 24. MFA en modo de contacto intermitente -----	39
Figura 25. Microscopio de Fuerza Atómica JSTM-4210 JEOL -----	40
Figura 26. Esquema de una Microbalanza de Cuarzo con Disipación -----	40
Figura 27. Perfiles de ΔF y D -----	43
Figura 28. Microbalanza de Cuarzo con Disipación Z-500 -----	43
Figura 29. Micrografías MFA de sílica y superficie silanizada -----	47
Figura 30. ΔF_3 y D_3 de las superficies de sílica y APTS -----	48
Figura 31. Acercamiento al perfil de ΔF_3 y D_3 para SiO_2 y APTS en agua -----	49
Figura 32. ΔF_3 y D_3 para SiO_2 y APTS en medio líquido -----	51
Figura 33. Adsorción entre iones Na solvatados sobre la superficie de APTS -----	52
Figura 34. IR-TF de mezclas celulosa-solvente para los tres solventes evaluados -----	54
Figura 35. Grupos -OH de la celulosa II activados en el infrarrojo por THF y DMSO -----	56
Figura 36. UV-vis a soluciones de lignina en los tres solventes evaluados -----	56
Figura 37. Isotermas presión superficial-área de las soluciones de celulosa -----	58
Figura 38. Comparación del método de solubilización de celulosa -----	59
Figura 39. Isotermas presión superficial-área de las soluciones de lignina -----	60

Figura 40. <i>Isoterma II-A típica-micrografías MAB de celulosa disuelta en THF</i> -----	62
Figura 41. <i>Posible ordenamiento de la celulosa en la interfase aire-agua</i> -----	64
Figura 42. <i>Compresión-expansión-compresión de la película de celulosa</i> -----	66
Figura 43. <i>Isoterma II-A típica-micrografías MAB de lignina disuelta en THF</i> -----	68
Figura 44. <i>Posible ordenamiento de la lignina en la interfase aire-agua</i> -----	69
Figura 45. <i>Compresión-expansión- recompresión a la película de lignina</i> -----	71
Figura 46. <i>Isotermas II - A-micrografías MAB de mezcla (50:50)</i> -----	73
Figura 47. <i>Isotermas II-A de todas las mezclas evaluadas en la interfase aire-agua</i> -----	75
Figura 48. <i>Evolución del área específica y la compresibilidad</i> -----	76
Figura 49. <i>Área por molécula y Aex en función de composición</i> -----	77
Figura 50. <i>Curvas de relajación normalizadas</i> -----	79
Figura 51. <i>Micrografías MFA de superficies de celulosa</i> -----	80
Figura 52. <i>Micrografías MFA de superficies de lignina</i> -----	83
Figura 53. <i>Micrografías MFA de superficies de mezcla (70:30)</i> -----	84
Figura 54. <i>Acercamiento al perfil de ΔF_3 y D_3 APTS y celulosa en agua</i> -----	86
Figura 55. <i>ΔF_3 y D_3 para APTS y celulosa en medio acuoso</i> -----	89
Figura 56. <i>Comportamiento de la superficie modelo de celulosa en medio acuoso</i> -----	91
Figura 57. <i>Acercamiento al perfil de ΔF_3 y D_3 para APTS y lignina en agua</i> -----	92
Figura 58. <i>ΔF_3 y D_3 para APTS y lignina en medio acuoso</i> -----	93
Figura 59. <i>Comportamiento de la superficie modelo de lignina en medio acuoso</i> -----	94
Figura 60. <i>Acercamiento al perfil de ΔF_3 y D_3 para APTS y mezcla (70:30) en agua</i> -----	95
Figura 61. <i>ΔF_3 y D_3 de todas las superficies lignocelulósicas modelo en medio acuoso</i> -----	96
Figura 62. <i>Comportamiento de las superficies lignocelulósicas modelo en ambientes acuosos</i> --	97

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. <i>Composición de diversos recursos lignocelulósicos</i> -----	11
Tabla 2. <i>Propiedades fisicoquímicas de algunas ligninas técnicas</i> -----	15
Tabla 3. <i>Métodos de preparación de superficies modelo de celulosa</i> -----	18
Tabla 4. <i>rms para distintas superficies de SiO_2 y APTS</i> -----	47
Tabla 5. <i>Grosor para distintas superficies de SiO_2 y APTS</i> -----	50
Tabla 6. <i>Asignación de bandas para los grupos -OH de la celulosa II</i> -----	54
Tabla 7. <i>A_E para celulosa y derivados</i> -----	65
Tabla 8. <i>A_E para distintas ligninas técnicas</i> -----	70
Tabla 9. <i>rms de superficies de celulosa y derivados</i> -----	81
Tabla 10. <i>rms de superficies de ligninas técnicas</i> -----	83
Tabla 11. <i>Grosor de superficies de celulosa</i> -----	87
Tabla 12. <i>Grosor de superficies de lignina</i> -----	97

RESUMEN

En el presente trabajo se produjeron y estudiaron superficies lignocelulósicas modelo, con potencial para realizar estudios sistemáticos de las interacciones enzima-superficie, necesarios para comprender los factores que afectan la actividad enzimática. Para ello, primero se obtuvieron soluciones de celulosa microcristalina (por sonicación) y lignina kraft (por agitación) en tetrahidrofurano (THF), a temperatura ambiente. Posteriormente, las soluciones se caracterizaron mediante espectroscopías de ultravioleta visible (UV-vis) y de Infrarrojo por Transformada de Fourier (IR-TF), donde se observó distinta conformación de los biopolímeros, posiblemente ocasionada por las condiciones de solubilización.

Utilizando estas soluciones, se estudió el comportamiento fisicoquímico y morfológico de películas de Langmuir de celulosa, lignina y mezclas de ambos polímeros, utilizando isothermas de presión superficial vs área por molécula (II-A) y Microscopía de Ángulo de Brewster (MAB). La película de Langmuir de celulosa, se esparce espontáneamente en la interfase aire-agua, con un área molecular específica (A_E) de $490 \pm 96 \text{ \AA}^2$ por molécula, y una compresibilidad (C) relativamente alta, de $0.033 \pm 1 \times 10^{-3} \text{ m mN}^{-1}$. Ésta película es estable a ciclos de recompresión, y mostró una morfología de gránulos y poros. La película de Langmuir de lignina no se esparce espontáneamente. Presentó un $A_E = 35.46 \pm 0.66 \text{ \AA}^2$ por molécula, y una compresibilidad, $C = 0.029 \pm 1.53 \times 10^{-3} \text{ m mN}^{-1}$. Esta película es menos estable a ciclos de recompresión y muestra una morfología parecida a la observada para la celulosa, pero con agregados relativamente grandes ($\approx 50 \text{ \mu m}^2$) de material expulsado de la interfase. Finalmente, la película de Langmuir de mezcla celulosa:lignina (50:50 p/p) presentó un $A_E = 189 \pm 14 \text{ \AA}^2$ por molécula, y un valor de $C = 0.028 \pm 0.03 \text{ m mN}^{-1}$. Esta película es estable a ciclos de recompresión, y muestra una morfología que presenta agregados del orden de 200 \mu m^2 , presumiblemente de mezcla lignocelulósica. Todas las películas lignocelulósicas producidas presentan solamente una fase condensada, no presentan colapso, y muy probablemente forman multicapas. Por otra parte, los biopolímeros mostraron un comportamiento miscible en la interfase aire-agua, como se observó utilizando el concepto de área en exceso (A_{ex}).

Las películas de Langmuir obtenidas resultaron ser adecuadas para realizar depósitos en un sustrato sólido (silica funcionalizada con 3-aminopropiltrimetoxisilano), mediante la técnica de depósito de Langmuir-Schaefer (LS), a una presión superficial de

$\Pi=10 \text{ mN m}^{-1}$. La morfología y la topología de estas superficies fue estudiada con Microscopía de Fuerza Atómica (MFA). Esta técnica mostró que se generaron superficies modelo de celulosa relativamente planas ($\text{rms} \approx 2.25 \text{ nm}$), homogéneas, sin orientación, y que presentan una estructura de agregados de aproximadamente $30\text{-}50 \text{ nm}^2$. Las superficies de lignina fueron menos rugosas ($\text{rms} \approx 1.36 \text{ nm}$) y no presentaron estructura ni orientación. Las superficies de mezcla celulosa:lignina (70:30 p/p) presentaron una rugosidad de aproximadamente 2.43 nm y presentan una estructura similar a la observada para celulosa, pero con agregados de mayor tamaño ($\approx 200 \text{ nm}^2$).

Finalmente, se analizaron las propiedades de estabilidad de las superficies lignocelulósicas modelo con la Microbalanza de Cuarzo con Disipación (MBC-D). La superficie modelo de celulosa tiene una masa de $\approx 75 \text{ ng}_{\text{Celulosa}}$ y presenta un grosor de $\approx 2.43 \text{ nm}$, es estable en agua, y no presenta hinchamiento, mismo que puede ser generado con un incremento en la fuerza iónica del medio, sin modificar su rigidez. La superficie modelo de lignina tiene una masa de $\approx 46 \text{ ng}_{\text{Lignina}}$, y presenta un grosor de $\approx 1.7 \text{ nm}$, presenta un hinchamiento importante en agua, y se disuelve al aumentar la fuerza iónica. Por su parte, la superficie modelo con una mezcla celulosa:lignina (70:30), tiene una masa de mezcla de $\approx 84 \text{ ng}_{\text{Mezcla}}$, y presenta un grosor de $\approx 5.31 \text{ nm}$. Esta superficie mostró un comportamiento de hinchamiento similar al de la superficie de celulosa, pero es más sensible a los cambios de fuerza iónica, respecto a su hinchamiento y rigidez, que la de celulosa.

ABSTRACT

In this work, lignocellulosic model surfaces were obtained and studied. These surfaces are a potential useful tool that allows enzyme-surface interactions studies, in a reproducible and controlled way, to get a better understanding of the controlling factors of such interactions. In order to do this, firstly, solutions of microcrystalline cellulose (prepared by sonication) and kraft lignin (prepared by agitation) in tetrahydrofuran (THF) at room temperature were obtained. These solutions were characterized by means of Fourier-Transform Infrared (FTIR) and ultraviolet-visible (UV-vis) spectroscopies. Different biopolymers configurations were observed, possibly due to solubilization conditions.

Using these solutions, physicochemical and morphological properties of Langmuir films of cellulose, lignin and their mixtures were studied using surface-pressure vs area per molecule (Π -A) isotherms and Brewster Angle Microscopy (BAM). It was observed that cellulose Langmuir film spreads spontaneously at the air-water interface, with a specific molecular area (A_S) of $490 \pm 96 \text{ \AA}^2/\text{molecule}$, and a relatively high compressibility (C) of $0.033 \pm 1 \times 10^{-3} \text{ m mN}^{-1}$. This film showed stability in recompression-cycles and displays a porous-granular morphology. Opposite to the cellulose films, lignin Langmuir films do not spread spontaneously at the air-water interface. These films had a $A_S = 35.46 \pm 0.66 \text{ \AA}^2/\text{molecule}$, and a $C = 0.029 \pm 1.53 \times 10^{-3} \text{ m mN}^{-1}$ and are not so stable in recompression cycles. However, they showed similar morphology to that of cellulose films. It is worth to mention that lignin films also display relatively big aggregates ($\approx 50 \text{ \mu m}^2$) expelled from the condensed phase. Finally, cellulose:lignin mixture (50:50 w/w) films showed a $A_S = 189 \pm 14 \text{ \AA}^2/\text{molecule}$, and a $C = 0.028 \pm 0.03 \text{ m mN}^{-1}$. In addition, these films exhibited $\approx 200 \text{ \mu m}^2$ aggregates, presumably of lignocellulosic mixture. All of the produced lignocellulosic films presented one condensed phase, did not had collapse, and probably form multilayers. On the other hand, the excess area (A_{ex}) concept was used to establish the degree of miscibility between both biopolymers.

All the Langmuir lignocellulosic films showed to be suitable for deposition onto a solid substrate (silica functionalized with 3-aminopropyltrimethoxysilane) using the Langmuir-Schaefer (LS) deposition technique, at 10 mN m^{-1} surface pressure. The produced surfaces were morphologically and topologically characterized by means of Atomic Force Microscopy (AFM). Cellulose model surfaces were homogeneous, non-orientated, relatively flat ($rms \approx 2.25 \text{ nm}$) and with a structure formed by aggregates of approximately $30\text{-}50 \text{ nm}^2$. Lignin surfaces presented a smaller rugosity ($rms \approx 1.36 \text{ nm}$),

and no structure nor orientation was observed. Cellulose:lignin (70:30 w/w) mixtures surfaces had a rms value of 2.43 nm, and a structure similar to cellulose surfaces, but with bigger dimensions, i.e. 200 nm² aggregates.

Finally, stability properties of the lignocellulosic model surfaces were studied by means of a Quartz Crystal Microbalance with Dissipation (QCM-D). The cellulose model surfaces showed a mass of ≈ 75 ng_{Cellulose}, and a thickness of ≈ 2.43 nm. These surfaces also showed stability and a no-swelling behavior in water. However, swelling can be achieved with a higher ionic strength, without causing rigidity changes. Lignin model surfaces have a mass of ≈ 46 ng_{Lignin}, and a thickness of ≈ 1.7 nm. These surfaces showed water swelling behavior and dissolve with a higher ionic strength. On the other hand, cellulose:lignin (70:30 w/w) mixture model surfaces have a mass of ≈ 84 ng_{Mixture}, and a thickness of ≈ 5.31 nm. These surfaces showed similar stability and swelling behavior to that of cellulose model surfaces in water and higher ionic strength solutions, but also showed a higher swelling and rigidity sensibility than the cellulose ones.

1

INTRODUCCIÓN

La producción de combustibles a partir de alimentos genera por su doble finalidad problemáticas económicas y sociales,¹ y también una emisión masiva de gases de efecto invernadero por el cambio de uso de suelos.² Los residuos agroindustriales y de la industria papelera son *biomasa lignocelulósica* que representa una alternativa de recursos renovables, abundante y barata.^{3,4} Sin embargo, las tecnologías basadas en este tipo de materiales enfrentan obstáculos técnicos que han evitado su uso generalizado, pues la biomasa está constituida principalmente por celulosa, hemicelulosa y lignina en una estructura rígida, lo que causa la necesidad de pretratamientos para generar materiales susceptibles de catálisis que redunden en la producción de combustibles o productos químicos.⁵ Así mismo, los procesos biocatalíticos son costosos pues las enzimas se adsorben hasta en un 60% por la lignina residual.⁶ Por otro lado, se ha encontrado que si se remueve a la lignina de estos materiales se necesitan del orden de seis veces menos enzimas para producir la misma conversión catalítica,⁷ sin embargo, la remoción de la lignina trae como consecuencia un incremento en los costos de los procesos de conversión de la biomasa en azúcares fermentables. Se cree que la adsorción de celulasas y hemicelulasas sobre lignina es debida a interacciones hidrofóbicas, y en menor medida por interacciones iónicas,⁸ sin embargo, a pesar de la importancia que tienen los fenómenos de superficie que ocasionan esta inhibición, aún no son del todo comprendidos.

El enfoque biotecnológico utilizado para resolver el reto de los biocombustibles ha sido mediante ingeniería y reingeniería de bioprocesos,⁹ o mediante mejora genética de los agentes biológicos utilizados en éstos.¹⁰ Otra aproximación complementaria, consiste en estudiar los fenómenos superficiales que ocurren entre los materiales lignocelulósicos y las enzimas; en este sentido, para poder realizar estudios sistemáticos, y dada la complejidad de las substratos naturales, se requieren superficies reproducibles, con composición química y morfológica bien caracterizadas, conocidas como *superficies modelo*, que se hacen interactuar con enzimas para estudiar sistemáticamente las interacciones de estas con las superficies.¹¹ Los estudios de interacción superficiales de

materiales lignocelulósicos con enzimas para la producción de biocombustibles han ganado interés recientemente, pero aún no se han descrito estudios con superficies con los polímeros celulosa y lignina mezclados, y el primer paso para estudiar sistemáticamente estas interacciones es generar superficies modelo con composiciones distintas de celulosa y lignina, estudiando sus propiedades y caracterizándolas fisicoquímicamente.

Esta tesis presenta un estudio de las propiedades fisicoquímicas de películas de celulosa, lignina y mezclas de ambos polímeros, en la interfase aire-agua y como superficies modelo sólidas. Para lograr lo anterior se formaron películas de estos compuestos en la interfase aire-agua, analizándolas mediante isothermas de presión superficial vs área por molécula (II-A) y con microscopía de ángulo de Brewster (MAB). Una vez caracterizadas se produjeron superficies modelo con la técnica de Langmuir-Schaefer (LS), mismas que fueron analizadas con microscopía de fuerza atómica (MFA) y con una microbalanza de cuarzo con disipación (MBC-D), para estudiar su morfología y estabilidad, respectivamente.

Respecto a la organización de la tesis, en los Capítulos 1 a 4 se presenta la introducción al tema de estudio, así como la justificación, objetivos e hipótesis planteados en el presente trabajo. En el Capítulo 5, se describe el uso y la formación de superficies modelo y se presenta una breve descripción de la estructura y propiedades de la biomasa y de dos de sus componentes principales: celulosa y lignina. También, se hace una breve revisión de algunos trabajos de investigación realizados con estos materiales en interfases y superficies. En el Capítulo 6, se detallan los materiales y los métodos utilizados en este trabajo, describiendo las principales características y principios de operación de las técnicas experimentales utilizadas, poniendo especial énfasis en aquellas que son novedosas en el Posgrado en Biotecnología de la UAM-I. Los resultados obtenidos con cada una de las técnicas, así como su interpretación, se presentan en el Capítulo 7. Los Capítulos 8 y 9, puntualizan las conclusiones globales del trabajo, así como las perspectivas que éste genera. Finalmente, en los Capítulos 10 y 11 se presenta la divulgación de los resultados obtenidos, así como las referencias consultadas para la escritura y sustento de la presente tesis.

2

JUSTIFICACIÓN

El uso rentable y generalizado de biomasa lignocelulósica no ha sido posible debido al desconocimiento de las interacciones superficiales entre estos materiales y las enzimas utilizadas en los procesos biocatalíticos, lo cual dificulta la selección y optimización estructural de estas proteínas para evitar su adsorción en la biomasa y lograr una mayor actividad. Así, por ejemplo, es necesario estudiar cambios conformacionales de las proteínas en las interfases, mecanismos de adsorción secuencial y competitiva, o la formación de películas adsorbidas.

Las superficies modelo son una herramienta de la ciencia de materiales que tienen composición química y morfología definidas, y son utilizadas como unidades experimentales para estudiar las interacciones enzima-superficie. Esto se debe a que permiten una aproximación sistemática al entendimiento de estos fenómenos, que no es posible utilizando materiales en su estado natural, pues son complejos y difíciles de estudiar de forma reproducible.

Para realizar estudios sistemáticos de interacción enzima-superficie, primero es necesario definir una metodología de producción de estas superficies, y posteriormente caracterizarlas fisicoquímicamente, para evaluar su posible uso en estudios futuros de interacción enzimática.

3

OBJETIVOS

3.1. GENERAL

Generar y caracterizar fisicoquímicamente superficies modelo con diferentes grados de composición de lignina y celulosa, tanto en la interfase aire-agua como en superficies sólidas.

3.2. PARTICULARES

- a) Definir una metodología, en condiciones suaves, para generar soluciones de celulosa y lignina sin modificaciones químicas, que sirvan para producir películas en la interfase aire-agua.
- b) Estudiar el comportamiento fisicoquímico y la morfología de las películas de celulosa, lignina y mezclas lignocelulósicas en la interfase aire-agua.
- c) Definir la metodología para producir superficies de celulosa, lignina y mezclas lignocelulósicas en sustratos sólidos.
- d) Analizar la morfología y propiedades fisicoquímicas de las superficies modelo.

4

HIPÓTESIS

Es posible producir, en condiciones suaves, y con biopolímeros sin modificaciones químicas, superficies modelo de celulosa, lignina y mezclas lignocelulósicas con distintas propiedades, de manera controlada y reproducible.

Estas superficies tendrán propiedades fisicoquímicas bien definidas y adecuadas para realizar estudios sistemáticos futuros de las interacciones enzima-superficie, utilizando, por ejemplo, la microbalanza de cuarzo con disipación (MBC-D).

5

ANTECEDENTES

5.1. SUPERFICIES MODELO

Las superficies modelo son una herramienta de la ciencia de materiales que consisten de una pequeña cantidad de compuesto o compuestos químicamente definidos, que son depositados de forma controlada desde fase gaseosa o líquida sobre una superficie plana e inerte, también llamada *substrato sólido*. El depósito controlado y sobre diseño del material permite que además de la naturaleza química del sistema, se encuentren bien definidas su morfología y sus propiedades fisicoquímicas, lo que las vuelve útiles como unidades experimentales para estudios sistemáticos de interacción superficial, o para buscar nuevas aplicaciones nanotecnológicas, que no son posibles utilizando materiales heterogéneos, o de mezclas no definidas. Típicamente estas superficies tienen un grosor del orden de nanómetros ($1 \text{ nm} = 1 \times 10^{-9} \text{ m}$), por lo que se les conoce también como *películas delgadas*. La Figura 1 muestra un ordenamiento típico de estas superficies.

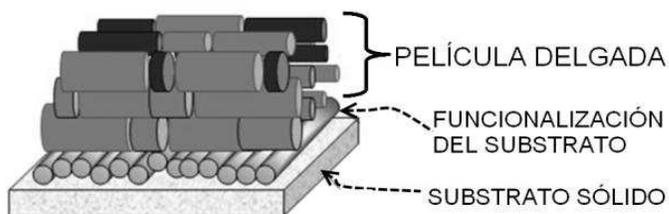


Figura 1. Ordenamiento típico de una película delgada. Una película delgada de moléculas es depositada sobre un sustrato sólido, que puede ser funcionalizado para aumentar la interacción entre las superficies.

La elección de la técnica de depósito se define en función de las propiedades de la molécula a depositar (composición, solubilidad, densidad, viscosidad, estabilidad, peso molecular), propiedades del solvente (volatilidad, miscibilidad, polaridad), características del medio (fuerza iónica, pH, campo magnético) y propiedades deseadas en la superficie (rugosidad, grosor). En general, el depósito se puede realizar desde fase gas (evaporación y sublimación en vacío, ablación laser),¹² en solución (autoensamblado por inmersión), o a partir de una solución (películas abiertas), depósito por giro (*spin coating*, en inglés), o por depósitos tipo Langmuir.¹³ Para estudiar su ordenamiento químico se utilizan técnicas espectroscópicas: Electrónica de Análisis Químico (EAQ), Fotoemisión de

rayos-X (FEX) e Infrarrojo por Transformada de Fourier (IR-TF). Su topografía (rugosidad, distribución de material, grosor) se estudia con Microscopía de Fuerza Atómica (MFA), mientras que para estudiar fuerzas de interacción se utiliza el Aparato de Fuerzas Superficiales (AFS) o MFA,¹⁴ la goniometría (medición de ángulos de contacto) se utiliza para estimar la energía libre de superficie, por otra parte, la Microbalanza de Cuarzo con Disipación (MBC-D) permite el estudio sistemático de grosor, adherencia, viscosidad y estabilidad de superficies modelo, así como las interacciones entre éstas superficies y otras moléculas.^{11,15}

5.2. BIOMASA

Los residuos agroindustriales contienen principalmente celulosa, hemicelulosa y lignina, mientras que las pulpas papeleras solo celulosa y lignina, los cuales son biopolímeros constituidos por monómeros fermentables y modificables químicamente,¹⁶ por lo tanto, es factible que a partir de estos materiales se puedan obtener biocombustibles y productos químicos en biorefinerías.¹⁷ La Tabla 1 muestra la composición típica de algunos recursos lignocelulósicos.

Fuente	Celulosa	Hemicelulosa	Lignina
Olote de maíz	45	35	15
Pastos	25-50	35-50	10-30
Papel	85-99	0	0-15
Cáscara de trigo	30	50	15
Residuos papeleros	60-70	10-20	5-10

Tabla 1. Composición de diversos recursos lignocelulósicos (porcentaje). Adaptada de ref. 18.

En la biomasa vegetal, el homopolímero celulosa se encuentra en formas cristalinas y amorfas, formando microfibras y fibras que dan las propiedades mecánicas a los tejidos. Por otra parte, la lignina y la hemicelulosa son heteropolímeros que forman estructuras amorfas ramificadas e irregulares. Estos tres polímeros están íntimamente ligados en la matriz de los tejidos vegetales. La Figura 2 muestra un esquema de la disposición de estos polímeros en la biomasa vegetal.

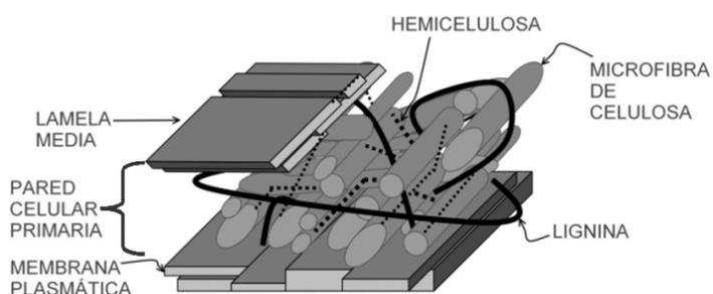


Figura 2. Disposición de los tres biopolímeros (celulosa, hemicelulosa y lignina) en los tejidos vegetales.

Esta estructura compacta y heterogénea genera la necesidad de someter la biomasa a un pretratamiento que separe e hidrolice estos componentes para poder obtener un beneficio de los monómeros que la constituyen.

5.3. PRETRATAMIENTOS A LA BIOMASA

Los pretratamientos a la biomasa lignocelulósica separan la lignina de la celulosa e hidrolizan la hemicelulosa, generando pulpa de celulosa con lignina residual, y también un “licor” con una cantidad mayoritaria de lignina fraccionada y extractivos, para ambas fracciones las propiedades fisicoquímicas dependen del proceso. Estos tratamientos se pueden categorizar en: (1) físicos (molienda, pirólisis), (2) químicos (alcalino, ácido, oxidante, explosión de amonio, con solventes orgánicos), (3) fisicoquímicos (vapor/autohidrólisis, hidrotermólisis, oxidación húmeda, explosión de vapor, explosión de CO₂), (4) eléctrico, (5) biológico, o una combinación de los anteriores, y su elección depende de la composición de la biomasa y de los subproductos obtenidos, que son factores asociados a los costos. El tratamiento ideal debería cumplir varios requisitos: (1) hidrólisis total de la hemicelulosa, (2) mejorar la formación de azúcares, o permitir la formación subsecuente de éstos mediante hidrólisis, (3) evitar la degradación o pérdida de carbohidratos, (4) evitar la formación de productos inhibitorios a los procesos de hidrólisis y fermentación subsecuentes, (5) generar fracciones de celulosa y lignina bien definidas y, (6) ser económico.¹⁸ El proceso químico-alcalino “kraft” (licor de cocción con 0.2 M de sulfuro de sodio y 1 M de hidróxido de sodio a 150-180° C, por más de una hora), es el proceso dominante a nivel mundial, pues ofrece un buen compromiso entre una alta cantidad de azúcares fermentables remanentes, hidrólisis prácticamente total de hemicelulosa, celulosa casi deslignificada y lignina libre de azúcares, por otra parte, también aumenta el área superficial de celulosa, por ello, aunque produce sulfuros, este proceso es el que presenta el mayor potencial como pretratamiento para el uso de biomasa vegetal en la producción de combustibles y productos químicos.¹⁹

Independientemente del tipo de pretratamiento, la hemicelulosa es hidrolizada prácticamente en su totalidad,¹⁸ por lo que solamente la celulosa y la lignina tienen relevancia durante los procesos fermentativos para producir energéticos y químicos. A continuación se presentan brevemente las características principales de estos dos biopolímeros.

5.4. CELULOSA

La celulosa es el polímero natural más abundante del planeta y es el componente principal de las maderas y muchas fibras vegetales como algodón, lino, caña, yute y agave, entre otros,²⁰ y es renovable fotosintéticamente con una biosíntesis de aproximadamente 1,000 toneladas a nivel mundial.²¹ Su estructura molecular fue determinada en la década de 1920,²² y se encontró que se trata de un homopolímero lineal conformado de unidades (1- α -4)- β -glucopiranosas, que polimerizada presenta tres grupos hidroxilo susceptibles de ser funcionalizados, y treinta unidades de este monómero son suficientes para representar la estructura y propiedades del polímero.²³ Su unidad repetitiva es el dímero celobiosa,²⁴ y el grado de polimerización es determinado por el número de anhidroglucosas sencillas con conformación de silla. Se considera que la cadena polimérica tiene dirección, porque algunos grupos no reductores terminan con una estructura de anillo cerrado, mientras que los grupos reductores con estructura alifática y con un grupo carbonilo están en equilibrio con hemiacetales. La Figura 3 muestra la estructura lineal de la celulosa. A un primer nivel, consiste de una cadena lineal de glucosa, con uniones de hidrógeno entre estas cadenas, formando una estructura tipo fibrilar.

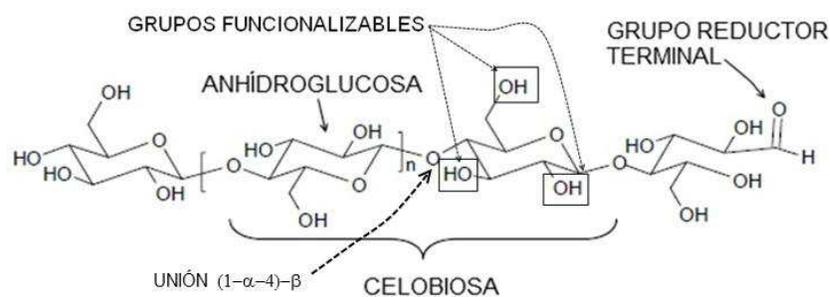


Figura 3. Estructura lineal de la celulosa. Adaptada de ref.23.

Su peso molecular en estado natural es de $570,000 \text{ g mol}^{-1}$,²⁵ y, en general, varía en función del pretratamiento deslignificante, para dar lugar a polímeros de peso molecular menor, entre $50,000$ y $100,000 \text{ g mol}^{-1}$.²⁶ Por otra parte, se conocen cuatro tipos distintos, o polimorfos supramoleculares de la celulosa. La tipo I es la forma encontrada en la naturaleza y la que tiene mejores propiedades mecánicas, se encuentra en forma de microfibras y nanofibras intermezcladas en la pared celular, con dominios nanocristalinos y regiones amorfas, y existe en las formas Ia y Ib.²⁷ La celulosa tipo II es la forma cristalina obtenida luego de una recristalización o de aplicar el tratamiento kraft a la tipo I, y es la forma cristalina más estable termodinámicamente. A nivel supramolecular

existen enlaces de puentes de hidrógeno característicos a cada tipo.²⁸ Así, la unión intramolecular principal en ambos polimorfos es la O3-H—O5. Sin embargo, la celulosa I tiene una unión intra-cadena O6-H—O3, mientras que la celulosa II la tiene en la posición O6-H—O2. La Figura 4 muestra la estructura de los polimorfos I y II.

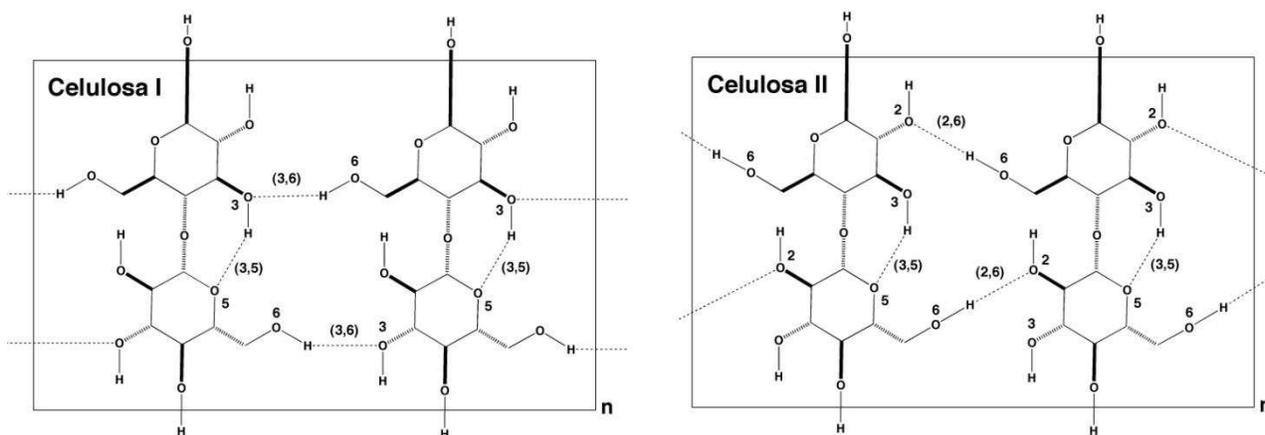


Figura 4. Polimorfos supramoleculares de celulosa. Adaptada de refs. 29 y 30.

Las celulosas III_i y III_{ii} se obtienen mediante tratamiento en amoníaco líquido de la celulosa I y II respectivamente, finalmente, la celulosa IV es el resultado de calentar la celulosa III.

5.5. LIGNINA

Luego de la celulosa, la lignina representa la macromolécula más abundante en los tejidos vegetales. Este biopolímero mantiene unidas a la celulosa y a la hemicelulosa, dando rigidez, flexibilidad y protección a la planta contra insectos y microorganismos.³¹ Por otra parte, también ayuda al transporte de agua en los tejidos.³² Su abundancia es de 27-33% en maderas blandas, 18-25% en duras y de 17-24% en pastos. Por otra parte, existen dos tipos de lignina, la nativa presente en las plantas, y distintos tipos de *ligninas técnicas*, aisladas luego de los pretratamientos, que son identificadas por la especie y técnica de aislamiento, por ejemplo la *lignina sauce-kraft*. La lignina se utiliza principalmente para la producción de vainillina sintética y dimetil sulfoxido (DMSO), en menor medida como agente dispersante, emulsificante y secuestrador (por ejemplo de poliaminocarboxilatos), y también como combustible para los procesos delignificantes, sin embargo, su uso es bajo en comparación con otros biopolímeros.³³ Su composición y su peso molecular varía en función de la especie y del tipo de pretratamiento delignificante, ya que fractura enlaces covalentes,^{34,35} lo cual modifica de forma muy importante algunas

propiedades fisicoquímicas de la lignina, como el peso molecular. La tabla 2 resume la diversidad de propiedades físicas para tres tipos de ligninas técnicas.

Propiedad	Tipo Kraft	Lignosulfonato	Organosolv
Peso molecular	2,000 - 3,000	20,000 - 50,000	< 1,000
Peso molecular promedio	180	215 - 254	188
Polidispersidad	2 - 4	6 - 8	2.4 - 6.4
Sulfonatos (meq/g)	0	1.25 - 2.5	0
Sulfuro orgánico (%)	1 - 1.5	4 - 8	0
Solubilidad	Soluble en álcalis (pH > 10.5)	Soluble en agua (cualquier pH), insoluble en orgánicos.	Insoluble en agua, soluble en álcali y en muchos orgánicos.

Tabla 2. Propiedades fisicoquímicas de algunas ligninas técnicas. Adaptada de ref. 33.

Además, el contenido de otros grupos funcionales también varía dependiendo del proceso de aislamiento, por ejemplo, la lignina aislada mediante métodos oxidativos (técnica organosolv con oxígeno) tiene más grupos carboxilo en su esqueleto que la extraída mediante métodos no-oxidativos con ácidos o alcoholes.

Con respecto a su estructura, aunque ésta es aleatoria y varía en función de la especie y pretratamiento, en general se trata de una red cruzada y ramificada de unidades fenilpropano, biosintetizadas por polimerización deshidrogenante de las unidades cinámicas, guaiacil y siringil.³⁵ La Figura 5 muestra los monómeros constituyentes de la lignina.

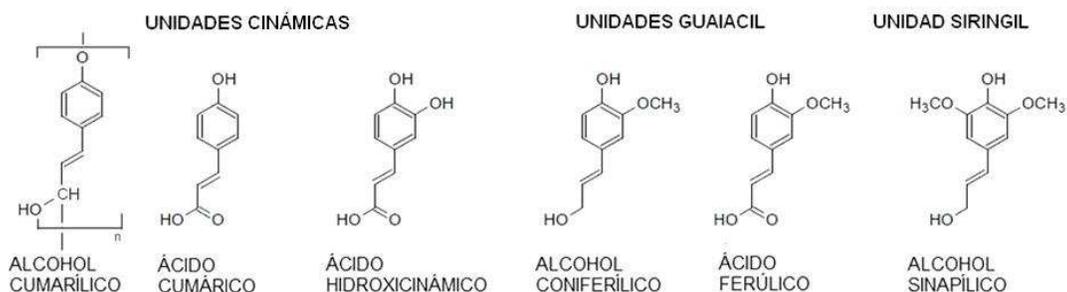


Figura 5. Monómeros fenilpropano de la lignina; La polimerización se da como se indica en el alcohol cumarílico. Adaptada de ref. 35.

Supramolecularmente los monómeros fenilpropano están unidos de forma entrecruzada mediante uniones C-C y C-O-C (ver Figura 6), formando muchas estructuras tridimensionales. En su forma natural la lignina está muy entremezclada, con al menos 11 tipos distintos de uniones formadas entre los monómeros que se dan con la variedad de planta de origen. En la lignina natural el tipo de unión predominante es β -O-4, presente hasta en un 58%, mientras que en las ligninas técnicas es menor, y varía según el

pretratamiento.³⁶ La lignina natural tiene menos grupos hidroxilo que la celulosa, es considerada hidrofóbica y en su estado natural es insoluble en todos los solventes comunes. Sin embargo, el proceso delignificante rompe los enlaces covalentes, solubilizando fracciones de bajo peso molecular,³⁷ que tienden a asociarse mediante uniones no covalentes hacia complejos de mayor peso molecular por la formación de muchos puentes de hidrógeno. Este proceso parece ser reversible y dependiente del solvente^{38,39} y del tipo de lignina.⁴⁰ La Figura 6 muestra un esquema de una posible estructura de la lignina.

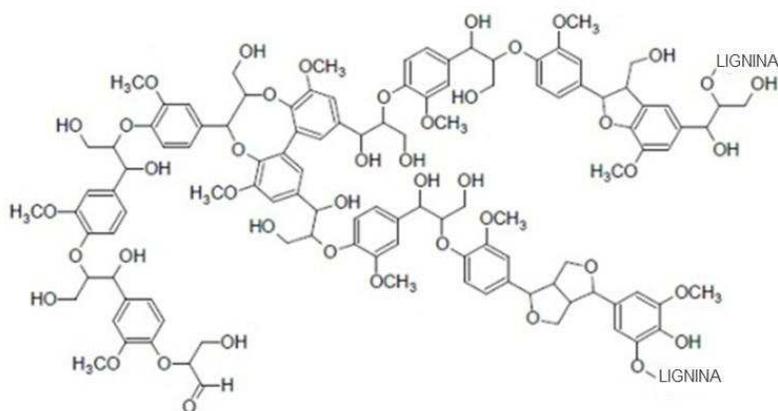


Figura 6. Posible estructura de la lignina. Las unidades fenilpropano se encuentran asociadas aleatoriamente. Adaptada de ref. 35.

Las estructuras que forman las ligninas en solución son partículas esféricas, impermeables al solvente y densamente empacadas, debido a la tendencia que presentan los grupos aromáticos a “apilarse”.⁴¹ Por otra parte, la estabilidad de soluciones diluidas depende de la alcalinidad, la fuerza iónica y la temperatura.^{35,42}

5.6. INVESTIGACIÓN CON MATERIALES LIGNOCELULÓSICOS EN INTERFASES Y SUPERFICIES

Se han realizado trabajos de investigación con superficies de celulosa o lignina con diversos fines, como son estudiar interacciones con polímeros y tintas en el contexto de la industria del papel, o también para entender su comportamiento en las plantas, y para buscar nuevas aplicaciones. Recientemente, el potencial de la biomasa para producir combustibles y químicos ha generado una serie de estudios de las interacciones de superficies con enzimas. En todos los casos, el uso de superficies modelo está justificado pues los fenómenos de interés son interfaciales, y no son posibles estudios sistemáticos de las interacciones presentes utilizando fibras y licores obtenidos de los pretratamientos delignificantes, debido a que su estructura y su comportamiento fisicoquímicos son

complejos. Utilizando superficies modelo es posible distinguir cuales aspectos de la estructura física y química de la superficie (cristalinidad, rugosidad, reactividad, etc) tienen un efecto sobre las interacciones observadas experimentalmente.

5.7. ESTUDIOS CON CELULOSA EN INTERFASES Y SUPERFICIES

Para realizar estudios en interfases y superficies con celulosa primero es necesario disolver éste biopolímero, el cual es insoluble en la mayoría de los disolventes orgánicos e inorgánicos comunes. Esta insolubilidad es debida al empaquetamiento cerrado con puentes de hidrógeno intra e intermoleculares que presenta la celulosa a nivel supramolecular.²³ Los solventes de celulosa se categorizan en no-funcionalizantes y en funcionalizantes, los primeros son sistemas que disuelven el polímero solamente mediante interacciones moleculares, pues causan una disolución física del polímero sin funcionalizar ningún grupo hidroxilo de la celulosa. Se dividen en sistemas acuosos y no acuosos, y en general requieren temperaturas elevadas (>100° C). Los solventes funcionalizantes son sistemas que destruyen la red de puentes de hidrógeno mediante la substitución de los grupos hidroxilo por otros radicales, generando derivados funcionalizados de celulosa que son solubles en solventes comunes. Los dos derivados de celulosa más utilizados son la carboximetilcelulosa (CMC, soluble en agua), y la trimetilsililcelulosa (TMSiC, soluble en solventes orgánicos).⁴³ Por otra parte, los líquidos iónicos, son una alternativa reciente, que también disuelven la celulosa sin la presencia de interacciones covalentes.⁴⁴

Respecto a estudios interfaciales, en 1929 se publicó el primer trabajo sobre películas de celulosa y derivados de celulosa en la interfase aire-agua.⁴⁵ Posteriormente, se utilizaron principalmente derivados de celulosa con diversos fines, como realizar estudios del comportamiento interfacial del biopolímero,^{46,47} estimar sus dimensiones,^{48,49} o para estudiar su interacción con otras moléculas.^{50,51}

Por otra parte, el primer trabajo descrito del uso de superficies modelo de celulosa en vez de materiales naturales data de 1969,⁵² en el cual se crearon superficies de celulosa regenerada a partir de derivados, y se estudiaron sus propiedades superficiales e hinchamiento. Sin embargo, no fue sino hasta la década de 1990 que Neuman⁵³ retoma la investigación con superficies de celulosa (sin modificar) en trabajos orientados al estudio de fuerzas superficiales. La investigación con superficies modelo de celulosa continuó desde entonces, y se han presentado diversas soluciones y métodos para su producción, como por ejemplo, utilizando ácido trifluoroacético (TFA),⁵⁴ el sistema n-

metilmorfolina n-óxido y dimetil sulfóxido (NMMO-DMSO),⁵⁵ y dimetilacetamida con cloruro de litio (DMA-LiCl).⁵⁶ Sin embargo estas metodologías implican condiciones ásperas. En el caso de derivados de celulosa, principalmente se han utilizado carboximetilcelulosa (CMC)⁵⁷ o trimetilsililcelulosa (TMSC) para generar superficies de celulosa, regenerándola a con vapores de ácido clorhídrico (HCl).⁵⁸

Las técnicas principales para producir superficies sólidas de celulosa o derivados, son los métodos de depósito Langmuir-Blodgett (LB) y Langmuir-Schaefer (LS), también depósito por giro (spin coating) y películas abiertas.⁶⁷ La tabla 3 muestra las ventajas y desventajas de las técnicas principales utilizadas para obtener superficies modelo de celulosa.

Superficie	Ventajas	Desventajas
Películas abiertas	Simple Equipo simple	Grosor no definido Superficie gruesa y rugosa
Langmuir-Blodgett / Langmuir-Schaeffer	Bien definidas Producidas a una presión superficial definida PERMITEN ESTUDIOS EN LA INTERFASE AIRE-AGUA	Tardadas Se desprenden en soluciones con surfactantes
Depósito por giro "spin coating"	Relativamente simple Grosor controlable Equipo simple	Ajuste del grosor complicado para superficies delgadas Es complicado identificar polímeros unidos a la celulosa

Tabla 3. Métodos de preparación de superficies de celulosa y sus características. Adaptada de ref.67.

Finalmente, las superficies modelo de celulosa se han utilizado como unidades experimentales para medir fuerzas entre superficies,^{59,60,54} para evaluar su fuerza de interacción en presencia de diversas moléculas^{61,62} y en estudios de la interacción de estas superficies con enzimas.^{63,64,65}

Como se observa, para generar superficies de celulosa o sus derivados, se requieren solventes y condiciones ásperas, o bien la funcionalización de la celulosa para lograr solubilizarla, lo cual genera películas que solamente son representativas de su estructura amorfa, por lo que no son modelos de las estructuras cristalinas de la celulosa.⁶⁶ Para mayor información se recomienda leer la revisión de Kontturi *et al*,⁶⁷ el capítulo inicial del libro "Model Cellulosic Surfaces",⁶⁸ así como el artículo de investigación descrito por Aulin *et al*,⁶⁹ donde compararon y estudiaron fisicoquímicamente, muchas de las metodologías conocidas para la producción de superficies modelo de celulosa.

5.8. ESTUDIOS CON LIGNINA EN INTERFASES Y SUPERFICIES

El primer trabajo descrito sobre lignina en la interfase aire-agua data de 1970,⁷⁰ posteriormente se han descrito estudios en la interfase para evaluar el efecto que tiene el método de extracción de ligninas sobre sus propiedades.^{71,72} Por otra parte, también se ha estudiado el comportamiento de compuestos fenilpropano modelo en esta interfase, como una primera aproximación a la compleja estructura de la lignina.^{73,74}

Utilizando superficies modelo de lignina se han descrito estudios orientados al método de producción y caracterización,⁷⁵ para evaluar la morfología de las superficies en función de métodos de extracción distintos,^{76,77} o incluso para buscar nuevas aplicaciones nanotecnológicas, como sensores.^{78,79} También se han utilizado para realizar estudios acerca de interacciones con polielectrólitos,^{80,81} y de autoensamblaje molecular.⁸² Para estos estudios, la lignina se ha disuelto de forma satisfactoria en acetona, N,N dimetilformamida, DMSO, dioxano e hidróxido de amonio (NH₄OH), etanol, THF y cloroformo (CHCl₃).

5.9. ESTUDIOS CON MEZCLAS LIGNOCELULÓSICAS

En otras áreas de investigación se han descrito estudios de estos dos biopolímeros mezclados, por ejemplo de estudios de mezclas en estado sólido,^{83,84,85} o estudios teóricos de simulación molecular de las interacciones entre ambos polímeros.^{86,87}

Estudios de tipo interfacial utilizando celulosa y lignina mezclados están plenamente justificados, pues después de los pretratamientos delignificantes, la precipitación de la lignina sobre las fibras de celulosa ocasiona que sus propiedades interfaciales dominen sobre la celulosa, debido a que se presenta una concentración de lignina más alta que en el bulto de la fibra.⁸⁸ Sin embargo no se han descrito estudios en interfases con estos compuestos mezclados, como es el caso del presente trabajo. Cuando se han utilizado ambos biopolímeros, se han utilizado de forma separada. Por ejemplo, en la interfase aire-agua está el trabajo descrito por Casilla,⁸⁹ o en superficies sólidas, están los trabajos de Notley,⁹⁰ quien presentó un estudio de las interacciones de superficies estos biopolímeros con electrólitos, o Saarinen,⁹¹ quien presentó estudios de adsorción de celulosa y lacasas sobre superficies de lignina y de un derivado de celulosa.

6

EXPERIMENTAL

6.1. MATERIALES

Se utilizaron compuestos comerciales; celulosa cristalina de alta pureza con un tamaño de partícula de 2 μm (\overline{M}_n Supuesto = 75,000 g/mol,⁹² Sigma-Aldrich, No. Cat. C4146-100G), lignina alcalina kraft con bajo contenido de sulfonatos, (\overline{M}_n = 10,000 g/mol, Sigma-Aldrich, No. Cat. 471003-100G), y D(+)-glucosa (99.5, GC, Sigma-Aldrich, No. Cat. 67528). Los solventes utilizados fueron cloroformo anhidro, (>99% de pureza), tetrahidrofurano (THF, $\geq 99.9\%$), dimetilsulfóxido (DMSO, $\geq 99.9\%$) y n-metilmorfolina-n-óxido (NMMO), todos del proveedor Sigma-Aldrich. Las Figuras 7 y 8 muestran las estructuras moleculares de los solventes utilizados, así como la del agente acoplante de tipo silano 3-aminopropiltrimetoxisilano (APTS), utilizado para la funcionalización del sustrato sólido.



Figura 7. Estructuras químicas de los solventes utilizados en este estudio; ordenados de mayor a menor polaridad de izquierda a derecha.

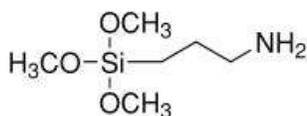


Figura 8. Estructura química del agente acoplante utilizado, 3-aminopropiltrimetoxisilano (APTS).

Los sustratos utilizados fueron superficies de sílica (SiO₂, dopado-*p*, capa de SiO₂ con grosor de ≈ 300 Å), obtenidas mediante el método de oxidación térmica, donadas por el Dr. Tommy Nylander, del Centro de Química e Ingeniería Química, del Departamento de Físicoquímica 1 de la Universidad de Lund, Suecia. También se usaron discos de cuarzo (corte-AT) con cubierta de SiO₂, (Q-sense, Suecia), de 0.3 mm de grosor, y un área activa (de SiO₂) de 19.63 mm²; frecuencia fundamental de resonancia $f_0 \approx 5$ MHz, y

constante de sensibilidad $C \approx 0.177 \text{ mg m}^{-2} \text{ Hz}^{-1}$ (para detalles consultar sección 6.2.5.2 Microbalanza de Cuarzo con Disipación).

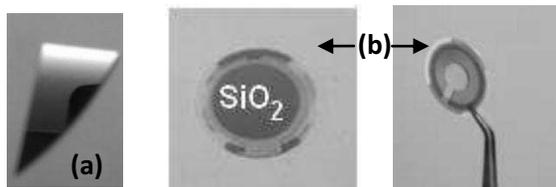


Figura 9. Substratos sólidos inertes utilizados. (a) Silica, (b) Disco de la microbalanza de cuarzo recubierto con SiO_2 (anverso y reverso).

6.2. MÉTODOS

6.2.1. SOLUBILIZACIÓN DE BIOPOLÍMEROS

Se examinó la solubilidad de los biopolímeros en tres tipos distintos de solventes, que presentan valores distintos de la constante dieléctrica y de poder acomplejante.⁹³ Debido a que la celulosa es insoluble en la mayoría de los solventes orgánicos comunes, se exploraron las alternativas para lograr su solubilización sin funcionalizar la molécula y sin utilizar condiciones ásperas. En este sentido, las técnicas sónicas posibilitan la solubilización de polímeros, concretamente se ha descrito la homogeneización de suspensiones de celulosa microfibrilar,⁹⁴ nanofibrilar⁹⁵ y nanocristalina.⁹⁶ Teniendo en cuenta lo anterior, se exploró el uso de un sonicador para solubilizar este polímero.

Para ambos biopolímeros se eligieron concentraciones iniciales para causar solubilización en condiciones de saturación. Para obtener celulosa en solución se utilizaron 100 mg de celulosa a 5 mL del solvente utilizado, mientras que para la lignina se utilizaron 20 mg en 20 mL de solvente. Para ambos biopolímeros se utilizaron dos estrategias de solubilización: (i) sonicación durante 40 minutos (sonicador Branson 1510, 47 kHz), y (ii) agitación a 1200 rpm durante 72hr a temperatura ambiente. Para el caso de la sonicación el cambio de temperatura fue de 25 a 32 °C aproximadamente. Una vez transcurrido el tiempo de sonicación o agitación se separaron los sólidos remanentes en los viales mediante filtración utilizando un filtro de 0.45 μm de diámetro de fluoruro de polivinilideno (PVDF, Millipore), como se observa en la Figura 10.

Las soluciones obtenidas (con concentración desconocida), fueron utilizadas en pruebas preliminares en la interfase aire-agua y con espectroscopias de infrarrojo por transformada de Fourier y ultravioleta visible (ver apartado 6.2.6. para detalles de estas técnicas). Una vez definido el solvente en el cual se lograba mayor solubilidad y que era capaz de formar películas en la interfase aire-agua, se determinó gravimétricamente (por diferencia de peso) la concentración de las soluciones de celulosa y lignina.

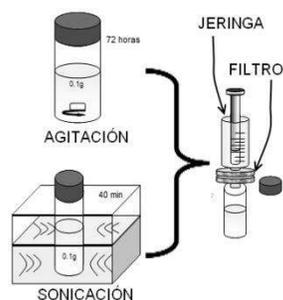


Figura 10. Estrategias de solubilización de biopolímeros utilizadas.

6.2.2 PELÍCULAS DE LANGMUIR

Benjamin Franklin fue el primer científico en interesarse en las películas que el aceite forma en la interfase aire-agua.⁹⁷ Posteriormente, Irving Langmuir concluyó una serie de trabajos sistemáticos con películas de moléculas anfifílicas en esta misma interfase, que confirmaron que estas películas -llamadas posteriormente películas de Langmuir- tienen espesor monomolecular y una orientación definida en la interfase. Además, esos trabajos apoyaron la hipótesis de las interacciones de corto alcance.⁹⁸

Las monocapas de Langmuir son películas de una molécula de grosor de un compuesto orgánico insoluble que es dispersado sobre una subfase acuosa. Tradicionalmente los compuestos utilizados para obtenerlas son anfifílicos, moléculas que están compuestas por una parte hidrofílica, como los grupos hidroxilo o carboxilo, y una parte hidrofóbica, típicamente una cadena alifática, este equilibrio hidrofóbico/hidrofílico permite la formación de monocapas. Sin embargo, posteriormente se han utilizado muchos compuestos para producir este tipo de películas, como son compuestos semi-anfifílicos, o macromoléculas, como polímeros y proteínas, los cuales en algunos casos no tienen grosor monomolecular. Cuando una molécula se disuelve en un solvente volátil y se esparce en la superficie de un líquido polar, el solvente se evapora dejando estas moléculas en la interfase aire-agua con una orientación particular en función de su carácter hidrofóbico o hidrofílico. Por otra parte, una película superficial solo se producirá si la molécula particular tiene la tendencia a permanecer en la interfase, ya sea por tratarse de una molécula anfifílica, o por ser insoluble en el agua.

Los fenómenos que ocurren en la interfase aire-agua se estudian determinando en distintas condiciones el valor de la energía libre superficial, llamada también tensión superficial (γ), y evaluando visualmente la morfología de la interfase, por ejemplo con microscopía de ángulo de Brewster (ver apartado 6.2.2.3. para detalles). Ambos parámetros son estudiados cuando el sistema está en equilibrio (modo estático) o en

función del tiempo (modo dinámico); tanto la morfología como la tensión superficial son características de los distintos compuestos que forman las películas en la interfase.

6.2.2.1 TENSIONOMETRÍA

En la interfase gas-líquido, a temperatura, presión y número de moles constantes la tensión superficial representa el cambio de la energía libre de Gibbs con respecto al cambio de área superficial, y se mide con un dispositivo llamado tensiómetro, que utiliza un sensor en contacto con la interfase aire-agua. Existen varios tipos de sensores y de distintos materiales y geometrías, como el Plato de Wilhelmy, el anillo de Du Noüy, o en forma de barra. En la Figura 11 se muestra un sensor tipo plato de Wilhelmy en la interfase aire-agua.

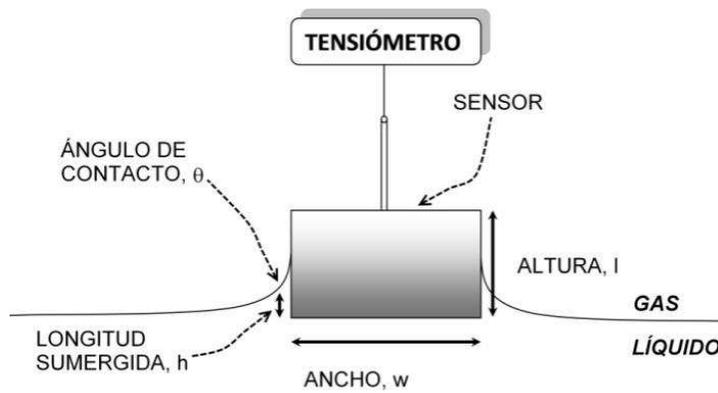


Figura 11. Sensor de tensión superficial (plato de Wilhelmy) en la interfase gas-líquido.

En la Figura 11 se observan las fuerzas que actúan sobre el sensor: su peso, el empuje que ejerce el bulto del líquido sobre la parte sumergida de éste y la tensión superficial del líquido. Si las dimensiones del sensor son $l \cdot w \cdot t$ (altura*ancho*grosor), y se encuentra sumergido una longitud h , entonces la fuerza total es:

$$\begin{aligned}
 \mathbf{FUERZA} &= (\rho_s g l w t) - (\rho_L g h w t) + 2(w + t) \cdot (\gamma) \cdot \cos\theta \quad \text{--- (1)} \\
 (\mathbf{FUERZA} &= \mathbf{PESO} - \mathbf{EMPUJE} + \mathbf{TENSIÓN SUPERFICIAL})
 \end{aligned}$$

donde ρ_s es la densidad del sensor, ρ_L es la densidad del líquido, γ es la tensión superficial del líquido, θ es el ángulo de contacto del líquido sobre el sensor y g es la aceleración de la gravedad. Si se coloca el sensor minimizando el ángulo de contacto, entonces $\theta \rightarrow 0$, y

$$\mathbf{FUERZA} = 2\gamma(w + t) \quad \text{--- (1b)}$$

Bajo estas condiciones, la única fuerza que actúa sobre el sensor es la debida a la tensión superficial en la interfase, y entonces la tensión superficial queda definida como:

$$\gamma = \text{FUERZA} / 2(w + t) \quad \text{--- (2)}$$

Donde el término “fuerza” corresponde a la lectura instrumental, la cual es dividida entre un término geométrico que depende del tipo de sensor, siendo por ejemplo $\gamma = \text{Fuerza} / 2\text{Diámetro}$ para el caso de un sensor cilíndrico. Por otra parte, otro tipo de estudios en la interfase aire-agua consisten en estudiar los cambios en la tensión superficial debidos a cambios en el área, y para realizar este tipo de experimentos de forma controlada se requiere de un dispositivo conocido como palangana de Langmuir.

6.2.2.2. PALANGANA DE LANGMUIR

El equipo conocido como palangana de Langmuir es un recipiente de un material inerte, típicamente politetrafluoretileno (teflón) y en algunos otros casos de vidrio de borosilicato, con barreras móviles que permiten modificar el área superficial en forma controlada, los cambios en la tensión superficial ocasionados por el cambio en el área interfacial son registrados con un tensiómetro. La palangana se llena con una subfase acuosa, típicamente agua, pero se pueden utilizar distintas soluciones en función del experimento a realizar. La calidad del agua usada como subfase es crítica, pues aún trazas de contaminantes pueden afectar dramáticamente las propiedades superficiales de la película. Por ejemplo, iones metálicos pueden unir a las moléculas, ó impurezas orgánicas pueden reducir la tensión superficial del agua, con lo que se modifica la estructura de la película y por lo tanto las mediciones obtenidas. Por ello una subfase acuosa debe tener un alto grado de pureza, con un valor de tensión superficial cercano al teórico para el agua (72.8 mN/m, a 20 °C), para lograr esto se utiliza un sistema de ultra purificación basado en una combinación de cinco diferentes tecnologías (foto oxidación por luz ultravioleta, ósmosis inversa, adsorción orgánica, intercambio de iones y ultra micro filtración) que permiten producir agua con un valor de resistividad muy cercano al teórico ($\geq 18 \text{ M}\Omega/\text{cm}$).⁹⁹ La temperatura de la subfase acuosa se controla mediante una tubería interna por la que se hace pasar un fluido a temperatura definida. La Figura 12 muestra un esquema de los componentes de este equipo.

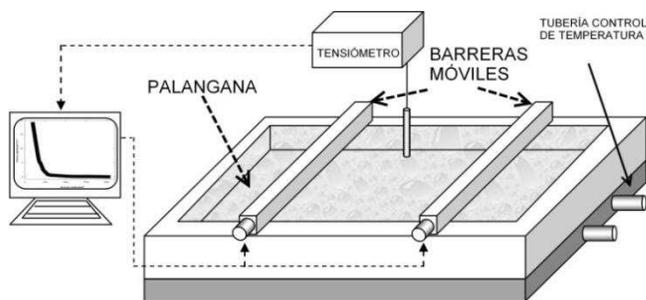


Figura 12. Componentes de una palangana de Langmuir. Las barreras móviles modifican el área de la interfase aire-agua, un tensiómetro registra los cambios de tensión superficial. Un software registra las lecturas del tensiómetro y modifica el área superficial.

El disolvente que se utiliza para esparcir las moléculas en la interfase debe cumplir varios criterios: (i) tener una solubilidad baja en el agua, (ii) ser inerte a las moléculas disueltas y (iii) ser volátil, para que después de esparcirse sólo quede la molécula de interés en la interfase. Algunos disolventes que se suelen utilizar son hexano, ciclohexano (con solubilidades $< 0.1 \text{ g}/1000 \text{ g H}_2\text{O}$), tolueno ($1.5 \text{ g}/1000 \text{ g H}_2\text{O}$) y cloroformo ($8 \text{ g}/1000 \text{ g H}_2\text{O}$). En algunos casos se utilizan pequeñas porciones de un co-solvente, por ejemplo etanol, para aumentar la disolución del compuesto.

Una vez que el disolvente se evapora, se genera una película de Langmuir la cual puede ser comprimida o expandida modificando su área accesible con las barreras móviles de la palangana, generando un cambio en la tensión superficial que generalmente se expresa utilizando el término de *presión superficial* (Π):

$$\Pi = \gamma_0 - \gamma \quad \text{---(3)}$$

donde γ_0 es la tensión superficial del agua, y γ es la tensión superficial resultante de un cambio de área superficial, tanto la tensión superficial como la presión superficial tienen unidades de Fuerza/Área. Cuando se reduce el área interfacial, a temperatura constante, la densidad superficial de las moléculas aumenta, γ disminuye y Π aumenta, generando una *isoterma de presión superficial o isoterma de Langmuir* (ver Figura 13). Esta isoterma muestra la variación de la presión superficial con respecto al área. Si se conoce el número de moléculas en la interfase, es posible generar una *isoterma de presión superficial vs área molecular* (Π -A) y se puede relacionar la presión superficial con el área ocupada por una molécula del compuesto esparcido en la interfase. Cuando se conoce el peso molecular del compuesto esparcido, el número de moléculas en la interfase se puede estimar a través de la siguiente ecuación:

$$\text{No. de moléculas} = \frac{V C N}{P M} \quad \text{---(4)}$$

Donde V es el volumen (mL) y C la concentración (mg mL^{-1}) de la solución depositada sobre la interfase, N es el número de Avogadro (moléculas $\text{g}_{\text{mol}}^{-1}$) y PM es el peso molecular del compuesto ($\text{g g}_{\text{mol}}^{-1}$).

Inicialmente, cuando la película se esparce en la superficie de agua y no se le ha aplicado ninguna presión lateral, las moléculas se comportan como un gas bidimensional, al ir comprimiendo gradualmente la película, su estructura se vuelve más ordenada y el comportamiento molecular corresponde al de un líquido bidimensional, si aun se reduce más el área molecular, la monocapa actúa como un *cuasi sólido* con un comportamiento lineal entre la presión superficial y el área molecular. Es por esto que las isothermas Π - A son una analogía en dos dimensiones de una isoterma presión-volumen (P - V), pues en el plano 2D también existen fases, conocidas como gaseosa (G), y condensada, subclasificada a su vez como líquido expandido (LE), líquido condensado (LC) y sólido (S).¹⁰⁰ El paso de una fase a otra se conoce como *transición de fase*,¹⁰¹ por otra parte, la coexistencia de fases es distinguible como regiones con pendiente ≈ 0 . Las isothermas Π - A permiten también conocer cuantitativamente el valor de área molecular específica (A_E), extrapolando hasta $\Pi=0$ la región de mayor pendiente de la isoterma. También permiten visualizar la llamada presión de colapso (Π_C), distinguible como un máximo que indica la salida abrupta de material del plano 2D. Por otra parte, la forma de la isoterma Π - A (secuencia de fases y transiciones) es característica al compuesto que forma la película. En la Figura 13 se observa una serie de isothermas Π - A y la información que contienen.

La *compresibilidad* de una película de Langmuir es análoga a la compresibilidad de los gases, y está definida como:

$$C = -\frac{1}{A} \left(\frac{dA}{d\Pi} \right)_T \quad \text{---(5)}$$

donde C es la compresibilidad de la película interfacial (m N^{-1}); A es el área molecular (Å^2), y Π la presión superficial (mN m^{-1}). El valor en la compresibilidad sigue la secuencia $G > LE > LC > S$. El análisis de la compresibilidad puede dar información acerca de características termodinámicas y estructurales, como la determinación del ordenamiento estructural y sus cambios en las transiciones de fase. El recíproco de C , conocido como el módulo de compresibilidad superficial (K [=] N m^{-1}) es típicamente utilizado para caracterizar las películas de Langmuir, pues su valor se puede obtener directamente del valor de la pendiente de la región condensada de la isoterma Π - A :

$$K = \left(\frac{1}{c}\right) = -A \left(\frac{d\Pi}{dA}\right)_T \quad \text{---(6)}$$

Para evaluar la estabilidad de una película de Langmuir, se realizan rutinas de compresión-expansión-compresión, pues si se observa histéresis en la recompresión, se puede atribuir a un reacomodo de las moléculas en el ciclo de compresión-expansión. Este reacomodo puede correlacionarse con un cambio en la entropía de la película adyacente a la interfase aire-agua,¹⁰² a la pérdida de material en el plano 2D por formación de agregados o por solubilización en la subfase.¹⁰³ Sin embargo, también puede deberse al movimiento del sensor ocasionado por películas rígidas.¹⁰⁴

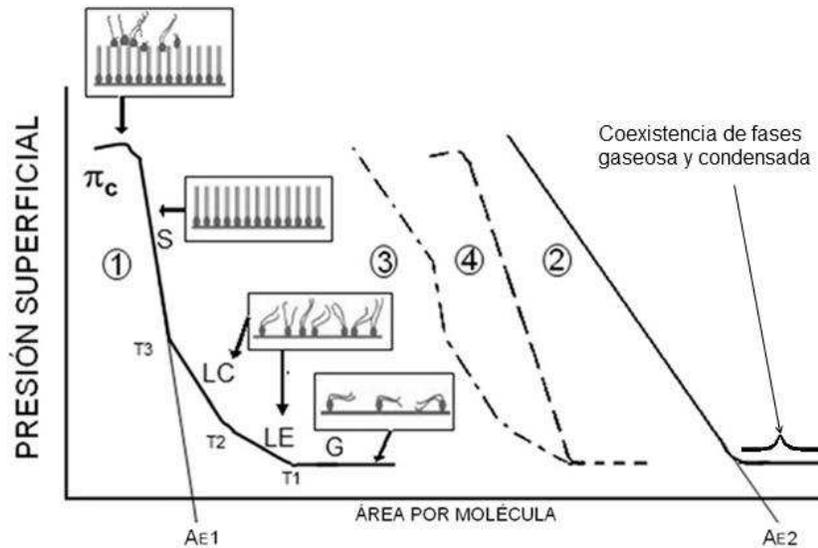


Figura 13. Isotermas II-A. En la isotermia 1 se observan las fases gaseosa (G), líquido expandido y condensado (LE, LC) y sólido (S), así como su área específica (A_{E1}), las transiciones de fase (T1-T3) y la presión de colapso (Π_c). La isotermia 2 corresponde a un compuesto con área específica A_{E2} , y solo una transición de fase. Las isotermias 3 y 4 corresponden a dos posibles comportamientos de mezclas de estos dos compuestos. La primera implica fuerzas repulsivas, con transiciones de fase independientes y conservando los valores de los módulos compresionales; la segunda implica la cohesión de ambos componentes de la mezcla en la interfase, con distinto número de transiciones y compresibilidad.

La estabilidad *dinámica* de las películas de Langmuir en función del tiempo se estudia analizando las llamadas *curvas de relajación*, siguiendo ya sea cambios en la presión superficial a área constante, o cambios en el área interfacial a presión constante. Con ayuda de las isotermias II-A también se puede estudiar la interacción de dos compuestos en el plano 2D, en este caso, si las transiciones de fase y compresibilidades individuales se mantienen en la mezcla, no hay miscibilidad de los compuestos y se habla entonces de una mezcla ideal. Por otra parte, si hay cambios en compresibilidad y

transiciones de fase, se puede hablar de miscibilidad en los compuestos, pues generan una película con propiedades diferentes a los compuestos individuales.¹⁰⁵

METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

En este trabajo las películas de Langmuir se obtuvieron con una palangana de Langmuir modelo Minimicro (KSV Instruments, ver Figura 14) con un área de 100 cm² y un volumen de subfase de 40 mL más 8 mL en el pozo para depósitos. Se utilizó un sensor de platino tipo barra (3.25 diámetro, 0.91 mg) con una resolución de 0.01 mN/m. Para controlar la temperatura se usó un baño recirculador con mezcla etilenglicol-agua 40 % v/v. Para generar isothermas Π -A, las barreras y la palangana se limpian mecánicamente con etanol y cloroformo respectivamente, utilizando un paño (que no raye la superficie y que tampoco libere partículas); posteriormente se deja evaporar el solvente y finalmente se llena la palangana con agua ultrapura (Millipore, resistividad \geq a 18 m Ω /cm). Posteriormente, el sensor de platino se calienta en el mechero al rojo vivo durante unos segundos para evitar la contaminación de la interfase, y una vez que se enfría se coloca de modo que no quede inmerso en la subfase acuosa. La interfase se limpia aspirando con una punta de plástico y cuando durante una compresión el valor de $\Pi \leq 0.2$ mN/m se considera que la interfase se encuentra limpia.

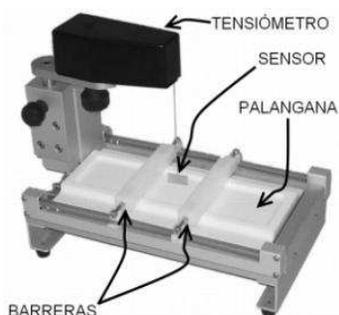


Figura 14. Palangana de Langmuir Minimicro, KSV. (Con plato de Wilhelmy).

La solución del biopolímero particular se gotea sobre la interfase aire-agua con una microjeringa graduada, y se permite la evaporación del solvente durante 15 minutos. La evaporación se puede verificar como una presión superficial constante y que, por lo general, es cercana a cero dado que se suele esparcir a áreas correspondientes a la fase gaseosa. Una vez que se tiene una película interfacial en equilibrio, se procede a reducir el área superficial mediante el movimiento de las barreras a una velocidad particular de

forma constante, a la par el equipo registra los cambios en presión superficial, generando una isoterma de presión superficial.

Las curvas de relajación a presión superficial constante se obtienen programando al equipo para reducir el área interfacial hasta alcanzar una presión de superficie determinada, momento en el cual comienza a registrar el cambio en área superficial necesario para mantener la presión superficial constante.

6.2.2.3. MICROSCOPIA DE ÁNGULO BREWSTER

El microscopio de ángulo de Brewster (MAB) es una técnica desarrollada y descrita independientemente por Hénon y Meunier¹⁰⁶ en Francia, y por Honing y Mobius¹⁰⁷ en Alemania; se trata de una microscopía óptica-polarizada, que permite el estudio *in situ* de la calidad y anisotropía de una película en la interfase aire-agua, con una resolución del orden de micrómetros ($1 \mu\text{m} = 1 \times 10^{-6} \text{ m}$), sin la necesidad de utilizar sensores o marcadores moleculares, que pueden modificar la fisicoquímica de las películas estudiadas.

En este equipo sólo se registra una imagen si existen moléculas en la interfase, y su principio de funcionamiento es el siguiente: cuando se hace incidir un haz de luz polarizado sobre una interfase aire-agua limpia hay reflexiones, pero si el haz de luz se polariza en un ángulo de incidencia $i=53.1^\circ$ (ángulo de Brewster) con respecto a la normal (llamada polarización p) todo el haz de luz es transmitido, sin producirse reflexión. Cuando se esparce una molécula en la interfase aire-agua se forma una nueva interfase, por lo que el ángulo Brewster disminuye ligeramente, entonces, si se mantiene el ángulo de incidencia parte de la luz se refleja debido a la película esparcida. La reflectividad de una interfase en el ángulo de Brewster para un haz p-polarizado se debe a el grosor de la interfase, a su rugosidad y a la anisotropía de la película formada,¹⁰⁶ si la luz reflejada es recogida por una cámara, es posible observar directamente la morfología de la película durante su proceso de formación. La cámara percibe distintas tonalidades en función del grosor o “altura” que tiene la película interfacial, en general tonalidades más claras implican películas más gruesas. La Figura 15 muestra un esquema de este dispositivo y su principio de funcionamiento.

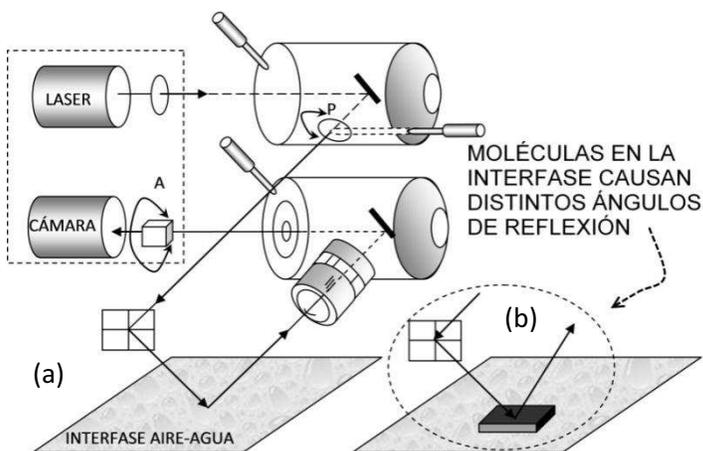


Figura 15. Principio de MAB. (a) La luz polarizada con ángulo de Brewster sale del polarizador (P) y no produce una reflexión al incidir en la fase acuosa limpia. (b) La presencia de moléculas en la interfase producen un cambio con respecto al ángulo de Brewster y la reflexión correspondiente visible a un lente óptico. Distintas cantidades de material en la interfase producen distintos ángulos de reflexión, que la lente percibe como tonalidades distintas. El dispositivo se enfoca con el nivel de la subfase o con el ajustador (A). Adaptada de manual BAM1.

El análisis visual de la película aporta información acerca su organización molecular, pues la luz reflejada en un MAB detecta cualquier cambio en el índice de refracción de la interfase aire-película-agua y esto puede ser utilizado para observar y estudiar en tiempo real algunos aspectos de una película interfacial como son: homogeneidad, defectos, separación de fases, transiciones de fase, orientación, tamaño y morfología de los dominios, anisotropía, adsorción a partir de la subfase, etc. con una alta sensibilidad en la detección de dominios y estructuras, además, la isoterma Π -A y las imágenes MAB se obtienen simultáneamente, lo que permite correlacionar la información.

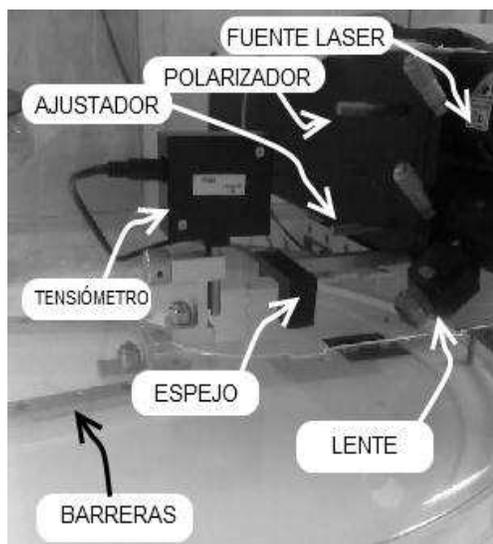


Figura 16. Palangana de Langmuir con el microscopio BAM1.

METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

Las observaciones por MAB presentadas en esta tesis se realizaron en una palangana de Langmuir (TKB 2410A, Nima Technology LTD, Inglaterra), con un

microscopio BAM1 plus (Nanofil Technologie GMBH, Alemania, Figura 16), que tiene una resolución espacial de $4\mu\text{m}$, la interfase es iluminada en el ángulo de Brewster ($\sim 53^\circ$) con un haz de un laser de He-Ne polarizado (632.8 nm), en un área de $\sim 800\ \mu\text{m}^2$. Un microscopio recibe el haz reflejado, que es analizado por un analizador de polarización, y la señal es recibida por una cámara de video para generar una imagen de la película interfacial.

6.2.3. PRODUCCIÓN DE SUPERFICIES HIDROFÓBICAS

Para lograr una mayor interacción entre la celulosa y la silica (SiO_2), es necesario utilizar un agente funcionalizante de anclaje,⁶⁹ por ello en este trabajo primero se produjeron superficies hidrofóbicas mediante la funcionalización de los substratos de silica.

6.2.3.1. LIMPIEZA Y ACTIVACIÓN DE LA SUPERFICIE DE SILICA

La silica (SiO_2) es uno de los materiales más comunes en el planeta, se le clasifica como un adsorbente de óxidos, y es ampliamente utilizada en la ciencia de materiales debido a su reactividad química. Por otra parte, sus propiedades superficiales son importantes en otros muchos campos, como catálisis, química de suelos y cromatografía. La silica se puede preparar por distintos métodos, y sus propiedades están en función del método de obtención. La adsorción y otras propiedades de las silicas, dependen de sus grupos hidroxilo ($-\text{OH}$) superficiales,¹⁰⁸ por otra parte, la densidad superficial de estos grupos es conocida como el *número silanol* (α_{OH}), el cual varía en función de la temperatura y los distintos tratamientos para modificar su concentración, y no depende significativamente del tipo de silica utilizada.¹⁰⁹ Modificando el número silanol es posible cambiar substancialmente las propiedades superficiales de SiO_2 , pues la reactividad de estas superficies cambia dramáticamente entre la fase deshidroxilada, llamada siloxano (Si-O-Si), la cual es muy inerte, y la superficie de silanol hidratada (SiOH), con grupos $-\text{OH}$ químicamente reactivos. Sin embargo, esta transición de siloxano a silanol, llamada rehidroxilación ($\text{Si-O-Si} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow 2\text{SiOH}$), ya sea con vapor de agua o en solución, es un proceso muy lento y poco favorable, que puede ocurrir en horas o días. Para obtener una rehidroxilación completa en un tiempo menor, se ha descrito el uso de descargas de plasma o de ultravioleta en cámaras de alta presión.¹¹⁰ Bajo estas condiciones, los radicales $\bullet\text{OH}$ y $\bullet\text{O}$ tienen una alta energía que les permite reaccionar con las superficies deshidratadas de silica, ocasionando que los sitios del llamado puente siloxano se

fracturen por la unión de radicales $\bullet\text{OH}$ y $\bullet\text{H}$, formando los grupos SiOH , e hidroxilando completamente la superficie de SiO_2 . La Figura 17 muestra una representación de la activación de la superficie de silica.

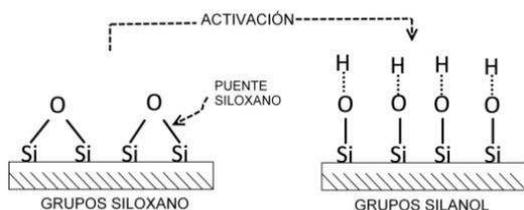


Figura 17. Activación de la superficie de silica.
Adaptada de ref. 110.

METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

Para limpiar y activar las superficies de SiO_2 primero se limpian según un método descrito previamente,¹¹¹ el cual consiste en sumergir la superficie en una mezcla de hidróxido de amonio (NH_4OH), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y agua en proporción 1:1:5 a 85° Celsius durante 5 minutos, y posteriormente en una mezcla de ácido clorhídrico (HCl) al 37%, peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y agua en proporción 1:1:5 a 85° C durante 5 minutos. Luego de esta limpieza química se enjuaga con agua, metanol y cloroformo consecutivamente. Posteriormente, las superficies se limpian y activan en una cámara de limpieza por plasma a vacío (Plasma cleaner, Harrick Scientific Corporation, Figura 18), con una potencia de 30 W durante 15 minutos, con aire (0.1 mbar); cuando la presión es la adecuada, la cámara muestra un color azul-violeta.

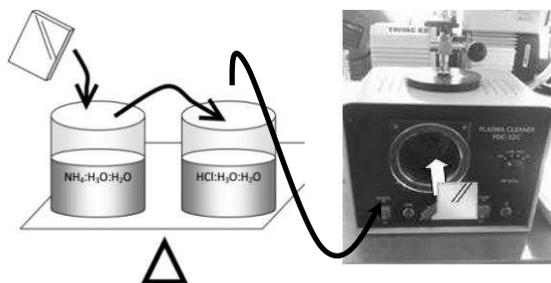


Figura 18. Procedimiento de limpieza/activación de las superficies de SiO_2 .

6.2.3.2. FUNCIONALIZACIÓN DE SUPERFICIE DE SILICA

Para funcionalizar una superficie se utilizan (entre otras técnicas) los llamados *agentes acoplantes*. Entre estos, los silanos son ampliamente utilizados para modificar superficies,^{112,113} pues se pueden aplicar métodos de autoensamblaje sobre superficies como silica, vidrio y óxidos de metal, donde los hidroxilos superficiales pueden reaccionar con los grupos activos de este agente acoplante, típicamente grupos *metoxi-* o *cloro-*

silano. Los agentes acoplantes silanos más sencillos tienen un solo grupo reactivo, y forman una unión sencilla Si-O-Si con la superficie,¹¹⁴ mientras que los silanos bi y tri funcionales generan mecanismos más complejos, ofreciendo la posibilidad de múltiples uniones con la superficie y también la polimerización lateral entre silanos adyacentes; por ejemplo, los *trimetoxisilanos* reaccionan espontáneamente con los grupos hidroxilo de las superficies, de modo que se forman capas autoensambladas^{115,116} bien alineadas.^{117,118} Este tipo de arreglos ordenados son deseados en distintas aplicaciones, pues generan superficies planas homogéneas y definidas. Se sabe que las condiciones de reacción, como temperatura, contenido de agua, naturaleza del silano, y tipo de sustrato tienen influencia en la tasa de reacción y la estructura formada,^{117,119} y se han realizado numerosos esfuerzos para dilucidar y optimizar los factores que afectan la silanización y formación de monocapas. En la Figura 19 se muestra un esquema de la silanización de la superficie de sílica.

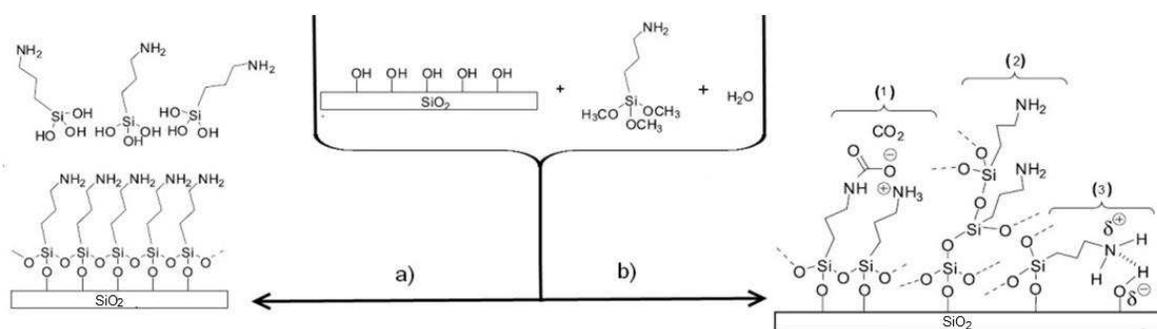


Figura 19. Mecanismos en la silanización de la superficie de sílica. (a) Depósito ideal, (b) Distintos posibles mecanismos de formación de películas agregadas. El número de grupos funcionales amino (-NH₂) es menor en la superficie b), sin embargo sigue teniendo un carácter hidrofóbico. Adaptada de ref. 121.

METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

En este trabajo se decidió utilizar el agente acoplante silano trifuncional 3-aminopropil-trimetoxisilano (APTS) por la tendencia que presenta a formar capas autoensambladas sobre superficies hidroxiladas. Esto permite modificar el carácter hidrofílico de la sílica por un comportamiento hidrofóbico, adecuado para realizar depósitos de celulosa y lignina. Para silanizar la superficie de sílica activada, se evaluaron dos metodologías descritas en la literatura: (i) sumergiendo directamente las superficies activadas en el bulto de soluciones de silanos en solventes aromáticos,^{120,121} y depositando el agente silano desde fase gas.^{122,123} Además se evaluó la técnica de realizar depósitos de tipo Langmuir-Blodgett (LB, detalles en la sección 6.2.4. de esta tesis) en la palangana de Langmuir.

Para las técnicas en bulto y depósitos LB se preparó una solución al 1% de APTS en tolueno anhidro (Sigma). Por otra parte, para realizar el depósito en bulto se sumerge la superficie de sílica en la solución APTS-tolueno durante 30 minutos y posteriormente se remueve el exceso con tolueno y se seca en la estufa a 60° C durante 15 minutos. Para el depósito LB se gotean 50 μL de solución en la interfase aire-agua y se realiza una emersión del substrato a 3 mm min^{-1} a una presión constante de 10 mN m^{-1} (ver apartado 6.2.4). Para el depósito desde fase gas, se colocan las superficies y un vaso de precipitado con APTS en un desecador y se hace vacío durante 15 minutos con una bomba de vacío (Felisa, FE-1500) a 1 Torr, dejando el sistema sellado durante toda la noche; posteriormente las superficies ya silanizadas son enjuagadas con agua y metanol, secadas con N_2 . Finalmente, las superficies son calentadas a 130° C durante una hora en un horno, para promover la formación de enlaces covalentes entre la sílica y el APTS. En todos los experimentos las superficies silanizadas fueron utilizadas inmediatamente después de su obtención. En la Figura 20 se muestran estos dos procedimientos de depósito de APTS.

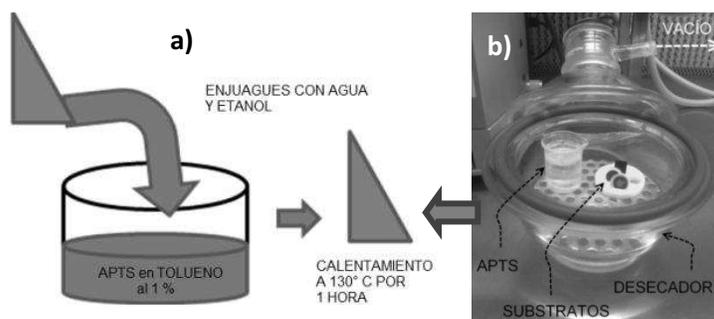


Figura 20. Procedimiento de silanización de superficie de sílica. (a) en solución, (b) por evaporación en vacío. En ambos casos se da un tratamiento térmico al final.

6.2.4. PRODUCCIÓN DE SUPERFICIES MODELO

Bajo la dirección de Irving Langmuir, Katherine Blodgett transfirió monocapas de ácidos grasos desde la interfase aire-agua sobre soportes sólidos, como vidrio hidrofílico.¹²⁴ A éste tipo de depósito se le llamó Langmuir-Blodgett (LB). Con ésta técnica se han ensamblado películas delgadas de forma controlada desde la década de 1960.¹²⁵ Actualmente es una herramienta útil para producir este tipo de superficies para aplicaciones en óptica no lineal, sensores, electrónica molecular, fotocromismo, y superficies modelo.¹²⁶ Para realizar un depósito LB primero se coloca un substrato sólido perpendicular a la película interfacial, y se realiza el depósito mediante su inmersión ó emersión a velocidad controlada, con ayuda de un brazo mecánico. Si la afinidad del substrato por las moléculas de la película es la adecuada, éstas se depositan sobre el

substrato. Debido al depósito del material, la presión superficial disminuye, y para mantenerla constante área interfacial se reduce con las barreras (mecanismo de retroalimentación). Varias capas pueden ser transferidas mediante inmersiones y emersiones sucesivas. En multidepósitos, las interacciones moleculares en el primer depósito pueden ser muy distintas de las que ocurren en los siguientes,¹²⁶ y este aspecto debe ser considerado en la formación de las superficies. La Figura 21 muestra una rutina de depósito LB por emersión del substrato.

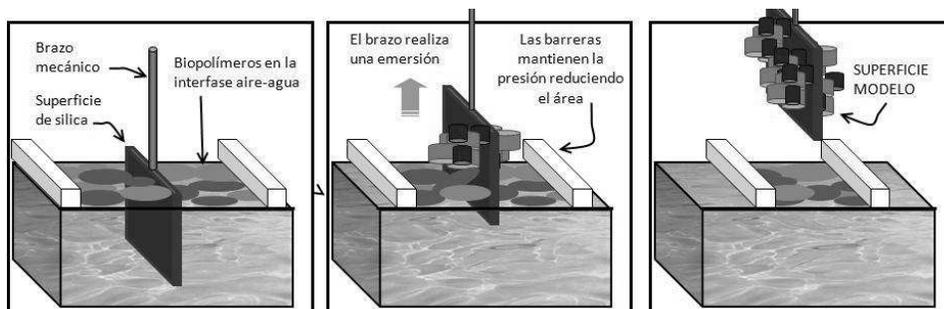


Figura 21. Esquema de depósito vertical Langmuir-Blodgett por emersión.

Por otra parte, una variante de este tipo de depósito es el horizontal, o depósito Langmuir-Schaefer (LS) introducido por Langmuir y Vincent Schaefer,¹²⁷ que minimiza los esfuerzos cortantes durante el depósito de las películas. Los materiales poliméricos presentan dificultades para su depósito con el depósito LB, así, los derivados de celulosa solamente se han podido transferir mediante la técnica LS.¹²⁸ En la Figura 22 se muestra un esquema de este tipo de depósito.

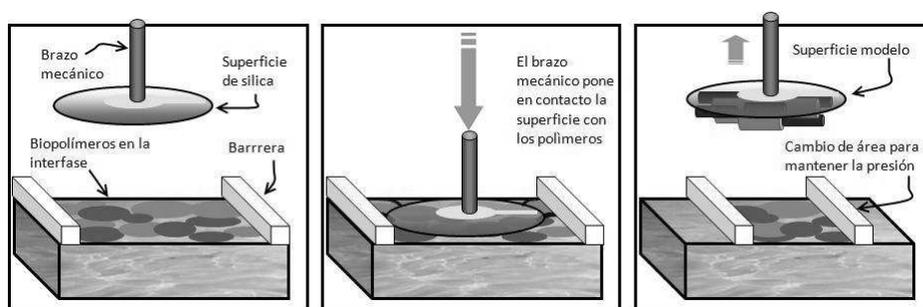


Figura 22. Esquema de depósito horizontal Langmuir-Schaefer.

Entonces, las técnicas LB y LS permiten la fabricación de películas nanoestructuradas, con grosor controlable, bajo número de defectos y un grado de organización a escala molecular, incluso para películas de polímeros. Sin embargo, en muchos casos se produce una reorganización de las moléculas en la película depositada, distinta a la que tenían en la interfase aire-agua. Por otra parte, también existen otras variantes de estos métodos, como el método de contacto de Schulman,¹²⁹ el de Kossi y

Leblanc que combina depósito vertical y de contacto,¹³⁰ y el ultra-rápido, para obtener películas no homogéneas e irregulares (útiles en el campo de sensores de gases tóxicos).¹³¹

La eficiencia del proceso de depósito de películas de Langmuir en superficies sólidas se evalúa mediante la denominada tasa de transferencia (T_T), definida por Langmuir y colaboradores:

$$T_T = \frac{A_L}{A_S} \quad \text{---(7)}$$

donde A_L es la disminución del área superficial, que ocurre durante el depósito y A_S es el área del sustrato. Este parámetro indica la afinidad entre la película y el sustrato. Si $T_T = 1$ entonces se cubrió todo el sustrato, $T_T = 0$, indica que el material no fue transferido. Producir películas LB y LS de forma reproducible requiere conocimiento fisicoquímico de la película que será transferida y del sustrato sólido, para definir la presión y velocidad de depósito.

METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

Para realizar depósitos LB el sustrato limpio se coloca en el brazo mecánico acoplado a la palangana de Langmuir, se establece la altura inicial y se sumerge (para el caso de una emersión inicial). Se registra la longitud sumergida, que es necesaria junto con el ancho y grosor de la superficie para que el equipo estime la tasa de transferencia. Se programa el software para que al alcanzar la presión de depósito comience la emersión del sustrato a 3 mm min^{-1} , manteniendo la presión superficial constante en 10 mN m^{-1} , modificando el área superficial. Por otra parte, para realizar depósitos LS primero se fija horizontalmente un trozo de cubreobjetos de vidrio al brazo mecánico con cinta adhesiva, y posteriormente se coloca una pequeña gota de agua entre esta superficie y el disco, la cual sirve como adhesivo. Posteriormente se calibra como la distancia cero el punto donde el sustrato está en contacto con la interfase, luego de esto se hace ascender el brazo mecánico, y el sustrato se seca con una punta de paño del agua adsorbida luego de la calibración. Se programa al software para que una vez formada la película interfacial, a 10 mN m^{-1} , comience la rutina de descenso del brazo (a 5 mm min^{-1}) hasta la distancia calibrada. El sustrato es mantenido en contacto con la superficie durante 30 segundos,¹³² realizando el depósito, y posteriormente el brazo asciende de nuevo a 5 mm min^{-1} . Una vez realizado el depósito, las superficies modelo son secadas con un flujo de nitrógeno, y son almacenadas en un desecador en vacío hasta su uso, en

ninguno de los experimentos realizados en este trabajo éste tiempo fue mayor a 48 horas. La Figura 23 muestra experimentos de depósitos LS con substratos distintos.

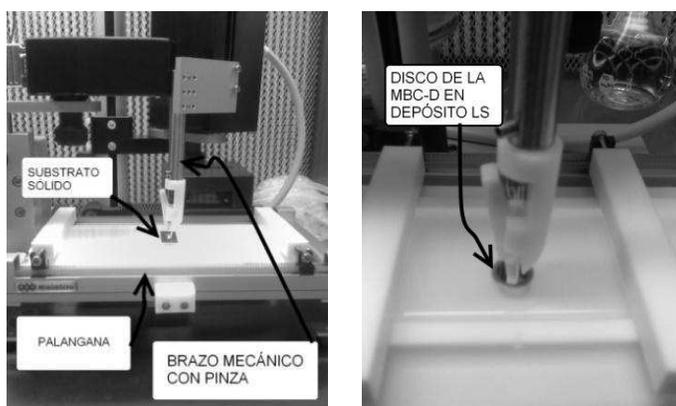


Figura 23. Depósitos horizontales (LS) con los substratos sólidos utilizados en este trabajo.

6.2.5. CARACTERIZACIÓN DE SUPERFICIES MODELO

6.2.5.1. MICROSCOPIA DE FUERZA ATÓMICA

En 1986 Gerd Binnig y Heinrich Rohrer ganaron el Premio Nobel de Física por su trabajo en una microscopía basada en el efecto túnel, conocida como microscopía de barrido de túnel (MBT). Esta técnica forma imágenes de cada uno de los átomos (resolución atómica) de superficies conductoras o semiconductoras, mediante el barrido de una punta sobre la superficie, a una distancia de unos pocos diámetros atómicos.

Posteriormente, con base en este principio, se desarrolló el microscopio de fuerza atómica (MFA),¹³³ el cual tiene las ventajas (sobre el MBT) de (i) no requerir que las muestras sean conductoras, lo que evita el recubrimiento metálico de éstas, o su deshidratación, permitiendo estudiar muestras hidratadas, y (ii) permitir mediciones directas sobre las superficies para obtener información cuantitativa sobre la altura.¹³⁴ La MFA no es una microscopía óptica, sino de contacto, que ha resultado esencial para el desarrollo de la llamada nanotecnología, pues permite la caracterización y visualización de muestras a dimensiones nanométricas.

El equipo consiste de una micropalanca flexible, típicamente de silicio o nitruro de silicio, con una longitud típica de $\approx 200 \mu\text{m}$, con una punta muy afilada, de forma piramidal o cónica (con radio de curvatura del orden de 5-10nm), la cual es el corazón del equipo, pues se coloca en una gran cercanía a la muestra, de modo que interactúa con la superficie de la muestra (a distancias $< 10 \text{ nm}$). La muestra se coloca sobre una unidad piezoeléctrica que permite mover la superficie en todas direcciones, la interacción de la superficie con la punta, a través de distintas fuerzas, ocasionan que la microlapalanca se

flexione, lo cual genera la desviación de un haz laser que incide sobre ésta, y la desviación es detectada por un fotodetector. Las desviaciones en el fotodetector generan una señal de retroalimentación que modifica la posición del piezoeléctrico. Las imágenes tridimensionales son adquiridas al barrer la superficie con la punta, y registrar las deflexiones del resorte (ver Figura 24).

Este instrumento opera en medio gaseoso o líquido, en modalidades de contacto y dinámico. En modo de contacto la palanca permanece estática y es desviada por el contacto con la muestra. La deformación de la palanca genera la señal; existen dos formas de producir imágenes en el modo de contacto, altura constante y fuerza constante, siendo el segundo el más utilizado. En el modo de fuerza constante el ángulo del resorte con respecto a un haz de luz se mantiene constante durante un barrido por medio de un circuito electrónico cerrado que ajusta la posición vertical del piezoeléctrico utilizado para barrer la superficie. Las imágenes se obtienen bajo la suposición de que la interacción entre la punta y la superficie, como función de la separación, es la misma en todos los puntos de la superficie y por lo tanto cualquier fuerza que se obtenga corresponde a un valor particular de separación. El modo dinámico se divide en modos de no-contacto y de contacto intermitente, también llamado “tapping”. El modo de contacto intermitente se basa en la vibración de la palanca en su frecuencia de resonancia, o cerca de ésta, en la proximidad de la superficie. Al acercar la punta a la muestra el resorte deja de oscilar libremente debido a las interacciones con la superficie, causando una reducción en la amplitud y el ángulo de fase de las ondas armónicas. En este caso, cambios de amplitud, frecuencia o fase de la oscilación pueden usarse en un circuito cerrado, pues la amplitud de la oscilación es ajustada para mantenerla constante moviendo la muestra con el piezoeléctrico y la frecuencia es utilizada como un parámetro de retroalimentación para medir la topología. Grabando el decaimiento de la fase durante el barrido y detectando el movimiento del piezo se obtiene una imagen topográfica, pues típicamente las imágenes se obtienen a partir del voltaje requerido para ajustar la posición vertical del piezoeléctrico de tal manera que se mantenga una amplitud de oscilación fija. Ésta modalidad es obligada para materiales suaves, como los polímeros, que pueden ser deformados por la punta en modo de contacto, pues es posible lograr que las interacciones entre la punta y la superficie se vean reducidas al mínimo. Por otra parte, no siempre es posible evitar que durante el proceso de barrido las interacciones provoquen cambios irreversibles tanto en la superficie, como en la punta, que puede llegar a ser inutilizada. Otra ventaja del modo de contacto intermitente es que permite utilizar velocidades de barrido más altas que en

los modos de contacto, cuando se evalúa de manera cuantitativa la rugosidad de una superficie.¹³⁵ La Figura 24 muestra un esquema de un microscopio MFA operando en modo de contacto intermitente.

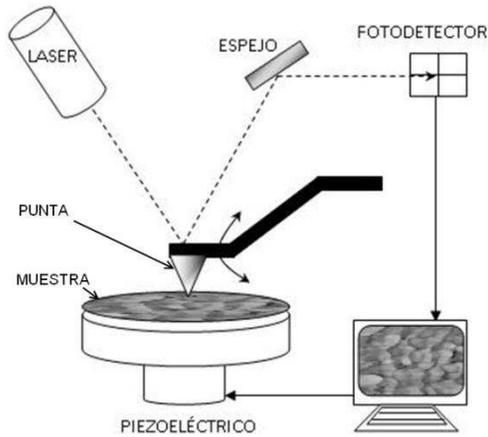


Figura 24. MFA en modo de contacto intermitente. La micropalanca oscila a su frecuencia de resonancia, la punta unida a la palanca barre la superficie, la reducción en la amplitud debida a las interacciones de superficie son grabadas por la desviación de un haz laser con un fotodetector. La distancia entre la muestra y la punta se mantiene constante mediante un sistema de retroalimentación que modifica la posición del piezo.

Este equipo genera imágenes topográficas, o *de altura* y también imágenes de *fase*, las cuales son una imagen contrastada generada por las diferencias de adhesión en la superficie de la muestra, la cual proporciona información cualitativa del grado de dureza de la superficie, y cuantitativamente estima la raíz cuadrada de la media de rugosidad (rms por sus siglas en inglés), la cual es una medición estadística usual de la rugosidad de las superficies.¹³⁶

METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

En este trabajo se utilizó un equipo de MFA JSTM-4210 JEOL (JEOL, Japan, Figura 25) con un scanner de $25 \times 25 \mu\text{m}$. Se utilizaron puntas de nitruro de silicio (Si_3N_4) con una constante de fuerza de $\approx 0.3 \text{ Nm}^{-1}$. Las imágenes topográficas (de altura) y de fase fueron obtenidas con modo intermitente a temperatura ambiente ($\approx 25 \text{ }^\circ\text{C}$) y analizadas con el mismo software del equipo (JEOL). Solo se realizó el ajuste de contraste a las imágenes. El valor de rugosidad fue determinado a partir de imágenes de $1 \mu\text{m}^2$ a 300 nm^2 y es presentado como valores *rms*.



Figura 25. Microscopio de Fuerza Atómica JSTM-4210 JEOL.

6.2.5.2. MICROBALANZA DE CUARZO CON DISIPACIÓN

La microbalanza de cuarzo con disipación (MBC-D) utiliza las propiedades piezoeléctricas de discos resonantes de cuarzo para detectar cambios de masa del orden de nanogramos ($1 \text{ ng} = 1 \times 10^{-12} \text{ Kg}$). Consiste de un circuito electrónico formado por un oscilador y un disco de cuarzo, típicamente de corte tipo “T”, que tiene contactos metálicos en su estructura, el cual es estimulado eléctricamente por el oscilador, (ver Figura 26), lo cual genera una frecuencia fundamental de resonancia, y sobretonos de ésta. El disco se coloca en el interior de una cámara con condiciones controladas de temperatura y flujo, llamada *cámara de flujo axial*, llamada así pues cuando se utiliza en régimen continuo, no se presenta flujo horizontal en su interior. Por otra parte, el equipo también se puede operar en régimen por lotes. La Figura 26 muestra un diagrama del equipo.

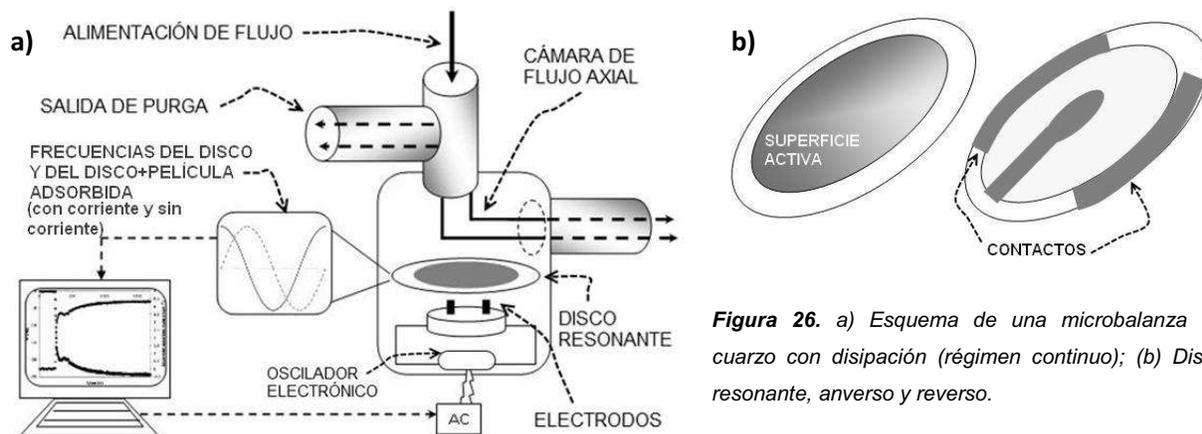


Figura 26. a) Esquema de una microbalanza de cuarzo con disipación (régimen continuo); (b) Disco resonante, anverso y reverso.

El principio de funcionamiento de la MBC-D fue descrito por Rodahl *et al.*¹³⁷ y Höök *et al.*¹³⁸ como sigue: cuando un oscilador electrónico excita un cristal de cuarzo, barriéndolo a frecuencias distintas, éste comienza a oscilar, tanto a su frecuencia de

resonancia f_0 , como a diversos sobretonos. Cuando se adsorbe material sobre la superficie del cristal, la frecuencia disminuye a un valor F . Por otra parte, cuando la corriente suministrada al oscilador es suspendida, el sobrevoltaje del cristal decae de forma sinusoidal y exponencial. Registrando el voltaje del cristal durante el decaimiento, y ajustando numéricamente esta curva a una frecuencia de referencia, tanto la frecuencia resonante como el factor de disipación del disco son obtenidas simultáneamente.

Inicialmente este instrumento fue utilizado en aire, pero Kanazawa fue pionero en estudiar las propiedades de las ondas en medios acuosos,¹³⁹ lo cual expandió enormemente sus aplicaciones prácticas. De esta forma la MBC-D mide simultáneamente los cambios en la frecuencia de resonancia, ΔF , y la energía de disipación, D , la cual en este caso se refiere a las pérdidas friccionales y viscoelásticas debidas a los cambios en la superficie. Si algún material es adsorbido sobre el cristal, se puede tratar como un cambio de masa equivalente del cristal según la ecuación de Sauerbrey,¹⁴⁰ que establece que el incremento en la masa, induce un cambio proporcional en la frecuencia, ΔF :

$$\Delta m_{\text{Sauerbrey}} = -\frac{\rho_q t_q \Delta F}{f_0^n} = -\frac{\rho_q v_q \Delta F}{2f_0^2 n} = -\frac{C \Delta F}{n} \quad \text{---(8)}$$

donde Δm es la masa adsorbida por unidad de área (mg m^{-2}), ρ_q y v_q son la densidad específica y la velocidad de la ola de corte del cuarzo respectivamente, t_q es el grosor del cristal de cuarzo, y f_0 es la frecuencia de resonancia utilizada en los cálculos (puede ser o no la fundamental, cuando es la fundamental, $n=1$). Por lo tanto, la constante C corresponde al disco de cuarzo resonante utilizado y es llamada *constante de sensibilidad* ($\text{mg m}^{-2} \text{ Hz}^{-1}$), ΔF es el cambio en la frecuencia de resonancia y n es el número de sobretono utilizado en la medición. La ecuación de Sauerbrey es válida cuando se satisfacen las condiciones siguientes: (i) La masa adsorbida (adsorbato) está distribuida uniformemente sobre todo el resonador, (ii) Δm es mucho menor que la masa del cristal ($<1\%$), y (iii) la masa adsorbida está firmemente unida al cristal, sin presentar desfases o deformaciones inelásticas debidas al movimiento de oscilación. La última condición es válida cuando la frecuencia disminuye linealmente con la masa verdadera del adsorbato, sin cambios en la disipación. Por otra parte, la ecuación de Sauerbrey no es válida para películas que no sean rígidas, sin embargo, las películas viscoelásticas pueden ser modeladas utilizando las descripciones de Voigt o Maxwell.¹⁴¹ Por otra parte, la masa adsorbida detectada por la MBC-D usualmente es mayor que la

obtenida con técnicas ópticas, por ejemplo la elipsometría,¹⁴² ya que también se detecta el agua asociada a la película.

El grosor de la película adsorbida, $d_{\text{Sauerbrey}}$, puede ser calculado combinando la masa adsorbida estimada con la densidad supuesta de la película adsorbida (ρ):

$$d_{\text{Sauerbrey}} = \frac{\Delta m_{\text{Sauerbrey}}}{\rho} \quad \text{---(9)}$$

Cuando la fuente de la oscilación del cristal es interrumpida, la amplitud de la oscilación disminuye a través de la disipación de la energía en el cristal, la capa adsorbida, y la solución circundante. La tasa de disminución depende de las propiedades viscoelásticas de estos materiales. La disipación está caracterizada por el *factor de disipación* D , el cual es proporcional al poder de disipación en el sistema oscilatorio y puede dar información valiosa acerca de la rigidez de la película. Por ejemplo, una película suave (viscoelástica) no estará totalmente unida a la oscilación del cristal, y en estos casos el factor de disipación está definido como:

$$D = \frac{E_{\text{disipada}}}{2\pi E_{\text{almacenada}}} \quad \text{---(10)}$$

donde E_{disipada} es la energía disipada durante un ciclo de oscilación y $E_{\text{almacenada}}$ es la energía total almacenada en la oscilación. Los valores altos de disipación indican una capa delgada y poco adsorbida, pues las capas más externas de la película no siguen la oscilación del cristal. Por otra parte, una película rígida adsorbida no ocasiona cambios en la disipación. Así, valores constantes de ΔF y D indican que no hay adsorción o desorción sobre la superficie del disco. Por otra parte, disminución en el valor de ΔF indican un aumento de masa sobre la superficie del disco, y por el contrario, aumento en su valor indica pérdida de masa, si estos cambios se dan a valores constantes de disipación, se puede considerar que la rigidez de la superficie del disco no se vio alterada por los cambios de masa. En cualquier condición, valores mayores de D significan reblandecimiento de la superficie sobre el disco, y valores menores aumento en su rigidez (por ejemplo, cuando se desorbe una película de moléculas de su superficie, causando la exposición de un substrato más rígido. La Figura 27 muestra curvas de ΔF y D obtenidas de cuatro posibles cambios en las superficies estudiadas.

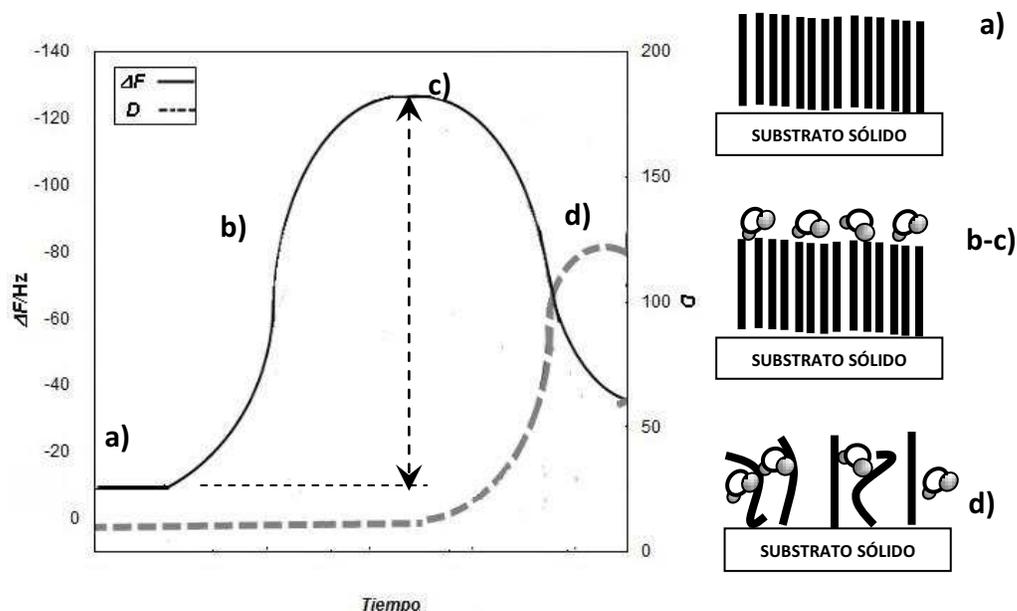


Figura 27. Ejemplo de perfiles de ΔF y D . (a) No hay ninguna molécula interactuando con la película, por lo que ΔF y D son constantes; (b) Se cambia el medio en la cámara de flujo axial, una molécula se adsorbe sobre la superficie sin reblandecerla, (disminución de ΔF y $D \approx \text{cte}$); (c) equilibrio en las nuevas condiciones, (ΔF y D constantes); (d) Cambio en las condiciones de la cámara de flujo axial, hay pérdida de material y reblandecimiento de la superficie (ΔF y D aumentan). La diferencia en el valor de ΔF marcada con flechas se puede asociar a masa adsorbida (Δm) con la ecuación de Sauerbrey, pues D es constante (la superficie es rígida). Por otra parte, en (d), tanto Δm como la densidad de la película se estima mediante ajustes numéricos, pues D no es constante (no es una superficie rígida).

METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

Los experimentos se realizaron en la QCM-D Z-500 (KSV, Finlandia, Figura 28).

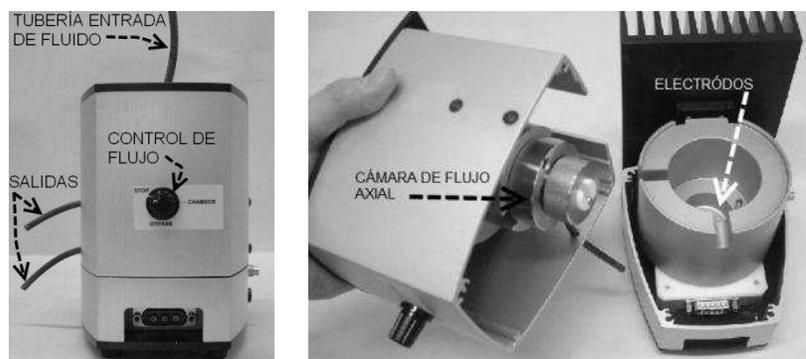


Figura 28. Microbalanza de Cuarzo con Disipación Z-500.

Las superficies modelo fueron guardadas en un desecador en vacío hasta su uso, y secadas con un flujo de N_2 antes de las mediciones. El disco es colocado en el puerto correspondiente, que lo pone en contacto con los fluidos en la cámara de flujo axial. Cada medición comienza en aire, y posteriormente se inyecta agua a la cámara de flujo axial, y luego de 10 minutos entonces se añade una solución de cloruro de sodio ($NaCl$), este procedimiento se realiza consecutivamente para varias concentraciones, desde 1 mM y

hasta 1 M, luego de cada inyección se esperan 10 min antes de inyectar la siguiente. Los experimentos fueron realizados por duplicado para cada tipo de superficie.

6.2.6. ESPECTROSCOPIAS

Para comprobar la presencia de los biopolímeros en solución se realizaron evaluaciones espectroscópicas cualitativas, UV-vis para lignina y FT-IR para celulosa. En todos los casos, se comparó el espectro obtenido contra espectros descritos en una base de datos electrónica.¹⁴³

6.2.6.1 ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO POR TRANSFORMADA DE FOURIER

La espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier (IR-TF) utiliza energía de la región infrarroja del espectro electromagnético (400 a 4,000 cm^{-1}). Se fundamenta en la absorción de la radiación infrarroja por los enlaces de los grupos funcionales presentes en las moléculas de una sustancia pura o en mezclas, las cuales vibran por absorber esta energía (dicho movimiento es lo que registra el equipo analítico). Una molécula absorberá la energía de un haz de luz infrarroja cuando ésta sea igual a la necesaria para que ocurra una transición vibracional de enlace en la molécula. En principio, cada molécula presenta un espectro IR característico, debido a que prácticamente todas las moléculas tienen algunas vibraciones que, al activarse, provocan la absorción de una determinada longitud de onda en la zona del espectro electromagnético correspondiente al infrarrojo. De esta forma, analizando cuales son las longitudes de onda que absorbe una sustancia en la zona del infrarrojo, es posible obtener información acerca de los enlaces presentes en dicha sustancia, y en general de los grupos funcionales presentes en la sustancia evaluada.¹⁴⁴

METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

Se utilizó un espectrofotómetro IR-TF modelo Tensor 27 (Bruker). Para el análisis de líquidos (solventes y soluciones) se utilizó el puerto Miracle-ATR (Pike Technologies) y en el caso de celulosa en estado sólido, el accesorio de reflectancia difusa (EasiDiff de Pike Technologies). Para THF y cloroformo se realizaron 4 barridos, y 64 para DMSO. Para soluciones, se corre la línea base y luego la solución, con el mismo número de barridos para los dos. Para la celulosa en polvo se preparó y homogeneizó una mezcla al 95% con KBr seco. Se corrió la línea base con KBr, y se hicieron las pruebas con 128 barridos. En todos los casos el intervalo de barrido fue de 4000 a 700 cm^{-1} . Se utilizó el software Tensor 27 standard system, versión Opus.

6.2.6.2. ULTRAVIOLETA-VISIBLE

La espectroscopia ultravioleta-visible (UV-vis) utiliza energía de las regiones visible, ultravioleta cercana (UV) e infrarroja cercana (IRC) del espectro electromagnético (190 a 800 nm). La radiación absorbida por las moléculas desde esta región del espectro provoca transiciones electrónicas que pueden ser identificadas y cuantificadas. Cuando las moléculas son expuestas a la luz, algo de la energía de la luz es absorbida, la absorción de radiación ultravioleta o visible provoca la excitación de los electrones de enlace, lo que ocasiona una transición electrónica desde niveles de menor energía, hasta niveles de mayor energía, y, en consecuencia, las bandas de absorción pueden relacionarse con los tipos de enlace que existen en las especies en estudio. Un espectrofotómetro UV-vis registra las longitudes de onda a las cuales ocurre la absorción, además del grado de absorción en cada longitud de onda. El espectro resultante es representado como una gráfica de absorbancia (proporcional al número de moléculas que absorben energía luminosa) vs longitud de onda. Ésta técnica puede ser utilizada cualitativa o cuantitativamente, en el primer caso, se utiliza para identificar algunos grupos funcionales en las moléculas, y para el segundo, para determinar la concentración de un compuesto (enlace) de una sustancia. La ley de Lambert y Beer explica que hay una relación exponencial entre la transmisión de luz a través de una sustancia y la concentración de la misma, así como también entre la transmisión y la longitud del cuerpo que atraviesa la luz. De manera que, la concentración de la sustancia puede ser deducida a partir de la cantidad de luz transmitida.¹⁴⁵

METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

Para las pruebas en espectroscopía UV-vis se utilizó un equipo Evolution 300 UV-visible Spectrophotometer de ThermoScientific. Se realizaron barridos de 190 a 400 nm (ancho de banda 0.5 nm) y los espectros fueron adquiridos con el software Vision Pro Thermo Electron UV-visible versión 4.10. El procedimiento experimental consiste en definir una línea base únicamente con el solvente correspondiente, y posteriormente leer la muestra, en el intervalo de longitudes de onda definido.

7

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 PRODUCCIÓN DE SUPERFICIES HIDROFÓBICAS

De las tres técnicas evaluadas de depósito de 3-aminopropiltrimetoxisilano (APTS) sobre el sustrato de SiO₂, los depósitos en bulto y tipo Langmuir-Blodgett (LB) no fueron satisfactorios, pues la película depositada con éstas técnicas es visible a simple vista, lo cual implica una rugosidad muy alta a escalas microscópicas, indeseable para este trabajo. Por otra parte, el depósito por evaporación en vacío generó superficies especulares, lo cual indica una rugosidad muy baja. También, estas superficies presentan tanto una tonalidad distinta a la original, pues cambian de un color violeta a una tonalidad iridiscente. Finalmente, presentan un comportamiento hidrofóbico importante, pues antes de la funcionalización el agua moja totalmente de la superficie de SiO₂, y una vez funcionalizada, el agua forma gotas pequeñas sobre la superficie. Debido a lo anterior, este método fue el elegido para volver hidrofóbica la superficie de SiO₂, tratamiento necesario para depositar los biopolímeros y obtener las superficies lignocelulósicas modelo.

7.1.1 MICROSCOPIA DE FUERZA ATÓMICA

En la Figura 29, se muestran micrografías de MFA de la superficie de SiO₂ antes y después de ser silanizada por evaporación en vacío. Como se puede observar, la superficie de APTS presenta una estructura similar a una descrita previamente, siendo más similar a una monocapa que a una multicapa.¹¹⁶ Aunque el valor de la raíz cuadrada de la media de rugosidad (rms), estimado en la región marcada con una flecha blanca en las micrografías, es más parecido al descrito para la multicapa (ver Tabla 4, adelante), el valor de rms se estimó en áreas de $\approx 1 \mu\text{m}^2$. Por otra parte, la superficie modificada no muestra orientación en su estructura, como era de esperarse, por tratarse de un depósito desde fase gaseosa. También se observa que el APTS cubre por completo la superficie de SiO₂. Por lo anterior se puede considerar que el depósito de APTS por evaporación en vacío genera una superficie plana, homogénea, que cubre totalmente al SiO₂.

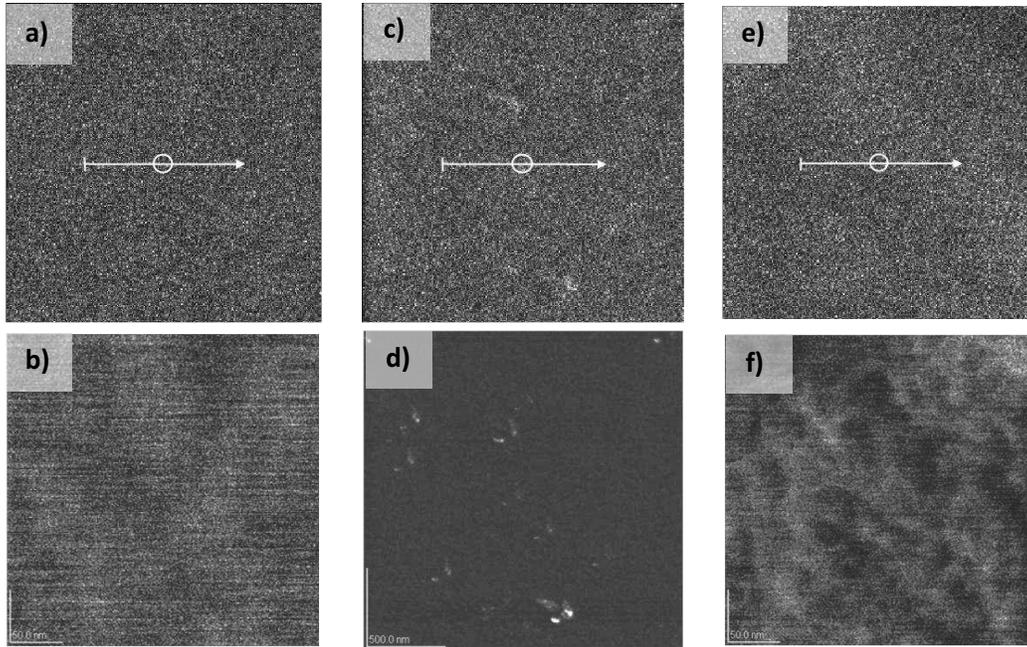


Figura 29. Micrografías MFA de silica y superficie silanizada. Micrografías de SiO₂ (a) altura y (b) fase, 300 nm². Micrografías de APTS de 2.05 μm² (c) altura y (d) fase; 300 nm² (e) altura y (f) fase. Las flechas indican la región donde se estimó el valor de rms.

Superficie	rms (nm)	Referencia
SiO ₂	1.29	Este trabajo
SiO ₂	0.5	56
SiO ₂	0.045	116
APTS (desde fase vapor)	1.41	Este trabajo
APTS, monocapa	0.24	116
APTS, multicapa	1.23	116

Tabla 4. Algunos valores de rms para distintas superficies de SiO₂ y APTS descritos en la literatura consultada.

7.1.2 MICROGRAVIMETRÍA

Con la finalidad de estimar el grosor de la superficie de APTS, y también para estudiar la estabilidad de las superficies de SiO₂ y APTS, tanto en aire como en un ambiente acuoso con distintos valores de fuerza iónica, se utilizó la microbalanza de cuarzo con disipación (MBC-D). Se estudió su comportamiento en estas condiciones, pues son las utilizadas para las superficies lignocelulósicas modelo, lo cual permite discernir entre las señales de las superficies de SiO₂, APTS y lignocelulósicas.

En la Figura 30, se muestran los perfiles de cambio en frecuencia y disipación registrados para el tercer sobretono (ΔF_3 y D_3 respectivamente), de las superficies de SiO₂ y APTS en la MBC-D, primero en aire y posteriormente en agua con distintas concentraciones de NaCl. Se describen los perfiles de este sobretono particular, y no de

la frecuencia fundamental de resonancia (f_0) pues: (i) el 3er sobretono es representativo de los otros sobretonos, y (ii) f_0 presenta comportamientos atípicos, debido tanto al tipo de corte del cuarzo (corte AT), como a la disposición del disco en la MBC-D, pues es sensible a la energía almacenada en el empaque del equipo.⁸⁰ Por lo anterior, en la literatura especializada siempre se utiliza el 3er sobretono.

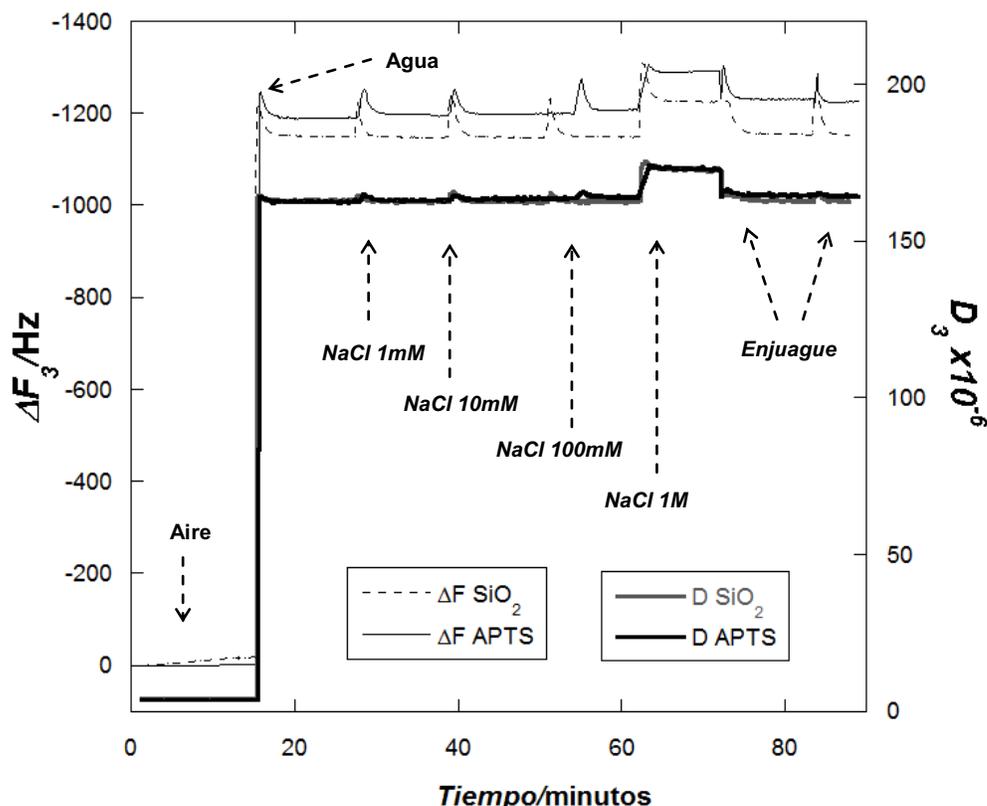


Figura30. Perfil del cambio en ΔF_3 y D_3 de las superficies de sílica y APTS en las condiciones experimentadas. Se indica con flechas el cambio de condiciones en la cámara de flujo axial

En la Figura 30 se observa que los perfiles de ΔF_3 y D_3 muestran una variación muy pronunciada al cambiar el medio de aire a agua. Este cambio pronunciado es conocido como “efecto del solvente”, y es un fenómeno típico de la MBC-D, descrito por primera vez por Kanazawa,¹³⁹ y posteriormente por otros autores.^{69,169} Este fenómeno ocurre debido a la gran diferencia en la viscosidad del aire y del agua. Una estrategia para ignorar este efecto es comenzar los experimentos en el medio acuoso. Sin embargo, debido a la posibilidad de estimar el grosor de las superficies obtenidas en este trabajo, los experimentos se iniciaron desde que hay aire en la cámara de flujo axial. Por otra parte, los picos que se observan en los perfiles de ΔF_3 y D_3 son causados por cambios de

densidad que percibe el disco debidos al recambio de medio en la cámara de flujo axial, lo cual también es un efecto común en este instrumento.¹³²

MEDICIONES EN AIRE

En la Figura 30 se observa que en aire la superficie de SiO_2 presentó un cambio en el valor de ΔF_3 de ≈ -20 Hz, lo que indica un aumento en la masa sobre el disco, el cual se podría atribuir a la hidratación de la superficie de SiO_2 , pues esta superficie es hidrofílica, y la cámara de flujo axial de la MBC-D no tiene control de humedad. Por otra parte, la superficie de APTS mostró un comportamiento más hidrofóbico, pues presentó un cambio de $\Delta F \approx -1$ Hz, lo cual daría evidencia de la silanización. Finalmente, el valor de disipación permanece constante para ambas superficies, lo cual indica que en estas condiciones la superficie silanizada tiene la misma rigidez que la superficie de SiO_2 .

MEDICIONES EN MEDIO ACUOSO

La Figura 31, muestra un acercamiento a los perfiles de ΔF_3 y D_3 de una superficie de SiO_2 y una de APTS en agua,

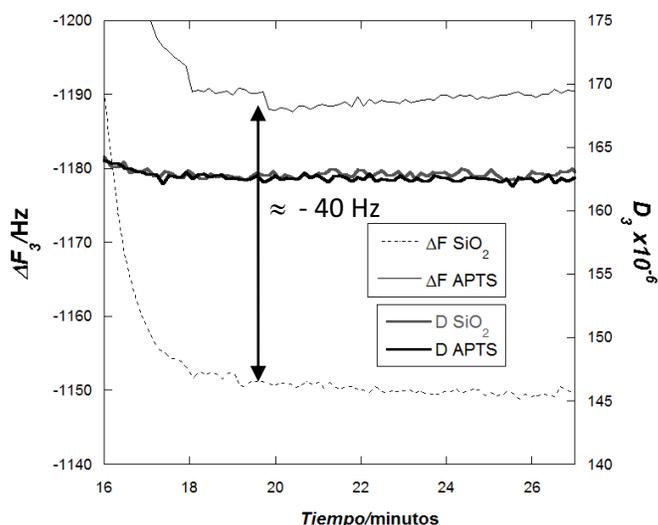


Figura 31. Acercamiento al perfil de ΔF_3 y D_3 para SiO_2 y APTS en agua.

Se observa una diferencia en el valor de ΔF_3 entre ambas superficies, la cual puede deberse a dos cosas: (i) la masa de APTS depositada sobre la superficie de SiO_2 , y (ii) la masa de agua absorbida/adsorbida dentro/sobre la superficie de APTS. Entonces, si se toma el valor de ΔF_3 cuando el tiempo de interacción de la superficie con el agua es mínimo, y se hace el supuesto de que los procesos de adsorción/adsorción aún no se han presentado en ese instante, se podría atribuir el cambio en el valor de ΔF_3 únicamente a la

película de APTS depositada. Bajo este supuesto, si la diferencia entre el valor de SiO₂ y de APTS es de ≈ -40 Hz y debido a que el valor de disipación permanece constante, el cambio en el valor de ΔF_3 observado se puede asociar a un cambio de masa sobre el disco resonante utilizando el modelo de Sauerbrey (ecuación 8):

$$\Delta m_{\text{Sauerbrey}} = -\frac{c\Delta f}{n} = -\frac{(0.177 \text{ mg m}^{-2} \text{ Hz}^{-1})(-40 \text{ Hz})}{3} = 2.36 \text{ mg m}^{-2}$$

$\Delta m_{\text{Sauerbrey}} = 2.36 \text{ mg}_{\text{APTS}} \text{ m}^{-2}$, si el área de superficie activa del disco es $1.933 \times 10^{-5} \text{ m}^2$, entonces hay $\approx 4.63 \times 10^{-5} \text{ mg}_{\text{APTS}} = 46.3 \text{ ng}_{\text{APTS}}$ sobre la superficie activa de SiO₂.

Una vez conocido el valor de masa, y haciendo el supuesto de que la densidad del APTS es la misma que en estado líquido, $\rho_{\text{APTS}} = 1.03 \times 10^9 \text{ mg m}^{-3}$, la ecuación "9" permite estimar de forma aproximada el grosor de la película de APTS obtenida:

$$d_{\text{Sauerbrey}} = \frac{\Delta m_{\text{Sauerbrey}}}{\rho} = \frac{2.36 \text{ mg m}^{-2}}{1.03 \times 10^9 \text{ mg m}^{-3}} = 2.29 \times 10^{-9} \text{ m} = 2.29 \text{ nm}$$

La Tabla 5 muestra valores de grosor de superficies de APTS descritas en la literatura consultada, se observa que el grosor estimado en este trabajo es menor al de una multicapa, pero mayor que el de un depósito realizado desde el bulto de la solución, es decir, al sumergir el substrato sólido directamente en una solución de APTS en tolueno.

Superficie	Técnica de depósito	Grosor (nm)	Referencia
APTS	Evaporación	2.29	Este trabajo
APTS	En bulto	1	173
APTS	Multicapa	40-60	116

Tabla 5. Algunos valores de grosor para distintas superficies de SiO₂ y APTS descritos en la literatura.

ESTABILIDAD EN AGUA

Por otra parte, en la Figura 31 también se observa que el valor de ΔF_3 de la superficie de APTS, a $t \approx 20$ presenta un ligero aumento de ≈ 2 Hz, y posteriormente vuelve a disminuir su valor durante el tiempo evaluado, con una tasa de cambio de $\approx -1 \text{ Hz min}^{-1}$. Por otra parte, la superficie de SiO₂ en ese mismo intervalo presentó un valor constante de $\Delta F \approx -1,150$ Hz. Además, el valor de disipación presentado por las dos superficies fue constante, en $\approx 164 \times 10^{-6}$ unidades de disipación (u.D.). Entonces, toda vez que no se observa ningún cambio en el perfil de disipación, se puede considerar que

el aumento inicial en ΔF_3 observado en la superficie de APTS se debe a la estabilización por parte del equipo, y no a pérdidas de APTS en este medio. Por otra parte, la posterior disminución en el valor de ΔF , indicaría que se está presentando un fenómeno de adsorción sobre la superficie.

EFFECTO DE FUERZA IÓNICA

La Figura 32, muestra un acercamiento de los perfiles de ΔF_3 y D_3 de una superficie de SiO_2 y una de APTS en medios acuosos con distintas concentraciones de NaCl.

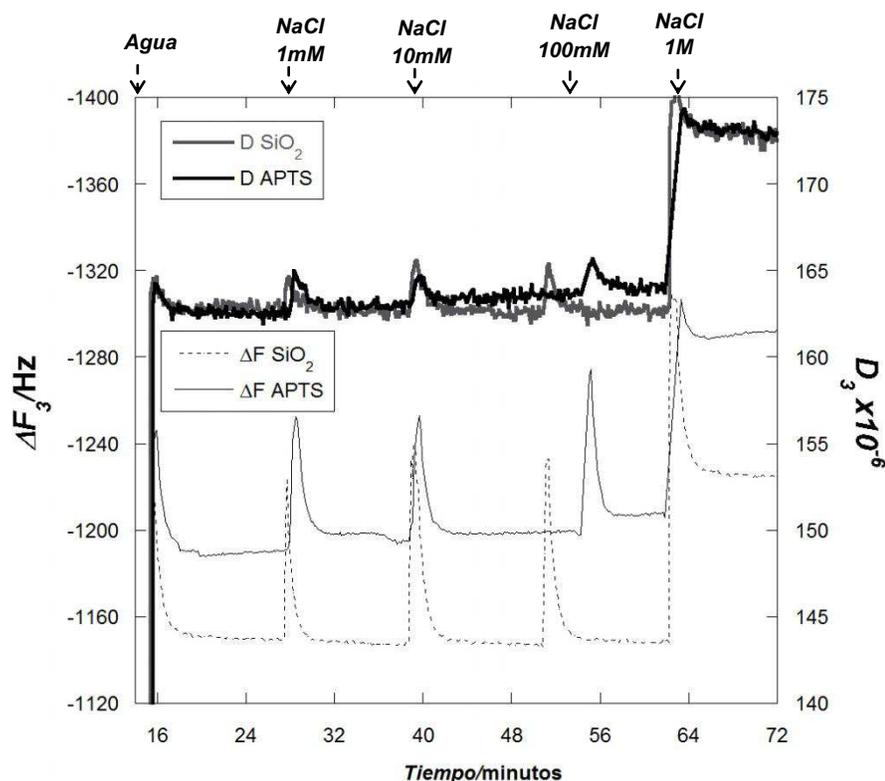


Figura 32. Perfiles de ΔF_3 y D_3 para SiO_2 y APTS en medio líquido.

Como se observa, la superficie de SiO_2 mostró un comportamiento estable, en ΔF_3 y D_3 en todas las concentraciones de NaCl evaluadas, con excepción de la concentración 1 M. Sin embargo, la superficie de APTS si presentó cambios. Al cambiar la fuerza iónica del medio a una concentración 1mM de NaCl, ésta superficie presenta una disminución de ΔF_3 de ≈ -8 Hz, y posteriormente ($t \approx 37$ min), aumenta en ≈ 4 Hz. Respecto al valor de disipación, este aumenta ligeramente, ≈ 0.5 u.D. El comportamiento de ΔF_3 y D_3 podría indicar que la superficie de APTS absorbió agua, lo cual ocasionó un aumento en la masa sobre el disco, y un ligero reblandecimiento de esta superficie. Al aumentar la

concentración de NaCl a 10 mM, las dos superficies presentan el mismo valor de frecuencia y disipación observado para la concentración de NaCl anterior. Sin embargo, la superficie de APTS presenta un ligero incremento de ≈ 1 u.D. Esto podría indicar que aunque ya no se registraron cambios de masa en esta superficie, estas condiciones generaron de nuevo un ligero reblandecimiento. Al aumentar a una concentración de 100 mM de NaCl, el ΔF_3 presenta una ligera disminución de ≈ -10 Hz respecto a las condiciones anteriores, y su disipación aumenta ≈ 1 u.D. Entonces, en estas condiciones el aumento de masa sobre la superficie de APTS es un orden de magnitud mayor respecto a la concentración de sal anterior, y de nuevo se presenta un ligero reblandecimiento. Es debido a estos cambios abruptos en las propiedades, que es factible considerar que la superficie de APTS se hincha en función de la cantidad de NaCl en el medio. Esto se podría explicar debido a la funcionalidad que presentan los grupos amino ($-\text{NH}_2$) del APTS, que al contar con un par de electrones libre pueden formar compuestos de coordinación de tipo aducto (se comparte un par de electrones de forma dativa) con los iones Na solvatados en el medio formando enlaces de tipo $-\text{H}_2\text{N} \rightarrow \text{Na}^+(\text{H}_2\text{O})_5$, donde dicho hinchamiento debido a la interacción $\text{N} \rightarrow \text{Na}$ se muestra esquemáticamente en la Figura 33. Al aumentar la fuerza iónica aumentaría la cantidad de estas interacciones, generando de forma global una superficie menos rígida y más hinchada.

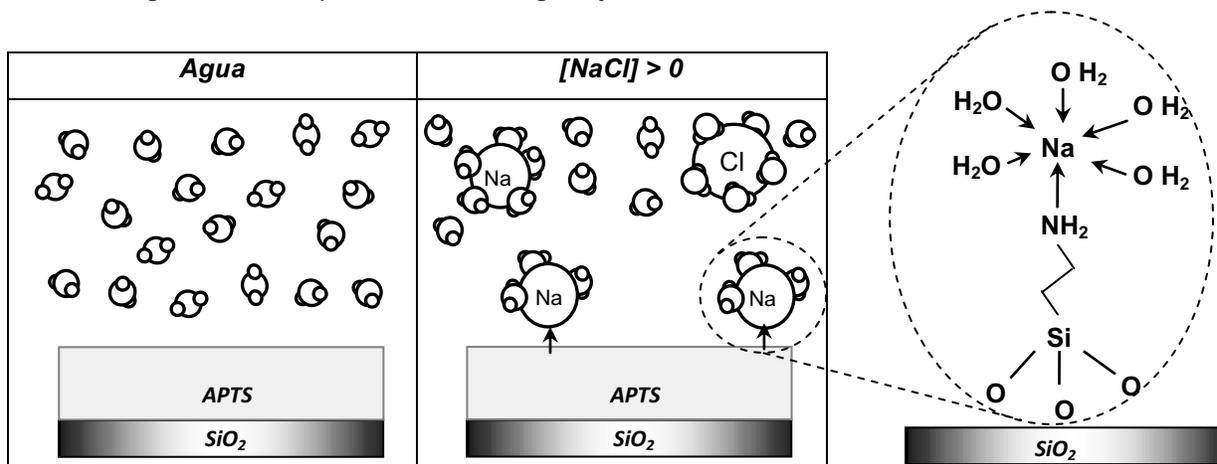


Figura 33. Esquema de la adsorción entre iones Na solvatados sobre la superficie de APTS.

Finalmente, al aumentar a una concentración 1 M de NaCl las superficies de SiO_2 y APTS presentan una disminución importante de frecuencia (≈ -100 Hz). Por otra parte, lo mismo ocurre con la disipación, que aumenta ≈ 8 u.D. para las dos superficies. Al enjuagar solamente la superficie de APTS queda ≈ -30 Hz por debajo de su valor original, por otra parte, el valor de ΔF_3 de SiO_2 , así como el de disipación de ambas superficies,

vuelven a su valor original. Entonces, aparentemente a esta concentración de sal se presentan efectos enmascarados, debido a un cambio importante en las propiedades de la solución. Resumiendo, la superficie de SiO₂ no presentó cambios debido a las distintas condiciones de fuerza iónica. Por otra parte, la superficie de APTS presentó incrementos en la masa adsorbida/absorbida debido al incremento de la concentración de NaCl. En ambos casos al utilizar una concentración de NaCl de 1 M se presentan lecturas muy altas, probablemente debidas al cambio en la densidad del medio acuoso.

En función de los estudios de MFA y MBC-D realizados, se puede considerar que la superficie de APTS obtenida es delgada, plana, homogénea, además de ser estable en agua y en soluciones de NaCl, aunque es posible generar un aumento en la masa y en la disipación dependiendo de la concentración de sal, muy probablemente debido a adsorción de iones Na solvatados con el grupo amino del APTS. Finalmente, y sin embargo, no se presentó en ninguna de las condiciones evaluadas pérdidas de masa sobre el disco.

7.2) SOLUBILIZACIÓN DE BIOPOLÍMEROS

En este apartado se detallan los estudios de solubilidad de los biopolímeros, y de la formación de películas lignocelulósicas en la interfase aire-agua con las soluciones obtenidas. Entonces, se evaluó el solvente adecuado para este trabajo tanto en función de su capacidad para solubilizar los biopolímeros, como del comportamiento que las soluciones obtenidas presenten en la interfase aire-agua, pues éste es el primer paso para generar superficies lignocelulósicas modelo mediante técnicas de depósito de Langmuir.

7.2.1 COMPORTAMIENTO DE LA SOLUCIÓN EN EL BULTO

7.2.1.1. CELULOSA

Se verificó la presencia de celulosa en solución mediante espectroscopía IR-TF. Primero se obtuvieron los espectros IR-TF de los solventes puros (espectros no mostrados), y se observó que ninguno de los tres presenta bandas vibracionales en la región de 3000 a 3500 cm⁻¹. Ésta región es relevante pues es característica de los grupos -OH presentes en la celulosa, por lo que esta región se definió como el criterio de disolución de este biopolímero en estos solventes. La Figura 34 muestra los espectros IR-TF típicos de celulosa en polvo, y de las soluciones en los tres solventes evaluados.

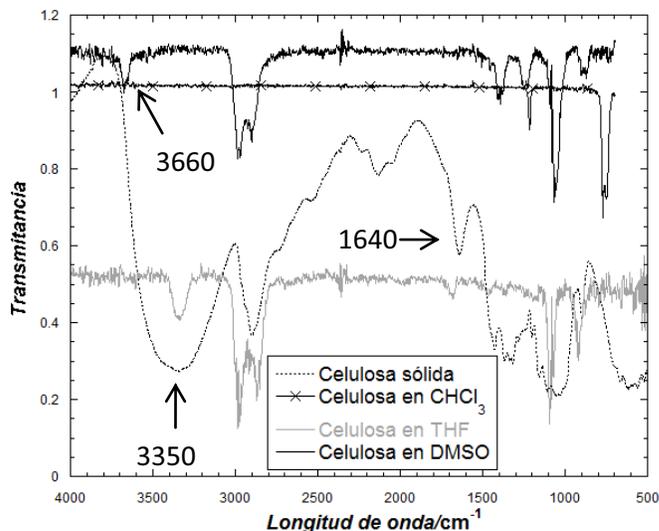


Figura 34. Espectros IR-TR de mezclas celulosa-solvente para los tres solventes evaluados, así como la celulosa en polvo.

Se observa que solamente hay bandas atribuibles a la celulosa para los casos de THF y DMSO, por lo que se puede considerar que solamente en esos solventes hubo disolución. Por otra parte, se puede observar que el DMSO y el THF solubilizan al biopolímero generando estados solvatados diferentes, pues las bandas de absorción en el infrarrojo difieren en cada caso. Esto se puede atribuir a los cambios en hibridación de los átomos de oxígeno que presenta cada solvente, pues el DMSO tiene los electrones de valencia en hibridación sp^2 y por lo tanto están más disponibles para formar puentes de hidrógeno, mientras que el THF los tiene en sp^3 y la interacción para formar dichos puentes es menos favorable. Adicionalmente hay que considerar el efecto del volumen molecular de cada disolvente, ya que esto se traduce en un intercalamiento distinto durante la solvatación, que ocasionaría un cambio conformacional en el biopolímero. A este respecto, en la literatura están asignadas bandas para los distintos grupos hidroxilo –OH de la celulosa, la Tabla 6 muestra las bandas de regiones –OH en el espectro infrarrojo para celulosa II, obtenidos experimentalmente o asignados teóricamente.¹⁴⁶

Frecuencia -medida experimentalmente o predicha teóricamente- (cm^{-1})	Interpretación de dato experimental	Molécula teórica
3175	Estiramiento –OH	
3305	Unión-H intermolecular	
3308		Unión-H intermolecular
3309		Unión-H intermolecular
3315		Unión-H intermolecular
3374		Unión-H intramolecular
3447	Estiramiento –OH	
3486		Unión-H intramolecular
3488	Unión-H intramolecular	

Tabla 6. Asignación de bandas para los grupos –OH de la celulosa II. Adaptada de ref. 146

Como se observa en la Tabla 6, se han asignado bandas para los grupos –OH en un intervalo de 3175 a 3488 cm^{-1} , sin embargo, en la Figura 34, para el caso del DMSO se observa una banda en 3660 cm^{-1} . A este respecto, se ha descrito que los grupos –OH libres absorben en general en la región de 3650-3590 cm^{-1} del espectro infrarrojo,¹⁴⁷ por lo que esta banda podría deberse a ese tipo de grupos funcionales. Por otra parte, esta banda también podría deberse a la hidratación de la solución, sin embargo, el agua presenta una banda de estiramiento asimétrico en 3490 cm^{-1} , simétrico en 3280 cm^{-1} , y de *bending* en 1644 cm^{-1} ,¹⁴⁸ por lo que se puede descartar que la banda presente en 3660 cm^{-1} sea debida a la hidratación del solvente durante el proceso de solubilización de la celulosa. Además, la ausencia de la banda característica de 1644 cm^{-1} también aportaría evidencia de ello. Entonces, aparentemente se trata de grupos –OH expuestos al medio de DMSO debido a un cambio en el plegamiento de la estructura del biopolímero, en donde expone a estos grupos, ocasionada por la acción intercalante del solvente. Sin embargo, no se ha encontrado evidencia en el infrarrojo sobre grupos –OH libres ni en celulosa amorfa ni en cristalina, ni en polisacáridos como amilosa, xilano, etc, por lo que la asignación de grupos –OH libres en la celulosa ha sido motivo de controversia.¹⁴⁹ Otras evidencias que soportan nuestra hipótesis de exposición de grupos –OH solvatados por DMSO las expondremos más adelante en los experimentos de formación de películas de Langmuir.

En el caso del THF, la banda asociada a los grupos –OH de la celulosa disuelta se encuentra en 3350 cm^{-1} , y para el caso del DMSO en 3660, lo que según la Tabla 5 corresponde a una unión –H intramolecular en la cadena central de la celulosa. La Figura 35 muestra los enlaces H activados debido a este posible cambio conformacional en THF y DMSO. Los grupos -OH intermoleculares (O2...H6) de la celulosa II son los que se observan activados en el infrarrojo (Tabla 2), tanto en THF como en DMSO. Mientras que los grupos –OH intramoleculares (O5...H3) de la celulosa II son activados en el infrarrojo únicamente por el DMSO. La Figura 35 muestra los grupos –OH activados mencionados. Como no se encontraron artículos que sustenten este efecto se puede mencionar que es la primera vez que se observa una disolución de celulosa en donde se expongan los grupos OH correspondientes a la posición 3, es por ello que en el espectro de IR-TF se activa un grupo OH en frecuencias tan altas como 3660 cm^{-1} .

Aunque se ha descrito que el comportamiento observado en el espectro IR-TF está relacionado a un fenómeno de fraccionamiento,¹⁵⁰ es más probable que las condiciones de solubilización utilizadas en este trabajo causaran un desplegamiento distinto de la

estructura de celulosa en función del solvente, lo cual expondría los grupos –OH del biopolímero de forma distinta y también en cantidades distintas para cada uno de ellos, aproximadamente en relación 1:2 entre puentes intra- e inter-moleculares.

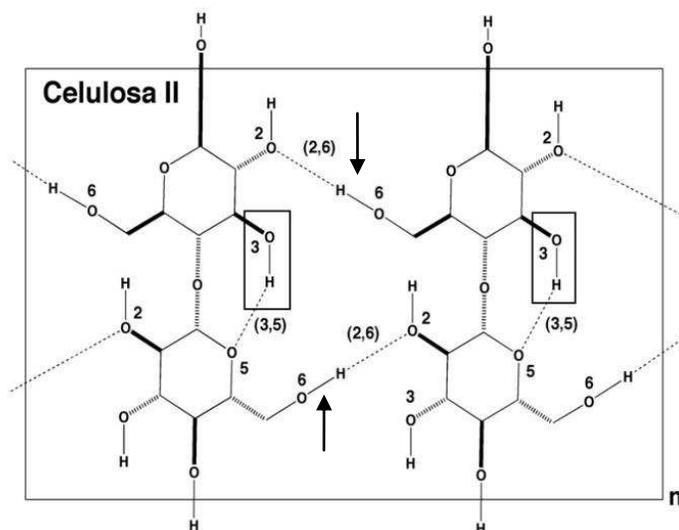


Figura 35. Los grupos –OH intermoleculares (O2···H6) de la celulosa II (flechas) son los que se observan activados en el infrarrojo, tanto en THF como en DMSO. Mientras que los grupos –OH intramoleculares (O5···H3) de la celulosa II (recuadros) son activados en el infrarrojo únicamente por el DMSO.

7.2.1.2. LIGNINA

Debido a los grupos fenólicos presentes en la estructura de la lignina, se realizó una comparación de la absorción en la región ultravioleta del espectro electromagnético de las soluciones obtenidas con cada solvente. La Figura 36 muestra los espectros UV-vis típicos obtenidos con las soluciones de lignina en los tres solventes evaluados.

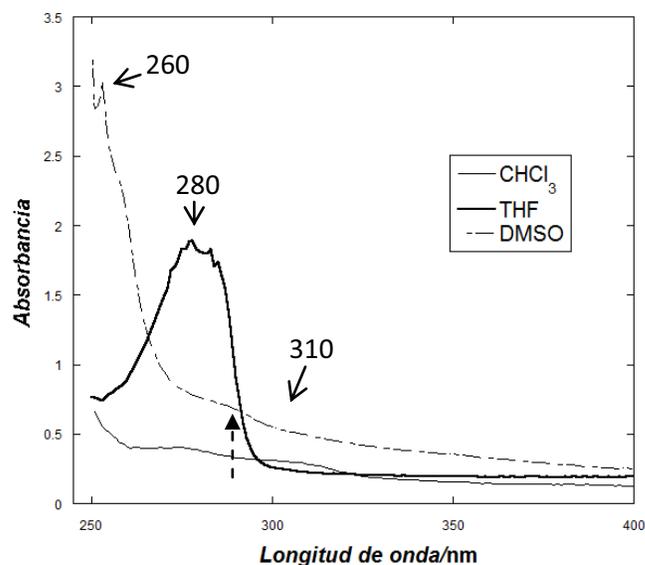


Figura 36. Espectros UV-vis a soluciones de lignina en los tres solventes evaluados. La flecha punteada indica un posible corrimiento batocrómico para el caso del DMSO.

Se observan dos bandas de absorción en el CHCl₃, en longitudes de onda de 310 y 270 nm, para el caso del THF se observa un máximo en forma de meseta entre 270 y 290 nm, y finalmente, en el caso del DMSO se observan dos máximos, uno en 260 y otro en 290 nm. A este respecto, está descrito que los grupos fenol y guaiacil presentan bandas de absorción alrededor de 280 nm en función del solvente utilizado (agua, NaOH y etanol), y que el ácido ferúlico presenta bandas de absorción alrededor de 263 nm.¹⁵¹ Por otra parte, se ha descrito que la lignina kraft presenta una banda de absorción definida a 283 nm en THF y DMSO, y que para la solución en THF existe una segunda banda a 240 nm.¹⁵² Entonces, tanto el THF como el CHCl₃ presentarían bandas características a varios grupos fenólicos (guaiacil, ionol, alcohol vanílico, propionato de guaiacilo, deshidro-dihidroisoeugenol).

Por su parte, el DMSO presentaría un ligero corrimiento hacia valores mayores en el espectro electromagnético, (corrimiento batocrómico flecha punteada en Figura 36), así como una banda de absorción en 260 nm. Respecto al corrimiento batocrómico, está descrito con anterioridad (para otros polímeros) que este fenómeno se relaciona con un posible cambio de peso molecular, pues se ha observado un aumento en el valor de la banda de absorción para pesos moleculares menores.¹⁵³ Sin embargo, al igual que en el caso de la celulosa, es poco probable que las condiciones de solubilización utilizadas ocasionaran fraccionamiento, por lo que el corrimiento batocrómico, y la banda observada en 260 nm, se podrían asociar a cambios conformacionales en la estructura molecular del compuesto,¹⁵⁴ por ejemplo un desplegamiento distinto en función del solvente y las condiciones de solubilización, tal cual se planteó para el caso de la celulosa.

Entonces, en función de las pruebas de solubilización de celulosa y lignina en los tres solventes evaluados, se podría concluir que: en el caso de la celulosa, el DMSO y el THF solubilizaron al biopolímero, aparentemente modificando la conformación de la estructura molecular, de manera que se exponen grupos -OH intramoleculares en ambos solventes, mientras que solo el DMSO es capaz de exponer los grupos -OH intramoleculares. Por otra parte, para el caso de la lignina, esta fue solubilizada en los tres solventes, pero al igual que con la celulosa, aparentemente el DMSO ocasiona un cambio en la estructura tridimensional, mientras que en CHCl₃ y en THF se exponen distintas unidades fenilpropano correspondientes a 280 nm debido a que estos dos últimos solventes son de polaridad baja y media, interactuando preferentemente con estas regiones del biopolímero y por lo tanto propiciando su exposición al medio solvente.

7.2.2 FORMACIÓN DE PELÍCULAS DE LANGMUIR

7.2.2.1. CELULOSA

Como se mencionó antes, en este trabajo la solubilización de celulosa y lignina es necesaria para generar películas en la interfase aire-agua, que después son transferidas a un substrato sólido. Por lo anterior resulta crítico evaluar si el material solubilizado genera una película en esta interfase. La Figura 37 muestra las isothermas típicas obtenidas con los tres solventes en la interfase aire-agua para el caso de celulosa. Como se puede observar, solamente la solución en THF ocasionó un cambio importante en la presión superficial, lo cual indica la presencia de material en la interfase.

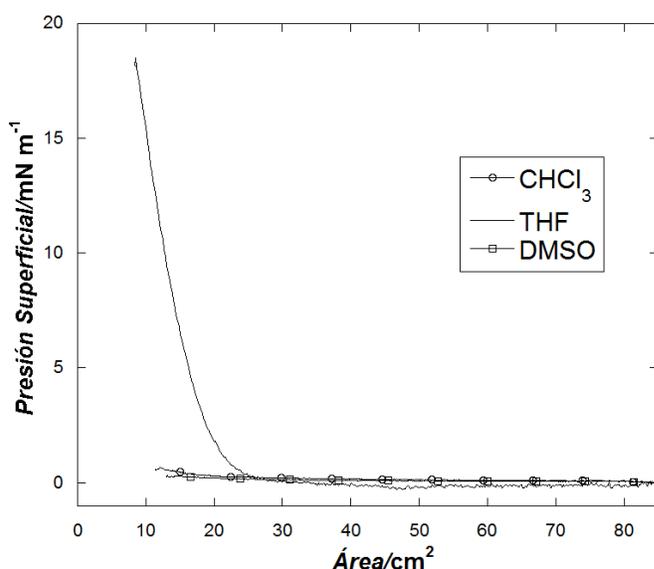


Figura 37. Isothermas presión superficial-área de las soluciones de celulosa en los tres solventes evaluados. Volumen de depósito de 27 μL de solución, a 24° C. Tasa de compresión de 5 mm min⁻¹. Se muestra en área y no área por molécula pues no se conocía la concentración.

Por otra parte, aunque se observó previamente que el DMSO también solubiliza a este biopolímero, no se observa un cambio de presión superficial cuando se deposita solución de celulosa en este solvente en la interfase. Esto posiblemente se debe a la baja presión de vapor del DMSO, lo cual ocasiona que el solvato biopolímero-solvente formado permanezca como tal. Lo anterior ocasiona entonces que las interacciones atractivas $\text{DMSO}_{\text{SOLVATO-subfase}}$ sean mayores que las fuerzas repulsivas $\text{celulosa}_{\text{SOLVATO-subfase}}$, lo que causa que el complejo se disuelva en el bulto y por ende no se observe actividad interfacial. Esto coincide con lo observado en los espectros IR-TF, que si bien indicaron que tanto el THF como el DMSO aparentemente exponen grupos -OH intramoleculares, el tamaño molecular del solvente y su polaridad alta serían los factores críticos en el proceso, pues el DMSO es una molécula más pequeña que el THF, pero también más polar lo que ocasionaría que se intercalara más y formara puentes de hidrógeno más

fuertes con la molécula de celulosa. Entonces, aparentemente el DMSO funcionaría en este caso como un pequeño surfactante o agente de transferencia entre las fases gaseosa y líquida, propiciando que la celulosa en este estado solvatado sea soluble en agua.

Por simplicidad en la preparación de soluciones de celulosa se evaluó la sonicación como otro método de solubilización, utilizando únicamente THF, por ser el único que generó películas de celulosa en la interfase. En la Figura 38, se muestran las isotermas típicas de películas de Langmuir generadas con soluciones obtenidas por ambos métodos (agitación y sonicación).

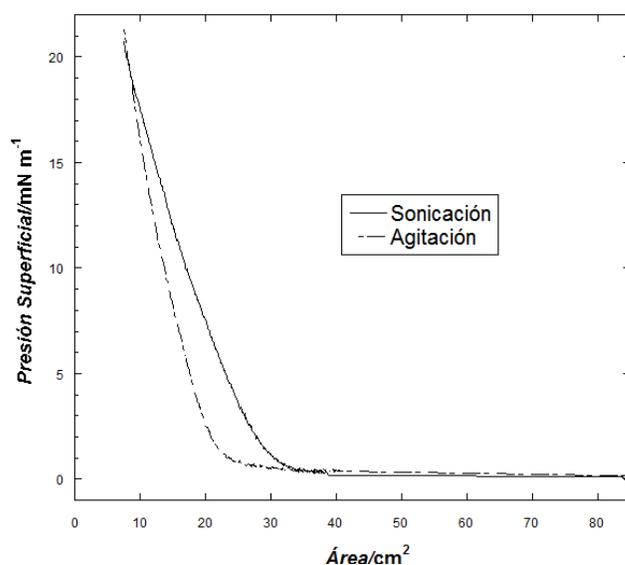


Figura 38. Comparación del método de solubilización de celulosa. Volumen de depósito de 27 μL de solución, a 24° C. Tasa de compresión de 5 mm min^{-1} .

Se observa que la película generada por sonicación presenta áreas mayores, y una compresibilidad menor, lo que indica que estos dos tratamientos de solubilización generan distintas conformaciones moleculares de la celulosa. Así, aparentemente la sonicación despliega o desempaca mejor al biopolímero, lo que ocasionaría el incremento observado en el área molecular, debido a que se mide un estado del biopolímero que es menos denso. Mientras que la agitación ocasionaría que el biopolímero permanezca plegado o empaado, ocasionando un área menor debido a que se mide un estado más denso del mismo biopolímero.

Posteriormente, se estimó gravimétricamente la concentración obtenida al sonicar celulosa en THF. Esta determinación se realizó cuantificando la diferencia de peso de la celulosa sin disolver, antes y después del tratamiento de solubilización, pesando todos los objetos que estuvieron en contacto con la mezcla celulosa-THF. Así, se determinó que la

concentración de celulosa en THF, al utilizar sonicación, es de $0.48 \pm 0.08 \text{ mg mL}^{-1}$ que resulta adecuada para el fin buscado en este trabajo.

De este modo, el método para obtener soluciones de celulosa microcristalina en THF bajo condiciones suaves consistió en agregar 100 mg de celulosa en 5 mL de THF y sonicar durante 40 minutos, luego de lo cual la mezcla celulosa-THF se filtra con presión positiva (jeringa), haciéndola pasar por una membrana de fluoruro de polivinilideno con diámetro de poro de $0.45 \mu\text{m}$.

7.2.2.2. LIGNINA

Al igual que con la celulosa, las soluciones de lignina obtenidas con agitación durante 72 horas fueron evaluadas en la interfase aire-agua. La Figura 39 muestra las isotermas típicas obtenidas de las soluciones en los solventes evaluados.

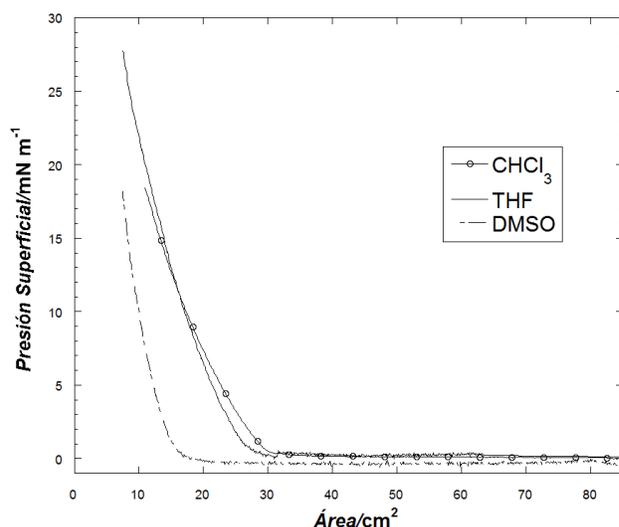


Figura 39. Isotermas presión superficial-área de las soluciones de lignina en los tres solventes evaluados. Las isotermas se obtuvieron por duplicado, depositando $20 \mu\text{L}$ de solución, a 24°C y comprimiendo a 5 mm min^{-1} .

Se observa que las soluciones en los tres solventes mostraron un cambio importante en la presión superficial, lo cual indica la formación de una película de Langmuir en la interfase aire-agua. Por otra parte, respecto a la compresibilidad de las películas, cualitativamente se observa que las obtenidas con soluciones en CHCl_3 y THF presentaron una compresibilidad menor que la obtenida en DMSO, lo que indica que la película con el último es más compacta, posiblemente debido a un buen intercalado del solvente con el biopolímero, donde a diferencia de CHCl_3 y THF, el DMSO no expone grupos grandes al medio solente como los son los fragmentos aromáticos, por lo tanto la conformación del biopolímero solvatada con DMSO es de menor área superficial. Este comportamiento distintivo coincide con lo observado en espectroscopía UV-vis. Debido a

que el THF fue el único solvente que solubilizó a la celulosa en un estado tal que continúa mostrando propiedades interfaciales, se le eligió también para lignina, pues el objetivo de este trabajo era estudiar mezclas con ambos biopolímeros para la formación de películas de Langmuir. Posteriormente, y del mismo modo como se hizo con la celulosa, se evaluó el tratamiento de solubilización en THF por sonicación, sin embargo, no se tuvo éxito generando películas de Langmuir con la solución obtenida, por lo que el método de agitación de 72 horas a 1200 rpm fue el utilizado en el trabajo para solubilizar ese polímero. De nuevo, aparentemente los cambios en la conformación de este biopolímero causados por el método de solubilización, ocasionarían que cuando se sónica, adquiera un carácter más hidrofílico, (posiblemente debido a la exposición de más grupos $-OH$) lo que ocasionaría que no forme una película en la interfase aire-agua. Finalmente, del mismo modo como se hizo para celulosa, se estimó gravimétricamente la concentración de lignina en THF, agitando 72 horas, y se determinó que era de $1.36 \pm 0.03 \text{ mg mL}^{-1}$.

En función de los resultados obtenidos, se observó que el THF solubiliza celulosa mediante sonicación durante 40 minutos, generando soluciones con concentración de $\approx 0.5 \text{ mg mL}^{-1}$. Estas soluciones forman películas de Langmuir en la interfase aire-agua. Este mismo solvente solubiliza a la lignina mediante los dos métodos, pero solamente la solución agitada conserva las propiedades de anfifilicidad del biopolímero para que sea capaz de generar películas en la interfase aire-agua, donde la solución obtenida por sonicación tiene una concentración de 1.36 mg mL^{-1} .

7.3. ESTUDIOS EN LA INTERFASE AIRE-AGUA

Una vez definido el solvente adecuado, las características fisicoquímicas y morfológicas de las películas de celulosa, lignina, y sus mezclas, fueron evaluadas mediante isothermas de presión superficial vs área por molécula (II-A) y microscopía de ángulo de Brewster (MAB). De esta manera, se obtuvo información de la estabilidad de las soluciones, del área molecular específica (A_E), compresibilidad (C), transiciones de fase, posibles presiones de colapso, estabilidad térmica, histéresis, morfología de los dominios formados en las distintas fases y miscibilidad de los dos biopolímeros en la interfase. Toda esta información es necesaria para caracterizar el sistema, y ayuda a definir las condiciones más adecuadas de depósito desde la interfase aire-agua sobre un substrato sólido.

7.3.1. ISOTERMA Π -A Y MORFOLOGÍA DE LA PELÍCULA DE CELULOSA

En pruebas preliminares se definieron las condiciones siguientes para la formación de películas de Langmuir de celulosa, las cuales fueron: gotear 150 μL de solución con concentración de 1 mg mL^{-1} , permitir la evaporación del solvente durante 15 minutos (intervalo típicamente utilizado para permitir la evaporación), y reducir el área interfacial con las barreras a una velocidad de compresión de 15 mm min^{-1} , a una temperatura de 24° C. En la Figura 40, se muestra una isoterma típica de celulosa obtenida en estas condiciones y las micrografías de MAB de las morfologías de la película de Langmuir a distintas presiones superficiales.

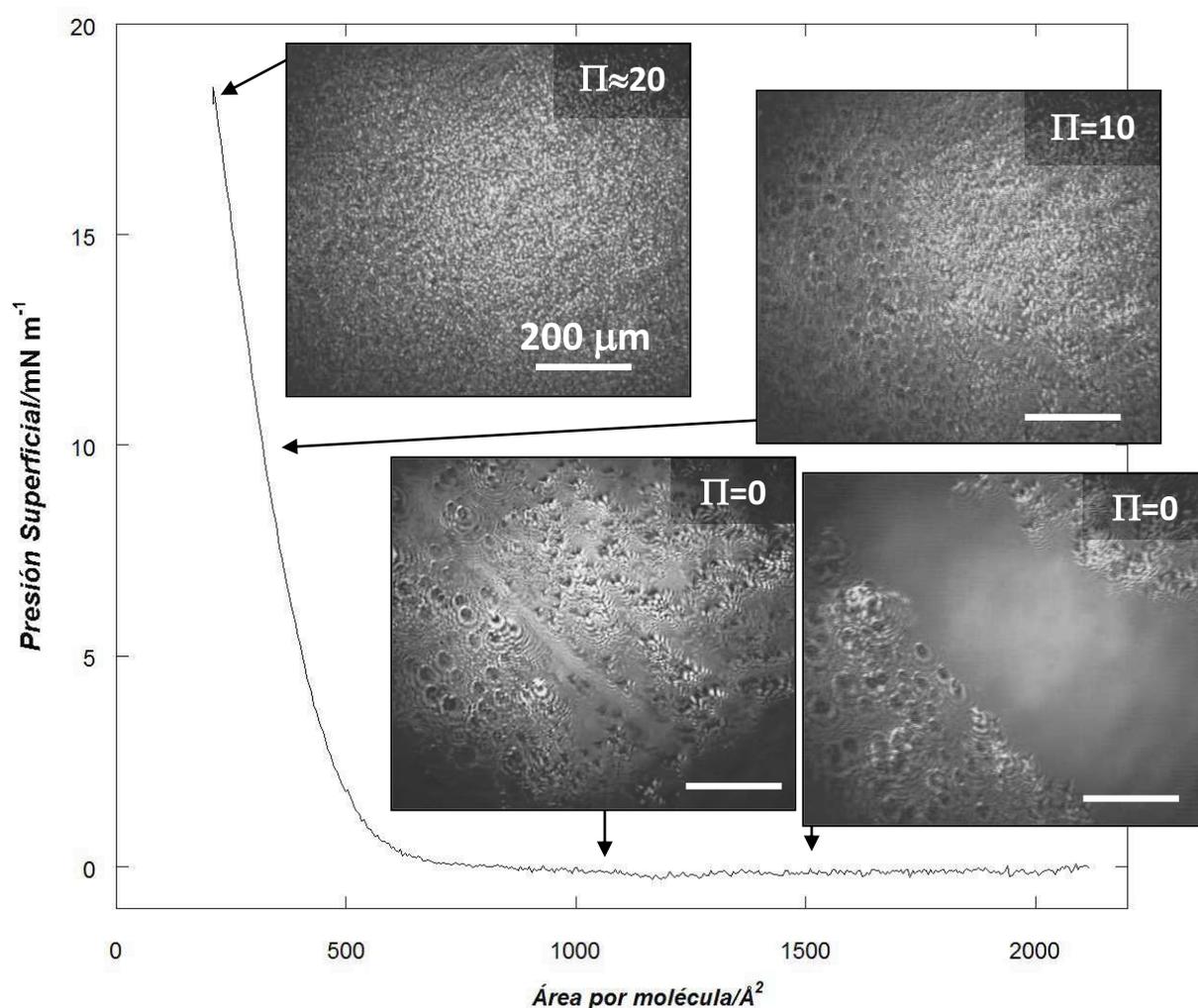


Figura 40. Isoterma Π -A típica de celulosa disuelta en THF y micrografías MAB de la morfología de la película a tres presiones superficiales distintas.

Como se puede observar, la isoterma muestra una transición de fase entre una fase gaseosa y una fase condensada, a muy bajas presiones superficiales ($\Pi \approx 0$ mN m^{-1}),

y hasta llegar a un valor de $\approx 700 \text{ \AA}^2$ por molécula. La única transición de fase observada concuerda con todos los trabajos descritos previamente en la interfase aire-agua, (ver Tabla 7) aunque en todos estos se utilizaron derivados de celulosa. Al reducir el área por molécula, a partir de valores menores a 500 \AA^2 se puede observar un incremento rápido en la presión superficial, llegando hasta un valor de $\Pi \approx 18 \text{ mN m}^{-1}$, sin manifestarse hasta este momento un colapso claro de la película. Se obtiene un valor de A_E promedio de $490 \pm 96 \text{ \AA}^2$ por molécula de celulosa, y un valor del módulo de compresibilidad superficial (K) de $30.38 \pm 0.97 \text{ mN m}^{-1}$, y por lo tanto, una compresibilidad ($C=1/K$) de $0.033 \pm 1 \times 10^{-3} \text{ m mN}^{-1}$ (similar y del orden encontrado en celulosas funcionalizadas, ver Tabla 9). Respecto a la alta desviación estándar observada, este tipo de comportamiento es habitual cuando se trata de polímeros naturales, aunque no siempre es determinado. Por ejemplo, en el único trabajo donde mencionan ese aspecto,⁷⁸ se determinó una variabilidad de aproximadamente $\pm 25\%$.

Respecto a la ausencia de colapso que se observa, esto es distinto a lo descrito en diversos trabajos (ver tabla 9). Para éste tipo de moléculas complejas, el colapso se entiende como un “amontonamiento” de las moléculas, más que el clásico concepto de “ruptura” de la película, usualmente aplicado a monocapas de moléculas anfífilas;¹⁵⁵ entonces, se ha sugerido que el colapso de una película polimérica sería un cambio gradual en la pendiente, y no un cambio brusco.¹⁵⁶ Sin embargo, tampoco se observaron estos cambios graduales. Posiblemente este fenómeno (o ausencia de) daría evidencia extra de una película muy agregada.

Respecto al área específica obtenida, si se considera el $\overline{Mn}_{\text{Supuesto}} = 7.5 \times 10^4 \text{ g mol}^{-1}$, y que una unidad de anhidroglucosa tiene un $PM = 172 \text{ g mol}^{-1}$, se tendrían ≈ 436 unidades monoméricas (residuos) por unidad molécula de la celulosa utilizada (en estado sólido). Entonces, en este trabajo se tendría un A_E por residuo de:

$$\frac{A_E}{\text{residuo}} = \frac{A_E/\text{celulosa}}{\text{Residuos/celulosa}} = \frac{490 \text{ \AA}^2}{436 \text{ residuos}} \approx 1.12 \text{ \AA}^2/\text{residuo}$$

A este respecto, el área molecular teórica de un anillo piranósico (muy similar a un residuo) en la interfase se ha estimado en 60 \AA^2 .¹⁵⁷ Entonces, el área específica por residuo estimada en el presente trabajo es mucho menor a ésta estimación teórica, y más aún, no es posible. Se ha interpretado que áreas menores se deben a fuerzas intramoleculares en la celulosa, que son muy fuertes como para permitir una dispersión molecular completa,¹⁵⁸ lo cual generaría la formación de estados todavía plegados de la

celulosa y que por lo tanto no existo otra posibilidad más que salir del plano 2-D. Por ejemplo, los derivados alifáticos de celulosa (ver Tabla 7) no presentan este comportamiento, pues se considera que en ese tipo de moléculas el eje de las cadenas alifáticas ocasionan la minimización de las fuerzas intermoleculares generadas por puentes de hidrógeno, permitiendo una mejor dispersión. A este respecto, en este trabajo se evaluó el uso de CHCl_3 como cosolvente, pues tiene nulo poder acomplejante, y se sabe que este tipo de solventes genera la dispersión de moléculas poliméricas, como el polimetilmetacrilato, debido a interacciones de tipo ácido-báse.⁹³ El uso de este cosolvente ocasionó un aumento de ≈ 3 veces en el A_E (resultado no mostrado), lo cual apoyaría la hipótesis de la formación de agregados que salen del plano 2-D interfacial. Entonces, si se hace el supuesto de que en las películas de celulosa (sin cosolvente), las moléculas del residuo anhidroglucosa se encuentran totalmente expandidas de forma paralela a la interfase aire-agua, y que a ese nivel se encuentran totalmente dispersos, entonces se podría considerar que se tienen estructuras con ≈ 8 residuos de anhidroglucosa en contacto con la interfase aire-agua, y estructuras de ≈ 54 unidades de anhidroglucosa saliendo del plano 2-D de la interfase aire-agua, aunque no es posible conocer la disposición espacial que tienen. La Figura 41 presenta un esquema de este posible ordenamiento de la celulosa en la interfase aire-agua.

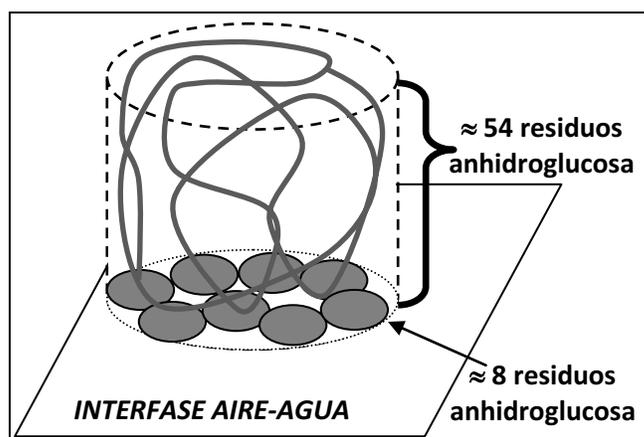


Figura 41. Esquema del posible ordenamiento de la celulosa en la interfase aire-agua.

Por otra parte, las micrografías de MAB obtenidas a $\Pi=0 \text{ mN m}^{-1}$ muestran claramente el equilibrio entre la fase gaseosa y la fase condensada, pues se observan áreas oscuras y áreas con dominios brillantes, respectivamente. A esta misma presión superficial, pero a áreas menores, se observa el crecimiento de la fase condensada, pero con regiones con tonalidades de brillo distintas, que indican alturas distintas, debido, probablemente, a la formación de multicapas. En la micrografía siguiente, ya en la fase

condensada ($\Pi = 10 \text{ mN m}^{-1}$), se observa una película rugosa. Así mismo, se observa la formación de gránulos (zonas blancas, con mayor altura), probablemente debidos a la agregación del polímero celulósico, y también se observan “poros” (zonas oscuras); la película es homogénea en toda la extensión de la superficie, (como se verificó moviendo el lente por distintas regiones de la interfase). En este punto, la película es rígida y no presenta movimiento (no es fluida), lo que confirma el carácter de fase condensada. Finalmente, a $\Pi = 20 \text{ mN m}^{-1}$, aparentemente la densidad de los gránulos aumenta, es decir, la película se compacta, pero los microagregados conservan sus dimensiones, por lo que se puede suponer que no aumentan de tamaño.

Molécula	\overline{Mn} (gmol^{-1})	Solvente	$A_E/\text{residuo}$ (Å^2)	Trans. de fase	Colapso	C (m mN^{-1}) ★★	Ref.
Celulosa microcristalina	75,000	THF	★	1	×	0.033	ESTE TRABAJO 159
Anillo piranósico teórico			60	1	-	-	
Etilcelulosa		CHCl_3 (0.05% p/v)	66.5	1	✓	0.011	50
Butil celulosa	-	CHCl_3 (1 mg mL^{-1})	60	1	✓	0.02	158
Hexil celulosa	-	CHCl_3 (1 mg mL^{-1})	86	1	✓	0.02	158
Octil celulosa	-	CHCl_3 (1 mg mL^{-1})	94	1	✓	0.02	158
Dodecil celulosa	-	CHCl_3 (1 mg mL^{-1})	113	1	✓	0.02	158
Metil pentil celulosa	-	CHCl_3 (1 mg mL^{-1})	75	1	✓	0.02	158
Docecil metil celulosa	-	CHCl_3 (1 mg mL^{-1})	75	1	✓	0.02	158
Trimetilsililcelulosa (TMSC)	70,000	Hexano	75, 90	1	✓	0.005 0.008	54 132

Tabla 7. Algunos valores de A_E para celulosa y derivados descritos en la literatura consultada. (★) No es posible determinarlo. (★★) Algunas compresibilidades se estimaron directamente de las isotermas descritas en la referencia.

7.3.1.1. REVERSIBILIDAD DE LA ISOTERMA Π -A DE CELULOSA

Los ciclos de recompresión se utilizan para investigar las interacciones moleculares en las películas de Langmuir, evaluando uno o más ciclos.⁷⁸ Con estos estudios se puede observar la histéresis y estabilidad de las películas, que indican el grado de equilibrio o reorganización en la interfase.⁷¹ Por lo tanto, en el presente trabajo se realizaron estos ciclos para estudiar la estabilidad de las películas, así como para identificar las condiciones óptimas para realizar transferencias tipo Langmuir, (técnica que se ha detallado con anterioridad).¹⁶⁰ La Figura 42 muestra el comportamiento típico que presentaron las películas de celulosa, donde se observa una marcada histéresis de expansión, que indica que la velocidad de expansión (15 mN m^{-1}) es ligeramente mayor que la velocidad que le lleva al sistema recuperar su estructura original. Así mismo, se observa que el área por molécula del ciclo de expansión (A_{EXP}) es de 400 Å^2 , sin embargo, luego de dos minutos, la película presenta el mismo comportamiento en la recompresión,

pues las áreas específicas de compresión (A_C) y recompresión (A_R) son de aproximadamente 440 y 460 \AA^2 respectivamente, es decir, el área por molécula disminuyó sólo un 5% respecto al valor original.

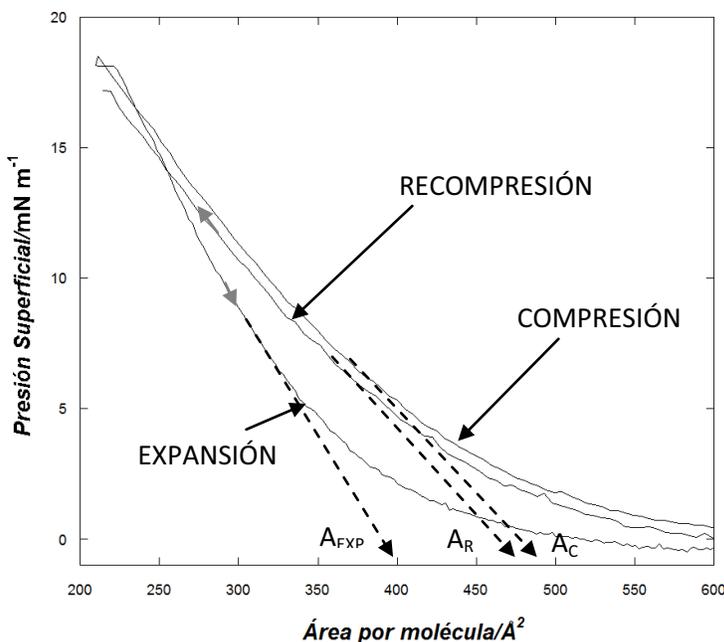


Figura 42. Ciclo de compresión-expansión-compresión de la película de celulosa en THF a 24° C. Se depositaron 100 μL , y se comprimió y expandió a una tasa de 15 mm min^{-1} , expandiendo inmediatamente después de comprimir, y recomprimiendo luego de 2 minutos. Las flechas grises indican el sentido en que evoluciona la isoterma Π -A.

Los casos límite de este comportamiento son las moléculas que no presentan ninguna histéresis de recompresión, por ejemplo, monocapas de ácido esteárico,⁷¹ o por el contrario, moléculas semi-anfifílicas y no-anfifílicas que en general presentan una gran histéresis. La histéresis se relaciona con distintos fenómenos: (i) entrecruzamiento de las cadenas, (ii) aumento súbito de la subfase acuosa a través de la monocapa durante la decompresión, (iii) solubilidad parcial del material de la monocapa, o (iv) reorganización molecular.^{126,161} Entonces, aparentemente este tipo de fenómenos se presentan en esta película, pero en un grado moderado, pues el hecho de que una película muestre poca histéresis de recompresión, indica una similitud en la organización de las moléculas luego del ciclo de recompresión. Más aún, este comportamiento también indica un esparcimiento espontáneo en la interfase, el cual es característico de sustancias que tienen tensiones superficiales bajas, y tensiones interfaciales con el agua igualmente bajas.¹⁵⁸ Entonces, el estudio de reversibilidad indica que la película es adecuada para realizar depósitos aún luego de una primera compresión, o en el caso de multidepósitos LB, sin que el trabajo lateral ejercido sobre la película modifique la estructura del biopolímero.

En función de los estudios realizados a la película de Langmuir de celulosa, se puede descartar la formación de una monocapa, pues se obtiene una película que presenta agregación de moléculas de celulosa fuera del plano 2-D, ocasionada por la formación masiva de puentes de hidrógeno entre las anhidroglucosas constituyentes de este biopolímero. Se definió la presión superficial de 10 mN m^{-1} como la presión adecuada para realizar depósitos de celulosa, pues la película es rígida, presenta una menor rugosidad que a 20 mN m^{-1} y es un punto intermedio de la fase condensada. Así mismo, la película formada es lo suficientemente estable para realizar rutinas de depósito más sofisticadas, como por ejemplo multidepósitos, sin modificar sus propiedades de forma importante.

7.3.2. ISOTERMA Π -A Y MORFOLOGÍA DE LA PELÍCULA DE LIGNINA

La Figura 43, muestra la isoterma Π -A típica de lignina obtenida a partir de una solución en THF, a 24° C , y las micrografías MAB asociadas a las distintas condiciones de la película.

La isoterma muestra una transición de fase, a muy bajas presiones superficiales ($\Pi \approx 0 \text{ mN m}^{-1}$), entre una fase gaseosa y una fase condensada, hasta llegar a un valor de $\approx 40 \text{ \AA}^2$. Lo cual coincide con todos los trabajos descritos, que solo observaron una transición de fase. A partir de valores de área por molécula menores a 35 \AA^2 se observa un rápido incremento en la presión. La isoterma alcanza un valor de presión superficial máximo de $\approx 17 \text{ mN m}^{-1}$ sin manifestarse un colapso claro de la película. El valor promedio de área específica, A_E obtenido fue de $35.46 \pm 0.66 \text{ \AA}^2$ por molécula de lignina, y el valor de compresibilidad, C , es de $0.029 \pm 1.53 \times 10^{-3} \text{ m mN}^{-1}$. Cabe notar que se observó una menor variabilidad en el valor de estos parámetros que en el caso de celulosa, lo cual podría indicar la posibilidad de una película de fracciones de lignina de bajo peso molecular.

Respecto a la ausencia de colapso observada, al igual que en el caso de la película de Langmuir de celulosa obtenida en este trabajo, podría indicar que se trata de una película con material muy agregado. Por otra parte, este comportamiento es distinto a lo descrito en diversos trabajos (ver Tabla 10), y esto puede deberse a: (i) en las referencias citadas, se trabajó con moléculas con mayor polaridad que las utilizadas en este caso, (ii) el colapso se presentó a $\Pi \geq 30 \text{ mN m}^{-1}$, la cual es una presión que no se alcanzó en el presente trabajo, aunque una referencia describió colapso de la película de lignina a $\Pi \approx 12 \text{ mN m}^{-1}$.⁵⁰

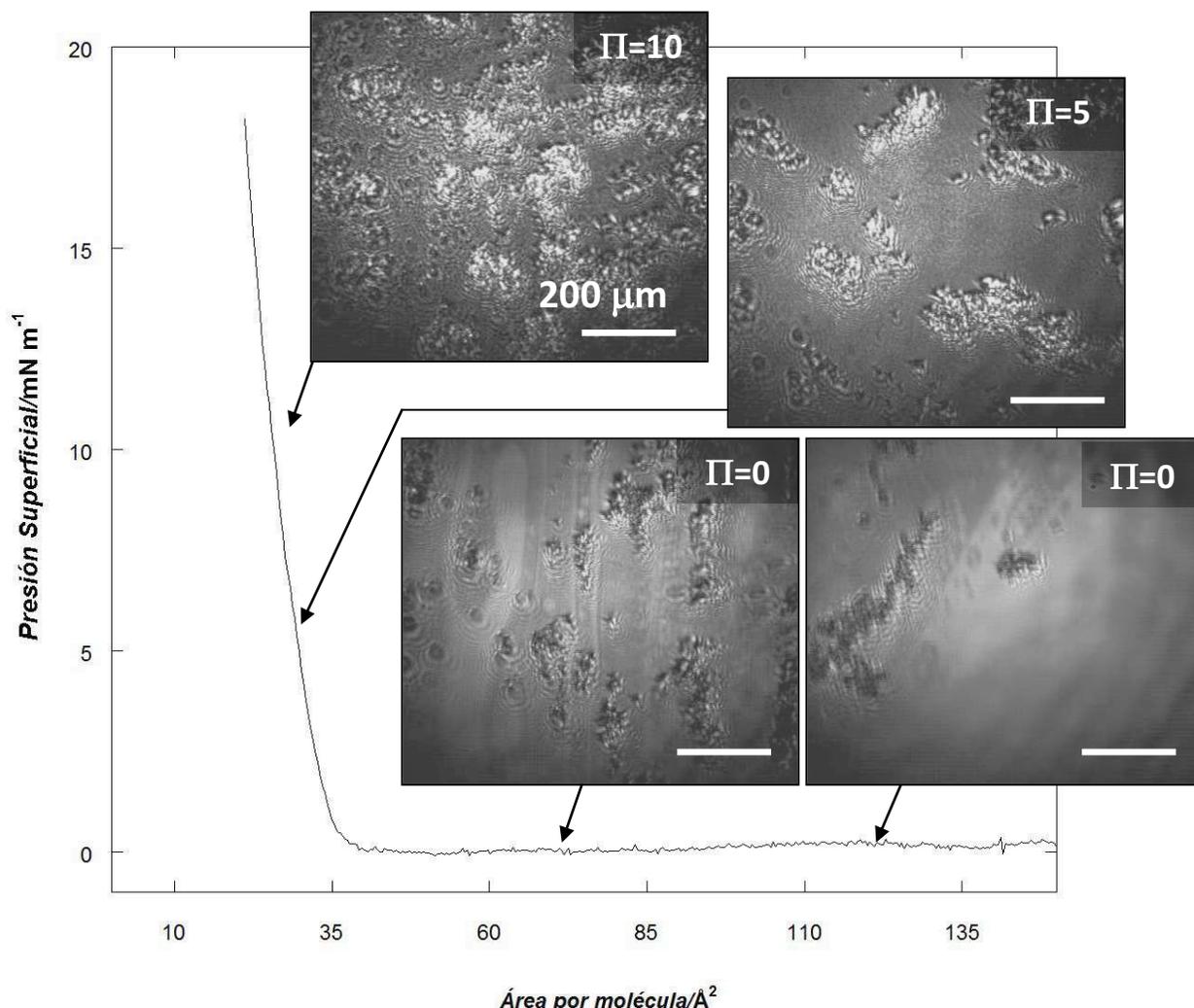


Figura 43. Isotherma Π -A típica de lignina disuelta en THF y micrografías MAB asociados a tres distintas presiones superficiales generadas por la película

Respecto al área específica obtenida, si se considera que el biopolímero utilizado en el presente trabajo tiene un $\overline{M}_n = 1 \times 10^4 \text{ g mol}^{-1}$, y que una unidad fenil propano típica tendría un $\text{PM} \approx 186 \text{ g mol}^{-1}$ (considerando una fórmula mínima *tipo* $\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_2(\text{OCH}_3)(\text{OH})_{0.5}$,^{76,79}), en teoría se tendrían 54 residuos fenilpropano (C_9) por molécula de lignina (en estado sólido). Entonces, el resultado obtenido en este trabajo indicaría que se tendría un A_E de $\approx 0.65 \text{ \AA}^2 / \text{residuo } \text{C}_9$, lo cual no es posible. En este sentido, la literatura se han descrito valores del área molecular teórica de la unidad C_9 de $25\text{-}100 \text{ \AA}^2$,⁷⁰ aunque en general se describen A_E de $10\text{-}20 \text{ \AA}^2$ por unidad C_9 .^{156,71,76} Entonces, al igual que en el caso de la película de celulosa, el área específica por residuo C_9 estimada en el presente trabajo es menor que la teórica. Esto puede deberse a varios factores: (i) en la literatura se utilizan ligninas con pesos moleculares \overline{M}_n del orden de $1,000 \text{ g mol}^{-1}$ (ver tabla 10), es

decir, una décima parte del \overline{M}_n utilizado en el presente trabajo; (ii) de nuevo, e igual que con la celulosa, es posible la formación de estructuras que están fuera del plano 2-D, lo cual ocasionaría las áreas por moléculas tan pequeñas. Al igual que con la celulosa, el uso de CHCl_3 ocasionó un aumento en A_E , de 3 veces en este caso (resultado no mostrado). Si se hace la misma simplificación que en el caso de la película interfacial de celulosa, se podría considerar que para el caso de lignina, se tienen estructuras con ≈ 2 residuos C_9 en contacto con la interfase aire-agua, y estructuras de ≈ 52 unidades C_9 saliendo del plano 2-D de la interfase aire-agua. La Figura 44 presenta un esquema de este posible ordenamiento.

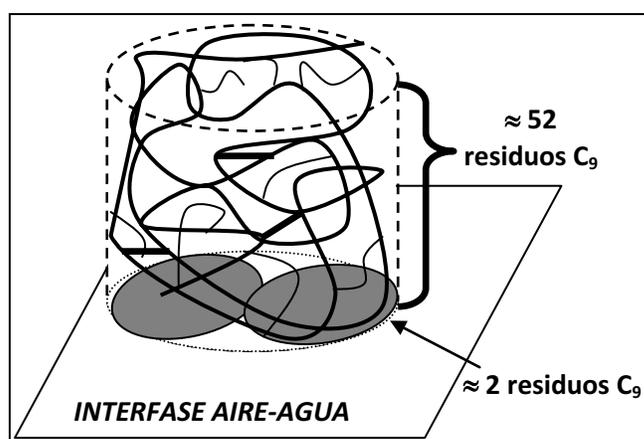


Figura 44. Esquema del posible ordenamiento de la lignina en la interfase aire-agua.

Respecto a la compresibilidad de la película, ésta es menor que la estimada para la película de celulosa, lo que indica una película interfacial más empaçada. Por otra parte, el valor obtenido en este trabajo es similar al descrito para películas de Langmuir de diversas ligninas técnicas (ver Tabla 8).

La microscopía MAB muestra que las zonas de fase gaseosa disminuyen al acercarse a un valor de área por molécula de $\approx 40 \text{ \AA}^2$. Por otra parte, a presiones superficiales $\Pi \approx 0 \text{ mN m}^{-1}$, las micrografías MAB muestran el equilibrio de entre la fase gas y la fase condensada. La película presenta dominios más definidos de material agregado que en el caso de la película de celulosa, lo que respalda la hipótesis de una superficie agregada en multicapas. En la fase condensada ($\Pi = 5 \text{ mN m}^{-1}$) se observa una película homogénea en un nivel, y por encima de éste nivel agregados con dimensiones del orden de $\approx 50\text{-}200 \text{ \mu m}$ de longitud. La película muestra estos agregados en toda la superficie; por otra parte, la película no presenta movimiento. A $\Pi \approx 10 \text{ mN m}^{-1}$ se observa que

desaparece el nivel inferior liso presente a $\Pi=5 \text{ mN m}^{-1}$, y se incrementa el número de los agregados, aunque aparentemente no hay aumento en su tamaño.

Método de extracción	\overline{Mn} (g gmol ⁻¹)	Solvente	A_E / residuo (Å ²)	Colapso	C (m mN ⁻¹) ★★	Ref.
Lignina kraft	10,000	THF	★	×	0.029	ESTE TRABAJO 70,71,156,76
Unidad C9 teórica			10-20	-	-	
Alcohol poli-coniferílico		DMA	17		0.01	74
Con metanol			60, 70	✓	0.017, 0.018	78, 79
Con etanol			100		0.015	78
Con propanol			60, 50		0.013, 0.018	78, 79
Con butanol			40, 45		0.018, 0.017	78, 79
Con mezcla etanol-agua (1:1)	1,400 2,400	Dimetilacetamida: cloroformo (DMA:CHCl ₃)	13	✓	0.008	76
Con sosa cáustica	1,100	DMA:CHCl ₃	14	×	0.012	76
Con acetona-agua-acido sulfúrico	1,300	DMA:CHCl ₃	11	×	0.007	76
Acetona-oxígeno	1,100	DMA:CHCl ₃	11	×	0.011	76
Acetona-oxígeno	1,190	DMA:CHCl ₃ (20:80) (V/V)	40	✓	-	71
Kraft	900	DMA:CHCl ₃ (20:80) (V/V)	25	✓	-	71

Tabla 8. Algunos valores de A_E para distintas ligninas técnicas descritos en la literatura. (★) No es posible determinarlo. (★★) Algunas compresibilidades se estimaron directamente de las isotermas descritas en la referencia.

Entonces, en función de toda esta información, y al igual que para la película de Langmuir de celulosa, se descarta la posibilidad de haber formado una monocapa. Toda la evidencia experimental indica que se generó una película con agregados fuera del plano 2-D, y aunque no queda clara la conformación del polímero en la interfase, se observa que los agregados formados son de dimensiones mayores que los observados en la película de celulosa.

7.3.2.1. REVERSIBILIDAD DE LA ISOTERMA DE LIGNINA

Se ha observado que las monocapas de ligninas no alcanzan un equilibrio verdadero, posiblemente a la reorganización en la interfase, por lo tanto, en este caso los ciclos de compresión expansión permiten estudiar las interacciones intermoleculares lignina-lignina.⁷⁸ Además, se pueden identificar condiciones óptimas para poder realizar transferencias LB,¹⁶⁰ pues estudios de estabilidad e histéresis permiten determinar las condiciones óptimas de depósito.⁷¹ Entonces, al igual que para el caso de la celulosa, para estudiar la estabilidad de la película de lignina, se realizaron ciclos de compresión-expansión-compresión para identificar condiciones que permitan realizar transferencias

tipo Langmuir. La Figura 45, muestra un ciclo de recompresión típico de películas de Langmuir de lignina obtenidas en este trabajo.

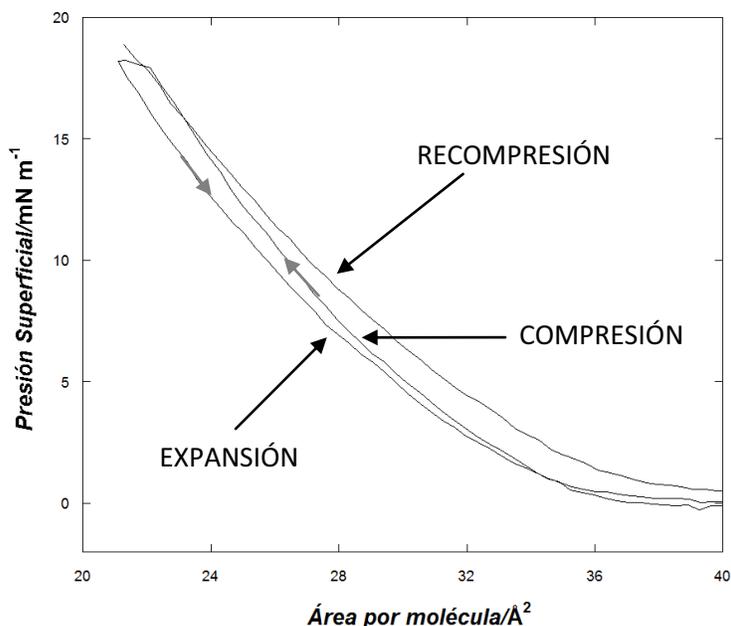


Figura 45. Ciclo de compresión-expansión-recompresión a la película de lignina.

Se observa que la velocidad de expansión (10 mm min^{-1}) es aproximadamente la misma que le lleva al sistema recuperarse, por lo que a diferencia de la película de celulosa no se presenta histéresis de expansión. Por otra parte, se observa que existe histéresis de recompresión, pues el área por molécula aumentó $\approx 10\%$. Este resultado es contrario al descrito por Pereira,⁷⁸ quien describió una reducción (mayor empaquetamiento) de aproximadamente 20% (a $\Pi=10 \text{ mN m}^{-1}$) del área molecular de recompresión, la cual atribuyó a la formación de agregados estables. También, Luner¹⁵⁶ reportó la disminución del área de recompresión, la cual atribuyó a la formación de puentes de H entre la lignina y el agua, y consideró que posiblemente las películas son metaestables debido al reordenamiento de las moléculas de lignina en la interfase, y no debido a su disolución en la subfase. Como sea, aunque estos dos trabajos describen disminución, y no aumento como se observó en el presente trabajo, las hipótesis planteadas respecto a la histéresis como tal, son igualmente válidas para el presente caso, pues se podría considerar, en función de las micrografías MAB, la formación de agregados estables, es decir, al contrario de la película de celulosa, ésta película no presenta una tendencia a dispersarse espontáneamente en la interfase, pues es más susceptible a cambios en su conformación en función del trabajo lateral aplicado. Entonces, si se utiliza la misma presión de depósito

definida para celulosa (10 mN m^{-1}) deberá tenerse en consideración que la película cambia para ciclos consecutivos.

En función de los estudios realizados, se puede considerar que la película presenta agregación de moléculas de lignina fuera del plano 2-D, ocasionada posiblemente por la formación de puentes de hidrógeno entre las unidades fenilpropano constituyentes de este biopolímero. A 10 mN m^{-1} la película es rígida, aunque presenta una menor estabilidad para realizar rutinas de depósito más sofisticadas, sin modificar sus propiedades de forma importante. La película es menos compresible que la de celulosa, según indica su compresibilidad y la histéresis de recompresión que presenta.

7.3.3. ISOTERMA Π -A Y MORFOLOGÍA DE LA PELÍCULA LIGNO-CELULÓSICA

Debido a que el objetivo era formar películas de Langmuir lignocelulósicas, se evaluó el comportamiento de mezclas de celulosa y lignina en la formación de películas en la interfase aire-agua. Para maximizar el efecto que tiene sobre la morfología la interacción de los dos biopolímeros, se analizó el comportamiento de una mezcla equilibrada celulosa:lignina 50:50 (p/p) con microscopía MAB, a 24°C y una velocidad de compresión de 15 mm min^{-1} . La Figura 46 muestra la isoterma y las micrografías MAB asociadas a ésta. La película presenta una sola transición de fase, con un valor de área específica, A_E de $189 \pm 14 \text{ \AA}^2$ por molécula, y de compresibilidad, C de $0.028 \pm 0.03 \text{ m mN}^{-1}$. Por otra parte, la película no presenta colapso a la presión experimentada. El valor de A_E obtenido es intermedio al observado para las películas de solo uno de los biopolímeros, sin embargo, el valor de compresibilidad no muestra esta tendencia. El comportamiento de A_E , así como el hecho de que la película presente una sola transición de fase, podría indicar que los biopolímeros presentan un comportamiento miscible entre sí.

La microscopía MAB muestra la formación de agregados con tamaños desde algunos μm hasta otros de más de $200 \mu\text{m}$ en la fase de equilibrio entre la fase gaseosa y la fase condensada ($\Pi=0 \text{ mN m}^{-1}$). A presiones de $\approx 0 \text{ mN m}^{-1}$, se generaron agregados con un comportamiento similar al presentado por la película de lignina, por lo que se podría argumentar que tal vez los agregados mayores se tratan predominantemente de este biopolímero y no de celulosa. En la fase condensada ($\Pi=5 \text{ mN m}^{-1}$) se observa una superficie rugosa, que no es homogénea, pues presenta zonas con agregados o “gránulos” de tamaño relativamente pequeño, y zonas con agregados más grandes,

algunos del orden de 100 μm . En estas condiciones, se observa un comportamiento que podría considerarse intermedio entre los dos polímeros, pues por una parte se observan los agregados grandes característicos a la lignina, como también la estructura de “poros” y “gránulos” observada en la película de celulosa. Por otra parte, la película es rígida.

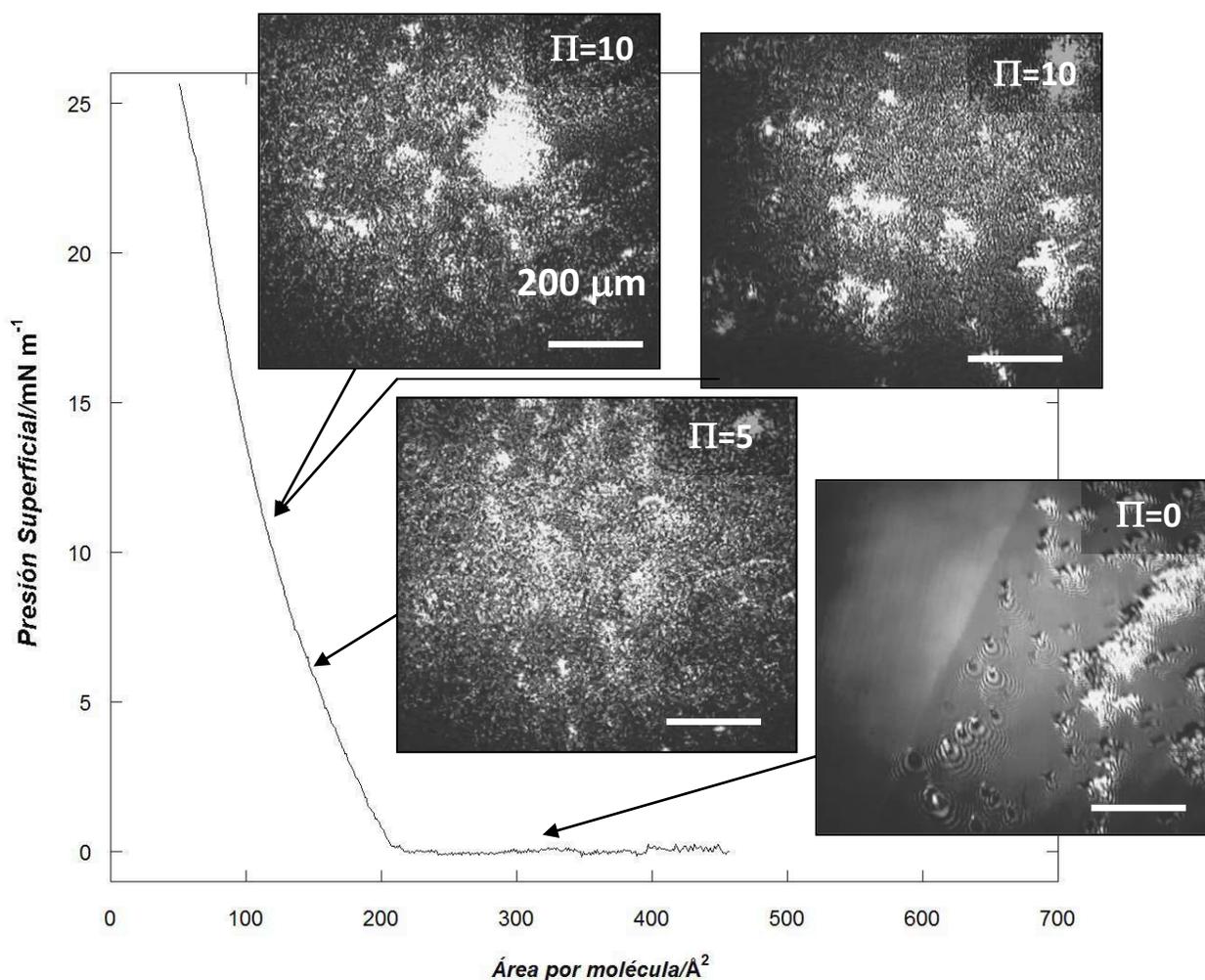


Figura 46. Isothermas Π - A y micrografías MAB de la morfología de la película de lignina-celulosa 50:50, (p/p) a distintas presiones superficiales.

A $\Pi=10 \text{ mN m}^{-1}$, la película muestra un empaquetamiento de los gránulos pequeños, sin que su tamaño aumente, y el crecimiento de ciertos agregados, llegando a dimensiones de $\approx 200 \mu\text{m}$. La estructura de poros y gránulos, que presenta el mismo comportamiento observado para la celulosa, es decir, un mayor empacamiento de los gránulos, sin aumentar las dimensiones individuales de éstos. Entonces, posiblemente los biopolímeros tienden a formar agregados de dimensiones mayores a los que presentan en películas de Langmuir de forma independiente. A este respecto, existen dos posibilidades,

que se trate de agregados de lignina que crecieron debido al aumento de presión lateral. Sin embargo, esta hipótesis sería contraria al comportamiento observado en estudios de simulación molecular,⁸³ y de mezclas de estos compuestos en estado sólido,⁸⁶ donde se observó que la celulosa en presencia de grupos aromáticos muestra la tendencia a aglomerarse, es decir, que los aglomerados de mayor tamaño serían de celulosa. Por otra parte, a estas condiciones la película mantiene un carácter rígido.

7.3.3.1. REVERSIBILIDAD DE LA ISOTERMA Π -A DE MEZCLA LIGNOCELULÓSICA

La película de mezcla lignina-celulosa en proporción 50:50 mostró un valor de A_E de recompresión $\approx 5\%$ distinto al observado durante la primera compresión. Por otra parte, se observa una compresibilidad ligeramente mayor ($\approx 5\%$). Entonces, aparentemente esta película muestra un comportamiento similar a la celulosa durante ciclos de recompresión.

Debido a que estos resultados mostraron una aparente miscibilidad de los biopolímeros, se realizó un estudio más detallado de las interacciones de atracción o repulsión que estos biopolímeros pudieran presentar en la interfase aire-agua.

7.3.4. MISCIBILIDAD DE LOS BIOPOLÍMEROS

Se estudió la interacción de los dos biopolímeros en la interfase aire agua, produciendo mezclas de las soluciones de celulosa y lignina, ya sea produciéndolas previamente para después gotearlas en la interfase, como produciéndolas directamente en la interfase. Para las mezclas formadas en la interfase el procedimiento es producir una película de un biopolímero, y posteriormente se añaden volúmenes de solución del otro polímero para generar distintas mezclas en la interfase aire-agua. Las mezclas celulosa:lignina producidas previo a gotearlas fueron 70:30 y 80:20 (peso/peso), mientras que las películas producidas directamente en la interfase fueron en incrementos de composición de lignina desde $X_{LIG}=0$ y hasta $X_{LIG}=0.9$. La Figura 47 muestra las isotermas Π -A obtenidas para las mezclas mencionadas. Se observa que respecto a la forma de la isoterma Π -A, aparentemente se trata de películas donde hay un grado de interacción en la interfase entre los dos polímeros, pues no se observan dos transiciones de fase, mismas que indicarían una repulsión entre los polímeros, que ocasionaría dos fases condensadas independientes una de la otra.

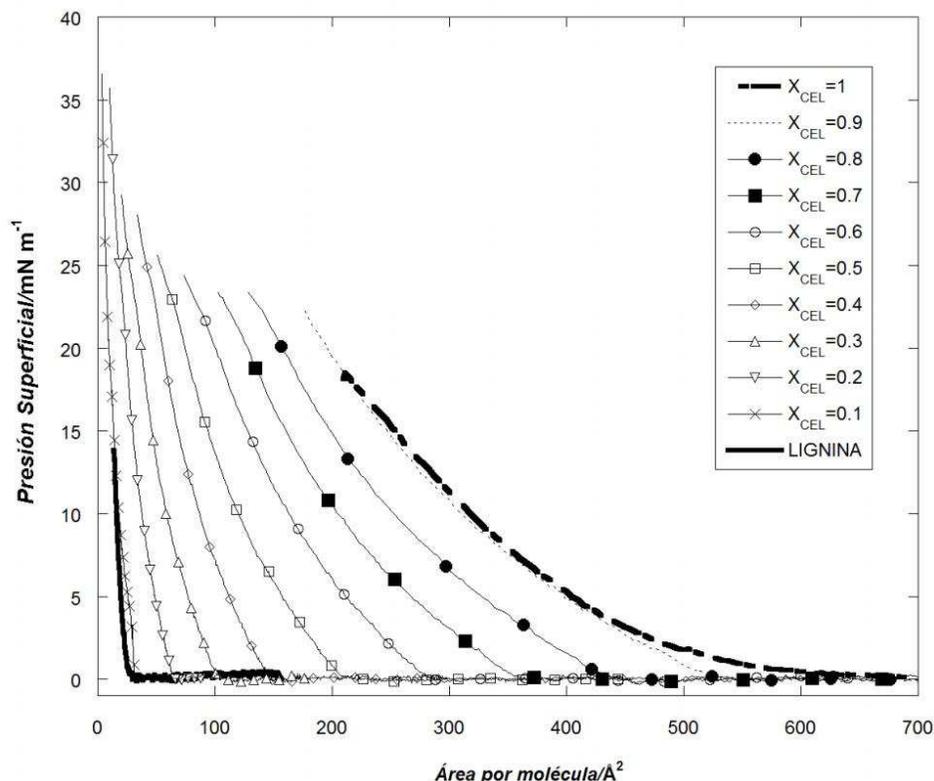


Figura 47. Isotermas II-A de las mezclas evaluadas en la interfase aire-agua. La isoterma de lignina, y las isotermas con marcadores ●-y ■ ($X_{CEL}=0.7$ y 0.8) corresponden a las mezclas formadas en bulto.

Por otra parte, el comportamiento de una mezcla generada en bulto, o una generada directamente sobre la interfase es muy similar, pues las isotermas para las composiciones $X_{CEL}=0.8$ y 0.7 , coinciden en la tendencia mostrada por las isotermas correspondientes a una mezcla generada en la interfase directamente. Entonces, se podría considerar que las mezclas preparadas por uno u otro método son análogas. Además, este resultado indica que las películas formadas con soluciones de celulosa principal o totalmente, se esparcen espontáneamente en la interfase.

La Figura 48 muestra los perfiles promediados de cambio en área por molécula y compresibilidad de las mezclas lignocelulósicas obtenidas en la interfase aire-agua en este trabajo. Se observa que al aumentar la composición de celulosa en las mezclas, el valor de A_E aumenta, y sigue esta tendencia para todas las composiciones evaluadas. Por otra parte, la compresibilidad muestra una tendencia a disminuir en su valor. Esta tendencia continúa hasta valores de mezclas equilibradas (50:50), y entonces se presenta un aumento, para después continuar con la tendencia a disminuir. Este comportamiento posiblemente se debe a los agregados formados a composiciones equilibradas de ambos polímeros.

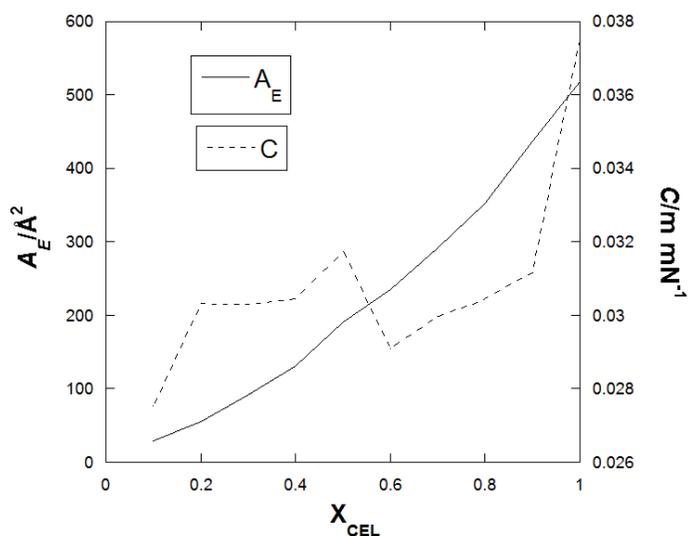


Figura 48. Evolución del área específica y la compresibilidad de las películas de Langmuir lignocelulósicas

Para analizar la miscibilidad de mezclas en la interfase aire-agua, se estima cualitativamente el carácter miscible de dos moléculas observando la desviación que la mezcla presenta respecto al comportamiento de una mezcla ideal, en la cual los componentes serían inmiscibles entre sí, lo que ocasionaría que su área por molécula fuera la suma algebraica del área que ocupa una molécula por el número de moléculas presentes en el plano 2D. Este concepto teórico (conocido como “regla de la adición”) ha sido utilizada para mezclas de surfactantes,¹⁶² y polímeros,¹⁶³ y se utilizó para analizar la mezcla de biopolímeros estudiada en este trabajo.

El área promedio por molécula de una monocapa de una mezcla de dos componentes puede ser comparada con aquella de una mezcla ideal a una cierta presión superficial para obtener el área en exceso (A_{ex}).^{101,164}

$$A_{ex} = A_{12} - (X_1 A_1 + X_2 A_2) \quad \text{---(14)}$$

donde A_{12} es el área por molécula de la mezcla, medida experimentalmente, A_1 y A_2 son las áreas por molécula de las películas puras de los componentes 1 y 2 respectivamente, y X_1 y X_2 son las fracciones molares de los componentes en la monocapa mezclada. Entonces, si se formara una monocapa con una mezcla ideal, el área en exceso sería cero y una gráfica de A_{12} en función de X_1 a cierta presión superficial, sería una línea recta. Cualquier desviación de una línea recta indicaría miscibilidad, o por el contrario repulsión entre los dos compuestos. Por otra parte, según la ecuación 14, una mezcla ideal ocasionaría valores de $A_{ex}=0$ a cualquier composición. Así mismo, valores de $A_{ex}>0$

implicarían repulsión (áreas mayores a la suma de las áreas individuales), y por lo tanto, valores de $A_{ex} < 0$ indicarían miscibilidad. La Figura 49 muestra la tendencia del área por molécula y del A_{ex} , en función de la fracción de X_{CEL} en la mezcla y de la presión superficial.

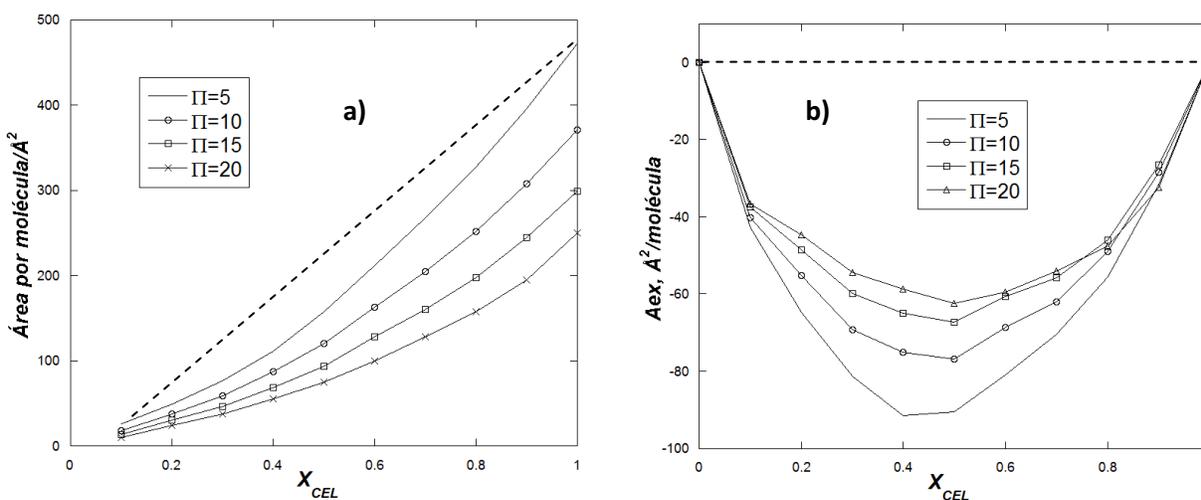


Figura 49. (a) Área por molécula en función de la composición de películas mezcladas de lignina y celulosa a distintas presiones superficiales. (b) Área exceso en función de la composición de películas mezcladas de lignina y celulosa a distintas presiones superficiales; la línea punteada indica el comportamiento de una mezcla ideal.

En la Figura 49-a se muestra el cambio en el área por molécula de las películas de distintas mezclas, a distintas presiones superficiales. A todos los valores de presión superficial (Π) se observa un comportamiento que difiere del área teórica (línea punteada). Por otra parte, la Figura 49-b muestra las curvas de A_{ex} , a distintas presiones superficiales, en función de la composición de la mezcla. Se observa un claro comportamiento de miscibilidad, pues se tienen siempre valores de $A_{ex} < 0$. Se observa que para composiciones donde predomina uno de los componentes, el grado de miscibilidad es independiente de la presión superficial, lo cual es razonable. Por otra parte, se observa que para composiciones equilibradas (50:50) el comportamiento se aleja más de la idealidad, y también, que esta desviación es más pronunciada para presiones superficiales bajas. Esto indica que la miscibilidad de los compuestos es mayor maximizando la composición de los dos compuestos, y que a presiones menores son más miscibles, lo cual podría relacionarse con la estructura molecular de los biopolímeros, así como con su disposición espacial en la película de Langmuir.

Por otra parte, para mezclas de dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) y colesterol se han descrito valores de A_{ex} de ≈ -10 ,¹⁶² es decir, un orden de magnitud menores que los

obtenidos con la mezclas lignocelulósicas. Esto podría ser indicativo de que la miscibilidad observada en el presente trabajo está relacionada con el tamaño de las moléculas presentes en la mezcla. Así, si la interacción entre los dos biopolímeros fuera causada por puentes de hidrógeno, un tamaño molecular mayor favorecería el ensamble masivo entre los biopolímeros mediante este tipo de interacción. Por otra parte, el carácter miscible tan marcado que se observó entre estos biopolímeros es un resultado que resulta lógico, toda vez que su ensamble se da de forma natural en los tejidos vegetales, para darles rigidez y estabilidad.

7.3.5. ESTABILIDAD DINÁMICA DE LAS PELÍCULAS DE LANGMUIR

Las pruebas de estabilidad se realizaron para evaluar la posibilidad de fabricar películas tipo Langmuir utilizando estos compuestos. La prueba consiste en comprimir las películas de Langmuir hasta una presión superficial definida, en la fase condensada, y entonces registrar el desplazamiento de las barreras para mantener esa presión superficial constante en un intervalo de tiempo, es decir, se construyó una *curva de relajación a presión constante*. Una mayor estabilidad se puede atribuir a películas que presenten una disminución menor de área en un cierto periodo de tiempo.⁷⁸ En este trabajo se estudió el comportamiento de relajación de las películas de celulosa, lignina y las mezclas celulosa:lignina 70:30 y 80:20 a una presión constante de 10 mN m^{-1} . Para normalizar todas las curvas, en la Figura 50 se presenta el eje ordenado como el cociente del área en cualquier instante (A) sobre el área inicial (A_0). En esta figura se observa que todas las películas evaluadas presentan una reducción de área interfacial de 35-40% en el intervalo de tiempo experimentado, y que la película de celulosa es la más estable, la de lignina la menos estable, y que las mezclas presentan un comportamiento intermedio de estabilidad.

La inestabilidad observada se puede deber a dos posibilidades: (i) las películas se encuentran en un estado metaestable en la interfase; o (ii) se están disolviendo en la subfase. El hecho de que la película de celulosa sea más estable que la de lignina sería explicado entonces en función de la solubilidad de los biopolímeros. Por otra parte, respecto a la lignina, se ha interpretado que este comportamiento de inestabilidad en la lignina se debe a una etapa de reordenamiento molecular en la interfase, más que a la solubilización del polímero.⁷⁶ En ese estudio se observó que la lignina es menos estable mientras más grupos polares presenta, y que presenta una disminución del 40% del área inicial durante las primeras dos horas.

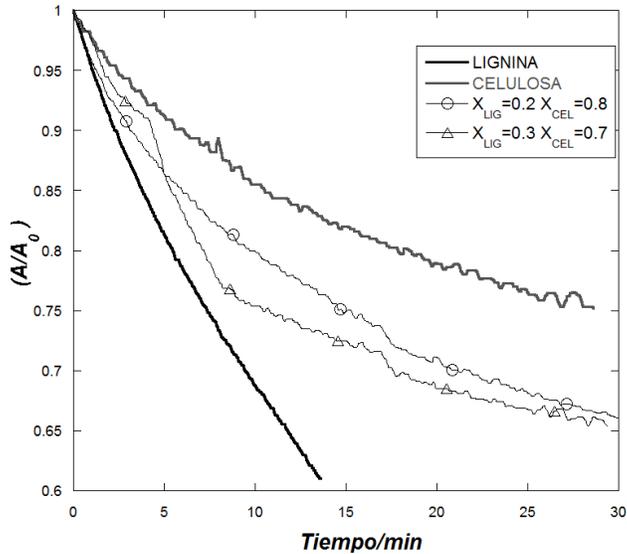


Figura 50. Curvas de relajación normalizadas.

El comportamiento de estabilidad intermedio observado para las mezclas celulosa:lignina podría explicarse en función de la miscibilidad de estos biopolímeros observada previamente, que ocasionaría que la lignina al agregarse con la celulosa fuera estabilizada en la interfase aire-agua. Finalmente, se observa que aparentemente la película con mayor contenido de lignina presenta dos fases de comportamiento, una inicial donde el cambio presenta la misma cinética que la película de lignina, y una segunda fase donde comienza a estabilizarse. Esto podría deberse a las moléculas de lignina que no estuvieran estabilizadas en forma de agregados lignocelulósicos.

En función de los estudios realizados a las películas de Langmuir de celulosa, lignina y mezclas lignocelulósicas, se puede considerar que los biopolímeros tienden a esparcirse en la interfase de forma espontánea, y que presentan una gran miscibilidad, la cual ocasionaría los comportamientos intermedios en A_E , morfología, histéresis de recompresión y estabilidad en la interfase, para las mezclas lignocelulósicas.

7.4) SUPERFICIES LIGNOCELULÓSICAS MODELO

Se realizaron depósitos LB de las películas de Langmuir de celulosa sobre las superficies silanizadas, y en todos los casos se observaron tasas de transferencia altas, ($T_T \geq 0.85$). Sin embargo, estas superficies presentaron la formación de agregados de celulosa macroscópicos, formados posiblemente debido a la rigidez de la película observada en MAB, la cual favorecería la formación de estos agregados por el esfuerzo cortante del depósito LB. Entonces, en función de estos resultados se descartó este tipo

de depósito, y se realizaron pruebas preliminares con depósitos Langumir-Schaeffer (LS), obteniendo superficies sin la formación de estos agregados, y con tasas de transferencia de $T_T \geq 0.95$ en todos los casos. Por lo anterior se decidió utilizar el depósito LS en este trabajo para generar superficies modelo de celulosa, y por lo tanto, esta técnica se utilizó también para las superficies de lignina y mezclas lignocelulósicas.

7.4.1 MICROSCOPIA DE FUERZA ATÓMICA

7.4.1.1. SUPERFICIE MODELO DE CELULOSA

La Figura 51 muestra las micrografías de altura y fase de superficies LS de celulosa sobre SiO_2 silanizada con APTS (SiO_2/APTS) obtenidas por microscopía de fuerza atómica (MFA).

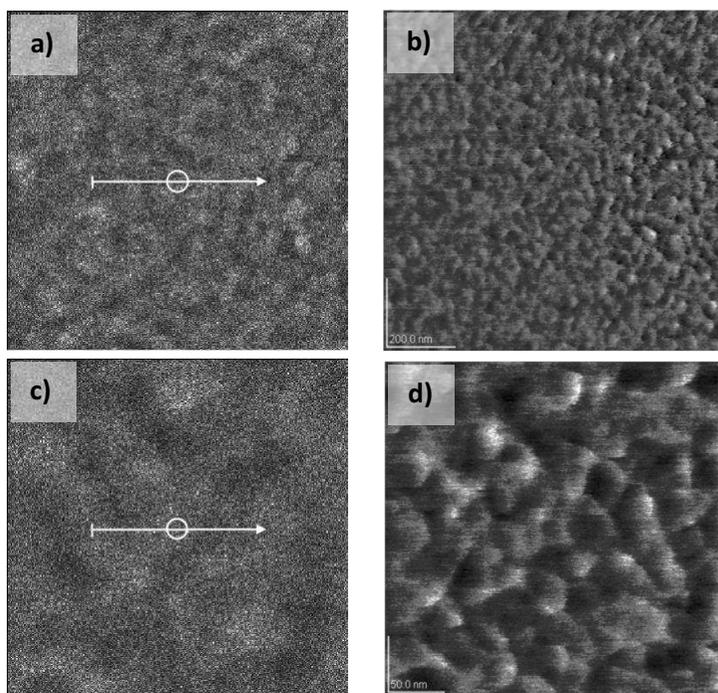


Figura 51. Micrografías de superficie LS de celulosa de $1 \mu\text{m}^2$, de altura (a), y fase (b); micrografías de 300nm^2 , de altura (c), y fase (d).

Se observa que en las imágenes de fase, la superficie muestra una estructura de pequeños gránulos, con un tamaño del orden de 30-50 nm. Ésta estructura es muy similar, a la descrita por Kontturi, obtenidas al regenerar una superficie de trimetilsililcelulosa (TMSC), en un ambiente ácido.^{67,175} En ese trabajo las superficies fueron descritas como ordenadas, y se consideró que el ordenamiento se debía a los grupos -OH de la celulosa, que contribuyen a uniones intra e intermoleculares. Esto coincide con lo reportado por Yokota,¹⁶⁸ que sugirió que una estructura de este tipo se debe a la interacción entre la celulosa y el sustrato utilizado.

Por otra parte, las superficies de celulosa obtenidas en este trabajo no muestran orientación, como era de esperarse en función de la técnica de depósito utilizada. Esta característica representa una ventaja, pues las películas con orientación (como las obtenidas por depósito por giro o LB) presentan fenómenos de birrefringencia (descomposición de un haz de luz por un objeto en dos haces perpendiculares) que las hacen poco adecuadas para algunas técnicas de análisis superficial, como por ejemplo medición de fuerzas superficiales.¹⁶⁵

Respecto a la cobertura del sustrato sólido, en la región analizada, la celulosa lo cubre totalmente totalmente, toda vez que no se observan “huecos”, como los descritos en las superficies de una sola capa de celulosa regenerada a partir de TMSO descritas por Tammelin,¹³² las cuales requieren hasta 15 depósitos LS para lograr una cobertura similar a la obtenida en el presente trabajo. La Tabla 9 presenta valores de rms para superficies de celulosa descritas en la literatura consultada.

Molécula	Peso molecular (g mol ⁻¹)	Solvente	Sustrato	Técnica	rms (nm)	Ref.
Celulosa microcristalina	7.5x10⁴	THF	SiO₂/APTS	LS	2.25	ESTE TRABAJO
Celulosa regenerada (de TMSO)	-	DMA/LiCl → CHCl ₃	Poliestireno (disco QCM)	LS , 15 capas	0.8	132
Regenerada	-	CHCl ₃	Poliestireno	LS	0.9	170
Regenerada	-	-	SiO ₂ /Diclorometil silano	LS	0.5	69
Celulosa microcristalina	-	DMAc/LiCl (1 g L ⁻¹)	SiO ₂	Por giro (4000 rpm)	3.8	166
Celulosa microcristalina	-	DMAc/LiCl (0.4 % peso)	SiO ₂	Por giro (3000 rpm)	2	167
Celulosa microcristalina	-	NMMO/DMSO (2% peso)	SiO ₂ /polivinilamina (PVAm)	Película abierta	3.88	168
Celulosa microcristalina	-	NMMO/DMSO	SiO ₂ /PVAm	Por giro (2500 rpm)	2.91	168
Celulosa microcristalina	-	NMMO/DMSO	SiO ₂ /PVAm	Por giro (5000 rpm)	2.6	65
Celulosa	1.6x10 ⁵	NMMO/DMSO	Silicón/Polivinilamida (PVAM)	Por giro (2500 rpm)	5	55
Pulpa extraída con acetona	-	NMMO/DMSO (1% de celulosa)	SiO ₂ /poliacrilamida glioxalada (G-PAM)	Por giro (3500 rpm)	13	169
Pulpa sulfito	-	Agua (0.4 g L ⁻¹)	SiO ₂ /APTS	Por giro (3000 rpm)	3.3	170
Nanocristal de algodón/celulosa	-	Agua	SiO ₂	Película abierta	2.1	171
Celulosa (extracción ácida papel Whatman)	-	Agua	Silicón	Por giro (4000 rpm)	5.3	172
Nanocristales de celulosa (Whatman)	-	Agua	SiO ₂ /PVAm	Película abierta	10.2	170
Nanofibras de carga baja (de pulpa sulfito)	-	Agua (0.4 g L ⁻¹)	SiO ₂ /APTS	Por giro (3000 rpm)	4	173

Tabla 9. Algunos valores de rms para distintas superficies de celulosa y derivados descritos en la literatura consultada.

Finalmente, considerando la técnica de depósito utilizada (LS), se obtuvo un valor alto de rugosidad (rms=2.25nm), en comparación a los valores descritos en la literatura al

utilizar la misma técnica (ver Tabla 9). Sin embargo, en esos casos también se utilizó TMSC que posteriormente se regeneró a celulosa, lo cual, según algunas referencias,^{166,167,65} genera superficies más planas que cuando se utiliza directamente celulosa. También, en la Tabla 11 se observa que para referencias que utilizaron el mismo tipo de celulosa microcristalina y substrato sólido (SiO_2), pero distinta técnica de depósito, se han descrito valores de rms parecidos al obtenido en este trabajo. Se aprecia también que la elección de la molécula de anclaje al parecer determina la rugosidad de la superficie, así, los valores más altos de rugosidad están asociados a polímero de anclaje como cloruro de polivinilamida (PVAm). Por otra parte, con nanofibras y nanocristales se han descrito valores en un rango de 2 a 4 nm; y para el caso de superficies obtenidas con pulpa de celulosa, valores en un intervalo que llega hasta valores de rms de 10 nm. Todo lo anterior indica que el APTS aparentemente funcionó bien para obtener superficies relativamente planas. Así mismo, el valor de rms obtenido en este trabajo estaría en concordancia con lo observado por MAB, en donde se observa que la celulosa se encuentra en una conformación de multicapa en la interfase en el momento del depósito. A pesar de lo anterior, se puede considerar la superficie obtenida en este trabajo como relativamente plana a nivel nanométrico.^{56,168}

7.4.1.2. SUPERFICIE MODELO DE LIGNINA

La Figura 52 muestra las micrografías de MFA de altura y fase de las superficies de lignina. Se observa que la estructura de la superficie de lignina no presenta agregados, no tiene orientación y cubre totalmente al substrato en la región analizada. Esto es un comportamiento distinto a superficies reportadas en la literatura, como la reportada por Norgren,⁸⁰ y Notley,^{81, ¡Error! Marcador no definido.} las cuales presentaron agregados del orden de 10-20 nm. Por otra parte, respecto a la rugosidad, las superficies de lignina obtenidas en este trabajo presentaron un valor de rms de 1.36. A este respecto, se han descrito superficies LB con una rms de ≈ 0.3 nm, aunque en esos casos se asoció su bajo valor de rugosidad a que debido al tipo de método de extracción (como etanol o acetona-oxígeno) las ligninas contenían un mayor número de grupos $-\text{COOH}$, ejemplos como estos se observan en la Tabla 10. El no observar valores de rms mayores a 3 nm, indica que para el caso de las superficies obtenidas en este trabajo no se presentó la formación de agregados elipsoidales perpendiculares al substrato, fenómeno asociado a grosores mayores en la literatura.⁸⁰

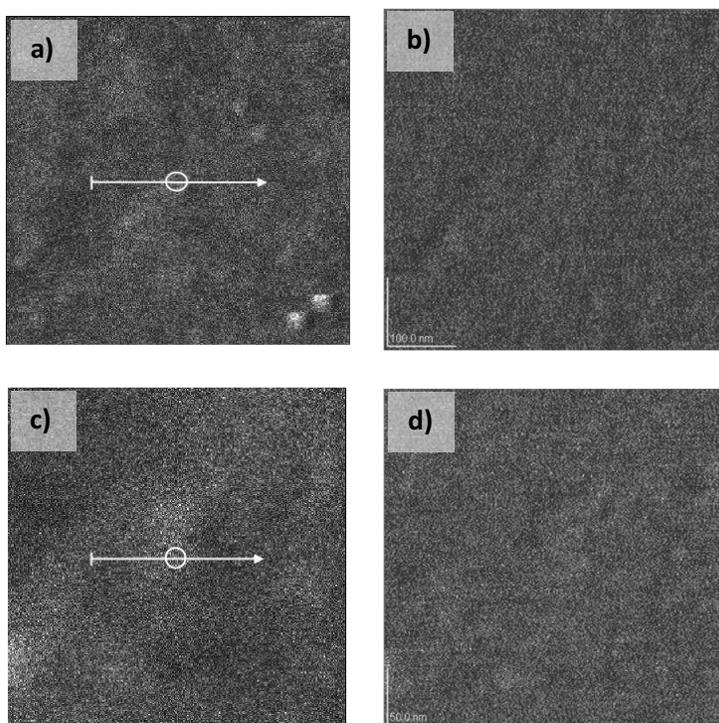


Figura 52. (a) Micrografías MFA de altura y fase de superficie LS de lignina. (a) Altura y (b) fase de 1 μm^2 . (c) Altura y (d) fase de 1 μm^2 ; (e) altura y (f) fase de superficie de 300 nm^2 .

Las superficies obtenidas en este trabajo se pueden considerar como poco rugosas y podrían mostrar potencial para mediciones de fuerzas pues rugosidades mayores ocasionan contactos ásperos entre la superficie y los instrumentos, lo que limita la sensibilidad instrumental. **¡Error! Marcador no definido.**⁷⁵ Por otra parte, se obtuvo una superficie con una rugosidad menor a la observada para celulosa ($\approx 2.25 \text{ nm}$).

Molécula	Substrato	Depósito	rms (nm)	Referencia
Lignina kraft	SiO ₂	LS	1.36	ESTE TRABAJO
Lignina de sacarificación		LB (5 capas)	3.8	77
Lignina etanol		LB (5 capas)	0.24	77
Lignina kraft de madera blanda	SiO ₂	-	1.4, 1.1	80, ¡Error! Marcador no definido.
Lignina acetona-oxígeno		LB (5 capas)	0.3	76
Lignina soda		LB (5 capas)	1.25	76
Lignina kraft	SiO ₂ activada		1-2	81
Lignina			1	75

Tabla 10. Algunos valores de rms de superficies de distintas ligninas técnicas descritos en la literatura consultada.

7.4.1.3. SUPERFICIE LIGNOCELULÓSICA MODELO

Se caracterizó en microscopía AFM una superficie obtenida mediante depósito LS (a $\Pi=10 \text{ mN m}^{-1}$) a partir de una película de Langmuir de mezcla celulosa:lignina en proporción (70:30). A escalas relativamente grandes ($5 \mu\text{m}^2$), esta superficie presentó una estructura completamente distinta a la observada en las superficies de los biopolímeros

de manera individual en micrografías de esa escala, pues la superficie de mezcla presentó estructuras del orden de micras, que podrían describirse como globulares. La Figura 53 muestra las micrografías de altura y fase de AFM de las superficies de la mezcla lignocelulósica con $X_{CEL}=0.7$ y $X_{LIG}=0.3$ a áreas de 1 y $0.3 \mu\text{m}^2$.

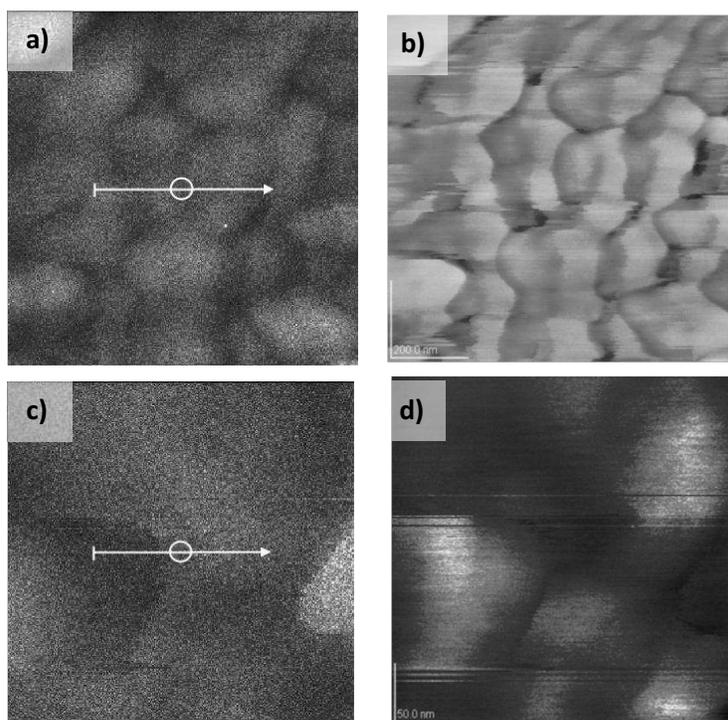


Figura 53. Micrografías MFA a superficie modelo de mezcla lignina:celulosa (30:70); Micrografías de $1 \mu\text{m}^2$ (a) de altura, y (b) de fase; micrografías de 300 nm^2 (c) de altura, y (d) de fase.

Se observa que en la región analizada, el material cubre totalmente el sustrato de APTS, y que no presenta ninguna orientación. Por otra parte, La micrografía de fase de $1 \mu\text{m}^2$ presenta una estructura similar a la reportada por Gunnars, obtenida a partir de pulpa con el sistema de solventes NMMO/DMSO.⁵⁵

Respecto a la rugosidad, la superficie de la mezcla presenta un valor de rms de 1.3 nm (en las regiones planas), el cual es un valor de rugosidad más aproximado a las superficies de lignina que a las de celulosa. El comportamiento de agregación observado en las micrografías MFA fue consistente con el observado con la microscopía MAB. Este comportamiento sería evidencia de que la interacción de miscibilidad de los dos compuestos permanece una vez realizado el depósito sobre un sustrato sólido.

CONCLUSIÓN MICROSCOPIA DE FUERZA ATÓMICA

Las superficies lignocelulósicas modelo obtenidas en este trabajo presentan una cobertura total del sustrato. Además, muestran una estructura sin orientación adecuada para diversas técnicas de análisis de superficies, como por ejemplo medición de fuerzas

superficiales. La superficie de celulosa resultó más rugosa que la de lignina, y que las reportadas con anterioridad en la literatura especializada para el tipo de depósito LS. Por otra parte, en el caso de la lignina se obtuvo un valor de rms del orden de los descritos en la literatura. La mezcla lignocelulósica mostró características particulares, probablemente ocasionadas por la miscibilidad observada entre los dos biopolímeros en los estudios en la interfase aire-agua.

7.4.2. MICROBALANZA DE CUARZO CON DISIPACIÓN

Tanto en la literatura como en este trabajo, la morfología de las superficies se caracterizó en aire, un ambiente que no es representativo de las condiciones acuosas de hidrólisis, pues se han descrito cambios en la conformación de las superficies una vez que se hidratan.⁶⁹ Debido a esto, se consideró el estudio de estabilidad de las superficies lignocelulósicas modelo en medios acuosos por medio de la MBC-D.

En este trabajo se estudió la estabilidad de las superficies lignocelulósicas modelo obtenidas en un medio acuoso, a distintos valores de fuerza iónica. Se decidió utilizar estas condiciones pues de esa manera se puede evaluar de mejor forma la estabilidad de una película polimérica. Por ejemplo, superficies similares (celulosa regenerada) bajo condiciones de fuerza iónica presentan un comportamiento de desequilibrio al incrementar la concentración de electrolito, que causa a su vez un incremento en el pH dentro de la superficie (efecto Donnan)¹⁷³, lo que ocasiona que las superficies se encojan o hinchen de forma incontrolada, o que se disuelvan.⁸⁰ De modo que evaluar las superficies en estas condiciones permite caracterizar su comportamiento para eventualmente realizar mediciones confiables.

7.4.2.1. SUPERFICIES MODELO DE CELULOSA

Del mismo modo a como se hizo con el depósito de APTS, se determinó el grosor de la película de celulosa con la QCM-D y se caracterizó su estabilidad en agua y a distintos valores de fuerza iónica. A continuación se muestran los perfiles de ΔF_3 y ΔD_3 en función del tiempo, a distintas concentraciones de NaCl.

EN AIRE

Las superficies de celulosa obtenidas en este trabajo mostraron ser inestables en aire (resultado no mostrado), pues se observó un incremento en el valor de ΔF , lo cual indica que se perdió material debido a la oscilación del disco de cuarzo. A este respecto superficies LB de celulosa mostraron ser muy frágiles e inadecuadas para mediciones en

aire.⁶³ En el caso de las superficies de este trabajo, obtenidas mediante depósito LS, se podría atribuir esta inestabilidad a un posible exceso de material no removido en los enjuagues posteriores a la producción de la superficie.

MEDICIONES EN MEDIO ACUOSO

La Figura 54 muestra el perfil de ΔF_3 y D_3 de una superficie de APTS y una de celulosa en agua. La diferencia de ΔF_3 presentado por las superficies de APTS y celulosa indican la cantidad de masa (celulosa) que hay por unidad de área (superficie activa silanizada).

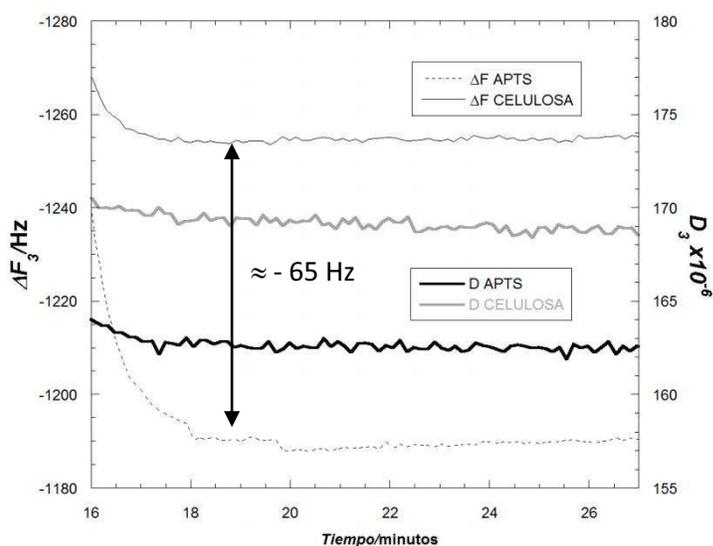


Figura 54. Acercamiento a perfil de ΔF_3 y D_3 para celulosa y APTS en medio líquido.

La diferencia $\Delta F_{\text{APTS}} - \Delta F_{\text{Celulosa}} \approx -65$ Hz, implica una $\Delta m_{\text{Sauerbrey}} \approx 3.84 \text{ mg}_{\text{Celulosa}} \text{ m}^{-2}$. Entonces, considerando el área de superficie activa silanizada de $1.933 \times 10^{-5} \text{ m}^2$, esto implica que hay $7.5 \times 10^{-5} \text{ mg}_{\text{Celulosa}} = 75 \text{ ng}_{\text{Celulosa}}$ sobre la superficie de APTS. Para estimar el grosor de la película, se considera una densidad para la celulosa tipo II de $1.582 \times 10^3 \text{ mg cm}^{-3}$,¹⁷⁴ que implica suponer que la película recupera la estructura cristalina que originalmente tenía la pulpa. Entonces, utilizando la ecuación de Sauerbrey, el grosor estimado de la superficie de celulosa es $d_{\text{Sauerbrey-Celulosa}} \approx 2.43 \text{ nm}$. La Tabla 11 presenta valores de grosor de algunas superficies de celulosa similares a la obtenida en este trabajo, reportadas en la literatura consultada. Se puede observar que el grosor estimado para las superficies de celulosa obtenidas en este trabajo es en general, menor a los valores descritos previamente. Por otra parte, se encuentra en el rango de algunas superficies de celulosa regenerada a partir de TMSC, lo cual concuerda con la microscopía MFA.

Molécula	Peso molecular (g mol ⁻¹)	Solvente	Substrato	Técnica	Grosor (nm)	Ref.
Celulosa microcristalina	7.5x10⁵	THF	SiO₂/APTS	LS	2.43	ESTE TRABAJO
Celulosa	1.6x10 ⁵	NMMO/DMSO	Silicón	Spin coat.	2	55
Celulosa	1.6x10 ⁵	NMMO/DMSO	SiO ₂	Spin coat.	37	55
Celulosa regenerada (de TMSC)		Tolueno	Silicón	Spin coat. (3000 rpm)	20	175
Regenerada		CHCl ₃	Silicón	Spin coat. (3000 rpm)	35	175
Regenerada		CHCl ₃ (0.7 mg mL ⁻¹)	SiO ₂ /Octadecil trimetoxi silano	LB (6 capas)	2.4	176
Regenerada		CHCl ₃ (0.7 mg mL ⁻¹)	SiO ₂ /ODTMS	LB (20 capas)	10.4	176
Regenerada	-	CHCl ₃	Poliestireno	LS	10-15	170
Regenerada	-	-	SiO ₂ /Diclorometil silano (DCMS)	LS	17.8	69
Celulosa microcristalina	-	NMMO/DMSO	SiO ₂ /PVAm	Spin coat. (5000 rpm)	11	65
Celulosa microcristalina	-	DMAc/LiCl (0.4 % peso)	SiO ₂	Spin coat. (3000 rpm)	7	167
CELULOSA II (pulpa de acetona)	-	NMMO/DMSO	SiO ₂ /Polietilen imina (PEM)	Spin coating	32.5	69
CELULOSA II (pulpa de metanol)	-	DMAc/LiCl	SiO ₂	Spin coating	53.8	69
Pulpa extraída con acetona	-	NMMO/DMSO (1% de celulosa)	SiO ₂ /poliacrilamida glioxalada (G-PAM)	Spin coating (3500 rpm, 50° C)	160	169
CELULOSA I	-	Agua	SiO ₂ /APTS	Spin coating (3000 rpm)	11.9	69

Tabla 11. Algunos valores de grosor de superficies de celulosa reportadas en la literatura.

ESTABILIDAD EN AGUA

El comportamiento de estabilidad y absorción con reblandecimiento (hinchamiento) de las superficies de celulosa en agua es analizada con la MBC-D pues permite obtener información sobre la estabilidad de las superficies en este ambiente, e inferir la posible estructura de la superficie. Respecto al primer punto, la estabilidad de la superficie de celulosa en un medio acuoso es relevante pues determina su potencial uso en la MBC-D, o en otras técnicas de caracterización de superficies. Por otra parte, la estructura amorfa o cristalina, y el grado de hinchamiento que pueda presentar, pueden resultar factores críticos para mostrar el potencial uso de las superficies en estudios de actividad enzimática, pues si no presenta hinchamiento, no se genera un microambiente acuoso y con área superficial alta, que es el adecuado para la actividad enzimática, y por lo tanto no son susceptibles a degradación enzimática.^{56,57}

En la Figura 54 se observa que la superficie de celulosa se mantuvo constante en un valor de $\Delta F_3 \approx -1,255$ Hz en agua. Es decir, no se presenta un decremento de masa (un aumento en el valor de ΔF), lo que indica que no se está perdiendo material en el medio líquido, a diferencia de lo observado en aire. En este mismo intervalo de tiempo el

valor de disipación se mantuvo también constante en $\approx 170 \times 10^{-6}$ unidades de disipación (u.d.), lo cual supone 7 u.d. más que la disipación de la superficie de APTS, indicando que la superficie celulósica modelo es más blanda que la de APTS en esas condiciones. También, el valor de disipación obtenido es muy similar (de 5 a 10 u.d. mayor) al descrito para diversas superficies obtenidas a partir de distintos solventes y técnicas de depósito, siendo las técnicas de Langmuir las que presentaron valores muy similares de disipación.^{69,169}

Respecto al hinchamiento, existen dos posibilidades para explicar el comportamiento observado: (i) la superficie alcanza el equilibrio de hinchamiento instantáneamente, o (ii) es un proceso tan lento que durante los primeros minutos no es perceptible. Entonces, aparentemente no se está presentando un fenómeno de hinchamiento pues no aumenta ni la masa sobre el disco, ni la disipación de la superficie celulósica modelo. Esto es una posibilidad razonable, pues aunque en general el hinchamiento es un proceso que requiere horas para llevarse a cabo,^{132,56,169,173} se han descrito superficies que presentan una estabilización casi instantánea (en menos de 5 minutos).^{69,169} Más específicamente, el resultado de hinchamiento observado en el presente trabajo coincide con lo descrito por Aulin, para una superficie de celulosa regenerada a partir de TMSC,⁶⁹ donde se observó este mismo comportamiento para películas LS, y se concluyó (en función de estudios de rayos X) que éste tipo de depósito genera una superficie muy densa, lo que genera el pobre hinchamiento. También, el comportamiento de hinchamiento observado en el presente trabajo es similar al descrito para una superficie obtenida con pulpa disuelta en el sistema NMMO/DMSO,¹⁷⁷ para superficies de celulosa regenerada a partir de TMSC,¹³² o superficies de nanofibras reportadas expuestas al agua durante ≈ 160 min.¹⁷³ Finalmente, se sabe que el hinchamiento ocurre de forma importante en superficies predominantemente amorfas (pues el agua puede penetrar a la estructura)⁶⁹, mientras que las predominantemente cristalinas se hinchan menos.^{54,166,175,178} Sin embargo, se ha descrito que las superficies con nanocristales presentan hinchamiento, posiblemente ocasionado por la penetración de agua entre los cristales,⁶⁹ lo cual ha llevado a sugerir que el hinchamiento de las superficies es un efecto de combinación donde el agua puede ser incorporada ya sea directamente en las partes amorfas o entre los cristales o fibras de celulosa, o una combinación de ambos procesos.

En función de todo lo anterior, el comportamiento de hinchamiento de la superficie de celulosa obtenida en el presente trabajo podría asociarse con una estructura cristalina.

EFFECTO DE FUERZA IÓNICA

En la Figura 55 se muestran los perfiles de ΔF_3 y D_3 de una superficie de celulosa y una de APTS en medios acuosos con distintos valores de fuerza iónica.

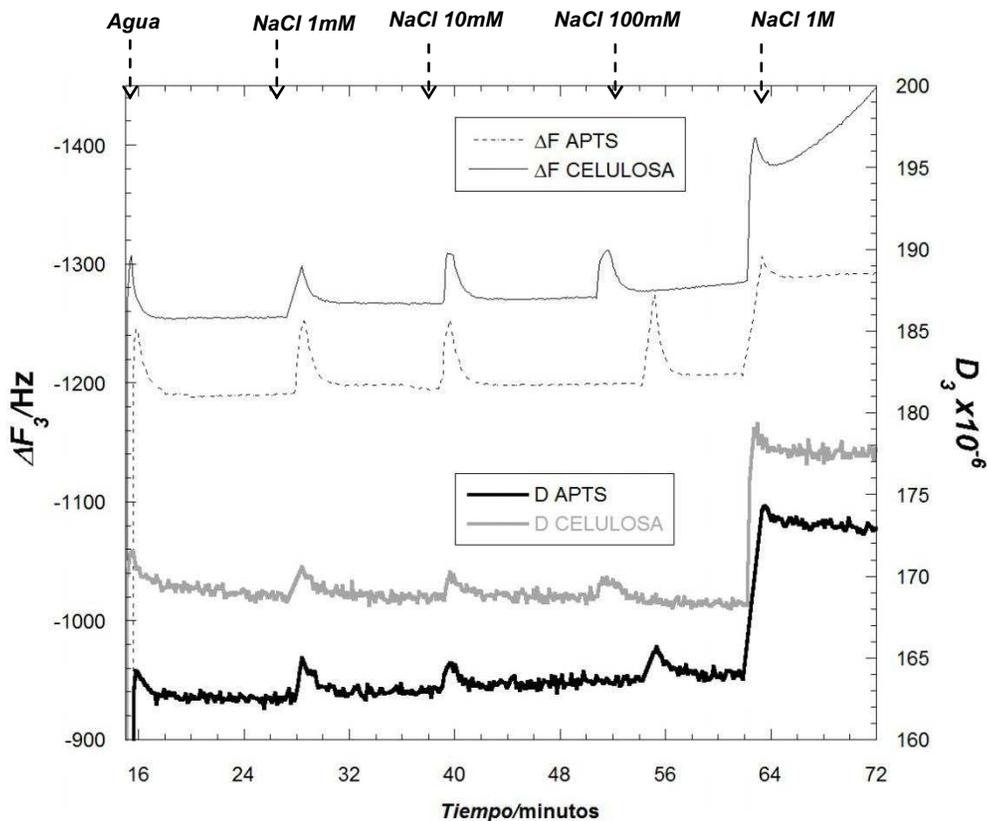


Figura 55. Cambio en ΔF_3 y D_3 de las superficies de APTS y celulosa en medio acuoso.

Se observa que al cambiar la fuerza iónica del medio a una concentración 1mM de NaCl, la frecuencia cambió en ≈ -12 Hz contra el valor observado en agua, y permaneció constante en ese valor. Por otra parte, la disipación no aumentó su valor respecto al presentado en agua. Respecto a la disminución observada en la frecuencia de resonancia del cristal de la MBC-D cuando las soluciones de electrolito son introducidas a la cámara de medición, esto es probablemente debido a que hay distintos fenómenos ocurriendo de forma simultánea: (i) la densidad y viscosidad de las soluciones de electrolito son mayores que las del agua desionizada utilizada al inicio, lo cual resulta en una disminución en la frecuencia de resonancia del cristal de la MBC-D, ó (ii) un ligero hinchamiento de la película y/o (iii) adsorción de iones, podría estar ocurriendo.¹⁷⁹ Así, la disminución en el valor de ΔF podría ser ocasionado por el fenómeno conocido como efecto Donnan, que ocurre cuando el aumento de carga en el medio ocasiona un cambio en el pH de la

superficie, que a su vez genera presión osmótica que ocasiona el incremento de agua en las superficies. Aunque esta hipótesis resulta más probable para superficies cargadas (por ejemplo con grupos carboxilo $-\text{COOH}$), también se ha descrito para superficies de baja carga.¹⁷³ Por otra parte, respecto a que la disipación indica que la ganancia de agua en la superficie no modifica la rigidez de la película, este comportamiento coincide con el descrito para superficies de nanofibras de baja carga,¹⁷³ y para celulosa regenerada de TMSC.¹³² Ya sea que el agua se adsorba o penetre, no se reblandece la superficie.

Al aumentar la fuerza iónica del medio a una concentración 10 mM de NaCl, el valor de frecuencia disminuye ≈ -4 Hz contra el valor observado a una concentración 1 mM de NaCl. Por otra parte, la disipación se mantiene constante en el mismo valor de las condiciones anteriores, 170×10^{-6} . De nueva cuenta, se puede estimar la cantidad de agua adsorbida/absorbida por la superficie con la ecuación de Sauerbrey, que en este caso es de ≈ 5 ng de agua. Para una concentración 100 mM de NaCl la frecuencia aumenta en ≈ -8 Hz respecto a la concentración de sal anterior, y posteriormente muestra un cambio en el valor de ΔF_3 de ≈ -0.58 Hz min^{-1} . Por otra parte, la disipación presenta el mismo valor de la concentración anterior. Aparentemente la disminución de frecuencia indica una mayor cantidad de agua e iones en la superficie, sin embargo, se ha descrito que a concentraciones ≥ 100 mM de NaCl se presentan fenómenos de apantallamiento (respuesta inespecífica del equipo, en función de cambios en viscosidad y densidad del medio) de los efectos de penetración de agua e hinchamiento debido a las propiedades del medio,¹³² pues las respuestas de frecuencia y disipación dependen también de la densidad y viscosidad del fluido. Finalmente, al aumentar la concentración a 1 M de NaCl se presenta un cambio inicial en la frecuencia de ≈ -100 Hz, y posteriormente sigue disminuyendo, por otra parte, la disipación aumenta ≈ 10 u.D. pero permanece constante. Esto podría indicar que la disminución en la frecuencia observada no se debe a adsorción/absorción de agua o iones en la superficie, sino al ya mencionado apantallamiento debido al cambio en las propiedades del medio, pues la disipación permanece constante, y un cambio tan abrupto de frecuencia debería estar asociado al reblandecimiento de la superficie.

La superficie celulósica obtenida en este trabajo aparentemente sería más robusta que las reportadas previamente en estas condiciones de fuerza iónica. Por ejemplo, a concentraciones de 10 y 100 mM de NaCl se han descrito comportamientos de hinchamiento/deshinchamiento para superficies de fibras de celulosa de carga baja.^{173,132} se han descrito decrementos en el valor de disipación, y se ha interpretado que la

superficie se endureció, por pérdida de agua, o “deshinchamiento”.¹³² También, se ha descrito que en estas condiciones se presenta un aumento rápido en la energía de disipación, que fue correspondiente al cambio en frecuencia.⁶⁹ La Figura 56 muestra un esquema del comportamiento de la superficie modelo de celulosa en medios acuosos.

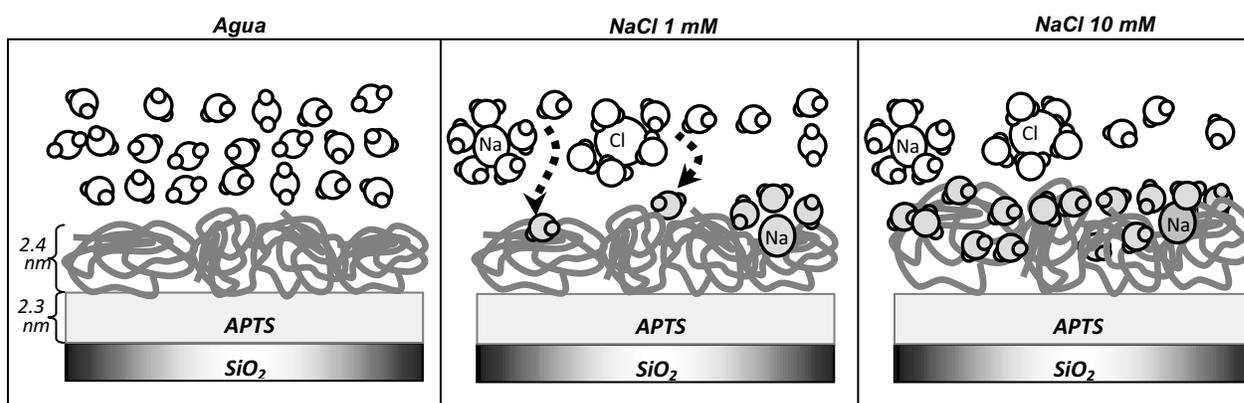


Figura 56. Esquema del comportamiento de la superficie modelo de celulosa en medios acuosos. En agua no se presenta adsorción/absorción; en NaCl 1mM comienza a presentarse un aumento en la masa; el aumento en masa continúa a concentraciones mayores de NaCl. En ningún caso se reblandece la superficie.

Entonces, en función de los resultados obtenidos, se puede considerar que las superficies de celulosa obtenidas en este trabajo tienen propiedades morfológicas (rugosidad, orientación, cobertura) y fisicoquímicas (hinchamiento, estabilidad) muy adecuadas para utilizarlas en diversas técnicas de análisis superficial. Por otra parte, en medio acuoso no presentan hinchamiento, lo cual podría comprometer su utilidad para estudios de interacción enzimática. Sin embargo, aparentemente un ligero aumento en la fuerza iónica del medio acuoso promovería su hinchamiento, donde ese incremento (del orden de 1 mM de NaCl, no comprometería la actividad enzimática.

7.4.2.2. SUPERFICIES MODELO DE LIGNINA

Se siguió la misma estrategia experimental con las superficies de lignina en la MBC-D, a continuación se muestran los resultados obtenidos en distintas condiciones.

MEDICIONES EN AIRE

Al igual que en el caso de las superficies de celulosa, las superficies de lignina obtenidas en este trabajo mostraron ser inestables en aire (resultado no mostrado), pues mostraron un cambio en el gradiente de frecuencia hacia valores mayores de ΔF , lo cual indica que se perdió material, posiblemente debido a la oscilación del disco de cuarzo.

MEDICIONES EN MEDIO ACUOSO

La Figura 57 muestra un acercamiento de los perfiles de ΔF_3 y D_3 de una de las superficies de lignina y APTS en agua.

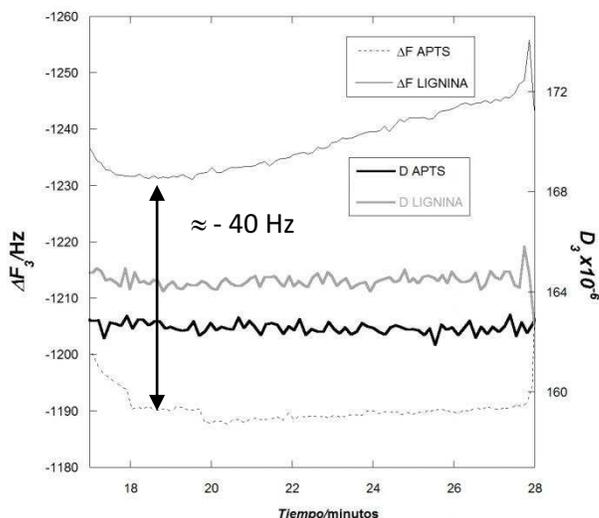


Figura 57. Acercamiento al perfil de ΔF_3 y D_3 para lignina y APTS en agua.

Se observa que la diferencia en el valor de frecuencia entre las superficies de APTS y lignina, al inicio de su contacto con el agua es de ≈ -40 Hz. Utilizando la ecuación de Sauerbrey se obtiene $\Delta m_{\text{Sauerbrey}} = 2.36 \text{ mg}_{\text{Lignina}} \text{ m}^{-2}$, que considerando el área de superficie activa silanizada implica que hay $4.63 \times 10^{-5} \text{ mg}_{\text{Lignina}} = 46 \text{ ng}_{\text{Lignina}}$ sobre la superficie de APTS. Si se considera una densidad de la lignina de 1.4 g cm^{-3} ,¹⁸⁰ entonces el grosor estimado de la superficie es $d_{\text{SauerbreyLignina}} \approx 1.7 \text{ nm}$. Como se observa en la Tabla 12, en este trabajo se obtuvo un grosor mucho menor al descrito en la literatura consultada, aunque evidentemente la técnica de depósito utilizada sería el factor que ocasiona una diferencia tan grande.

Molécula	Solvente	Substrato	Técnica	Grosor (nm)	Ref.
Lignina kraft	THF	SiO ₂ /APTS	LS	1.7	ESTE TRABAJO
			Por giro	68	75
Lignina kraft	NH ₄ OH		Por giro	60-75	81

Tabla 12. Algunos valores de grosor de superficies de lignina reportadas en la literatura consultada.

ESTABILIDAD EN AGUA

En la Figura 57 se observa que la película de lignina no es estable en agua, el valor de ΔF_3 disminuye ≈ -14 Hz en 8 minutos, por su parte, la disipación presenta un valor estable de $D_3 \approx 165 \times 10^{-6} \text{ u.D.}$, que es un valor mayor que el presentado por la superficie de APTS. La disminución de frecuencia observada probablemente es debida a

la adsorción/absorción de agua sobre la superficie hidrofílica de lignina, sin presentar un reblandecimiento de la misma. Esta marcada diferencia en estas condiciones respecto a la superficie de celulosa se podría explicar en función del carácter hidrofílico de este biopolímero. Es importante resaltar que esta superficie mostró una excelente estabilidad en estas condiciones, pues no se perdió material ni se reblandeció, aunque la lignina es hidrofílica. Este resultado concuerda con lo observado en la interfase aire-agua, donde la lignina mostró buena estabilidad. Por otra parte, también indicaría que el anclaje obtenido con el APTS estabilizó de manera adecuada este biopolímero sobre el sustrato sólido.

EFEECTO DE FUERZA IÓNICA

La Figura 58 muestra los perfiles de ΔF_3 y D_3 de una superficie de lignina y una de APTS en medios acuosos con distintos valores de fuerza iónica.

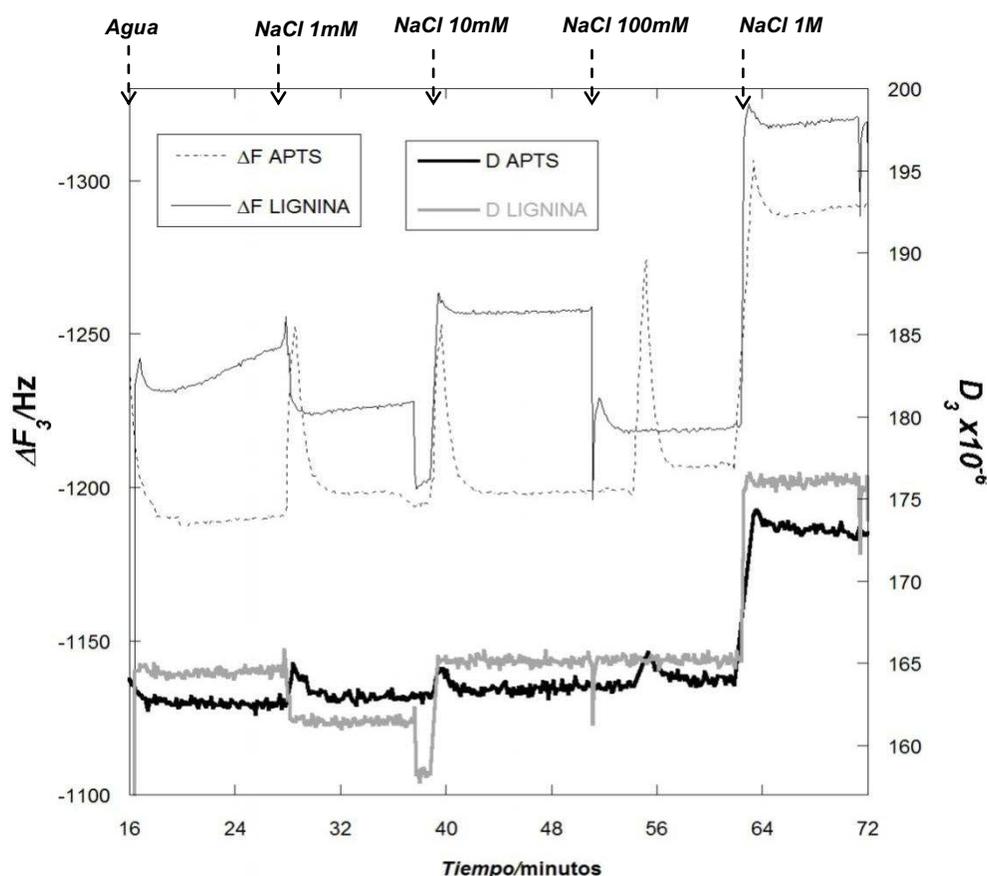


Figura 58. Cambio en ΔF_3 y D_3 de las superficies de APTS y lignina en medio acuoso, con diferentes $[NaCl]$.

Se observa que al aumentar la fuerza iónica con la solución 1 mM de NaCl, la frecuencia aumenta ≈ 20 Hz, mientras que la disipación disminuye $\approx 3 \times 10^{-6}$ u.D., esto indica que posiblemente se perdió lignina, lo que ocasiona que la superficie sea más

rígida, a la par que la masa disminuye. La causa de la mayor rigidez se debe a pérdida de lignina, pues el valor de ΔF_3 obtenido es menor al que se tenía en agua. Esto concuerda con lo descrito por Notley,⁸¹ que reportó que cuando los cambios de fuerza iónica no son bruscos, se observan cambios en la frecuencia, que se pueden atribuir a la disolución de la superficie de lignina. Al cambiar la fuerza iónica del medio a una concentración 10 mM de NaCl, se observa una disminución de ≈ -50 Hz, y el aumento de la disipación a su valor original, esto puede significar que: (i) la superficie de lignina que no fue removida se hinchó; o (ii) el material adsorbido (por ejemplo iones Na solvatados) generan un aumento de disipación, que terminó coincidiendo con el valor inicial. De nueva cuenta, esto concuerda con trabajos descritos previamente,⁸¹ donde se reportó que a concentraciones de 10 mM se presenta hinchamiento y disolución.

Al cambiar la fuerza iónica del medio a una concentración 100 mM de NaCl se observa que la frecuencia vuelve a aumentar ≈ 30 Hz, mientras que la disipación permanece constante, esto podría indicar que la superficie perdió masa sin reblandecerse, lo cual indica que posiblemente fue masa de lignina. El comportamiento inestable de la lignina puede deberse a una interacción frágil con las superficies de APTS, pues en general en la literatura se ha descrito siempre la tendencia a fijar la lignina sobre superficies hidrofílicas,⁸¹ y no relativamente hidrofóbicas como en el presente trabajo. Sin embargo, los estudios enzimáticos se realizarán principalmente en superficies lignocelulósicas modelo con mezclas de una proporción de celulosa mayor que la de lignina. La Figura 59 muestra un esquema del comportamiento de la superficie modelo de lignina en medios acuosos.

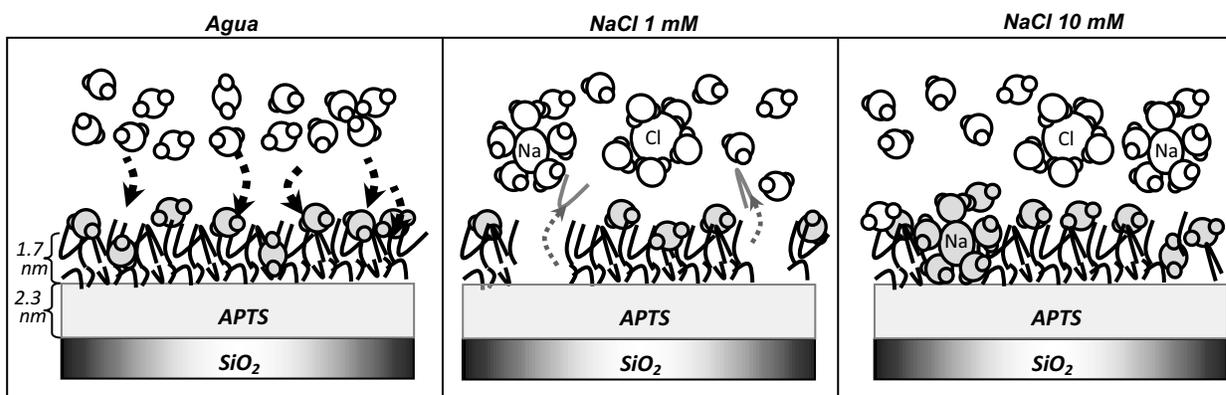


Figura 59. Esquema del comportamiento de la superficie modelo de lignina en medios acuosos. En agua

se presenta un aumento importante en la masa, atribuible a adsorción/absorción de la superficie; en NaCl 1mM se disuelve la lignina, y se expone una superficie más rígida (APTS o lignina); a concentraciones mayores de NaCl se tiene una superficie muy reblandecida.

7.4.2.3. SUPERFICIES LIGNOCELULÓSICAS MODELO

Se estudió el comportamiento de estabilidad en la MBC-D de una superficie lignocelulósica obtenida mediante depósito LS a partir de una película de Langmuir de mezcla celulosa:lignina (70:30).

MEDICIONES EN AIRE

En aire la superficie de mezcla mostró un comportamiento de estabilidad similar al de la lignina, que a su vez fue más estable que el encontrado para la superficie de celulosa.

MEDICIONES EN MEDIO ACUOSO

La Figura 60 muestra los perfiles de ΔF_3 y D_3 de una superficie de mezcla y una de APTS en agua.

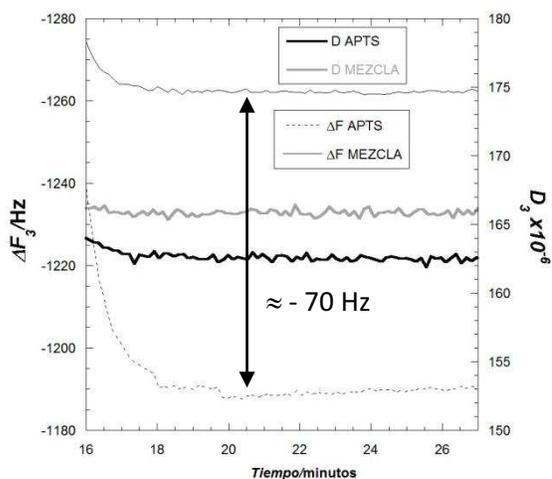


Figura 60. Acercamiento a los perfiles de ΔF_3 y D_3 de superficies APTS y de mezcla lignocelulósica (70:30) en agua.

Se observa que la superficie lignocelulósica modelo ocasionó un cambio de - 70 Hz respecto a la superficie de APTS, lo que implica $\Delta m_{\text{Sauerbrey}} \approx 2.3 \text{ mg}_{\text{Mezcla}} \text{ m}^{-2}$. Para estimar el grosor se consideró una densidad de la mezcla proporcional a sus componentes:

$$\rho_{\text{Mezcla}} = 0.7(\rho_{\text{Celulosa}}) + 0.3(\rho_{\text{Lignina}}) = 1.53 \times 10^9 \text{ mg m}^{-3}$$

Considerando la superficie activa, se depositaron $\approx 8 \times 10^{-5} \text{ mg}_{\text{mezcla}} = 81 \text{ ng}_{\text{mezcla}}$. Así, el grosor estimado de la superficie de mezcla es de 5.31 nm. Entonces, se obtuvo una

cantidad de masa similar a la obtenida para la superficie de celulosa (75 ng_{Celulosa}), y aproximadamente el doble que la masa en la superficie de lignina (46 ng_{Lignina}). Entonces, la mayor cantidad de material transferido desde la interfase aire-agua sobre la superficie de SiO₂, respecto a los casos de celulosa y lignina de forma individual, está relacionada con los agregados formados por la interacción de los biopolímeros, observados con las microscopías MAB y MFA de mezclas celulosa:lignina 50:50 y 70:30 respectivamente. Por otra parte, bajo los supuestos hechos acerca de la densidad, se habría obtenido un grosor de aproximadamente 2 veces o más, del estimado para las superficies de celulosa (2.43 nm) y lignina (1.7 nm).

ESTABILIDAD EN AGUA

En la Figura 60 se observa que el comportamiento de ΔF_3 de la superficie lignocelulósica modelo fue igual de estable que el observado para la superficie de celulosa. Es decir, la mezcla no muestra el comportamiento de hinchamiento observado en la superficie de lignina en estas condiciones.

Además, se observa que el valor de disipación de la superficie lignocelulósica es menor que el de la superficie de celulosa. Lo cual indicaría que al mezclarse la celulosa y la lignina, la superficie generada tiene una mayor rigidez.

Entonces, la superficie lignocelulósica modelo presentó las siguientes características particulares:

- (i) Una mayor cantidad de masa transferida
- (ii) Un posible grosor del doble o más, que el estimado para las superficies de los biopolímeros de forma individual
- (iii) No presentó hinchamiento en agua, a pesar de contener lignina, la cual mostró un hinchamiento importante en estas condiciones
- (iv) Una mayor rigidez que la de la superficie modelo de celulosa

Todas estas características de la superficie lignocelulósica modelo, observadas en agua con la MBC-D, indican que posiblemente la lignina presente en la superficie se encuentra estabilizada de alguna forma en la mezcla. Además, en el presente trabajo se observó una gran miscibilidad de los dos biopolímeros en la interfase aire-agua, que explicaría la formación de los agregados observados por microscopía.

Entonces, en función de todo lo anterior, se podría pensar que en la superficie lignocelulósica modelo, la lignina se encuentra “encapsulada” o atrapada en agregados

lignocelulósicos globulares, generados por la miscibilidad de los biopolímeros. Estos agregados le darían estabilidad a la lignina en agua, y producirían, de forma global, una estructura más rígida en la superficie, que la observada en la superficie de celulosa de forma independiente. Por otra parte, estas estructuras de celulosa y lignina ensambladas, son similares (respecto a su morfología) a las descritas en estudios de simulación molecular.^{86,87}

EFFECTO DE FUERZA IÓNICA

La Figura 61, muestra el comportamiento de una de las superficies lignocelulósicas modelo obtenida en este trabajo, en medio acuoso con distintos valores de fuerza iónica.

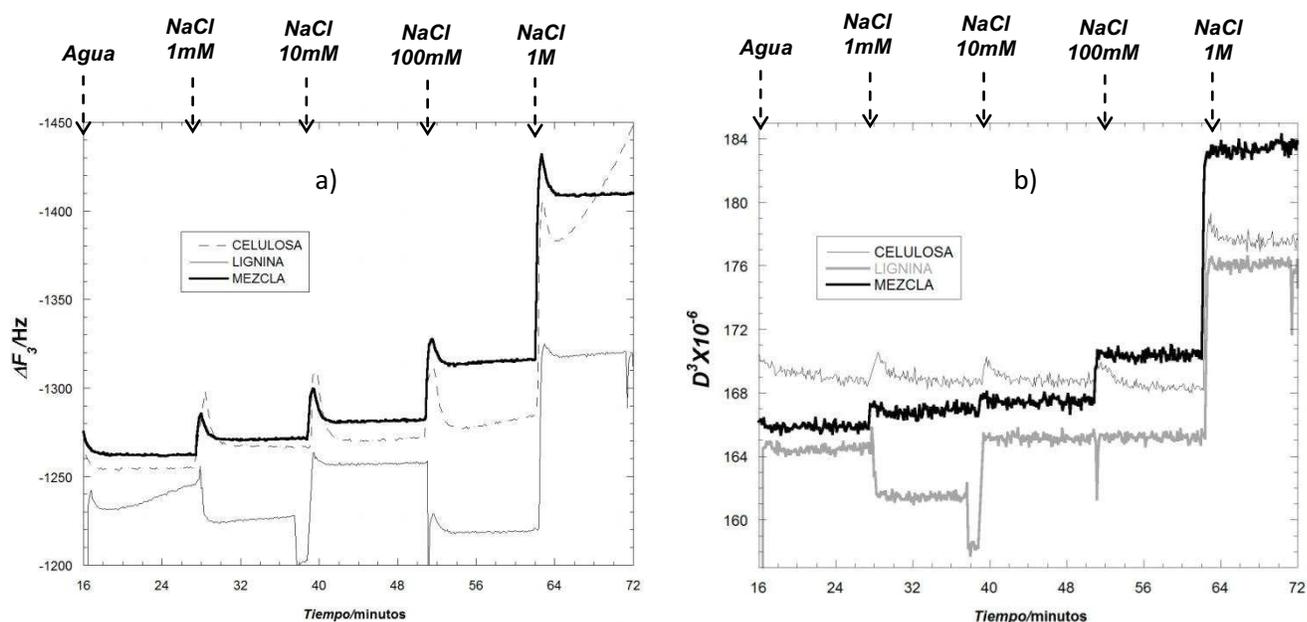


Figura 61. Cambio en a) ΔF_3 ; y b) D_3 de todas las superficies lignocelulósicas modelo en medio líquido.

Se observa que al incrementar la fuerza iónica, en todas las concentraciones de NaCl evaluadas, en el perfil de ΔF_3 se observa el comportamiento en escalón observado para la celulosa, pero de forma más pronunciada. Es decir, no se presenta la disolución observada en la superficie de lignina en estas condiciones. Sin embargo, el efecto de la fuerza iónica sobre los perfiles de ΔF_3 y D_3 es mayor en la superficie lignocelulósica modelo, que en la superficie modelo de celulosa. Finalmente, a 1 M se presentan los fenómenos de apantallamiento (por cambios en la densidad y viscosidad del medio) observados para las superficies de celulosa y lignina, pues se observa una disminución de ΔF_3 de ≈ 90 Hz, y un incremento de disipación de ≈ 12 u.D.

Entonces, si bien al parecer la lignina se encuentra estabilizada en el “ensamble” lignocelulósico, su presencia genera un reblandecimiento de la superficie debido al incremento en la fuerza iónica del medio. Esto se podría explicar de dos maneras: (i) se está presentando una disolución de la lignina *dentro* de la estructura ensamblada celulosa:lignina, debido al aumento de iones en el medio. Esta disolución, sin embargo, no generaría la pérdida de material, pero sí un efecto de reblandecimiento (con o sin aumento del grosor); o (ii) la estructura general de la superficie lignocelulósica, y no solamente las regiones donde se encuentra la lignina, es más sensible a la fuerza iónica del medio. Respecto a estas posibilidades, en función de lo observado en las superficies de los biopolímeros de forma individual, la primera posibilidad parecería la más adecuada.

En resumen, al parecer la mezcla celulosa:lignina, genera una superficie modelo con más material adsorbido, y posiblemente más gruesa. Esta superficie no presenta hinchamiento en agua, a pesar de estar parcialmente constituida por lignina. Además, es más rígida que la superficie constituida totalmente por celulosa. Por otra parte, incrementos en la fuerza iónica del medio ocasionan fenómenos de hinchamiento y reblandecimiento, posiblemente ocasionados por una disolución parcial de la lignina, dentro de la estructura de la superficie lignocelulósica, pero sin ocasionar pérdida de material. La Figura 62 muestra un resumen esquemático del comportamiento observado en las superficies lignocelulósicas modelo bajo las condiciones estudiadas.

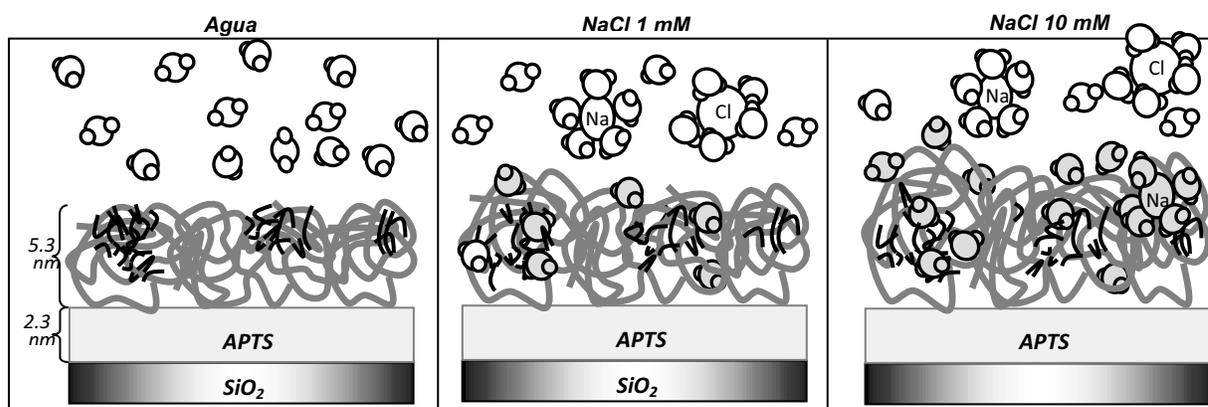


Figura 62. Esquema del comportamiento de la superficie lignocelulósica modelo en medios acuosos. En agua no se presenta un aumento en la masa; en NaCl 1mM se presenta un aumento en la masa sobre la superficie, a la par de un ligero reblandecimiento; a concentraciones mayores de NaCl continúa esta tendencia (se presenta el supuesto de aumento de grosor debido al reblandecimiento).

8

CONCLUSIONES

Se definió una metodología que permite solubilizar celulosa microcristalina, sin modificarla químicamente y en condiciones suaves, utilizando THF y sonicación de 47 kHz. Estas soluciones permitieron formar películas en la interfase aire-agua y a partir de ellas caracterizar la morfología, la estabilidad y el comportamiento fisicoquímico de éste biopolímero en esta interfase. Las películas obtenidas presentaron compresibilidades similares a los trabajos descritos en la literatura (0.033 m mN^{-1}), y son estables en la interfase. Lo anterior, además de representar uno de los objetivos de este trabajo, no había sido reportado hasta la fecha, por lo que significa una nueva alternativa para realizar estudios de celulosa en esta interfase.

Por otra parte, estas soluciones de celulosa también permitieron realizar por primera vez estudios con mezclas lignina:celulosa en la interfase aire-agua, pues si bien la lignina se solubiliza con relativa facilidad en el THF, la disolución de celulosa sin funcionalizar había significado el impedimento para realizar este tipo de estudios. En este aspecto, las películas formadas mostraron miscibilidad entre estos biopolímeros con un máximo en la composición de la mezcla de 50-50 %.

Se definió un método para depositar de forma controlada películas de Langmuir de celulosa, lignina y sus mezclas, desde la interfase aire-agua, sobre sustratos sólidos de SiO_2/APTS , mediante la técnica de depósito LS, lo cual era uno de los objetivos del presente trabajo, pues una vez obtenidas las superficies lignocelósicas modelo, fue posible caracterizarlas.

Las superficies modelo de celulosa mostraron ser relativamente planas ($\text{rms} \approx 2 \text{ nm}$), homogéneas, no tener orientación, presentar una estructura de agregados y cubrir toda la superficie del sustrato sólido. Estas superficies mostraron un comportamiento

estable en agua (esto es, no se solubilizan) al ser utilizadas en la MBC-D, lo cual implica que son adecuadas para realizar futuros estudios enzimáticos en este equipo. Si bien no presentan hinchamiento inmediato, esta propiedad se puede modular con cambios en la fuerza iónica del medio, por lo que su utilidad en estudios de tipo enzimático no se vería comprometida, y más aún, permitiría estudiar de forma sistemática el efecto del hinchamiento sobre la actividad enzimática (por ejemplo, estudiar a detalle el fenómeno conocido como amorfogénesis de la estructura de celulosa durante la degradación enzimática).

Por otra parte, las superficies modelo de lignina mostraron ser planas ($rms \approx 1.4$ nm), cubrir totalmente el substrato sólido, y mostrar una estructura sin los agregados observados en celulosa. En este caso, y contrario a lo esperado, las superficies presentaron un comportamiento estable en agua, pero con un hinchamiento mayor que las superficies de celulosa. Sin embargo, ante cambios en la fuerza iónica (NaCl 1mM) se disuelven.

La diferencia entre las propiedades de las superficies de celulosa y lignina es relevante, porque los estudios realizados a las superficies modelo de una mezcla celulosa:lignina (70:30), mostraron una morfología y comportamiento en medios acuosos distintos a los observados en las superficies de los biopolímeros de forma individual. Así, estas superficies resultaron ser más gruesas y rígidas que las superficies de celulosa y lignina, y también mostraron ser más susceptibles a cambios en la fuerza iónica del medio. Es decir, la mezcla presenta propiedades particulares, distintas a las superficies individuales, comportamiento que podría ser explicado por la miscibilidad observada en los estudios en la interfase aire-agua. Además, este resultado indicaría la posibilidad de modular de forma controlada propiedades como el hinchamiento, rigidez y estabilidad de este tipo de superficies en función de su composición y condiciones del medio. Lo anterior abre la posibilidad de generar un espectro de superficies lignocelulósicas modelo con distintas propiedades, que resultarían útiles para estudiar de forma sistemática los fenómenos de superficie entre enzimas y materiales lignocelulósicos, utilizando la MBC-D.

En resumen, los objetivos planteados para este trabajo fueron alcanzados, y la hipótesis planteada resultó ser verdadera, pues se produjeron superficies lignocelulósicas modelo que, en función de sus propiedades, muestran el potencial de ser adecuadas para realizar estudios de su degradación enzimática en medios acuosos, utilizando la MBC-D.

9

PERSPECTIVAS

La metodología definida para generar películas en la interfase aire-agua abre la posibilidad de estudiar sistemáticamente la actividad enzimática de celulasas, lacasas y otras enzimas de interés sobre películas de lignina, celulosa y sus mezclas en esta interfase, por ejemplo, con estudios variando las condiciones de la subfase (temperatura, pH, fuerza iónica, presencia de otras moléculas, etc), las condiciones de las películas (presión superficial, área por molécula) o evaluando la competencia interfacial de las propias enzimas. Este tipo de estudios no han sido reportados hasta la fecha para la celulosa utilizada en este trabajo, ni para mezclas lignocelulósicas, por lo que se abre una nueva línea de investigación a explorar. También, permitiría realizar estudios sobre su posible utilidad como sensores de distintas moléculas. Este tipo de estudios se han reportado con lignina y otros polímeros, pero hasta la fecha no se ha utilizado este tipo de celulosa. También, estas películas interfaciales permitirían estudiar sistemáticamente el efecto de diversas variables (estado de agregación, peso molecular) sobre la miscibilidad entre la celulosa y la lignina.

Las superficies modelo de celulosa, lignina, y mezcla lignocelulósica obtenidas en este trabajo permitirán realizar estudios sistemáticos de actividad enzimática, variando el tipo de enzima, la composición de la mezcla, y la fuerza iónica del medio, utilizando no solamente cinéticas de degradación, como en los estudios de fermentación regulares, sino también el estado de la superficie, en términos de hinchamiento, reblandecimiento, y cambios en su morfología y topología. Esto permitirá obtener información de la relación entre los materiales lignocelulósicos, el medio de reacción, y las distintas enzimas utilizadas en los procesos de fermentación, lo cual generará eventualmente información nueva para los estudios orientados a la producción de etanol celulósico y lignocelulósico.

Las propiedades morfológicas y topográficas de las superficies modelo de celulosa obtenidas las hace adecuadas para distintas técnicas de caracterización superficial, como estudios de medición de fuerzas, o de energía libre de superficie, así como también para evaluar el efecto de diversos tratamientos fisicoquímicos (hornificación, funcionalización)

sobre sus propiedades. Además, el hecho de que sean de celulosa sin funcionalizar, permitiría realizar estudios de tipo estructura-propiedades, contra superficies obtenidas con derivados de celulosa (trimetilsililcelulosa, carboximetilcelulosa).

Otra línea de investigación a explorar es la relacionada con el efecto de diversas variables de la producción de superficies modelo (solubilización por agitación o sonicación, tiempo de sonicación, presión superficial de depósito, estado de agregación, fuerza iónica del medio, tipo de anclaje hidrofóbico) sobre sus propiedades.

Finalmente, el conjunto de técnicas experimentales utilizadas, presentan potencial para estudiar también el ensamble biológico entre estos dos biopolímeros, y otros, presentes en los tejidos vegetales.

Esto implica que este trabajo representa una aportación no solamente a la literatura especializada en los fenómenos de degradación enzimática de estos biopolímeros, sino también en la investigación relacionada con la producción de papel y otros derivados de la madera, y posiblemente también en otras áreas, como biología vegetal, electrónica, optoelectrónica, y generación de nuevos materiales biocompositos con diversas finalidades nanotecnológicas, como por ejemplo recubrimientos poliméricos de anclaje estables en medios acuosos.

10

DIVULGACIÓN

REUNIONES

1. 29th Annual Meeting, International Conference on Surfaces, Materials and Vacuum 2009 de la SMCTSM. 21 a 25 de Septiembre, San Luis Potosí, S.L.P., México. *PONENCIA*: “Production and study of lignocellulosic model surfaces”. Sergio Ulises Espinosa Domínguez.
2. XXX Congreso Nacional de la Asociación Mexicana de Docencia de Ingeniería Química (AMIDIQ). 19 a 22 de Mayo de 2009. Mazatlán, Sinaloa, México. *CARTEL*: “Estudio de formación de películas lignocelulósicas en la interfase aire-agua”. Sergio Ulises Espinosa Domínguez, Maribel Hernández-Guerrero, Hiram Beltrán Conde, José Campos Terán.
3. Primer encuentro de Alumnos de Posgrado, UAM-Iztapalapa, 2010. 26 de Enero, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, México D.F., México. *CARTEL*: “Estudio de formación de películas lignocelulósicas en la interfase aire-agua”.
4. XXXI Congreso Nacional de la Asociación Mexicana de Docencia de Ingeniería Química (AMIDIQ). 4 a 7 de Mayo, Huatulco, Oaxaca, México. *PONENCIA*: “Lignocellulosic model surfaces: production and characterization”. Maribel Hernández-Guerrero.

PUBLICACIONES DE DIVULGACIÓN

Semanario de la UAM, Febrero de 2010. Volúmen XVI, Número 22. pp 4. “La meta: lograr procesos de producción de biocombustibles rentables y eficientes (Residuos lignocelulósicos, proveedores de etanol y otros productos sustentables)”.

11

REFERENCIAS

- ¹ Cassman, K.; Liska, A. Food and fuel for all: realistic or foolish?. *Biofuels, Bioprod. Bioref.* **2009**, 1(1): 18–23.
- ² Searchinger, T. et al. Use of U.S. Croplands for Biofuels Increases Greenhouse Gases Through Emissions from Land-Use Change. *Science*. **2008**, 319 (5867): 1238-1240.
- ³ Clark, J.; Deswarte F; Farmer T. The integration of green chemistry into future biorefineries. *Biofuels, Bioprod. Bioref.* **2009**, 3(1): 72–90.
- ⁴ a) Werpy, T.; Petersen, G. Top Value Added Chemicals From Biomass Volume I. Pacific Northwest National Laboratory (PNNL) and the National Renewable Energy Laboratory (NREL). **2004**. b) Kennedy, J. et al. Cellulose and cellulose derivatives: Physicochemical aspects and industrial applications; Woodhead Publishing: Cambridge, 1995.
- ⁵ Knauf, M.; Mohammed, M. Lignocellulosic biomass processing: A perspective. *International Sugar Journal*. **2004**, 106(1263): 147-150
- ⁶ Mansfield, S; Mooney, C.; Sandler, J. Substrate and enzyme characteristics that limit cellulose hydrolysis. *Biotechnol Prog.* **1999**, 15(5): 804-816.
- ⁷ Yang B. et al. Fast and efficient alkaline peroxide treatment to enhance the enzymatic digestibility of steam-exploded softwood substrates. *Biotechnol and Bioeng.* **2002**, 77(6): 678-684.
- ⁸ Berlin, A. et al. Inhibition of cellulase, xylanase and beta-glucosidase activities by softwood lignin preparations. *J. Biotechnol.* **2006**, 125(2): 198-209.
- ⁹ Gray, K.; Zhao, L; Emptage, M. Bioethanol. *Current Opinion in Chemical Biology.* **2006**, 10(2): 141-146.
- ¹⁰ Alper, H.; Stephanopoulos, G. Engineering for biofuels: exploiting innate microbial capacity or importing biosynthetic potential? *Nature Reviews Microbiology.* **2009**, 7(10): 715-723.
- ¹¹ Tsapikouni, T.; Missirlis, Y. Protein–material interactions: From micro-to-nano scale. *Materials Science and Engineering: B* **2008**, 152(1-3): 2-7.
- ¹² Seshan, K. Handbook of Thin-Film Deposition Processes and Techniques - Principles, Methods, Equipment and Applications, 2nd ed. *William Andrew Publishing/Noyes.* **2002**.
- ¹³ Erbil, H. Surface Chemistry of Solid and Liquid Interfaces. *Blackwell Publishing.* **2006**. p 308-337.
- ¹⁴ Riviere, J; Mihra, S. Handbook of Surface and Interface Analysis: Methods for Problem-Solving, 2nd ed. *CRC Press.* **2009**.
- ¹⁵ Wolfbeis, O. Piezoelectric Sensors. *Springer.* **2007**.
- ¹⁶ Barkalow, D; Young, R. Cellulose derivatives derived from pulp and paper mill sludge. *J. Wood Chem. Technol.* **1985**, 5(3): 293-312.
- ¹⁷ Clark, J.; Deswarte, F.; Farmer, T. The integration of green chemistry into future biorefineries. *Biofuels, Bioprod. Bioref.* **2009**. 3(1): 72-90.
- ¹⁸ Kumar, P. et al. Methods for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Efficient Hydrolysis and Biofuel Production. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2009**, 48(8): 3713-3729.
- ¹⁹ J et al. Top Value Added Chemicals From Biomass Volume II. Pacific Northwest National Laboratory (PNNL) and the National Renewable Energy Laboratory (NREL). **2007**.
- ²⁰ Brown, R. The Biosynthesis of Cellulose. *J. Macromol. Sci. Pure Appl. Chem. A.* **1996**, 33(10): 1345-1373.
- ²¹ Goodger, E. Hydrocarbon fuels, production, properties and performance. *Macmillan, London.* **1976**. p 120
- ²² Dore, W. ; Sponsler, O. The Structure of Ramie Cellulose as Derived from X-ray Data. *Fourth Colloid Symposium Monograph.* **1926**, 41: 174-202. (Original no consultado, citado por: O'Sullivan, A. Cellulose: the structure slowly unravels. *Cellulose* **1997**, 4(3): 173-207).
- ²³ Nehls, W. et al. Characterization of cellulose and cellulose derivatives in solution by high resolution ¹³C-NMR spectroscopy. *Prog. Polym. Sci.* **1994**, 19(1): 29-78.
- ²⁴ Haworth, W.; Hirst, E. The Existence of the Cellobiose Residue in Cellulose. *Nature.* **1930**, 126: 438.
- ²⁵ Gralen, N.; Svedberg, T. Molecular Weight of Native Cellulose. *Nature* **1943**, 152: 625
- ²⁶ Conrad, C. Molecular Weight Uniformity of Cellulose and Cellulose Derivatives. *Ind. Eng. Chem* **1953**, 45(11): 2511–2517.
- ²⁷ Paakkari, T.; Serimaa, R.; Fink, H. Structure of amorphous cellulose. *Acta Polym.* **1989**, 40(12): 731-734.

- ²⁸ O'Sullivan, A. Cellulose: the structure slowly unravels. *Cellulose* **1997**, 4(3): 173-207
- ²⁹ Nishiyama, Y. et al. Crystal Structure and Hydrogen-Bonding System in Cellulose I β from Synchrotron X-ray and Neutron Fiber Diffraction. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124: 9074-9082.
- ³⁰ Langan, P. et al., H. X-ray Structure of Mercerized Cellulose II at 1 Å Resolution. *Biomacromolecules* **2001**, 2: 410-416.
- ³¹ Nada, A.; El-Diwany, A.; Elshafei, A. Infrared and Antimicrobial Studies on Different Lignins. *Acta Biotechnologica* **1988**, 9(3): 295-298.
- ³² Kohonen, M. Engineered Wettability in Tree Capillaries. *Langmuir* **2006**, 22(7): 3148–3153.
- ³³ Holladay, J et al. Top Value Added Chemicals From Biomass Volume II. Pacific Northwest National Laboratory (PNNL) and the National Renewable Energy Laboratory (NREL). **2007**.
- ³⁴ Fengel, D.; Wegener, G. Wood-Chemistry, Ultrastructure, Reactions. *Walter de Gruyter, New York* **1984**.
- ³⁵ K.V. Sarkanen, K.; Ludwig, C. Lignins, Occurrence, Formation, Structure and Reactions, *Wiley, New York* **1971**.
- ³⁶ Whetten, R.; Sederoff, R. Lignin Biosynthesis. *Plant Cell* **1995**, 7: 1001-1013.
- ³⁷ Björkman A. Studies on finely divided wood. Part 1. Extraction of lignin with neutral solvents. *Svensk Papperstidn* **1956**, 59:477-85.
- ³⁸ Sarkanen, S. et al. Lignin. 18. Associative Effects among Organosolv Lignin Components. *Macromolecules* **1981**, 14(2): 426-434.
- ³⁹ Connors, W.; Sarkanen, S.; McCarthy, J. Gel Chromatography and Association Complexes of Lignin. *Holzforschung* **1980**, 3(1): 80-85.
- ⁴⁰ Ekman, K.; Lindberg, J. Gel filtration of milled wood lignin, Brauns' native tignin, dioxane lignin and their derivatives. *Paperi Puu* **1966**, 48:241-244. (Original no consultado, citado por: Wegener, G.; Fengel, D. Studies on Milled Wood Lignins from Spruce Part 1. Composition and molecular properties. *Wood Sci. Technol* **1977**, 11:133-145).
- ⁴¹ Yoshihiro Yamauchi, Y.; Yoshizawa, M.; Fujita, M. Engineering Stacks of Aromatic Rings by the Interpenetration of Self-Assembled Coordination Cages. *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, 130 (18): 5832–5833.
- ⁴² Zimm, B.; Stockmayer, W. The Dimensions of Chain Molecules Containing Branches and Rings. *J. Chem. Phys.* **1949**, 17(12): 1301-1314.
- ⁴³ Heinze, T; Koschella, A. Solvents Applied in the Field of Cellulose Chemistry - A Mini Review. *Polímeros: Ciência e Tecnologia* **2005**, 15(2): 84-90.
- ⁴⁴ Lateef, H. et al. Separation and recovery of cellulose and lignin using ionic liquids: a process for recovery from paper-based waste. *J Chem Technol Biotechnol* **2009**, 84: 1818–1827.
- ⁴⁵ Katz, J; Sarnwel, P. *Annalen*, **1929**,472:241. (Original no consultado, citado por: Casilla, R; Eley, D. Adhesive Interaction with Lignin and Various Cellulose Monolayers. *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 1*, **1975**, 71: 1469 - 1475).
- ⁴⁶ Adam, N. Surface films of cellulose derivatives on aqueous solutions. *Trans. Faraday Soc.* **1933**, 29: 90-106.
- ⁴⁷ Giles, C.; Agnihotri, V. Monolayers of Cellulose. *Chem. and Ind.* **1967**, 1874. (Original no consultado, citado por: Casilla, R; Eley, D. Adhesive Interaction with Lignin and Various Cellulose Monolayers. *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 1* **1975**, 71: 1469 - 1475).
- ⁴⁸ M. H. Allingham, M.; Giles, C.; Neustadter, E. Researches on Monolayers 4. A Study of Dyeing Processes of the Unimolecular Film Balance. *Disc. Faraday Soc.* **1954**, (16): 92-105.
- ⁴⁹ A. Cameron, C. H. Giles and T. H. MacEwan. Researches on monolayers. Part VI. A study of reactions in surface films of acetates and ketones, and their relation to adsorption by cellulose acetate. *J. Chem. Soc.* **1957**, 4304 - 4311.
- ⁵⁰ Casilla, R; Eley, D. Adhesive Interaction with Lignin and Various Cellulose Monolayers. *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 1*, **1975**, 71: 1469 - 1475
- ⁵¹ Trabelsi, S.; Langevin, D. Co-adsorption of Carboxymethyl-Cellulose and Cationic Surfactants at the Air–Water Interface. *Langmuir*, **2007**, 23 (3), pp 1248–1252
- ⁵² Luner, P.; Sandell, M. The wetting of cellulose and wood hemicelluloses. *Journal of Polymer Science Part C: Polymer Symposia* **1969**, 28(1): 115-142.
- ⁵³ Neuman, R.; Berg, J.; Claesson, P. Direct Measurements of Surface Forces in Papermaking and Paper Coating Systems. *Nordic Pulp Paper Res. J.* **1993**, 8(1): 96-104.
- ⁵⁴ Holmberg, M. et al. Surface Force Studies of Langmuir–Blodgett Cellulose Films. *J. Colloid Interface Sci.* **1997**, 186(2): 369-381.
- ⁵⁵ Gunnars, S.; Wagberg L.; Cohen, M. Model films of cellulose: I. Method development and initial results. *Cellulose* **2002**, 9(3-4): 239-249.
- ⁵⁶ Eriksson, J. et al. Enzymatic degradation of model cellulose films. *Journal of Colloid and Interface Science* **2005**, 284(1): 99-106.
- ⁵⁷ Eriksson, J. et al. Model cellulose films exposed to H. insolens glucoside hydrolase family 45 endo-cellulase—the effect of the carbohydrate-binding module. *J. Colloid Interface Sci.* **2005**, 285(1): 94–99.
- ⁵⁸ Schaub, M.; Wenz, G.; Wegner, G. Ultrathin films of cellulose on silicon wafers. *Advanced Materials* **1993**, 5(12): 919–922.

- ⁵⁹ Zauscher, S.; Klingenberg, D. Normal Forces between Cellulose Surfaces Measured with Colloidal Probe Microscopy. *J. Col. Int. Sci.* **2000**, 229(2): 497-510.
- ⁶⁰ Holmberg, M. et al. Interactions between cellulose and colloidal silica in the presence of polyelectrolytes. *Colloids Surf., A* **1997**, 129-130: 175-183.
- ⁶¹ Poptoshev, E.; Rutland, M.; Claesson, P. Surface Forces in Aqueous Polyvinylamine Solutions. 2. Interactions between Glass and Cellulose. *Langmuir* **2000**, 16: 1987-1992.
- ⁶² Rundlöf, M. et al. Application of the JKR Method to the Measurement of Adhesion to Langmuir–Blodgett Cellulose Surfaces. *Journal of Colloid and Interface Science* **230**, 441–447 (2000).
- ⁶³ Eriksson, J. et al. Model cellulose films exposed to *H. insolens* glucoside hydrolase family 45 endo-cellulase—the effect of the carbohydrate-binding module. *Journal of Colloid and Interface Science* **2005**, 285(1): 94-99.
- ⁶⁴ Josefsson, P.; Henriksson, G.; Wågberg, L. The Physical Action of Cellulases Revealed by a Quartz Crystal Microbalance Study Using Ultrathin Cellulose Films and Pure Cellulases. *Biomacromolecules* **2008**, 9(1): 249–254.
- ⁶⁵ Turon, X.; Rojas O.; Deinhammer, R. Enzymatic kinetics of cellulose hydrolysis: a MBC-D study. *Langmuir* **2008**, 24(8):3880-3887.
- ⁶⁶ Habibi Y. et al. Langmuir–Blodgett films of cellulose nanocrystals: Preparation and characterization. *Journal of Colloid and Interface Science* **2007**, 316(2): 388–397.
- ⁶⁷ Kontturi, E.; Tammelin, T.; Österberg M. Cellulose—model films and the fundamental approach. *Chem Soc Rev.* **2006**, 35(12): 1287-304.
- ⁶⁸ Roman, M. Model Cellulosic Surfaces, Chapter 1: History and Recent Advances. **2009** ACS Symposium Series; American Chemical Society: Washington, DC, 2010.
- ⁶⁹ Aulin, C. et al. Nanoscale Cellulose Films with Different Crystallinities and Mesosstructures; Their Surface Properties and Interaction with Water. *Langmuir* **2009**, 25(13): 7675–7685.
- ⁷⁰ Luner P.; Kempf, U. Properties of lignin monolayers at the air-water Interface. *Tappi Journal* **1970**, 53(11): 2069–2076. (Original no consultado, citado en: Barros, A. et al. Langmuir monolayers of lignins obtained with different isolation methods. *Thin Solid Films* **1999**, 354: 215-221.
- ⁷¹ Barros, A. et al. Langmuir monolayers of lignins obtained with different isolation methods. *Thin Solid Films* **1999**, 354(1-2): 215-221.
- ⁷² Aguié-Béghin, V. et al. Formation and Characterization of Spread Lignin Layers at the Air/Water Interface. *Langmuir* **2002**, 18(13): 5190–5196.
- ⁷³ Cathala, B. et al. Organization Behavior of Guaiacyl and Guaiacyl/Syringyl dehydrogenation Polymers (Lignin Model Compounds) at the Air/Water Interface. *Langmuir* **2000**, 16(26): 10444–10448.
- ⁷⁴ Micic, M. et al. ZL-DHP lignin model compound at the air–water interface. *Biophys Chem.* **2002**, 99(1):55-62.
- ⁷⁵ Norgren, M. et al. Smooth Model Surfaces from Lignin Derivatives. I. Preparation and Characterization. *Langmuir* **2006**, 22(3): 1209–1214
- ⁷⁶ Pasquini, D. et al. Lignin molecular arrangements in Langmuir and Langmuir–Blodgett films: the influence of extraction processes. *Colloids and Surfaces A* **2005**, 252(2-3): 193-200.
- ⁷⁷ Pasquini, D. et al. Surface Morphology and Molecular Organization of Lignins in Langmuir–Blodgett Films. *Langmuir* **2002**, 18(17): 6593–6596
- ⁷⁸ Pereira, A. et al. Lignin from Sugar Cane Bagasse: Extraction, Fabrication of Nanostructured Films, and Application. *Langmuir* **2007**, 23(12), pp 6652–6659
- ⁷⁹ Martins, G. et al. Ultrathin films of lignins as a potential transducer in sensing applications involving heavy metal ions. *Sensors and Actuators, B* **2008**, 129(2): 525-530.
- ⁸⁰ Norgren, M. Smooth Model Surfaces from Lignin Derivatives. II. Adsorption of Polyelectrolytes and PECs Monitored by MBC-D. *Langmuir* **2007**, 23(7): 3737–3743.
- ⁸¹ Notley, S.; Norgren, M. Adsorption of a Strong Polyelectrolyte To Model Lignin Surfaces. *Biomacromolecules* **2008**, 9(7): 2081–2086.
- ⁸² Pillai, K.; Renneckar, S. Cation– π Interactions as a Mechanism in Technical Lignin Adsorption to Cationic Surfaces. *Biomacromolecules* **2009**, 10(4): 798–804.
- ⁸³ Rials, T.; Glasser, W. Multiphase materials with lignin. IV. Blends of hydroxypropyl cellulose with lignin. *Journal of Applied Polymer Science* **1989**, 37(12): 2399-2415.
- ⁸⁴ Rials, T.; Glasser, W. Multiphase materials with lignin: 5. Effect of lignin structure on hydroxypropyl cellulose blend morphology. *Polymer* **1990**, 31(7): 1333-1338.
- ⁸⁵ Rials, T.; Glasser, W.; Wolfgang, G. Multiphase materials with lignin. VI. Effect of cellulose derivative structure on blend morphology with lignin. *Wood & Fiber Science* **1989**, 21(1):80-90.
- ⁸⁶ Besombes, S.; Mazeau, K. The cellulose/lignin assembly assessed by molecular modeling. Part 1: adsorption of a three guaiacyl β -O-4 dimer onto a β cellulose whisker. *Plant Physiology and Biochemistry* **2005**, 43: 299–308.
- ⁸⁷ Besombes, S.; Mazeau, K. The cellulose/lignin assembly assessed by molecular modeling. Part 2: seeking for evidence of organization of lignin molecules at the interface with cellulose. *Plant Physiology and Biochemistry* **2005**, 43: 277–286.

- ⁸⁸ Sjöberg, J. et al. Analyses of carbohydrates and lignin in the surface and inner layers of softwood pulp fibers obtained employing various alkaline cooking processes. *Nordic Pulp Paper Res. J.* **2002**, *17*(3): 295-301.
- ⁸⁹ Casilla, R.; Eley, D. Adhesive Interaction with Lignin and Various Cellulose Monolayers. *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 1* **1975**, *71*: 1469-1475.
- ⁹⁰ Nottley, S.; Norgren, M. Measurement of Interaction Forces between Lignin and Cellulose as a Function of Aqueous Electrolyte Solution Conditions. *Langmuir* **2006**, *22*(26): 11199–11204.
- ⁹¹ Saarinen, T. et al. Adsorption of laccases on cellulose and lignin surfaces. *BioResources* **2009**, *4*(1): 94-110.
- ⁹² Conrad, C. Molecular Weight Uniformity of Cellulose and Cellulose Derivatives. *Ind. Eng. Chem* **1953**, *45*(11): 2511–2517.
- ⁹³ Wypych, G. Handbook of Solvents. ChemTec Publishing **2001** p 578.
- ⁹⁴ Saito, T. et al. Homogeneous suspensions of individualized microfibrils from TEMPO-catalyzed oxidation of native cellulose. *Biomacromolecules* **2006**, *7*(6): 1687–1691.
- ⁹⁵ Herrick, F. et al. Microfibrillated cellulose: morphology and accessibility. *J. Appl Polym Sci Appl Polym Symp* **1983**, *37*: 797–813.
- ⁹⁶ Johnson, R. et al. A new bio-based nanocomposite: fibrillated TEMPO-oxidized celluloses in hydroxypropylcellulose matrix. *Cellulose* **2009**, *16*: 227-238.
- ⁹⁷ Tanford, C. Ben Franklin Stilled the Waves: An Informal History of Pouring Oil on Water with Reflections on the Ups and Downs of Scientific Life in General. *Durham, North Carolina: Duke University Press* **1989**.
- ⁹⁸ Langmuir, I. The Constitution and Fundamental Properties of Solids and Liquids. II. Liquids. *J. Am. Chem. Soc.* **1917**, *39*(9): 1848–1906.
- ⁹⁹ Truman S. The Fundamental Conductivity and Resistivity of Water. *Electrochemical and Solid-State Letters* **2005**, *8*(1): 16-19.
- ¹⁰⁰ Harkins, W. The Physical Chemistry of Surface Films. *Reinold, New York* **1952**.
- ¹⁰¹ Gaines, G. Insoluble Monolayers at Liquid-Gas Interfaces. *Wiley-Interscience: New York* **1966**.
- ¹⁰² Huhnerfuss, H.; Alpers, W. Molecular aspects of the system water/monomolecular surface film and the occurrence of a new anomalous dispersion regime at 1.43 GHz. *J. Phys. Chem.* **1983**, *87*(25): 5251–5258.
- ¹⁰³ Langmuir, I.; Schaefer, V. Properties and structures of proteins monolayers. *Chem. Rev.* **1939**, *24*(2): 181–202.
- ¹⁰⁴ Dhanabalan, A. et al. *Thin Solid Films* **1998**, *327–329*:787-791.
- ¹⁰⁵ Tzung-Han C. Thermodynamic behavior and relaxation processes of mixed monolayers at the air:water interface. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2000**, *17*: 71–79.
- ¹⁰⁶ Hénon, S; Meunier, J. Microscope at the Brewster angle: Direct observation of first order phase transitions in monolayers. *Rev. Sci. Instrum.* **1991**, *62*(4): 936-939.
- ¹⁰⁷ Honing, D; Mobius, D. Direct visualization of monolayers at the air-water interface by Brewster angle microscopy. *J. Phys. Chem.* **1991**, *95*(12): 4590-4592.
- ¹⁰⁸ Iler, R. The chemistry of silica, solubility, polymerization colloid and surface properties and biochemistry. *Wiley interscience, new York* **1979**.
- ¹⁰⁹ Zhuravlev, L. Concentration of hydroxyl groups on the surface of amorphous silicas. *Langmuir* **1987**, *3*(3): 316–318.
- ¹¹⁰ Sneh, O.; George, S. Thermal stability of hydroxyl groups on a well defined silica surface. *J. Phys. Chem.* **1995**, *99*(13): 4639–4647.
- ¹¹¹ Tiberg, F. et al. Ellipsometry Studies of the Self-Assembly of Nonionic Surfactants at the Silica-Water Interface: Equilibrium Aspects. *Langmuir* **1994**, *10*(7): 2294–2300
- ¹¹² Plueddemann, E. Silane coupling agents, 2nd ed. *Plenum Pub.* **1991**.
- ¹¹³ Swalen, J. et al. Molecular monolayers and films. A panel report for the Materials Sciences Division of the Department of Energy. *Langmuir* **1987**, *3*(6): 932–950.
- ¹¹⁴ Fadeev, A.; McCarthy, T. Trialkylsilane Monolayers Covalently Attached to Silicón Surfaces: Wettability Studies Indicating that Molecular Topography Contributes to Contact Angle Hysteresis. *Langmuir* **1999**, *15*(11): 3759–3766.
- ¹¹⁵ Ulman, A. An introduction to ultrathin organic films from Langmuir-Blodgett to self assembly. *Academic Press Inc. New York* **1991**.
- ¹¹⁶ Wang, A., et al. In vitro stability study of organosilane self-assemble monolayers and multilayers. *Journal of Colloid and Interface Science* **2005**, *291*(2): 438-447.
- ¹¹⁷ Parikh, A. et al. An Intrinsic Relationship between Molecular Structure in Self-Assembled n-Alkylsiloxane Monolayers and Deposition Temperature. *J. Phys. Chem.* **1994**, *98*(31): 7577–7590.
- ¹¹⁸ Brzoska, J.; Azouz, I.; Rondelez, F. Silanization of Solid Substrates: A Step Toward Reproducibility. *Langmuir* **1994**, *10*(11): 4367–4373.
- ¹¹⁹ Brunner, H. et al. Substrate Effects on the Formation of Alkylsiloxane Monolayers. *Langmuir* **1999**, *15*(6): 1899–1901.
- ¹²⁰ Krasnoslobodtsev, A.; Smirnov, S. Effect on wáter on silanization of silica by trimetoxysilanes. *Langmuir*, **2002**, *18* (8): 3181–3184.

- ¹²¹ Chauhan, A. et al. Self assembly of the 3-aminopropyltrimethoxysilane multilayers on Si and hysteretic current-voltage characteristics. *Applied Physics A: Materials Science & Processing* **2008**, 90(3): 581-589.
- ¹²² Aswal, D. et al. Self assembled monolayers on silicon for molecular electronics. *Analytica Chimica Acta* **2006**, 568 (1-2): 84-108.
- ¹²³ Aswal, D. et al. A Tunnel Current in Self-Assembled Monolayers of 3-Mercaptopropyltrimethoxysilane. *Small* **2005**, 1(7): 725-729.
- ¹²⁴ Blodgett, K. Films Built by Depositing Successive Monomolecular Layers on a Solid Surface. *J. Am. Chem. Soc.* **1935**, 57(6): 1007-1022.
- ¹²⁵ Kuhn, H.; Möbius, D. Monolayer Assemblies. In *Investigations of Surfaces and Interfaces*; Rossiter, B. W., Baetzold, R. C., Ed.; John Wiley & Sons, Inc: New York **1993**, IXB: p 375.
- ¹²⁶ Roberts, G. Langmuir-Blodgett Films. *Plenum: New York*, **1990**.
- ¹²⁷ Langmuir, I.; Schaefer, V. Activities of Urease and Pepsin Monolayers. *J. Am. Chem. Soc.*, **1938**, 60(6): 1351-1360.
- ¹²⁸ Kawaguchi, T.; Nakahara, H.; Fukuda, K. Mono- and multilayers of amphiphilic cellulose esters and some novel comblike polymers. *J. Colloid Interface Sci.* **1985**, 104(1): 290-293.
- ¹²⁹ Schulman, J.; Waterhouse, R.; Spink, J. Adhesion of amphipatic molecules to solid surfaces. *Kolloid Z* **1956**, 146: 77-95.
- ¹³⁰ Kossi, C.; Leblanc, R. Rhodopsin in a new model bilayer membrane. *J. Colloid Interface Sci.* **1981**, 80(2): 426-436.
- ¹³¹ Dooling, C. et al. Fast, reversible optical sensing of NO₂ using 5,10,15,20-tetrakis[3,4-bis(2-ethylhexyloxy)phenyl]-21H,23H-porphine assemblies. *Journal of Materials Chemistry* **2001**, 11(2): 392-389.
- ¹³² Tammelin, T. et al. Preparation of Langmuir/Blodgett-cellulose Surfaces by Using Horizontal Dipping Procedure. Application for Polyelectrolyte Adsorption Studies Performed with MBC-D. *Cellulose* **2006**, 13(5): 519-535.
- ¹³³ Binning, G.; Quate, C.; Gerber, Ch. Atomic Force Microscope. *Physical Review Letters* **1986**, 56(9): 930-934.
- ¹³⁴ Braga, P.; Ricci, D. Atomic Force Microscopy: Biomedical Methods and Applications. 2004, Humana Press.
- ¹³⁵ Simpson, G.; Sedin, D.; Rowlen, K. Surface Roughness by Contact versus Tapping Mode Atomic Force Microscopy. *Langmuir* **1999**, 15(4): 1429-1434.
- ¹³⁶ Majumdar, A., and Bhushan, B., in "Handbook of Micro/Nanotribology", (B. Bhushan, Ed.), p. 109. CRC Press, Boca Raton, FL, **1995**.
- ¹³⁷ Rodahl, M. et al. Quartz crystal microbalance setup for frequency and Q-factor measurements in gaseous and liquid environments. *Rev. Sci. Instrum.* **1995**, 66(7): 3924-3930.
- ¹³⁸ Höök, F. et al. Energy Dissipation Kinetics for Protein and Antibody-Antigen Adsorption under Shear Oscillation on a Quartz Crystal Microbalance. *Langmuir* **1998**, 14(4): 729-734.
- ¹³⁹ K.K. Kanazawa and J.G. Gordon, Frequency of a quartz microbalance in contact with liquid. *Anal. Chem.* **1985**, 57 : 1770-1771.
- ¹⁴⁰ Sauerbrey, G. Verwendung von Schwingquarzen zur Wägung dünner Schichten und zur Mikrowägung. *Zeitschrift für Physik A Hadrons and Nuclei* **1959**, 155(2): 206-222. (En alemán)
- ¹⁴¹ Voinova, M. Viscoelastic acoustic response of layered polymer films at fluid-solid interfaces: Continuum mechanics approach. *Physica Scripta* **1999**, 59(5): 391-396.
- ¹⁴² Shubin, V.; Linse, P. Effect of Electrolytes on Adsorption of Cationic Polyacrylamide on Silica: Ellipsometric Study and Theoretical Modeling. *J. Phys. Chem.* **1995**, 99(4): 1285-1291.
- ¹⁴³ Spectral Database for Organic Compounds SDBS. (Disponible en: http://riodb01.ibase.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/cre_index.cgi?lang=eng).
- ¹⁴⁴ Silverstein, R.; Webster, F.; Kiemle, D. Spectrometric Identification of Organic Compounds, 5th Edition. *John Wiley & Sons* **1998**.
- ¹⁴⁵ Skoog, D. Principios de análisis instrumental. 5a Ed. McGraw-Hill/Interamericana.
- ¹⁴⁶ Kondo, T. The assignment of IR absorption bands due to free hydroxyl groups in cellulose. *Cellulose* **1997**, 4(4): 281-292.
- ¹⁴⁷ Bellamy, L. The infrared spectra of complex molecules. p. 96, Methuen, London **1975**.
- ¹⁴⁸ Eisenberg, D.; Kauzmann, W. The structure and properties of water. *Oxford University Press, London* **1969**.
- ¹⁴⁹ Michell, A.; Higgings, G. The absence of free hydroxyl groups in cellulose. *Cellulose* **1999**, 6: 89-91.
- ¹⁵⁰ Toma, M. Ultrasonically Assisted Conversion of Lignocellulosic Biomass to Ethanol. Disponible en línea: <http://www.nt.ntnu.no/users/skoge/prost/proceedings/aiche-2006/data/papers/P70141.pdf>
- ¹⁵¹ Bogolitsyn, K.; Bokhovkin, I. Analysis of the UV Spectra of Model Lignin Substances of the Phenol Series. *Journal of Applied Spectroscopy* **1979**, 31(2): 1004-1007.
- ¹⁵² Dong, D.; Fricke, A. UV-Visible Response of Kraft Lignin in Soft Wood Black Liquor. *Materials Research Society. Symposium Proceedings* **1990**, 197: 77.
- ¹⁵³ Verilhac, J. et al. Molecular weight dependent charge carrier mobility in poly(3,3"-dioctyl-2,2':5',2"-terthiophene). *The journal of physical chemistry. B* **2006**, 110(27): 13305-13309.

-
- ¹⁵⁴ Glossary of terms used in photochemistry (IUPAC Recommendations 1996), p. 2274.
- ¹⁵⁵ Oliveira, O. N., Jr.; Constantino, C. J. L.; Balogh, D. T.; Curvelo, A. A. S. *Cellul. Chem. Technol.* **1994**, *28*, 541-549.
- ¹⁵⁶ P. Luner, G. Roseman. Monomolecular Film Properties of Isolated Lignins. *Holzforschung* **1986** *40*:61-66.
- ¹⁵⁷ Giles, C. H.; Agnihortri, V. G. Monolayers of Cellulose. *Chemistry & Industry* **1967**, *44*: 1874.
- ¹⁵⁸ Basque, P. et al. Monolayers of Cellulose Ethers at the Air-Water Interface. *Langmuir* **1996**, *12*: 5614-5619.
- ¹⁵⁹ T. Kawauchi, H. Nakahara, K. Fukuda. Monomolecular and Multimolecular Films of Cellulose Esters with Various Alkyl Chains. *Thin Solid Films* **1985**, *133*(1-4): 29-38.
- ¹⁶⁰ C. Constantino, et al. Langmuir-Blodgett films from lignins. *Thin Solid Films* **1996**, *284*: 191-194.
- ¹⁶¹ Constantino, C.; Dhanabalan, A.; Oliveira, O. Experimental artifacts in the surface pressure measurement for lignin monolayers in Langmuir troughs. *Review of Scientific Instruments* **1999**, *70*(9): 3674-3680.
- ¹⁶² Thermodynamic behavior and relaxation processes of mixed DPPC/cholesterol monolayers at the air/water interface. *Colloids and surfaces B: biointerfaces* **2000**, *17*: 71-79.
- ¹⁶³ Leiva, A. Biodegradable poly(DL-lactide)/poly(ϵ -caprolactone) mixtures: Miscibility at the air/water interface. *European Polymer Journal* **2006**, *42*: 316-321.
- ¹⁶⁴ Birdy, K. Lipid and Biopolymer Monolayers at Liquid Interface, *Plenum, New York* **1989**.
- ¹⁶⁵ Notley, S.; Petterson, B.; Wagberg, L. Direct Measurement of Attractive van der Waals' Forces between Regenerated Cellulose Surfaces in an Aqueous Environment. *J. AM. CHEM. SOC.* **2004**, *126*: 13930-13931.
- ¹⁶⁶ Radtchenko, I.; Papastavrou, G.; Borkovec, M. Direct Force Measurements between Cellulose Surfaces and Colloidal Silica Particles. *Biomacromolecules* **2005**, *6*: 3057-3066.
- ¹⁶⁷ Sczech, R.; Riegler, H. Molecularly smooth cellulose surfaces for adhesion studies. *Journal of Colloid and Interface Science* **2006**, *301*: 376-385.
- ¹⁶⁸ Yokota, S.; Kitaoka, T.; Wariishi, H. Surface morphology of cellulose films prepared by spin coating on silicon oxide substrates pretreated with cationic polyelectrolyte. *Applied Surface Science* **2007**, *253*: 4208-4214.
- ¹⁶⁹ Fält, S. et al. Model films of cellulose II – improved preparation method and characterization of the cellulose film. *Cellulose* **2004**, *11*: 151-162.
- ¹⁷⁰ Ahola, S. et al. Enzymatic Hydrolysis of Native Cellulose Nanofibrils and Other Cellulose Model Films: Effect of Surface Structure. *Langmuir*, **2008**, *24*(20): 11592-11599.
- ¹⁷¹ Stiernstedt, J. Friction and forces between cellulose model surfaces: A comparison. *Journal of Colloid and Interface Science* **2006**, *303*: 117-123.
- ¹⁷² Lefebvre, J.; Gray, D. AFM of adsorbed polyelectrolytes on cellulose I surfaces spin-coated on silicon wafers. *Cellulose* **2005**, *12*: 127-134.
- ¹⁷³ Ahola, S. et al. Model films from native cellulose nanofibrils *Biomacromolecules*, **2008**, *9*(4): 1273-1282.
- ¹⁷⁴ Hermans, P.; Weidinger, A. The hydrates of cellulose. *Journal of Colloid Science* **1946**, *1*(2): 185-193.
- ¹⁷⁵ Kontturi, E.; Thüne, P.; Niemantsverdriet, J. Novel method for preparing cellulose model surfaces by spin coating. *Polymer* **2003**, *44*: 3621-3625.
- ¹⁷⁶ Rehfeldt, S.; Tanaka, M. Hydration Forces in Ultrathin Films of Cellulose. *Langmuir* **2003**, *19*: 1467-1473.
- ¹⁷⁷ Fält S., Wagberg L. and Vesterlind E-V. Swelling of model films of cellulose having different charge densities and comparison to the swelling behavior of corresponding fibers. *Langmuir* **2003** *19*: 7895-7903.
- ¹⁷⁸ Mueller, M. et al. Visible-light-stimulated destabilization of PEG-liposomes. *Macromolecules* **2000**, *33*(13): 4799-4804.
- ¹⁷⁹ Kanazawa, K. K.; Gordon, II J. G. The Oscillation Frequency of a Quartz Resonator in Contact with a Liquid. *Analytica Chimica Acta* **1985**, *175*: 99-105.
- ¹⁸⁰ Ramaih, M. V.; Goring, D. A. I. Thermal Expansion of Cellulose Hemicellulose and Lignin. *Journal of Polymer Science Part C-Polymer Symposium* **1965**, *11PC*: 27.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
IZTAPALAPA
Posgrado en Biotecnología

OBTENCIÓN Y ESTUDIO DE SUPERFICIES LIGNOCELULÓSICAS MODELO

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE MAESTRO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:

SERGIO ULISES ESPINOSA DOMÍNGUEZ

DIRECTOR:

JOSÉ CAMPOS TERÁN _____

ASESORES:

HIRAM ISAAC BELTRÁN CONDE _____

SERGIO REVAH MOISEEV _____

MÉXICO, DISTRITO FEDERAL. 2010

