



Università
Ca' Foscari
Venezia

Corso di Laurea Magistrale
in Chimica e Tecnologie
Sostenibili

Tesi di Laurea

Sviluppo di Metodiche per il Frazionamento di Lignosolfonati

Relatori

Dr. Matteo Gigli
Prof. Claudia Crestini

Laureando

Paolo Guzzonato
Matricola 847062

Anno Accademico

2020 / 2021

Sommario

1.	Introduzione	3
1.1.	Bioraffineria e Biomasse.....	3
1.2.	Lignina.....	4
1.2.1.	Biosintesi.....	5
1.2.2.	Lignine Tecniche	8
1.3.	Lignosolfonato	11
1.4.	Frazionamento.....	14
2.	Scopo del Lavoro	17
3.	Parte sperimentale	18
3.1.	Materiali	18
3.2.	Metodi	18
3.2.1.	Acidificazione Lignosolfonati	18
3.2.2.	Prove di solubilità	18
3.2.3.	Sequential Solvent Extraction (SSE).....	18
3.2.4.	Sequential Solvent Precipitation (SSP)	19
3.3.	Strumenti e Analisi	20
3.3.1.	Cromatografia di permeazione su gel (GPC)	20
3.3.2.	Spettroscopia NMR.....	20
3.3.3.	Analisi Elementare.....	20
4.	Risultati e Discussioni	21
4.1.	Acidificazione.....	21
4.2.	Solubilità.....	26
4.3.	Sequential Solvent Extraction (SSE).....	27
4.4.	Sequential Solvent Precipitation (SSP)	31
5.	Conclusioni	38
6.	Bibliografia.....	39

1. Introduzione

1.1. Bioraffineria e Biomasse

La produzione di materiali e di energia è fortemente legata allo sfruttamento dei combustibili fossili che, come è noto, hanno una disponibilità limitata e a causa del loro progressivo consumo risentono di un incremento sempre maggiore di prezzo.¹

Questa condizione porterà inevitabilmente ad una crisi del sistema produttivo industriale attuale. Proprio per prevenire tale problematica, e per ridurre l'emissione di gas serra in atmosfera e dunque limitare i cambiamenti climatici in atto, la Chimica Verde propone di sostituire le risorse fossili con materie prime rinnovabili (punto 7), ovvero le biomasse.

A dire il vero la conversione di biomasse in energia e in combustibili non è un'idea recente. Infatti, la modalità di produzione di bioetanolo da canna da zucchero era già nota nel 6000 a.C. L'unica differenza è che all'epoca il bioetanolo veniva utilizzato esclusivamente per scopi alimentari, mentre oggi la sua produzione è legata all'impiego come combustibile verde.¹

È stato dimostrato, infatti, che l'utilizzo di biocombustibili come biometano, biometanolo e bioetanolo produce nel ciclo di vita un numero sensibilmente limitato di gas serra rispetto agli equivalenti metano, metanolo ed etanolo ottenuti da giacimenti di petrolio o carbone.¹ Secondo le stime del WBGU (*wissenschaftlicher beirat der bundesregierung globale umweltveränderungen*, ovvero il comitato scientifico consultivo tedesco per il cambiamento ambientale) la produzione di questi biocombustibili per mezzi di trasporto arriverà nel 2030 a coprire un quarto del fabbisogno europeo.²

La sfida per le bioraffinerie che invece si prefiggono l'obiettivo di ottenere prodotti chimici è quella di riuscire a sostituire quelli già ottenuti dalle attuali raffinerie di petrolio, o producendo esattamente le medesime sostanze chimiche, o generando dei composti alternativi con le stesse funzionalità.¹ Analogamente a quanto avviene per le raffinerie di petrolio, nelle quali i prodotti chimici e l'energia sono ricavati dal grezzo, le bioraffinerie dividono le biomasse nei loro componenti costitutivi che possono poi essere trasformati in prodotti ad alto valore aggiunto, biocarburanti, biomateriali, calore ed energia. Per poter sviluppare questo tipo di impianti è però necessario che si verifichino due condizioni: i prodotti devono essere ecologici e ricavati con basso consumo di acqua e ridotte emissioni di anidride carbonica e devono avere un prezzo competitivo.³

Dal punto di vista tecnologico un impianto di bioraffineria può essere modulato in base a diversi fattori: la tipologia di biomassa, la sua qualità e disponibilità, le industrie locali, la possibilità di intensificare e integrare i processi, le infrastrutture disponibili, etc.¹

L'Europa è generalmente povera di raccolti dedicati alla produzione di biomasse, ma al contrario abbondano i prodotti di scarto di attività agricole, silvestri, ittiche, industriali e alimentari.

Fra queste, la biomassa lignocellulosica, che è la più disponibile e abbondante, ha il vantaggio di essere economica e rinnovabile. Principalmente ricavata da biomasse agricole e forestali, contiene una grande varietà di composti organici, che possono essere utilizzati come additivi per alimenti e cosmetici, ma soprattutto come base per ottenere sia commodities, e.g. plastiche, sia prodotti di chimica fine (**Figura 1**).^{4,5}

Da questi processi di bioraffineria e dai processi industriali di produzione di carta, il principale materiale di scarto è la lignina. Nel 2015, la produzione mondiale di lignina ha raggiunto le 100 Mt/anno con un valore di 732 milioni di dollari (USD). Attualmente, una quantità che va dalle 50 alle 70 milioni di tonnellate di lignina viene annualmente prodotta come sottoprodotto dell'industria cartaria.⁶

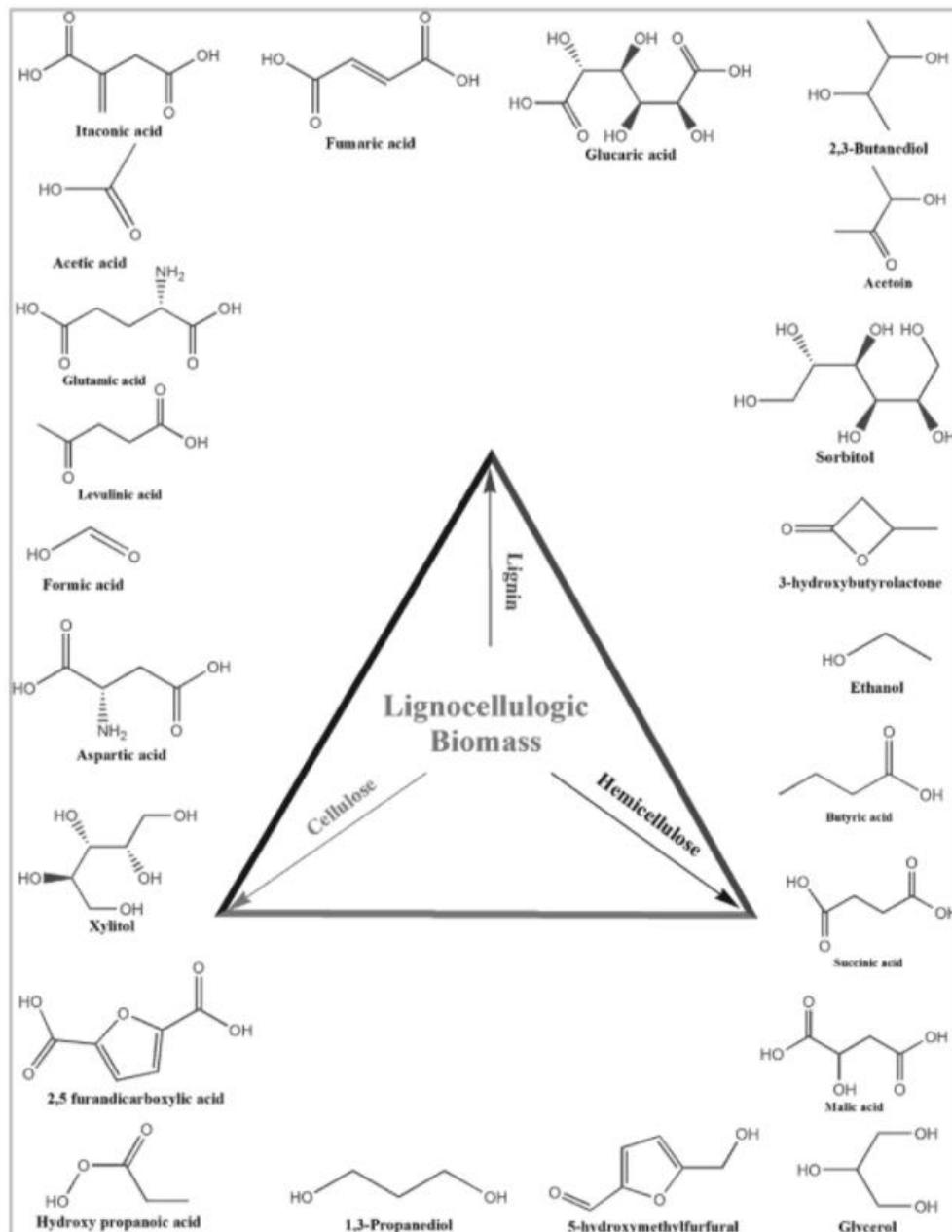


Figura 1: Principali prodotti chimici che possono essere derivati dalla biomassa lignocellulosica¹

1.2. Lignina

Dopo cellulosa ed emicellulosa, la lignina è il biopolimero più abbondante sulla terra ed è la principale fonte di composti aromatici presente in natura.^{7,8}

Nonostante la sua grande disponibilità e il gran numero di applicazioni conosciute, la lignina è ancora poco valorizzata, e viene in gran parte bruciata per produrre energia che alimenta il processo di estrazione dalla biomassa lignocellulosica o, in minor parte, impiegata in prodotti a basso valore aggiunto.^{6,9,10}

La principale causa è da attribuire alla complessità e all'eterogeneità della sua struttura, che rende complicato un impiego del materiale tal quale. Infatti, per poter ottenere dei processi di valorizzazione sostenibili e con un costo competitivo, è necessario sviluppare delle tecnologie di raffinamento che siano in grado di trasformare la lignina in un valido materiale di partenza per l'industria.

La lignina è un componente chimico e morfologico caratteristico dei tessuti vascolari di vegetali evoluti che appartengono alle superdivisioni delle pteridofite e delle spermatofite (divise in angiosperme e gimnosperme), nei quali svolge le funzioni strutturali e di trasporto di liquidi.⁸ Le interazioni chimico fisiche fra lignina, cellulosa ed emicellulosa sono alla base della forza, della rigidità e dell'impermeabilità delle pareti cellulari di legno e corteccia. La lignina incrementa a tal punto la resistenza meccanica delle cellule

vegetali che può permettere a certe varietà di alberi di superare i cento metri di altezza. Le piante primitive, quali funghi, licheni e muschi, non contengono lignina, e di conseguenza non si sviluppano in altezza.⁸

La quantità di lignina presente in diverse specie botaniche può variare di molto. Infatti, nelle gimnosperme (*softwood*) la lignina può arrivare a costituire il 30% del peso del legno, mentre nelle angiosperme (*hardwood*) il suo contenuto scende al 20-25%, e al 10-15% nelle piante erbacee.¹¹⁻¹³

Inoltre, la distribuzione della lignina non è uniforme né all'interno delle cellule vegetali, né nelle diverse parti della pianta. Ad esempio, nello stelo il contenuto di lignina è maggiore alla base e alla sommità. Inoltre, sembra che il contenuto di lignina all'interno di spine e foglie vari in funzione del loro stato di sviluppo.⁸

1.2.1. Biosintesi

La lignina è composta principalmente da tre unità costituenti dette monolignoli: l'alcol *para*-cumarilico, l'alcol coniferilico e l'alcol sinapilico (**Figura 2**). Questi tre fenilpropanoidi sono sintetizzati a partire dalla fenilalanina, che deriva a sua volta dal ciclo biosintetico dell'acido shikimico. Nel processo di formazione della lignina, i monolignoli generano le unità *para*-idrossifenilica (H), guaiacilica (G) e siringilica (S).

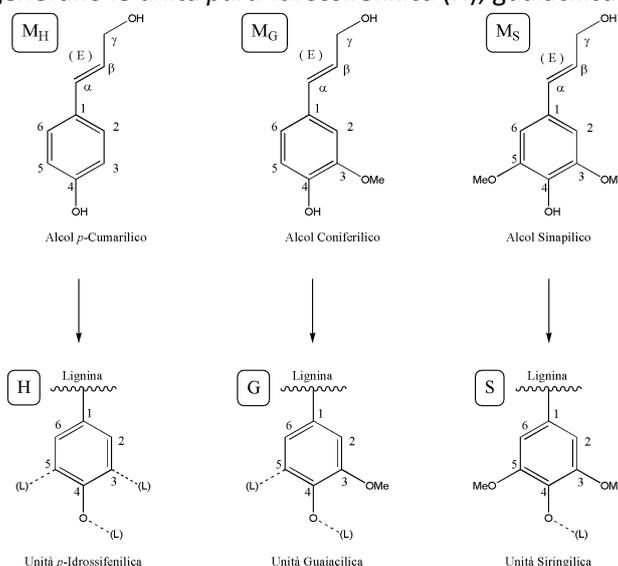


Figura 2: Monolignoli ed unità H, G e S nella lignina

Per convenzione, nella nomenclatura dei monolignoli la numerazione degli atomi di carbonio non segue le regole IUPAC, ma nell'anello fenolico si assegna la posizione 1 all'atomo di carbonio a cui è legata la catena propenolica (**Figura 2**).

La composizione della lignina varia da pianta a pianta. Generalmente le gimnosperme (*softwood*) sono composte principalmente da unità G, mentre le angiosperme (*hardwood*) presentano sia unità G che S. Le piante erbacee possono contenere tutte e tre le unità G, S e H.

La biosintesi della lignina è divisa in due fasi: la sintesi dei monolignoli e la loro successiva polimerizzazione (**Figura 3**).

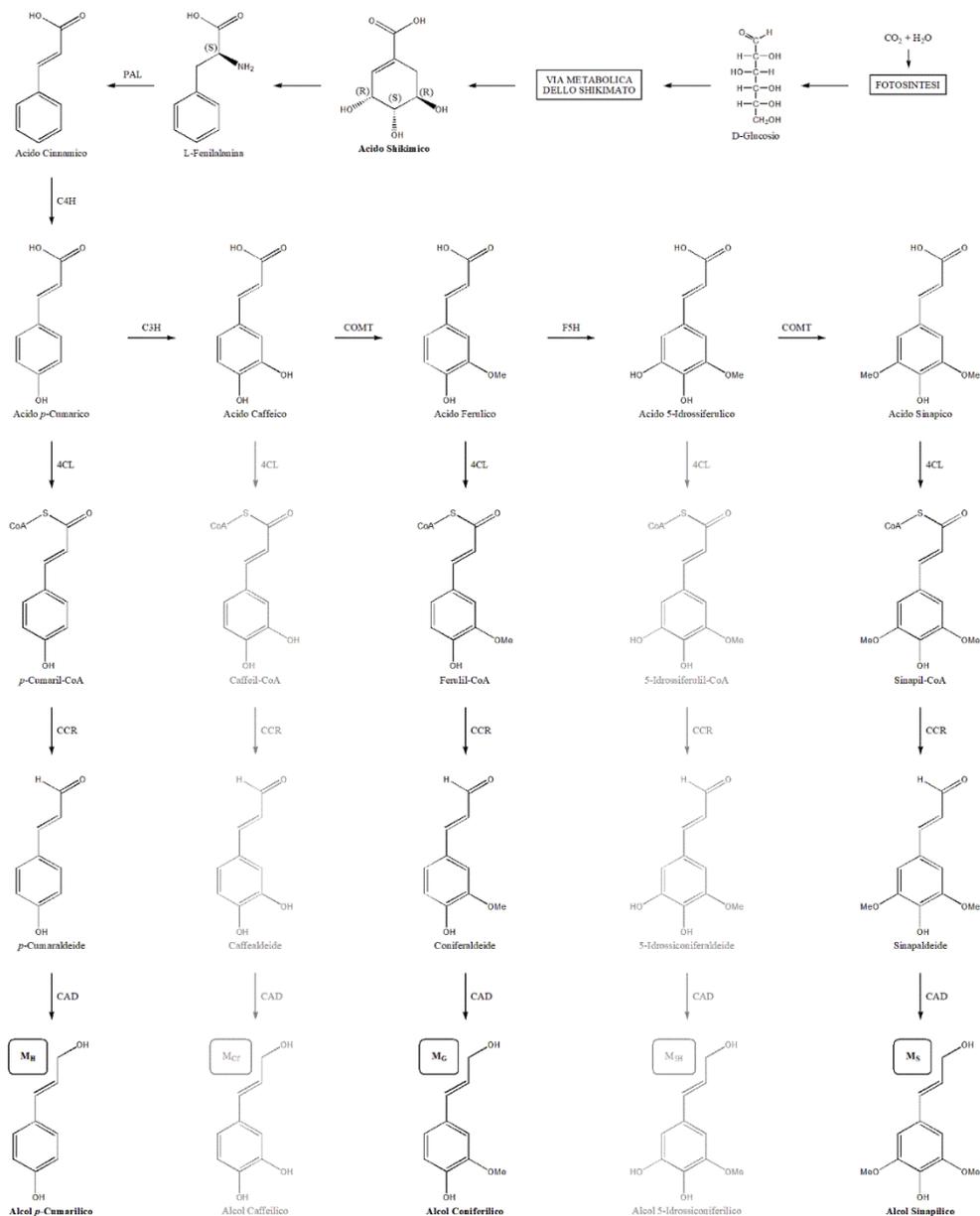


Figura 3: Percorso biosintetico dei monolignoli

Tutte le reazioni per la sintesi dei precursori sono catalizzate da specifici enzimi. Dopo la sintesi, i monolignoli, resi solubili in acqua per glicosilazione, vengono trasportati sulle pareti cellulari dove vengono ossidati ai corrispondenti radicali fenossido per opera di perossidasi e/o laccasi. In seguito a questa attivazione enzimatica avviene il processo di lignificazione tramite reazioni radicaliche di accoppiamento.

I radicali monomerici favoriscono la formazione di nuovi legami nelle posizioni O-4, C¹, C³, C⁵ e C^β a causa della selettività dell'attivazione enzimatica (Figura 4). Le unità che reagiscono con il radicale in posizione C^β (struttura *para*-metiliden chinonica), hanno come *driving force* la riaromatizzazione dell'anello fenolico per attacco nucleofilo, esterno o intramolecolare, in posizione α. Il nucleofilo può essere una molecola d'acqua, un acido, un fenolo o un alcol. Per le unità che reagiscono con il radicale in posizione C¹, C³ e C⁵ l'aromaticità viene invece ristabilita per rottura del legame presente in quella posizione e contemporanea formazione dell'anione fenolato.

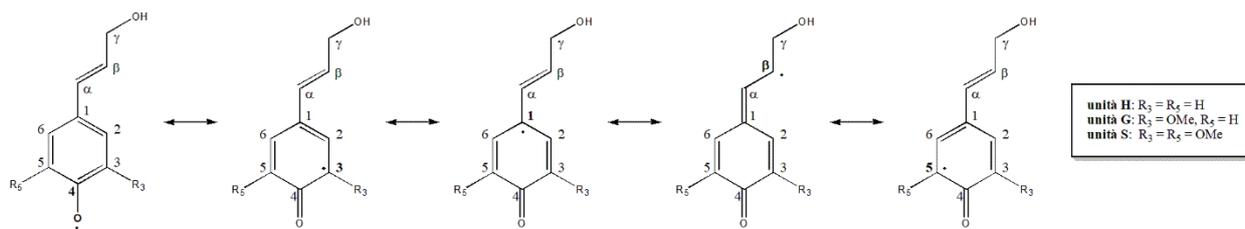


Figura 4: Forme di risonanza del radicale fenossido per teoria VB

La reazione radicalica si propaga con meccanismo *endwise*, e porta alla formazione di oligolignoli con legami C-C o C-O-C in varie configurazioni (Tabella 1, Figura 5). Inoltre, in questo processo la lignina può inglobare una grande varietà di molecole contenute nelle cellule vegetali andando a formare legami eterici, esterei o legami a idrogeno. Possono quindi formarsi complessi lignina-polisaccaridi (LPC) e complessi lignina-carboidrati (LCC).

Tabella 1: Modalità di accoppiamento dei radicali fenossido (* più strutture possibili)

	O-4	C ¹	C ³	C ⁵	C ⁶
O-4	(4-O-O-4')	1-O-4'*	3-O-4'	5-O-4'	β-O-4'
C ¹	1-O-4'*	1-1'*	1-3'*	1-5'*	β-1'*
C ³	3-O-4'	1-3'*	3-3'	3-5'	β-3'
C ⁵	5-O-4'	1-5'*	3-5'	5-5'	β-5'
C ⁶	β-O-4'	β-1'*	β-3'	β-5'	β-β'

Nelle fasi iniziali di propagazione, l'elevata percentuale di monolignoli favorisce la formazione di dilignoli con legami β-O-4', β-5', β-1' e β-β'. Con il procedere della reazione aumenta la quantità di oligolignoli e cominciano a formarsi legami 4-O-5', 5-5' e 5-5'-α-β-O-4' che terminano la propagazione. Le congiunzioni più comuni sono le β-O-4', 5-5', β-5' e 4-O-5'. Dato che la propagazione non è controllata enzimaticamente, si ha la formazione di tutti i possibili enantiomeri.

La lignina è quindi un oligopolimero con un ridotto numero di ramificazioni, con uno scheletro idrofobico che presenta funzionalità idrofiliche. Inoltre, i vari oligolignoli tendono ad aggregarsi in strutture macromolecolari per formazione di legami π-π a carico degli anelli aromatici.

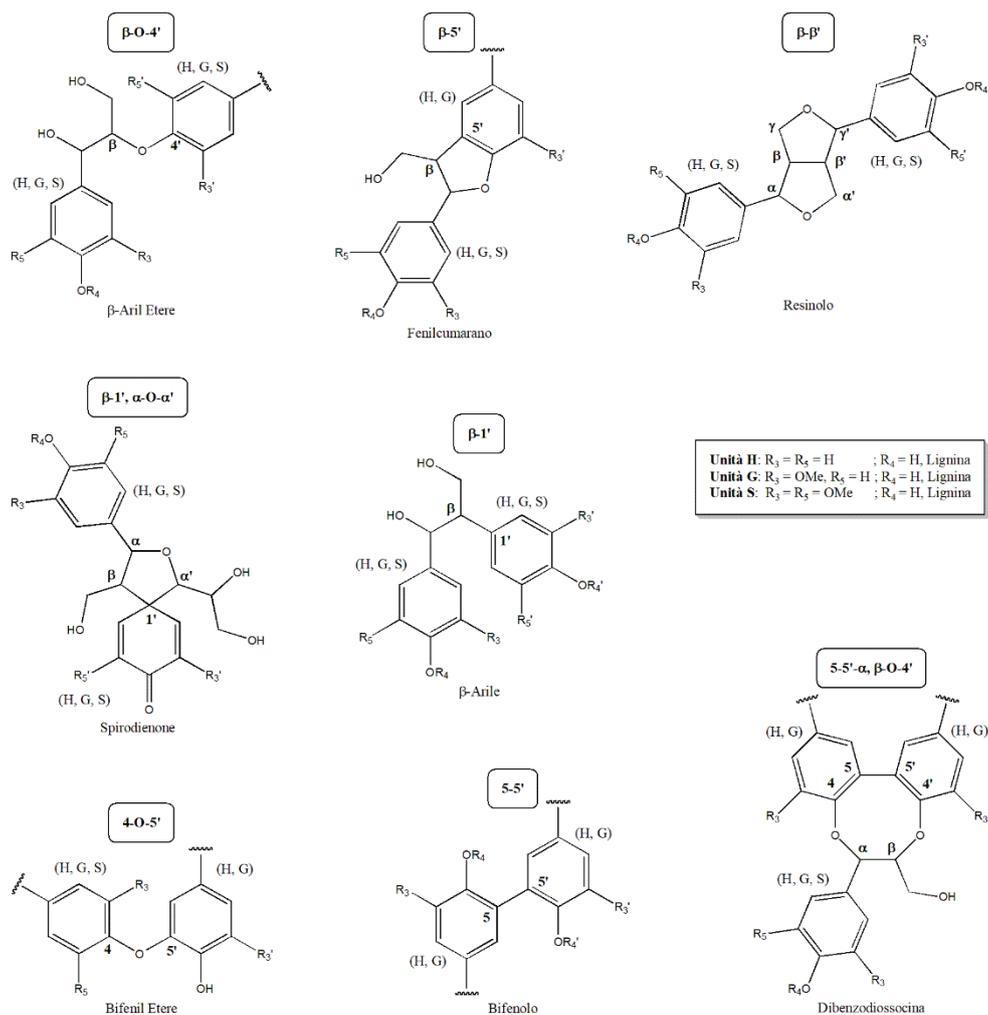


Figura 5: Principali unità secondarie di lignina

1.2.2. Lignine Tecniche

Storicamente i processi di estrazione di lignina dal legno, contrariamente a quanto avvenuto per i processi di estrazione della cellulosa, non hanno avuto sviluppi a livello industriale. Di conseguenza è a partire dal XIX secolo che la lignina è disponibile quasi unicamente come sottoprodotto della lavorazione della pasta di legno in impianti di produzione della carta.^{14,15}

Precedentemente in Europa la carta veniva preparata a partire da stracci di canapa e lino, ma gli studi del tedesco Jacob Christian Shaefer e dell'inglese Matthias Koops individuarono nella polpa di legno di conifere l'approvvigionamento ideale per l'estrazione di cellulosa.¹⁶

La produzione della carta su larga scala cominciò negli anni '40 dell'Ottocento, con processi di delignificazione meccanici realizzati da Friedrich Gottlob Keller in Germania e da Charles Fenety in Canada.¹⁷

La sempre maggior richiesta di carta portò negli anni '70 allo sviluppo di processi chimici di estrazione, inizialmente con trattamenti a base di soda, e successivamente con trattamenti a base di acido solforoso.^{15,16}

Quest'ultimo processo, migliorato dallo statunitense Benjamin Tilghman con l'implementazione di bisolfito di calcio, e ottimizzato dallo svedese Carl Daniel Ekman, diventò nel 1900 il principale metodo di delignificazione a livello industriale.^{14-16,18}

Il processo di spapolamento chimico concorrente, quello al solfato, o processo Kraft (*forza* in tedesco), fu sviluppato da Carl F. Dahl nel 1879.¹⁵

Questo, a partire dagli anni '40 del Novecento, è diventato dominante per l'estrazione di cellulosa destinata alla produzione di carta in quanto ha la capacità di accettare come alimentazione un'ampia varietà di tipi di legno e di produrre fibre più resistenti.¹⁹⁻²¹

Negli anni '30 del Novecento i tedeschi Theodor Kleinert e Tayenthal cominciarono a sviluppare un metodo di delignificazione più sostenibile, basato sull'estrazione con solventi (e.g. etanolo) in assenza di sali inorganici.²² Questi studi culminarono col brevetto del processo Organosolv nel 1968.²³ Nel linguaggio comune il termine Organosolv viene utilizzato per indicare tutti i processi di trattamento di biomasse con solventi organici.¹⁵

A partire dagli anni '90 del Novecento sono stati studiati sistemi di delignificazione a base di funghi dotati di enzimi lignolitici (e.g. lignina perossidasi e laccasi), considerati vantaggiosi per il loro basso impatto ambientale e l'elevata modulabilità. Tuttavia, attualmente il loro utilizzo è ancora limitato al solo interesse accademico.^{15,24,25}

È importante notare che tutti questi processi di delignificazione generano come sottoprodotti delle lignine tecniche, che a causa delle severe condizioni di reazione, presentano una struttura chimica che può differire di molto da quella della lignina presente nell'alimentazione lignocellulosica.^{7,10,15}

Le lignine tecniche presentano quindi una variazione dei gruppi funzionali e un certo grado di depolimerizzazione o degradazione in base al processo di estrazione utilizzato. Lignine tecniche ottenute con diversi processi avranno caratteristiche chimico fisiche differenti (**Figura 6**, **Figura 7**, **Figura 8**). Ad esempio, il processo al solfito produce lignosolfonati, che hanno un'elevata concentrazione di gruppi solfonici e sono solubili in acqua, mentre il processo al solfato produce lignine kraft, che hanno un minore contenuto di gruppi solfonici e risultano quindi solubili in acqua solo in condizioni alcaline. Completamente differenti risultano le lignine organosolv, che non contengono zolfo nella struttura e sono meno solubili in acqua rispetto alle lignine kraft e più simili dal punto di vista strutturale alle lignine native.

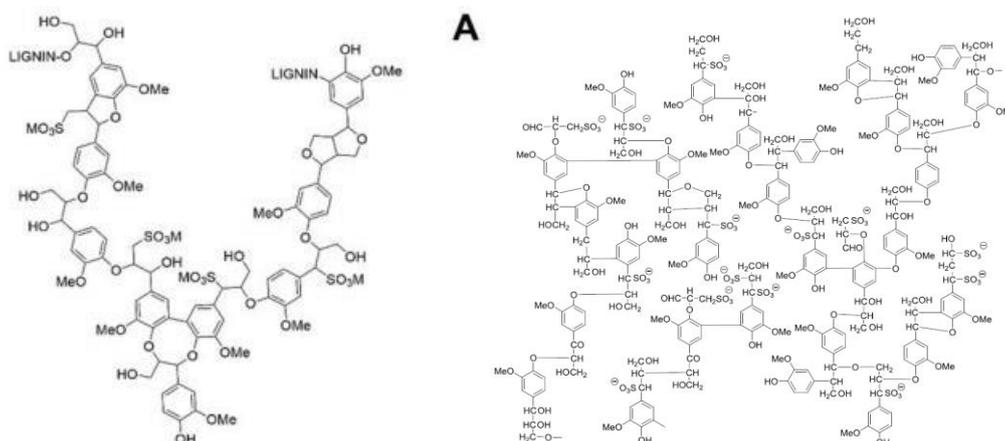
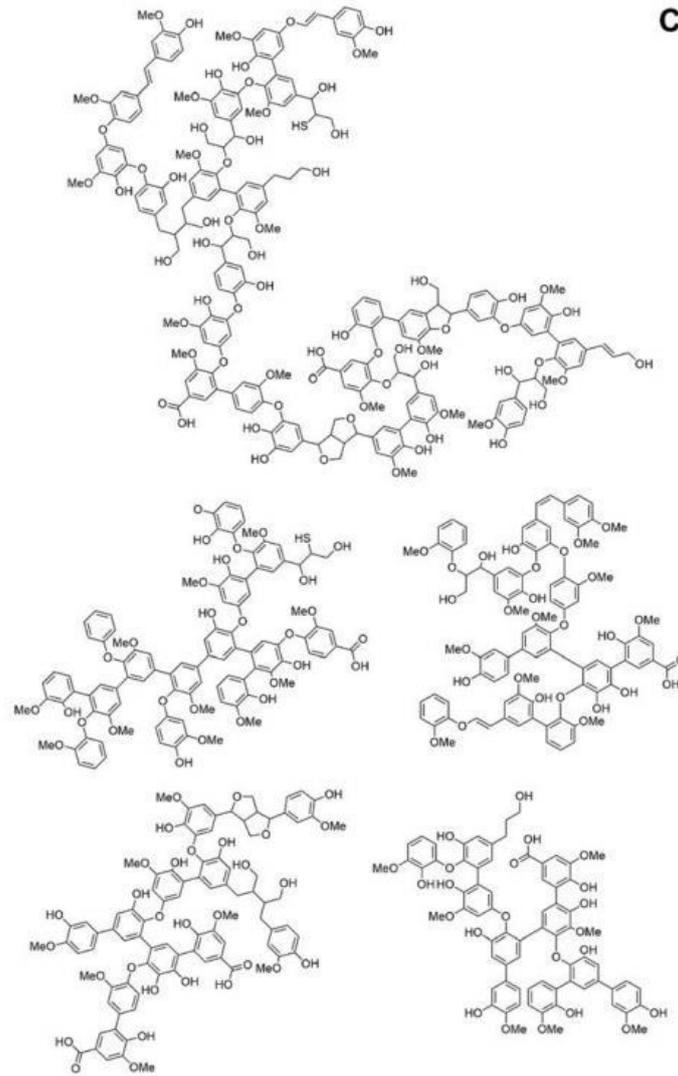
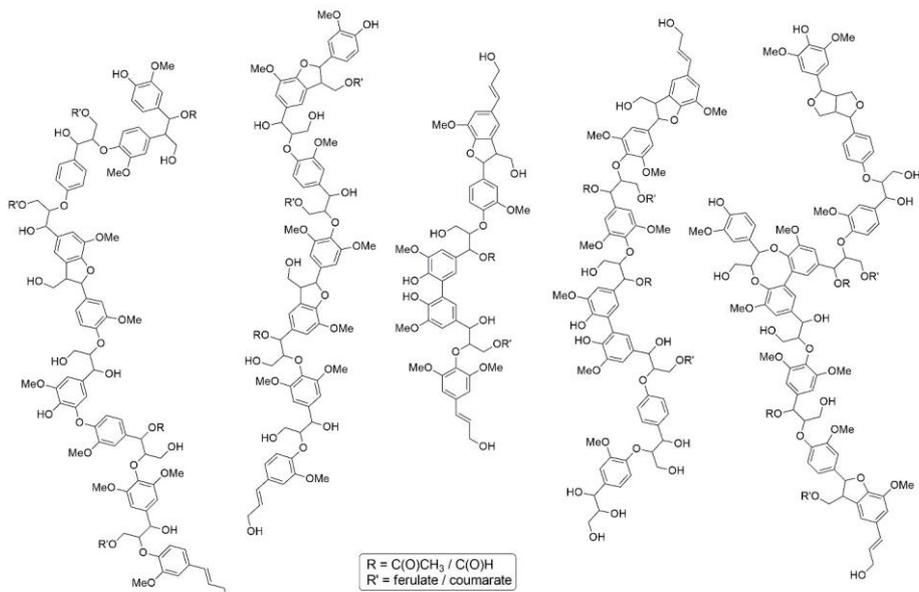


Figura 6: Struttura ipotizzata di lignosolfonato^{7,10}



C

Figura 7: Struttura ipotizzata lignina kraft⁷



B

Figura 8: Struttura ipotizzata lignina organosolv⁷

1.3. Lignosolfonato

Il lignosolfonato (anche ligninsolfonato) è la lignina tecnica derivata dal processo di delignificazione con solfito.

Il processo al solfito è facilmente modulabile e permette la produzione di molti tipi di pasta adatti ad un vasto spettro di applicazioni. La polpa cellulosica ottenuta può essere utilizzata per produrre carta pregiata, carta patinata, carta tessuto e carta glassine. In alternativa può essere trattata con processi di sbiancamento e fungere da materia prima per la produzione di rayon, cellophane, acetato di cellulosa e metil cellulosa.

Il liscivio di cottura del legno è costituito da una soluzione acquosa di anidride solforosa al 4-7%, a cui viene aggiunta una base per modularne il pH. Questo processo opera sotto pressione ad una temperatura che varia tra i 125 e i 180 °C, per tempi di cottura variabili tra 1 e 7 ore.

Per quanto riguarda la scelta della base, occorre tenere presente che l'idrossido di calcio è caratterizzato da basso costo ma dà solfiti meno solubili delle altre basi. L'idrossido di magnesio e l'idrossido di ammonio danno appunto solfiti più solubili, e inoltre penetrano meglio nel tessuto legnoso e danno meno problemi di incrostazioni nel processo di recupero del liscivio. Il processo più diffuso è quello che opera con bisolfito di sodio, in cui il pH si fa variare iniettando nel liscivio nei vari stadi del processo: pH = 4 in fase di impregnazione, pH = 2 in cottura e pH = 8-10 a fine cottura.

Il liscivio residuo di cottura viene solitamente chiamato liscivio marrone (per distinguerlo dal liscivio nero del processo kraft), ma viene talvolta indicato anche come liscivio rosso, liscivio denso o liscivio del solfito. Da questo liquido si recuperano i sali inorganici, il lignosolfonato e l'emicellulosa.

Storicamente il liscivio marrone veniva riversato nei fiumi, fino a quando a partire dagli anni '30 del Novecento cominciò a svilupparsi un interesse economico nel recuperare i sali inorganici da questo liquido.

Primo fra tutti, Howard propose di eseguire una precipitazione frazionata con calce viva, per ottenere il solfito di calcio, recuperato per eseguire il trattamento della polpa, la lignina tecnica, da utilizzare come materia combustibile, e l'acqua con zuccheri e calce spenta, da riversare nei fiumi.²⁶

Come dimostrato però da Kobe questa procedura non permette di riottenere il sale solfito in quanto questo si lega alla struttura della lignina, dando origine al lignosolfonato.²⁷

I tentativi di valorizzare il liscivio marrone si intensificarono a partire dal decennio successivo, per rispondere agli emergenti protocolli ambientali che impedivano di sversare in modo incondizionato gli scarti industriali.

In particolare, nello stato del Wisconsin (Wisconsin state laboratory of hygiene), gli studi di Howard vennero rivalutati e indicati come efficaci nel ridurre dell'85% il contenuto di inquinanti presenti nelle acque di scarto. Dalle analisi dei processi dell'epoca, risulta che le acque di scarto contenevano un 3,5-5% di lignina e un 2-3,5% di carboidrati, che riversati nei fiumi in complessi idrosolubili, venivano facilmente assimilati nei cicli biologici della fauna fluviale, causando processi di ossidazione che sottraevano ossigeno all'acqua. All'epoca già si era provato a recuperare questi residui organici, ma non vennero sviluppate metodiche di estrazione a livello industriale in quanto non sarebbero state competitive con le fonti di componenti organici più economiche.²⁸

Negli anni sono stati sviluppati processi per migliorare l'estrazione dei lignosolfonati dal liscivio marrone. Inizialmente vennero utilizzate metodiche di filtrazione su membrana, che diedero buoni risultati in quanto il lignosolfonato ha un peso molecolare solitamente superiore a quello delle altre specie presenti nel liscivio. Curiosamente, per questo processo risultano efficaci le membrane di acetato di cellulosa prodotte con la polpa cellulosica precedentemente estratta.²⁰ L'ultrafiltrazione è al momento la metodica di estrazione più efficace, ma ha due lati negativi: in primo luogo l'elevato costo e la veloce degradazione delle membrane, e in alcuni casi l'impossibilità di separare lignosolfonati ed emicellulosa se con pesi molecolari simili.

Come alternativa è stato riproposto il processo Howard, non più per recuperare il solfito, ma per recuperare la lignina. Viene quindi effettuata un'aggiunta di idrossido di calcio fino al raggiungimento di un pH>13, con conseguente precipitazione del lignosolfonato di calcio con una percentuale del 95%.²⁰

Altri metodi di estrazione del lignosolfonato sono: la precipitazione con ammine, l'elettrolisi, l'estrazione con resine a scambio ionico, il processo Pekilo (ultrafiltrazione in seguito a fermentazione) e l'osmosi inversa.

Tra questi metodi viene spesso utilizzata una combinazione di resine per acidificare ed estrarre l'acido lignosolfonico, che essendo solubile in solventi organici è più facile da caratterizzare rispetto al lignosolfonato.²⁹

Odiernamente i lignosolfonati occupano meno del 10% del mercato del commercio della lignina, e hanno una produzione annuale che raggiunge le 7 milioni di tonnellate. Molti dei impianti al solfito sono stati dismessi nell'ultimo ventennio, principalmente per problemi legati alle stringenti norme di limitazione delle emissioni di zolfo nell'atmosfera.²⁰ Esiste però una controtendenza in Sud Africa e in Brasile, dove si stanno diffondendo impianti al solfito per il trattamento della pasta di *eucalyptus globulus*.^{30,31}

Il lignosolfonato ha moltissime applicazioni, ma a basso valore aggiunto. Viene infatti utilizzato come additivo deflocculante, fluidificante, omogeneizzante o surfattante in molteplici campi, che spaziano dall'edilizia alla zootecnica. L'utilizzo principale è quello di detergente industriale, e il consumo è così elevato che si stanno sperimentando metodiche per ottenere il lignosolfonato per solfonazione delle altre lignine tecniche (i.e lignina kraft).²⁰

Una delle poche applicazioni a valore aggiunto del lignosolfonato è l'utilizzo come materia di partenza per la sintesi di vanillina, in un processo correntemente adottato solo dall'azienda Borregaard, ma che in passato aveva un ampio impiego negli Stati Uniti d'America.³²

Esistono due principali problemi che impediscono l'utilizzo del lignosolfonato come materia prima per applicazioni ad elevato valore aggiunto:

- La scarsa conoscenza della struttura chimica del lignosolfonato, a causa delle difficoltà di caratterizzazione
- L'elevata variabilità delle proprietà chimico-fisiche del lignosolfonato,

Per risolvere entrambi i problemi può essere utile un processo di omogeneizzazione del materiale di partenza come quello ottenibile attraverso frazionamento.

La struttura del lignosolfonato può essere ipotizzata andando a considerare le possibili reazioni fra gli oligolignoli e il solfito.

Tipicamente il trattamento della polpa con solfito avviene in ambiente acido (pH 1-5), ma esistono processi semichimici in ambiente neutro (pH 2-7, e.g. NSSC: neutral sulfite semichemical pulping).

Nel processo di trattamento della polpa con solfito le due principali reazioni che portano alla solubilizzazione della lignina sono la solfonazione e l'idrolisi.

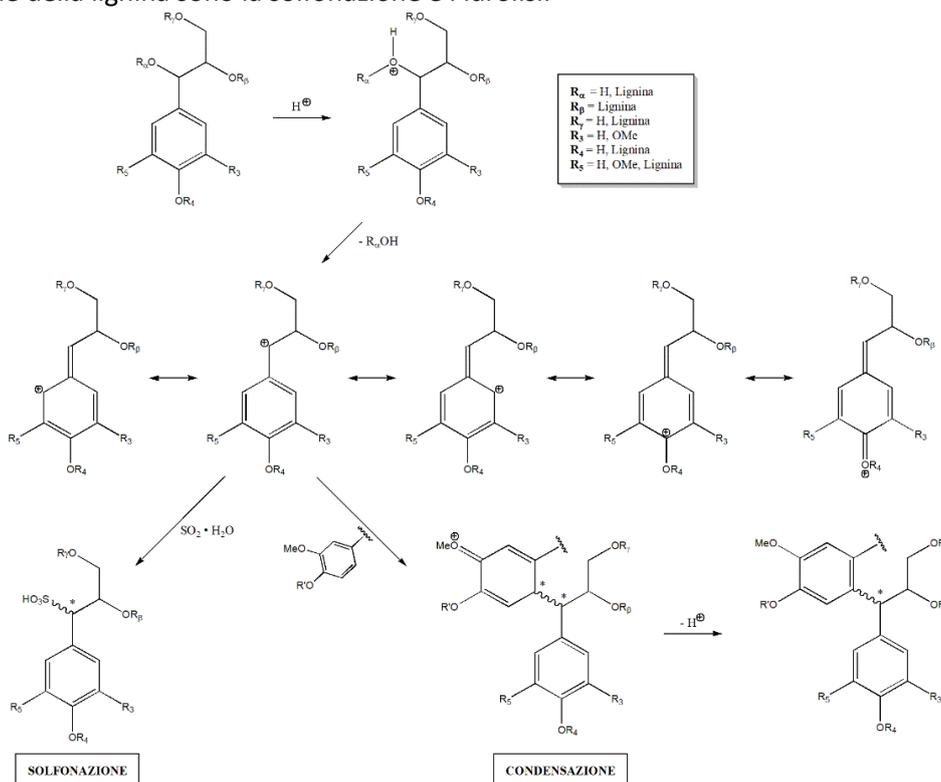


Figura 9: Reazioni di solfonazione e condensazione in condizioni acide

Nel processo a pH acido, la perdita del gruppo idrossilico, o la rottura del legame etereo, in posizione α al benzene fenolico o non-fenolico avviene con formazione di un carbocatione benzilico secondario stabilizzato dalla forma *para*-metiliden chinonica. L'anione solfito, o bisolfito, presente in soluzione si addiziona al carbocatione benzilico secondario per formare il corrispettivo acido α -benzilsolfonico (**Figura 9**).

Si può ipotizzare che l'anione solfito possa addizionarsi ad uno degli atomi di carbonio C^1 , C^3 o C^5 dell'anello fenolico. Questa reazione è sicuramente sfavorita data la rottura dell'aromaticità. Se si ipotizza che la reazione continui con l'eliminazione di uno dei legami esistenti e il ripristino dell'aromaticità con formazione dello ione fenolato, allora si otterrebbe l'acido benzensolfonico. È importante però notare che nelle condizioni di reazione è favorita la reazione di desolforazione. Si può quindi affermare che nella struttura del lignosolfonato non saranno presenti gruppi solfonici legati all'anello aromatico.

Con un analogo meccanismo di attivazione, può invece avvenire una reazione di addizione elettrofila del carbocatione benzilico all'anello aromatico, che ha come prodotto di condensazione una unità α -6'. Questa reazione è possibile grazie all'effetto attivante dei gruppi idrossilici o eteri. È importante notare che l'effetto *orto*-*para*-orientante di questi gruppi può permettere l'attacco elettrofilo in più posizioni, ma verosimilmente è favorita la posizione C^6 perché è quella con il minor ingombro sterico.

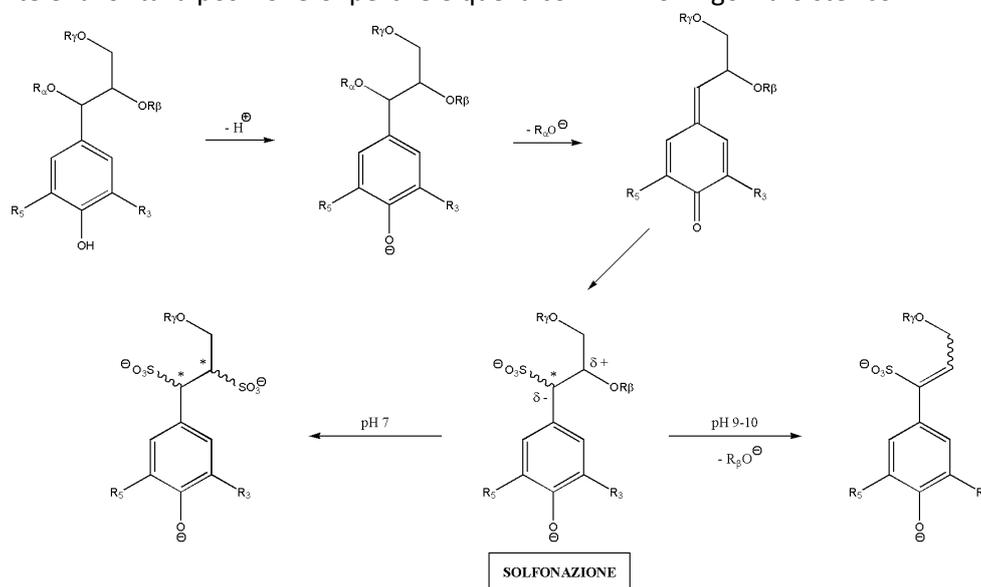


Figura 10: Reazioni di solfonazione in condizioni neutre e alcaline

Nel processo a pH neutro la solfonazione in α può avvenire solo in presenza di un gruppo fenolico, che permetta la formazione di un anione fenolato nella struttura *para*-metiliden chinonica (**Figura 10**). In queste condizioni il gruppo solfonico presente in α favorisce l'attacco di un secondo anione solfito in posizione β per effetto di attrazione elettronica che rende il carbonio etereo parzialmente carico positivamente. In seguito all'attacco del solfito in β si ha la rottura del legame etereo, con conseguente depolimerizzazione del lignosolfonato. Se invece si opera in condizioni alcaline si ha la rottura del legame etereo in β con formazione di una unità α -solfonata- α,β -insatura.

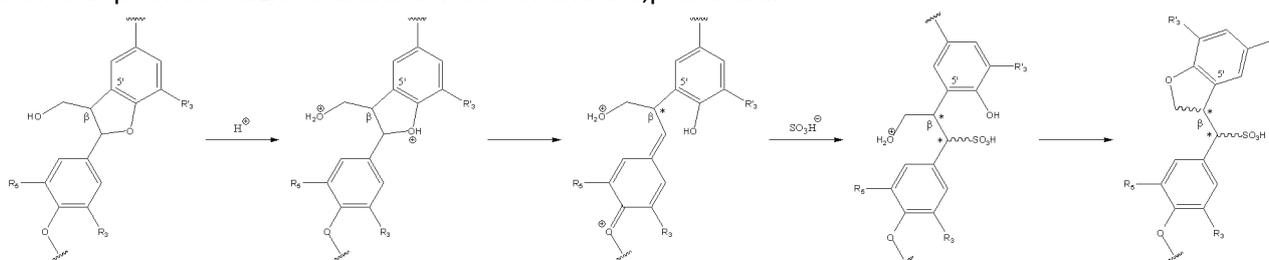


Figura 11: Reazione di solfonazione dell'unità β -5' in condizioni acide

Chiaramente si possono ipotizzare dei meccanismi di reazione per ogni singolo bilignolo. Viene riportato un esempio di solfonazione dell'unità β -5' in ambiente acido per evidenziare come il processo di delignificazione possa alterare sensibilmente la struttura della lignina (**Figura 11**).

1.4. Frazionamento

Nell'ottica della transizione industriale verso un'economia circolare, non è più sostenibile considerare le lignine tecniche, che peraltro sono già separate dalla matrice lignocellulosica originale, come mero scarto. Il principale ostacolo che attualmente ne impedisce l'utilizzo come alimentazione in impianti di produzione di *commodities* o prodotti di chimica fine è dato dalla grande variabilità ed eterogeneità della loro struttura.^{7,33}

Ricordiamo che il rapporto fra le unità base della lignina (S/G/H) varia in funzione della specie vegetale e all'interno di una stessa pianta la distribuzione di queste unità non è omogenea nei vari organi ed è influenzata dalle condizioni ambientali.³⁴ Inoltre, queste unità, tramite reazioni radicaliche, possono originare molteplici tipologie di legami distribuiti in modo imprevedibile lungo le catene biopolimeriche.⁸ Si consideri poi che il processo di estrazione delle lignine tecniche va ad incrementare ulteriormente questa complessità, anche in questo caso in modo non prevedibile, sia andando ad introdurre nuovi gruppi funzionali, sia causando riarrangiamenti e reazioni di depolimerizzazione.¹⁵

Ed ecco che il grado di complessità diventa talmente elevato che ancora oggi per alcune lignine tecniche (i.e. lignosolfonato) non esiste un modello della struttura chimica univocamente condiviso dalla comunità scientifica.^{7,10,21,31}

Proprio in seguito all'interesse legato alla valorizzazione delle biomasse, nel campo dello studio della lignina lo sviluppo di protocolli efficienti e riproducibili per l'isolamento di tagli omogenei ha acquisito negli ultimi anni un'importanza imprevedibile.⁷

Tra le diverse strategie elaborate, quella che ha riscosso più successo in ambito accademico è senza dubbio il frazionamento, che ha avuto la sua prima espressione negli studi di Argyropoulos (2014).^{7,33}

Nel corso di questi ultimi anni sono stati studiati diversi metodi di frazionamento su una grande gamma di lignine tecniche, che si possono dividere concettualmente in tre categorie:

- Frazionamento con solvente: Separa le frazioni in funzione della solubilità; è la metodica più utilizzata e ha avuto varie declinazioni. Si può avere una singola estrazione con un solvente, o con una miscela di solventi oppure si possono operare estrazioni successive con una sequenza di solventi o miscele di essi (**Figura 13**). In alternativa si può effettuare una precipitazione frazionata per aggiunta di un cattivo solvente o per variazione di pH (**Figura 12**).
- Frazionamento con membrane: Separa le frazioni in funzione del raggio idrodinamico. Vengono effettuate ultra- o nano- filtrazioni con membrane ceramiche o polimeriche (**Figura 14**).
- Frazionamento accoppiato: è una metodica ibrida che unisce il frazionamento con solvente ed il frazionamento con membrana.

A causa dell'elevato costo delle membrane e della loro perdita di efficienza, per l'*up-scaling* e le applicazioni industriali risulta di maggiore interesse il frazionamento con solvente.

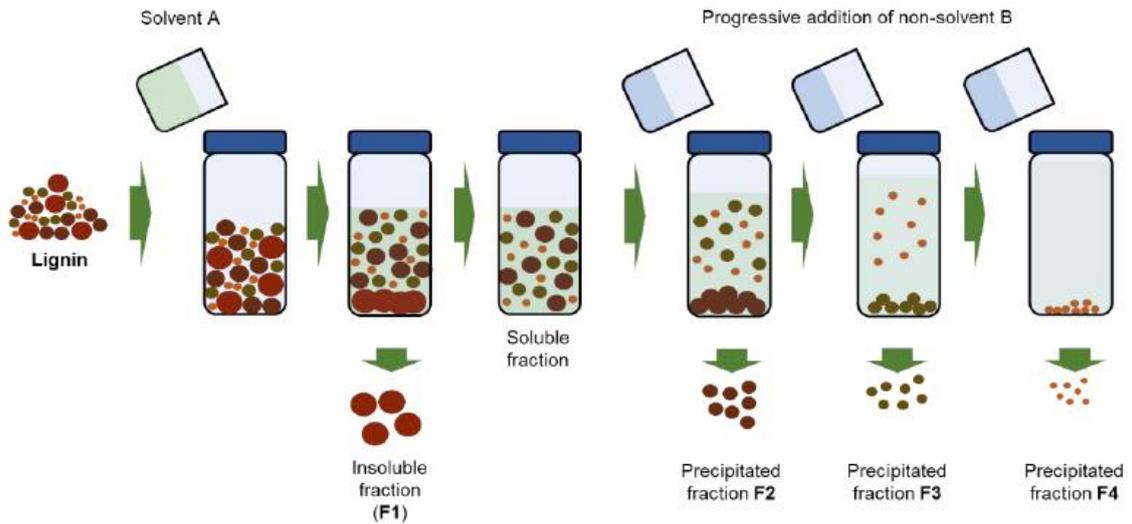


Figura 12: Schema rappresentativo del frazionamento per precipitazione⁷

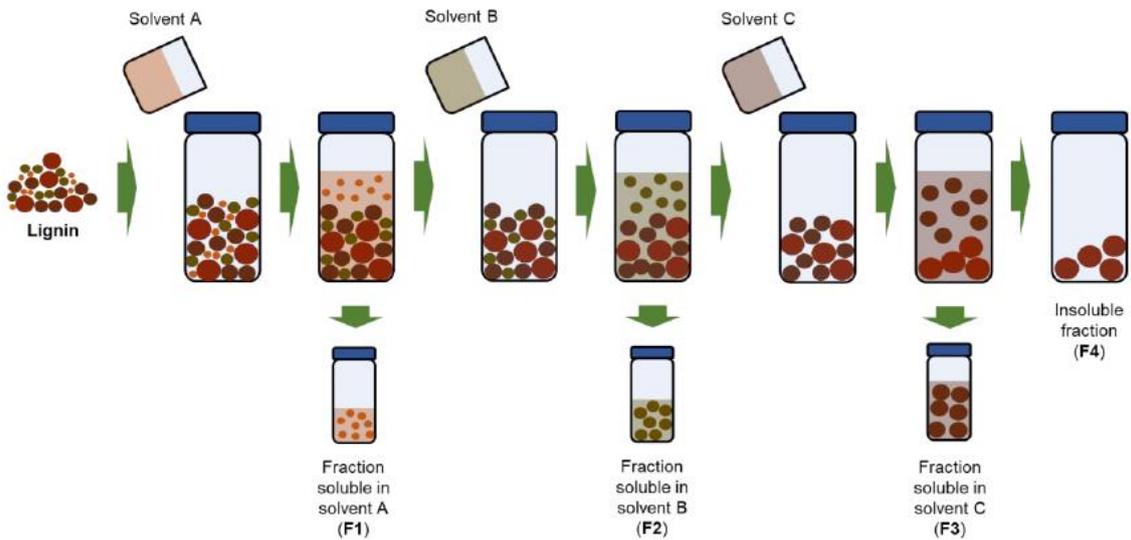


Figura 13: Schema rappresentativo del frazionamento per estrazione con solvente⁷

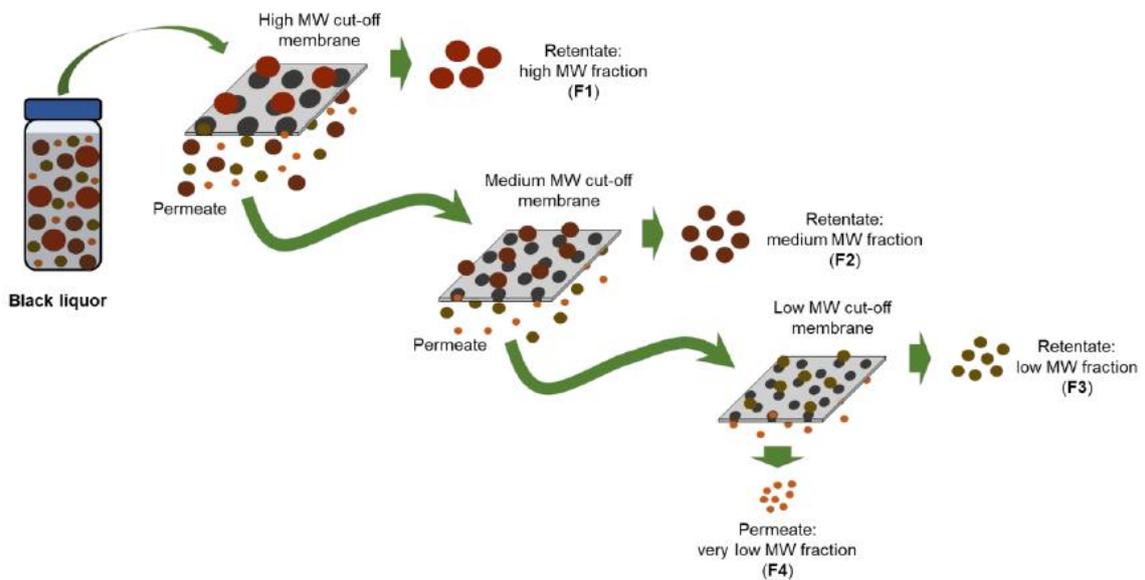


Figura 14: Schema rappresentativo del frazionamento per filtrazione⁷

Le frazioni che si ottengono con questi processi possono differire per: peso molecolare medio, polidispersità, grado di polimerizzazione, grado di cross-linking, contenuto di gruppi idrossilici aromatici e alifatici, contenuto di gruppi funzionali, polarità, acidità e contenuto di legami ionici. Ovviamente tutte queste caratteristiche sono fra loro interdipendenti e nascono dalla particolare composizione della lignina tecnica frazionata. Per riuscire a razionalizzare i processi di frazionamento è di fondamentale importanza che questi siano affiancati da una caratterizzazione esaustiva che possa confluire nella determinazione delle strutture chimiche presenti in ciascuna frazione.

Attualmente, l'unica metodica che permette di ottenere le frazioni con le medesime caratteristiche chimico-fisiche a partire da diverse lignine tecniche (di tipo organosolv) è proprio quella proposta da Argyropoulos.^{7,33}

Gli altri frazionamenti ottengono frazioni con caratteristiche chimico-fisiche strettamente dipendenti dall'alimentazione.

Fra le lignine tecniche disponibili commercialmente, le lignine kraft e le lignine organosolv risultano essere le più utilizzate nei frazionamenti.⁷

Le metodiche più utilizzate risultano essere la *fractional precipitation* (precipitazione frazionata) e la *sequential solvent extraction* (estrazione sequenziale con solventi).

Per quanto concerne il frazionamento di lignosolfonati, si trovano pochi studi, probabilmente a causa della significativa riduzione negli ultimi decenni della produzione di cellulosa con processi al solfito. Inoltre, la presenza di gruppi solfonici nella struttura dei lignosolfonati, li rende molto solubili in acqua e poco solubili in solventi organici, e per questo motivo le metodiche di filtrazione con membrana sono risultate più facilmente applicabili rispetto a quelle basate su solvente.

Come abbiamo già detto, la lignina viene solitamente utilizzata come combustibile o come additivo inerte. Ma proprio grazie alle pubblicazioni sul frazionamento di lignina, è nato un filone di ricerca spinto da un rinnovato interesse nell'individuare possibili applicazioni delle frazioni.

Frazioni a ridotto peso molecolare trovano applicazioni come additivi per polimeri e resine. Posso fungere da agenti reticolanti o plastificanti se hanno un elevato contenuto di gruppi idrossilici e siti reattivi.^{35,36}

Frazioni con un elevato contenuto di gruppi idrossilici aromatici possono espletare azioni antiossidanti e UV-schermanti.³⁷ Frazioni selezionate possono migliorare la stabilità termica e le proprietà meccaniche di pneumatici.³⁸

Frazioni con ridotto contenuto di gruppi idrofilici ed elevato rapporto fra le unità S/G tendono a formare legami intermolecolari e sono utili nella sintesi di nanoparticelle sfruttando le caratteristiche autoaggreganti delle molecole di lignina.^{39,40}

Frazioni ad elevato peso molecolare contraddistinte da una purezza elevata possono essere utilizzate per la sintesi di fibre di carbonio.^{41,42}

Frazioni con un elevato contenuto di gruppi carbossilici e solfonici vengono usate come agenti disperdenti, se a basso peso molecolare, o per purificazione di acque reflue, se ad elevato peso molecolare.⁴³⁻⁴⁵

Inoltre, le frazioni possono essere derivatizzate per migliorarne proprietà emulsionanti, se a bassi pesi molecolari, o flocculanti, se ad elevato peso molecolare.^{43,44}

2. Scopo del Lavoro

La lignina, insieme a cellulosa ed emicellulosa, è uno dei principali componenti del legno e, come tale, risulta essere il più abbondante biopolimero aromatico disponibile sulla superficie terrestre.⁴⁶ Rappresenta quindi una risorsa rinnovabile di grande valore e una fonte potenziale di materiali per una vasta gamma di applicazioni e di composti aromatici di interesse per l'industria chimica. Come detto, le lignine tecniche sono ottenute in grandi quantità come sottoprodotto di industrie della polpa del legno e bioraffinerie volte all'estrazione di cellulosa ed emicellulosa dal materiale lignocellulosico di partenza.⁴⁶ Tra i vari processi impiegati a tale scopo uno dei più importanti è il processo al solfito che porta alla formazione di lignina con un certo grado di gruppi solfonici (contenuto di zolfo pari a circa il 5%).²⁰ La lignina estratta viene poi precipitata sottoforma di sale, generalmente di calcio, dando origine ai lignosolfonati.

I lignosolfonati così ottenuti sono comunemente utilizzati come additivi deflocculanti, fluidificanti, omogeneizzanti o surfattanti in molteplici applicazioni a basso valore aggiunto, che spaziano dall'edilizia alla zootecnica.^{20,30} L'elevata eterogeneità strutturale ne limita infatti l'impiego in prodotti ad alto valore aggiunto, per i quali risultano di fondamentale importanza proprietà chimico-fisiche ben definite, riproducibili ed omogenee.

Più in generale, tale problematica si riscontra in tutte le lignine tecniche, cioè ottenute attraverso processi industriali di estrazione dalla biomassa lignocellulosica. Negli ultimi anni si è dunque sviluppato un intenso filone di ricerca che, prendendo spunto dalle raffinerie petrolchimiche, si propone di trovare dei metodi di frazionamento di lignine tecniche per ricavare composti con caratteristiche più omogenee.⁴⁶

Si possono identificare due principali metodi di frazionamento: uno basato sull'uso di membrane per ultra- e nano-filtrazione^{29,47}, ed uno basato sull'impiego di solventi^{33,48}. La prima metodologia risulta facilmente adottabile per i lignosolfonati, data l'elevata solubilità in acqua. Questo metodo suscita però un ridotto interesse sia per l'elevato costo delle membrane, sia perché il frazionamento è basato sostanzialmente sul principio di esclusione dimensionale.

D'altro canto, protocolli di frazionamento basati su estrazione con solventi sono in grado di separare le diverse frazioni anche sulla base delle loro caratteristiche strutturali, e.g. tipo di gruppi funzionali e loro concentrazione, poiché diventano importanti le interazioni soluto-solvente e soluto-soluto. Tali metodiche, già applicate a lignine Kraft e organosolv, risultano molto meno studiate per i lignosolfonati, proprio a causa della loro scarsa (o nulla) solubilità in solventi organici.⁴⁶

In questo contesto si inserisce il presente lavoro di tesi che si prefigge di individuare delle metodiche di frazionamento con solvente applicabili ai lignosolfonati e di caratterizzare approfonditamente le frazioni ottenute, anche allo scopo di contribuire alla comprensione della struttura chimica di questi materiali, non ancora univocamente definita.^{10,21,31}

Sono state dunque individuate e studiate due strategie di frazionamento: *sequential solvent extraction* (SSE), che sfrutta la solubilità parziale degli acidi lignosolfonici in una varietà di solventi organici, e *sequential solvent precipitation* (SSP) che, al contrario, vede la precipitazione di diverse frazioni per aggiunta progressiva di un non-solvente ad una soluzione di lignosolfonato.

La mancanza di una teoria che possa prevedere la solubilità di un polimero così eterogeneo, contenente sia gruppi idrofilici che idrofobici, ha reso necessario eseguire una grande quantità di prove con diversi solventi e miscele di solventi. Una volta ottimizzati i protocolli sperimentali, la caratterizzazione delle frazioni estratte è avvenuta utilizzando cromatografia di permeazione su gel, per la determinazione del peso molecolare, spettroscopia NMR mono e bidimensionale, per la quantificazione dei gruppi idrossilici e la valutazione delle unità costituenti, e analisi elementare, per determinare il contenuto di zolfo nei diversi campioni ottenuti.

3. Parte sperimentale

3.1. Materiali

I campioni di lignosolfonato softwood (SLS) e lignosolfonato hardwood (HLS) sono stati forniti da Borregaard LignoTech.

I reagenti cloruro di litio (ACS, $\geq 99\%$), 2-cloro-4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-diossafosfolano (95%), colesterolo ($\geq 99\%$), cromo(III) acetilacetato ($\geq 97\%$), ossido di tungsteno(VI) (polvere, 99,9%) e solfanilammide ($\geq 99\%$) sono stati acquistati da Sigma Aldrich.

I polimeri Amberlite XAD-7 (20-60 mesh), Dowex 50WX8 100-200 H (100-200 mesh) e polistirensolfonato di sodio (standard GPC, Mw: 4300, 6800, 17000, 77000, 150000, 2600000 Da) sono stati acquistati da Sigma Aldrich.

I solventi acetato di etile (ACS, $\geq 99,5\%$), acetone (ACS, $\geq 99,5\%$), acetonitrile (HPLC, $\geq 99,9\%$), cloroformio (HPLC, $\geq 99,8\%$, 40-150ppm amilene), cloroformio deuterato (d), diclorometano (HPLC, $\geq 99,9\%$, 40-150ppm amilene), dimetilsolfossido (HPLC, $\geq 99,9\%$), dimetilsolfossido deuterato (d6), etanolo (absolute, $\geq 99,8\%$), metanolo (ACS grade, $\geq 99,9\%$), piridina (HPLC, $\geq 99,9\%$), iso-propanolo (ACS, $\geq 99,5\%$), tetraidrofurano (HPLC, $\geq 99,9\%$) e toluene (ACS, $\geq 99,5\%$) sono stati acquistati da Sigma Aldrich.

Nei protocolli sperimentali è stata utilizzata acqua milliQ.

3.2. Metodi

3.2.1. Acidificazione Lignosolfonati

I campioni SLS e HLS sono stati acidificati ai corrispettivi acidi lignosolfonici (rispettivamente indicati come SLS_H e HLS_H) impiegando una metodologia descritta in letteratura con piccole modifiche.²⁹ Nello specifico, in un vial da 50 mL vengono inseriti 5 g di resina a scambio cationico Dowex 50WX8, 12 g di resina Amberlite XAD-7, 2 g di lignosolfonato (SLS o HLS) e 25 mL di acqua milliQ. Le provette così preparate vengono tenute in agitazione per 16 ore a temperatura ambiente mediante un dispositivo appositamente fabbricato in laboratorio. In seguito, l'acqua e il lignosolfonato rimasto in soluzione vengono rimossi. Il lignosolfonato acidificato adsorbito dalla resina XAD-7 viene recuperato attraverso ripetute estrazioni con aliquote di etanolo a 40°C. Infine, l'acido lignosolfonico viene separato mediante evaporazione sottovuoto dell'etanolo, avendo l'accortezza di utilizzare un bagno ad acqua che non superi i 30°C per evitare alterazioni nella struttura del prodotto. Si ottengono in questo modo due frazioni: un solido di acido lignosolfonico (LS_H) e un residuo di lignosolfonato in soluzione acquosa (LS_{WR}). Sul residuo in soluzione acquosa è stata ripetuta l'acidificazione per verificare la possibilità di aumento di resa di acido lignosolfonico. Il residuo di lignosolfonato in acqua viene recuperato tramite evaporazione del solvente sottovuoto a 30°C.

3.2.2. Prove di solubilità

Per uno studio preliminare sulle solubilità di lignosolfonato e acido lignosolfonico sono stati selezionati i seguenti solventi: acqua milliQ, acetato di etile, acetone, acetonitrile, cloroformio, diclorometano, dimetilsolfossido, etanolo, metanolo, iso-propanolo, toluene e tetraidrofurano. La solubilità è stata testata disperdendo 5 mg di solido in 1 mL di solvente all'interno di una provetta Eppendorf da 2 mL e agitando con ancoretta magnetica a 350 rpm per 16 ore a temperatura ambiente. Le frazioni solubile ed insolubile sono state prima separate centrifugando a 13000 rpm per 15 minuti, e poi essiccate in stufa sottovuoto a 30°C.

3.2.3. Sequential Solvent Extraction (SSE)

Il frazionamento degli acidi solfonici (SLS_H e HLS_H) viene eseguito con un rapporto di 20 mg di acido lignosolfonico per mL di solvente all'interno di un pallone termostato a 25°C; l'agitazione è effettuata con ancoretta magnetica a 500 rpm per 6 ore. La frazione insolubile viene separata dalla soluzione contenente la frazione solubile per centrifugazione a 13000 rpm per 15 minuti e seccata in stufa sottovuoto a 30°C. La frazione solubile viene separata dal solvente mediante evaporatore rotante con bagno ad acqua a 30°C.

La frazione insolubile viene poi ulteriormente frazionata nelle medesime condizioni utilizzando un solvente migliore, in grado di solubilizzare una ulteriore porzione di acido lignosolfonico. Si effettuano in totale tre estrazioni utilizzando nell'ordine: acetonitrile, acetone ed etanolo.

Si ottengono in questo modo quattro frazioni di acido lignosolfonico (**Figura 15**): la frazione solubile in acetonitrile (NS), la frazione insolubile in acetonitrile e solubile in acetone (AS), la frazione insolubile in acetone e solubile in etanolo (ES) e la frazione insolubile in etanolo (EI).

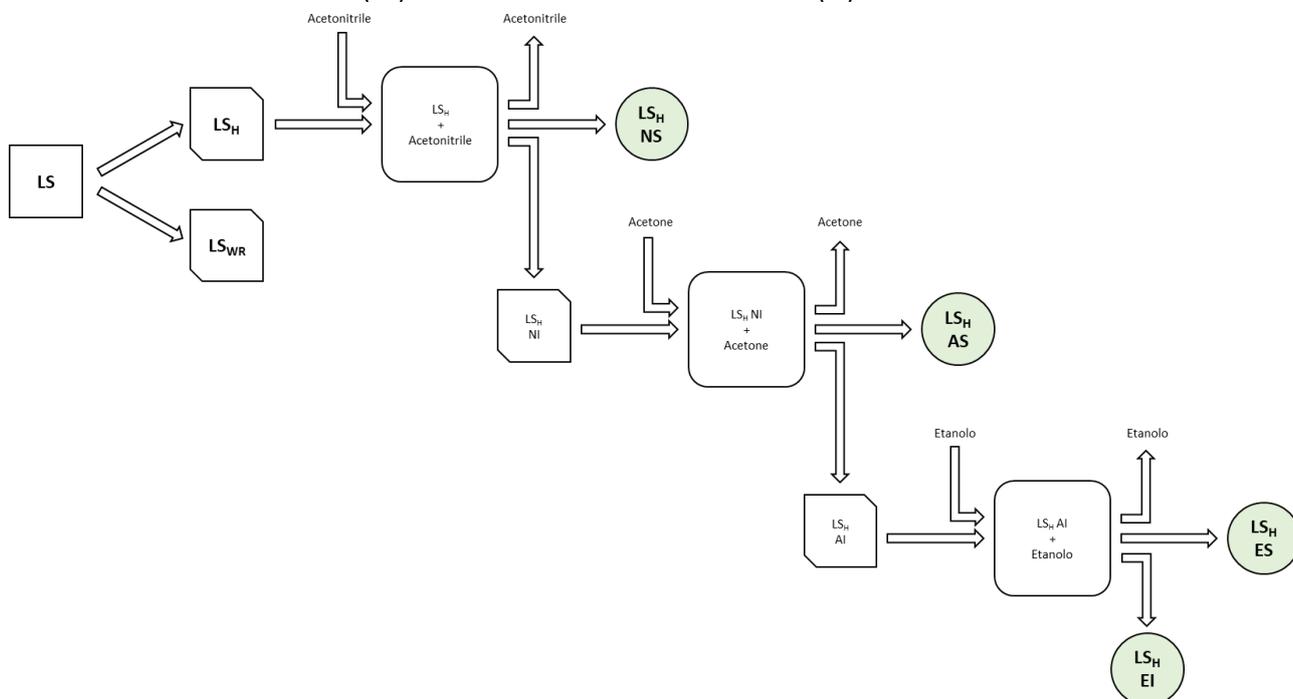


Figura 15: Schema di flusso del frazionamento SSE

3.2.4. Sequential Solvent Precipitation (SSP)

SLS e HLS vengono dapprima parzialmente solubilizzati in metanolo e la frazione solubile viene fatta successivamente precipitare per aggiunta di quantità sempre maggiori di acetone.

Il passaggio iniziale di frazionamento viene eseguito con un rapporto di 100 mg/mL di metanolo all'interno di un pallone termostato a 25°C e agitazione con ancorotta magnetica a 350 rpm per 16 ore. La frazione insolubile viene separata dalla soluzione contenente la frazione solubile per centrifugazione a 13000 rpm per 15 minuti e seccata in stufa sottovuoto a 30°C.

La precipitazione è effettuata con tre progressive aggiunte di acetone, ed è istantanea. La prima aggiunta porta il rapporto metanolo:acetone a 1:1, con la seconda aggiunta si raggiunge un rapporto metanolo:acetone pari a 3:7, con la terza ed ultima aggiunta il rapporto metanolo:acetone diventa 1:9. Ogni frazione insolubile precipitata viene separata per centrifugazione a 13000 rpm per 15 minuti e seccata in stufa sottovuoto a 30°C. La frazione solubile viene separata dal solvente mediante evaporatore rotante con bagno ad acqua a 30°C.

Con questa metodica si ottengono cinque frazioni di lignosolfonato (**Figura 16**): la frazione insolubile in metanolo (MI), la frazione precipitata con la prima aggiunta di acetone (MSAI 50:50), la frazione precipitata con la seconda aggiunta di acetone (MSAI 30:70), la frazione precipitata con la terza aggiunta di acetone (MSAI 10:90) e la frazione solubile anche in seguito alla terza aggiunta di acetone (MSAS 10:90).

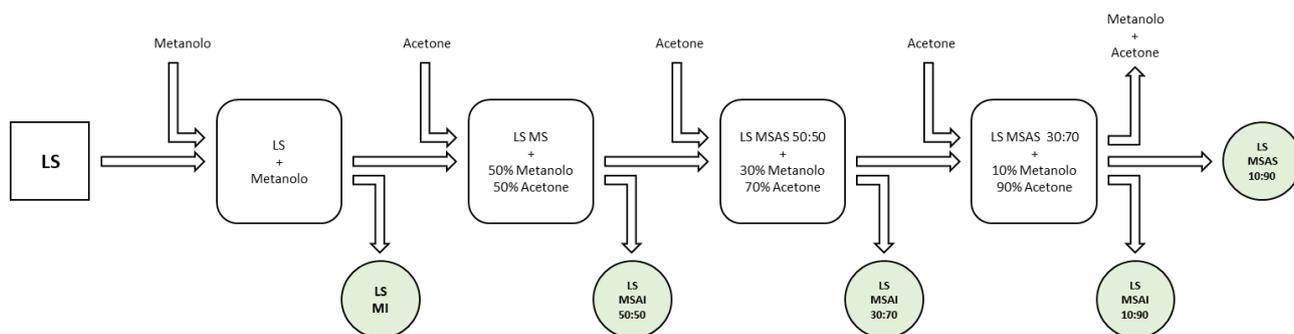


Figura 16: Schema di flusso del frazionamento SSP

3.3. Strumenti e Analisi

3.3.1. Cromatografia di permeazione su gel (GPC)

Le analisi cromatografiche sono state condotte su un sistema HPLC Shimadzu corredato di una colonna PLgel MiniMIX-C (Agilent). Come fase mobile è stato utilizzato dimetilsolfossido contenente 0,1% di LiCl (0,5 mL/min, 70°C). La retta di calibrazione è stata ottenuta con standard di polistirene solfonato nel range 2600 – 4.3 kDa e composti modello della lignina a basso peso (170 – 941 Da). I campioni iniettati sono stati precedentemente filtrati con Iso-Disc (membrana di PTFE con pori di 0,2 µm).

3.3.2. Spettroscopia NMR

Per le analisi ^{31}P NMR è stato impiegato uno spettrometro Bruker 300 MHz NMR. Il campione (precedentemente seccato e accuratamente pesato) è stato fosforilato con l'impiego di 2-cloro-4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-diossafosfolano, in accordo con una procedura riportata in letteratura.⁴⁹ Una miscela di cloroformio deuterato e piridina anidra in rapporto volumetrico 1:1,6 è stata usata come solvente e colesterolo come standard interno. Per l'analisi HSQC i campioni sono stati sciolti in dimetilsolfossido deuterato (DMSO-d₆) con una concentrazione di 80 mg/mL (32 scan, 0,256 s *acquisition delay*, 2 s *relaxation delay*).

3.3.3. Analisi Elementare

Le analisi elementari sono state eseguite su campioni accuratamente pesati (circa 2 mg) con uno strumento Elementar UNICUBE. Sono stati utilizzati solfanilammide come standard C-H-N-S e ossido di tungsteno(VI) come catalizzatore di ossidazione. I dati riportati rappresentano il valore medio di almeno tre misure.

4. Risultati e Discussioni

4.1. Acidificazione

Nel presente lavoro di tesi sono stati utilizzati due distinti lignosolfonati: uno *hardwood* (HLS) e uno *softwood* (SLS). Dal punto di vista strutturale, la principale differenza risiede nell'assenza di unità siringiliche nel campione derivante da legno *softwood*, presenti invece nel legno *hardwood*. Inoltre, tramite cromatografia di permeazione su gel è stato possibile riscontrare che il campione SLS ha un peso molecolare medio più alto rispetto a quello del campione HLS.

Entrambi i lignosolfonati, data la presenza di una significativa concentrazione di gruppi solfonati, sono contraddistinti da una elevata solubilità in acqua e da una scarsa (o nulla) solubilità in solventi organici. Quest'ultima proprietà risulta però desiderabile ai fini di agevolare la caratterizzazione in soluzione, i processi di frazionamento con solvente o delle eventuali funzionalizzazioni.

Comunemente, al fine di migliorare la solubilità dei lignosolfonati, si esegue o l'acidificazione del gruppo solfonato o l'acetilazione dei gruppi idrossilici. Queste operazioni si rendono essenziali per analisi che necessitano di soluzioni con concentrazioni elevate di analita (i.e. ^{13}C NMR).³⁰

È importante notare che i lignosolfonati utilizzati non sono puri ma, essendo i residui acquosi della delignificazione con bisolfito, possono contenere: monosaccaridi, polisaccaridi, emicellulosa, complessi lignina-carboidrato, complessi lignina-polisaccaride e sali inorganici.^{20,29,30}

Posto come obiettivo il trovare delle strategie di frazionamento basate sull'interazione con solventi, si è deciso di aumentare la solubilità dei lignosolfonati tramite una metodica di acidificazione proposta in letteratura da Sumerskii et al. (2015), che permette di ottenere i corrispondenti acidi lignosolfonici con un buon grado di purezza (99,5%).²⁹

Questo processo prevede di purificare il lignosolfonato, sciolto in acqua, per estrazione con una resina polimerica non-ionica macroreticolata (Amberlite XAD-7). L'adsorbimento avviene con maggiore efficacia in condizioni acide ($\text{pH} < 4$) in quanto si ha una migliore interazione fra adsorbente, che presenta una riduzione della carica superficiale, ed adsorbato, che nella forma acidificata presenta legami a minor carattere ionico. Inoltre, essendo questo adsorbimento un processo esotermico, risulta favorevole lavorare a temperatura ambiente.²⁹ Il desorbimento si può poi eseguire con etanolo leggermente caldo.

L'acidificazione è stata eseguita con una resina a scambio cationico (DOWEX 50WX8) perché, rispetto all'utilizzo di acidi minerali (e.g. acido solforico), permette una protonazione in condizioni più blande, con conseguente diminuzione di alterazioni alla struttura del lignosolfonato, e riduce la formazione di sali in soluzione.²⁹ Il principale svantaggio delle resine è il loro costo elevato, che può però essere ammortizzato con il recupero e la rigenerazione delle stesse.

L'ottimizzazione è stata eseguita variando sia il rapporto fra resine e lignosolfonato, sia il tempo e il metodo di agitazione. Si è riscontrato che la variabile che più influisce sulla resa dell'acido lignosolfonico (LS_H) è il rapporto fra resina XAD-7 e lignosolfonato, che è stato individuato ottimale in 6:1 in peso. I batch preparati sono stati agitati lentamente over-night con un sistema rotante appositamente costruito, concepito per permettere un buon contatto fra i reagenti e per ridurre l'abrasione meccanica delle sfere di resina.

Con questo processo di purificazione e acidificazione si ottengono due prodotti:

- L'acido lignosolfonico (LS_H), estratto con etanolo dalla resina XAD-7 e seccato per evaporazione sottovuoto, che si presenta come un solido marrone scuro, asciutto e facilmente polverizzabile con mortaio.
- Il residuo acquoso (LS_WR), rimasto in soluzione acquosa e recuperato per concentrazione e liofilizzazione, che si presenta come un solido nero molto igroscopico e colloso.

I due solidi, benché presentino in soluzione lo stesso pH, differiscono notevolmente per solubilità in solventi organici. Nello specifico, LS_WR risulta insolubile, mentre LS_H risulta essere solubile in una varietà di solventi organici (e.g. etanolo, acetone, THF).

Il processo ottimizzato di acidificazione dei lignosolfonati ad acidi lignosolfonici ha una resa compresa tra il 44 e il 50% (**Tabella 2**), che risulta essere superiore a quella pari al 35% riportata in letteratura.²⁹ Questa differenza potrebbe essere dovuta alla differente composizione del lignosolfonato di partenza o ad una metodica di estrazione più efficace.

I campioni LS, LS_H e LS_{WR}, sia *hardwood* che *softwood*, sono stati caratterizzati con cromatografia ad esclusione dimensionale (GPC), spettroscopia di risonanza magnetica nucleare (³¹P NMR, HSQC NMR) e analisi elementare (CHNS).

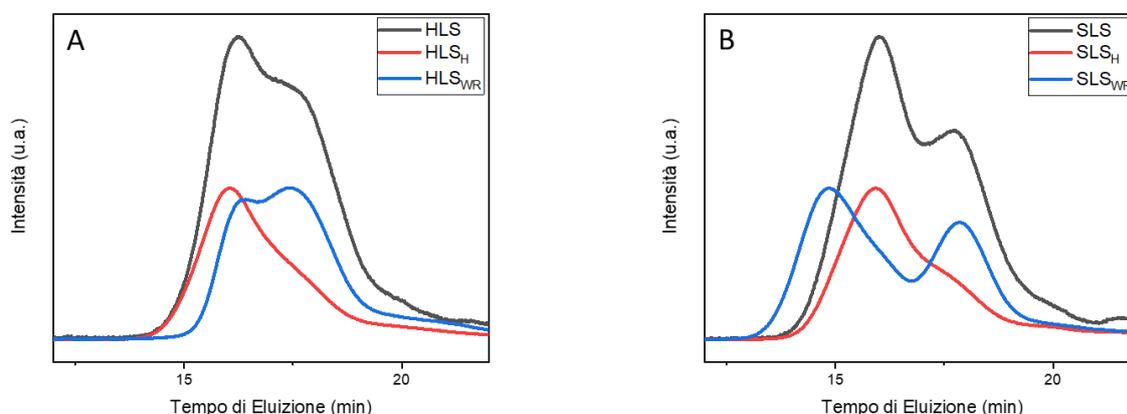


Figura 17: Elugrammi GPC dei prodotti di acidificazione di HLS (A) e di SLS (B), in DMSO

Tabella 2: Peso molecolare medio numerale (M_n), polidispersità (PDI), e dati CHNS per i prodotti di acidificazione di HLS e SLS

Campione	Resa(%WT)	M_n (Da)	PDI	C(%WT)	H(%WT)	N(%WT)	S(%WT)	S/C
HLS	-	1200	3.7	43.4	5.0	<0.1	4.9	0.11
HLS _{WR}	50	1100	2.0	24.6	3.7	<0.1	3.8	0.15
HLS _H	50	2400	3.2	48.9	5.2	<0.1	4.2	0.09
SLS	-	1600	5.4	48.6	5.0	<0.1	5.4	0.11
SLS _{WR}	56	2100	5.4	24.3	3.0	<0.1	5.1	0.21
SLS _H	44	2900	4.0	50.4	5.1	<0.1	5.0	0.10

La frazione LS_H, sia essa ottenuta da *softwood* (SLS_H) o *hardwood* (HLS_H) presenta un peso molecolare medio numerale (M_n) superiore sia alla rispettiva frazione LS_{WR} sia al lignosolfonato di partenza. Inoltre, entrambe le frazioni, a seguito del trattamento di acidificazione, risultano possedere una polidispersità (PDI) inferiore al corrispondente lignosolfonato (Tabella 2). Dal cromatogramma del campione *softwood* (Figura 17.B) risulta evidente come la frazione acidificata abbia un intervallo ben definito di pesi molecolari, mentre la frazione SLS_{WR} presenta una distribuzione bimodale. Questo fenomeno può essere correlato alla limitata capacità di adsorbimento della resina XAD-7 utilizzata per l'estrazione, non in grado di adsorbire quantitativamente molecole con pesi molecolari superiori ai 60 kDa.²⁹ Ciò, insieme al peso molecolare medio di partenza del campione *softwood*, superiore a quello *hardwood*, potrebbe essere il motivo della differenza di resa di acidificazione fra i lignosolfonati *hardwood* e *softwood*.

Dall'analisi elementare emerge che la frazione a più basso peso LS_{WR} presenta un rapporto S/C molto più elevato rispetto alla frazione a più alto peso LS_H, indicando un più alto contenuto di gruppi solfonici e spiegando la alta solubilità in acqua di questa frazione. I più bassi contenuti, in valore assoluto, di carbonio e zolfo riscontrati nei campioni LS_{WR} dall'analisi CHNS possono essere spiegati sulla base di residui inorganici presenti nel lignosolfonato.²⁰ I valori riscontrati sono in linea con quelli presenti in letteratura per campioni analoghi.^{20,29,30}

Per determinare la quantità e la tipologia dei gruppi idrossilici presenti nei campioni, sono state eseguite delle analisi ³¹P NMR in seguito a reazione di fosfitilazione con 2-cloro-4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-diossafosfolano, seguendo il protocollo riportato in letteratura da Meng et al. (2019).⁴⁹

Per ottenere una completa solubilizzazione dei campioni LS e LS_{WR} si è resa necessaria l'aggiunta di una/due gocce di DMSO (o di DMF) alla soluzione di piridina e cloroformio deuterato.

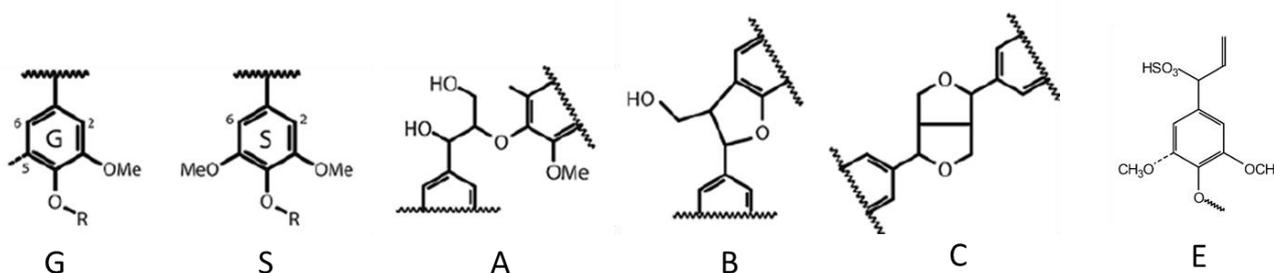
Tabella 3: Analisi quantitativa dei gruppi idrossilici mediante ^{31}P -NMR dei prodotti di acidificazione di HLS e SLS, con valori espressi in mmol/g

Campione	OH alifatici	OH fenolici condensati	OH fenolici non condensati	OH fenolici totali	OH carbossilici
HLS	0.95	0.26	0.14	0.40	0.07
HLS _{WR}	0.60	0.11	0.04	0.15	0.03
HLS _H	0.68	0.45	0.24	0.70	0.20
SLS	0.72	0.20	0.28	0.48	0.30
SLS _{WR}	0.68	0.12	0.17	0.29	0.10
SLS _H	0.47	0.28	0.39	0.67	0.24

Si è riscontrato che i residui acquosi dell'acidificazione (frazioni LS_{WR}) hanno una ridotta concentrazione di gruppi idrossilici fenolici e carbossilici, mentre hanno una relativamente elevata concentrazione di gruppi idrossilici alifatici (**Tabella 3**). Ciò da un lato conferma come il processo al solfito porti alla solfonazione delle catene alifatiche della lignina (dato che le frazioni LS_{WR} presentano anche un maggior rapporto S/C), ma può anche lasciare presupporre che i campioni HLS_{WR} e SLS_{WR} presentino un'elevata concentrazione di carboidrati, siano essi monosaccaridi, polisaccaridi o complessi lignina-carboidrato. Considerando però che il contenuto di carboidrati all'interno dei lignosolfonati è mediamente del 4% in peso²⁹⁻³¹, e anche ammettendo che possa raggiungere per alcuni processi il 30%^{20,29}, risulta evidente che questi non possano essere componente esclusiva del residuo acquoso, che costituisce il 50-56% in peso del LS di partenza.

Verosimilmente, i campioni LS_{WR} contengono quindi una quantità significativa di oligomeri ligninici a catena corta ad elevato grado di solfonazione, che si generano per depolimerizzazione durante il processo di delignificazione con solfito.³¹ Questi oligomeri solfonati a basso peso molecolare presentano una buona affinità con l'acqua e un elevato grado di solvatazione; non risentono quindi di alcuna spinta idrofobica e se adsorbiti sulla resina possono facilmente tornare in soluzione. D'altro canto, gli oligomeri meno solfonati a maggiore peso molecolare risentono di una maggiore spinta idrofobica e possono legarsi alla resina in diversi punti, e per questo motivo vengono più facilmente estratti.

Per stabilire se l'assunzione risulta verificata, la composizione delle varie frazioni LS, LSH e LS_{WR} è stata studiata tramite analisi HSQC NMR. Per l'assegnazione dei picchi ci si è basati su dati riportati in letteratura.^{21,29-31,45,50,51}

**Figura 18:** Possibili strutture di condensazione presenti all'interno del lignosolfonato, individuabili con 2D NMR

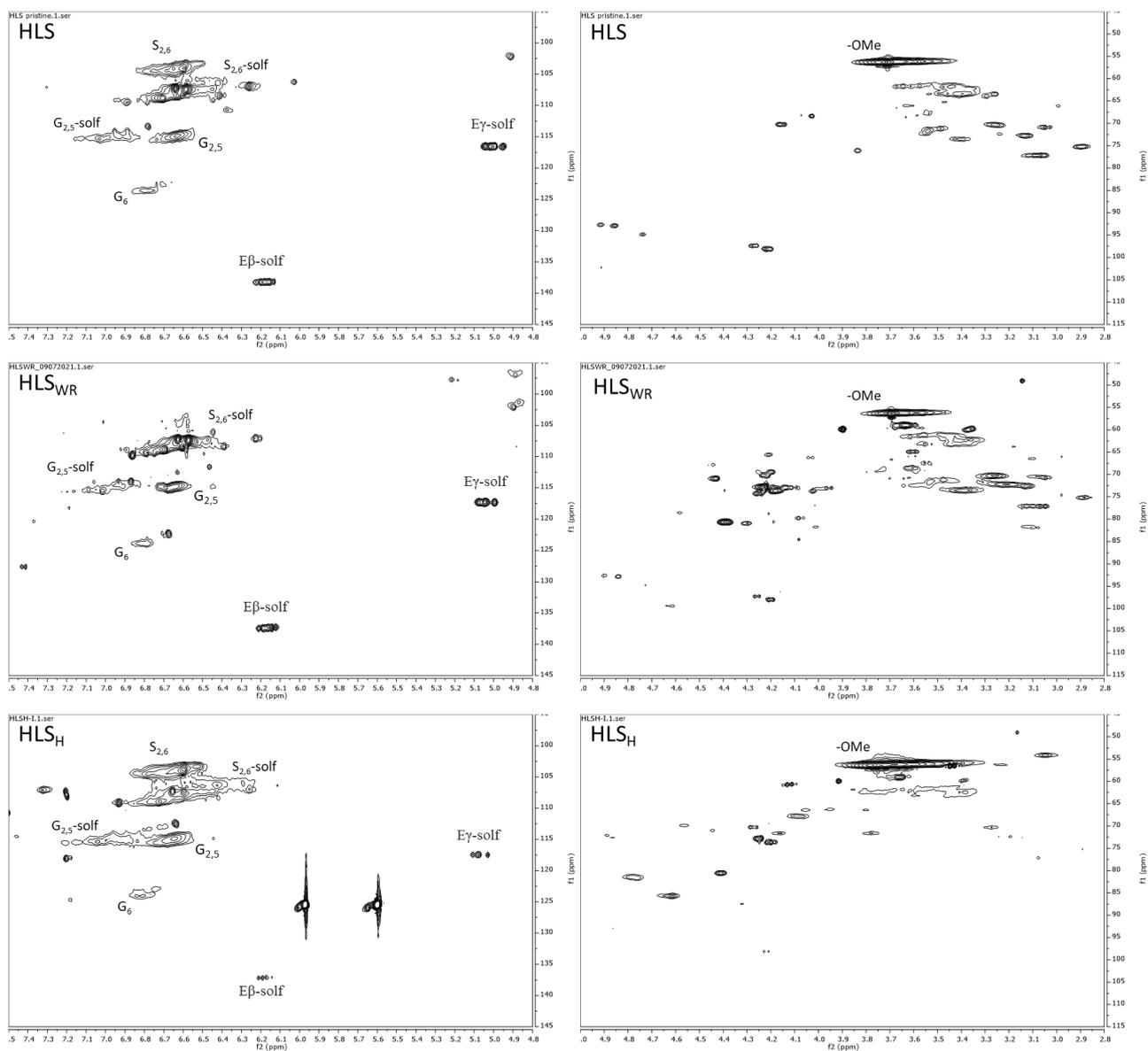


Figura 19: Spettri HSQC-NMR dei prodotti di acidificazione di HLS, in DMSO-d₆

Dagli spettri HSQC NMR si può notare che le frazioni LS_{WR} e LS_H hanno differenti strutture chimiche. In particolare, per quanto riguarda la zona relativa ai segnali aromatici, il campione HLS_{WR} non contiene unità siringiliche non solfonate, che rimangono invece nella frazione HLS_H ($\delta_{H/C}$ 6,8-6,3/103 ppm). Per il campione *softwood* si ha invece una riduzione dell'intensità dei picchi relativi alle unità guaiaciliche G₆ nella frazione SLS_H ($\delta_{H/C}$ 6,7-6.5 ppm G₆). Per entrambi i campioni si ha comparsa di picchi negli spettri di LS_H ($\delta_{H/C}$ 6,0/126 ppm e 5,6/126 ppm) con ogni probabilità relativi a impurezze dovute alle resine a scambio ionico, costituite da polimeri aromatici (si rende necessaria l'analisi HSQC NMR di un bianco, costituito da DMSO-d₆ rimasto a contatto con le resine a scambio ionico per verificare questa ipotesi).

Per quanto riguarda la zona relativa ai segnali alifatici, invece, nei residui acquosi LS_{WR} di entrambi i campioni è presente una pluralità di segnali relativi a carboidrati, mentre nei campioni LS_H tali segnali risultano molto meno intensi (Figura 19, Figura 20).

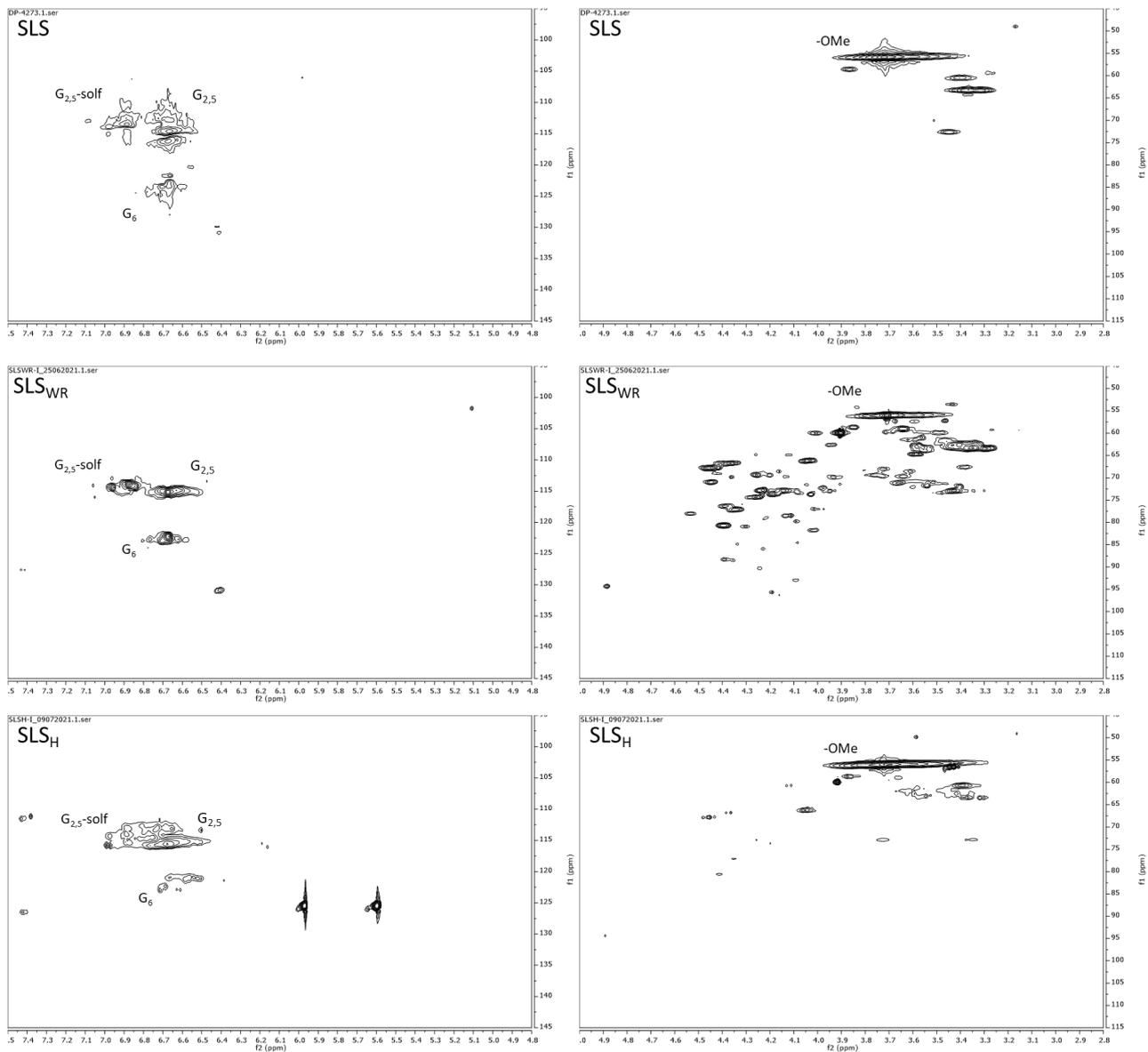


Figura 20: Spettri HSQC-NMR dei prodotti di acidificazione di SLS, in DMSO-d6

Per tentare di aumentare la resa della frazione acidificata sono state eseguite acidificazioni successive sui LS_{WR}. È stato riscontrato che è possibile ottenere una frazione acidificata LS_H-II con un 5%_{WT} di resa rispetto al LS di partenza. Analogamente, acidificando la frazione LS_{WR}-II, si può ottenere una frazione LS_H-III con un 1%_{WT} di resa rispetto al LS. Tutte le frazioni acidificate risultano avere pesi molecolari medi confrontabili. È evidente che la resa non sia sufficientemente elevata per giustificare questi ulteriori passaggi di acidificazione. Tuttavia, queste prove hanno dimostrato che con questa metodica di acidificazione con resine c'è un limite di resa della frazione LS_H che dipende probabilmente dalla composizione chimica del LS di partenza.

4.2. Solubilità

Per individuare i solventi idonei per il frazionamento sono stati eseguiti dei test di solubilità a temperatura ambiente. Si può ipotizzare che LS e LS_H abbiano una solubilità diretta e che sia quindi possibile aumentare la solubilità aumentando la temperatura. Tuttavia, è preferibile lavorare a temperatura ambiente perché: richiede una minima quantità di energia, assicura di non apportare modificazioni alla struttura di LS e LS_H e consente di utilizzare solventi organici infiammabili in condizioni di sicurezza.

Come descritto nella parte sperimentale, sono stati testati svariati solventi protici, aprotici e con diversa polarità. Come evidenziato nelle **Figura 21** e **Figura 22**, la solubilità è in generale maggiore nei solventi più polari (maggiore colorazione della soluzione).

Il lignosolfonato è, nelle concentrazioni di indagine, totalmente solubile in acqua e DMSO e parzialmente solubile in metanolo. Risulta invece insolubile negli altri solventi testati (**Figura 21**).

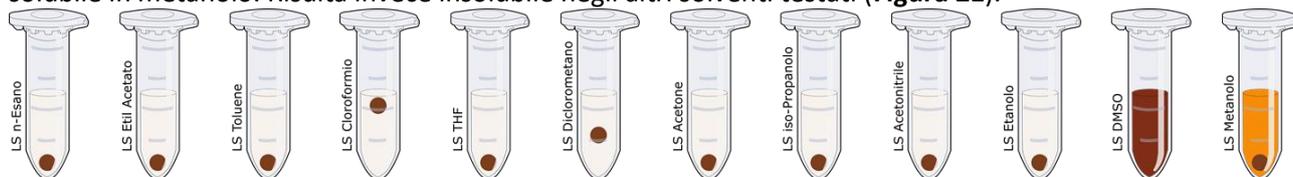


Figura 21: Rappresentazione illustrativa dei risultati delle prove preliminari di solubilità di LS nei diversi solventi organici testati (disposti in ordine ascendente di parametro totale di solubilità di Hansen, conc. LS 5 mg/ml)

Il corrispettivo acido lignosolfonico è totalmente solubile in acqua, DMSO e metanolo, parzialmente solubile in etanolo, acetonitrile, iso-propanolo, acetone, THF ed insolubile in diclorometano, cloroformio, toluene, etil acetato e n-esano (**Figura 22**). Questo conferma la maggiore solubilità ipotizzata di LS_H rispetto a LS.

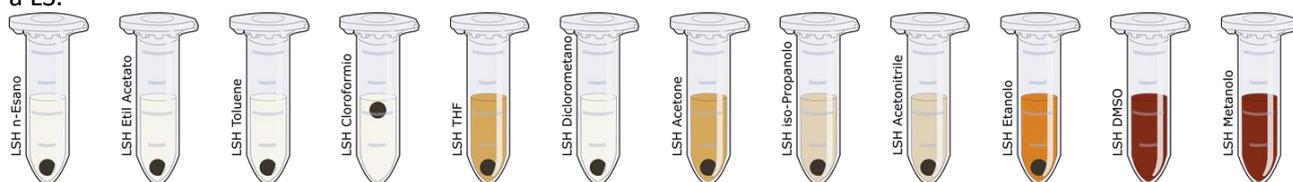


Figura 22: Rappresentazione illustrativa dei risultati delle prove preliminari di solubilità di LS_H nei diversi solventi organici testati (disposti in ordine ascendente di parametro totale di solubilità di Hansen, conc. LS_H 5 mg/ml)

Le evidenze sperimentali non aderiscono né alla teoria della solubilità di Hildebrand né alla teoria della solubilità di Hansen. Data la difficoltà di prevedere l'esito delle interazioni tra LS (o LS_H) e solvente, anche a causa della complessità della matrice polimerica, è stato necessario basarsi esclusivamente su prove empiriche per ideare ed ottimizzare metodi di frazionamento mediati da solvente.

Per eseguire un frazionamento risultano d'interesse quei solventi che solubilizzano parzialmente LS (o LS_H), e permettono così di separare una frazione solubile da una frazione insolubile.

Il LS_H risulta parzialmente solubile in una varietà di solventi. Quindi si ipotizza che sia possibile effettuare un frazionamento per *sequential solvent extraction*.

Il LS è invece parzialmente solubile unicamente in metanolo, con il quale si può eseguire un primo passaggio di estrazione. Ottenuta la frazione di LS solubile in metanolo si può farla precipitare aggiungendo uno dei solventi in cui LS non è solubile. Si ipotizza quindi che sia possibile effettuare un frazionamento per *sequential solvent precipitation*.

4.3. Sequential Solvent Extraction (SSE)

Nonostante la strategia di frazionamento per estrazioni sequenziali con solventi sia ampiamente riportata per lignina kraft ed Organosolv,⁴⁶ non sono stati trovati in letteratura esempi di frazionamento di lignosolfonato con questa metodica.

Tra i vari solventi che solubilizzano parzialmente l'acido lignosolfonico di partenza, e quindi di interesse per l'applicazione di un protocollo SSE, sono stati scelti quelli le cui frazioni solubili differiscono maggiormente in termini di peso molecolare (determinate tramite analisi GPC preliminari condotte sui campioni parzialmente solubilizzati in tutti i solventi testati). A questo punto è stato possibile determinare la sequenza migliore, che è risultata essere nell'ordine: acetonitrile, acetone ed etanolo.

Sono state così generate, per entrambi gli acidi solfonici, quattro diverse frazioni: la frazione solubile in acetonitrile (NS), la frazione solubile in acetone (AS), la frazione solubile in etanolo (ES) e la frazione insolubile in etanolo (EI). Queste frazioni si presentano tutte come dei solidi di colore marrone scuro, con igroscopicità decrescente da NS a EI.

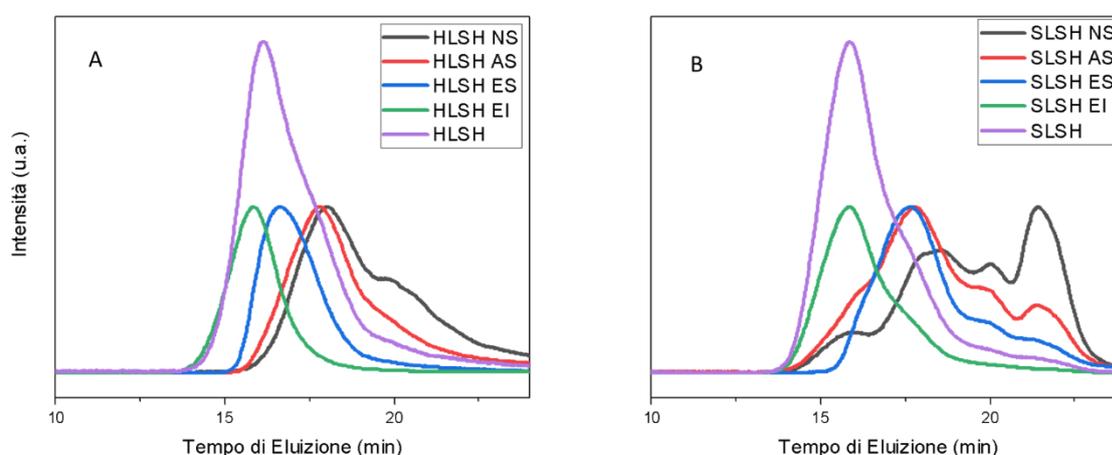


Figura 23: Elugrammi GPC del frazionamento SSE di HLS_H (A) e SLS_H (B), in DMSO

Tabella 4: Peso molecolare medio numerale (M_n), polidispersità (PDI) e dati CHNS per le frazioni SSE di HLS_H e SLS_H

Campione	Resa(% _{WT})	M_n (Da)	PDI	C(% _{WT})	H(% _{WT})	N(% _{WT})	S(% _{WT})	S/C
HLS_H	-	2400	3.2	48.9	5.2	<0.1	4.2	0.09
HLS_H NS	2	500	1.6	48.0	5.3	<0.1	2.9	0.06
HLS_H AS	20	800	1.6	54.4	5.7	<0.1	2.8	0.05
HLS_H ES	25	1700	1.8	51.4	5.4	<0.1	4.5	0.09
HLS_H EI	53	6200	2.6	52.0	5.1	<0.1	3.7	0.07
SLS_H	-	2900	4.0	50.4	5.1	<0.1	5.0	0.10
SLS_H NS	2	400	4.0	50.6	5.6	<0.1	2.4	0.05
SLS_H AS	3	700	4.0	53.7	6.0	<0.1	3.6	0.07
SLS_H ES	2	900	1.9	46.9	5.7	<0.1	6.0	0.13
SLS_H EI	92	3500	3.9	52.9	5.4	<0.1	5.2	0.10

In entrambi i campioni la frazione NS, a peso molecolare più basso, ha uno spiccato profumo di liquirizia. Per questo motivo si potrebbe ipotizzare che in questa frazione siano presenti in misura maggiore zuccheri e complessi carboidrati-lignina (LCC). Data inoltre la bassa resa di questa frazione, si potrebbe considerare, più che un reale frazionamento, piuttosto un passaggio di purificazione.

Seguono poi in peso molecolare la frazione AS e la frazione ES. La frazione EI risulta quella con peso molecolare medio maggiore (Figura 23.A e Tabella 4). Anche la polidispersità delle diverse frazioni risulta in tutti i casi significativamente minore rispetto all'acido lignosolfonico non frazionato, confermando una maggiore omogeneità delle stesse rispetto al materiale di partenza.

Le caratteristiche dei tre diversi solventi usati evidenziano una polarità decrescente passando da acetonitrile ad etanolo, mentre la capacità di formare legami a idrogeno cresce in senso opposto. Nello specifico, l'etanolo è un solvente protico e in grado di comportarsi sia da accettore sia da donatore di legami a idrogeno. Viceversa, acetonitrile e acetone sono solventi aprotici e in grado di comportarsi da donatori di legami a idrogeno, ma non da accettori. Sulla base di queste considerazioni si può desumere che per quanto riguarda la solvatazione delle frazioni a più basso peso risulti maggiormente importante la polarità del solvente, mentre diventa via via sempre più importante la capacità di formare legami a idrogeno per poter solvatare catene a peso molecolare più elevato.

Per quanto riguarda il confronto tra le frazioni solubili nello stesso solvente, ma ottenute da essenze legnose diverse, è interessante notare che la resa in ciascuna frazione, seppure seguendo lo stesso andamento, presenta valori molto diversi a seconda che l'acido lignosolfonico sia di tipo *softwood* (rese inferiori) o *hardwood* (rese maggiori). Si può ipotizzare che le frazioni di HLS_H contengano degli oligomeri con un peso molecolare relativamente basso e che nel campione SLS siano non siano presenti oligomeri con lo stesso peso che possano risultare solubilizzabili.

Osservando l'analisi elementare si può vedere che il contenuto di zolfo nelle varie frazioni non è costante, e segue un andamento simile per *hardwood* e *softwood*. La frazione ES risulta essere quella più ricca in zolfo, seguita poi da EI. Le frazioni NS e AS contengono zolfo in quantità minori, perché, come detto in precedenza, sono probabilmente più ricche in carboidrati.

Sulle frazioni del campione *hardwood* sono state eseguite analisi spettroscopiche di risonanza magnetica nucleare. Questa operazione non è stata possibile sulle frazioni del campione *softwood* a causa della bassa resa.

Tabella 5: Analisi quantitativa dei gruppi idrossilici mediante ³¹P-NMR delle frazioni SSE di HLS_H, con valori espressi in mmol/g

Campione	OH alifatici	OH fenolici condensati	OH fenolici non condensati	OH fenolici totali	OH carbossilici
HLS _H	0.68	0.45	0.24	0.70	0.20
HLS _H NS	1.18	0.39	0.21	0.60	0.27
HLS _H AS	0.60	0.61	0.28	0.89	0.16
HLS _H ES	0.79	0.51	0.28	0.79	0.04
HLS _H EI	0.17	0.13	0.07	0.20	0.01

La frazione NS risulta essere la più ricca in gruppi idrossilici alifatici e carbossilici (**Tabella 5**). Inoltre, ha un contenuto di unità fenoliche ridotto rispetto alla matrice di partenza, confermando dunque l'ipotesi che tale frazione risulti maggiormente ricca in carboidrati.

Le frazioni AS e ES presentano in generale valori più bassi per quanto riguarda gli idrossili alifatici e maggiori per ciò che concerne i fenoli, ma con andamento opposto. Infatti, se gli OH alifatici aumentano passando dal campione AS a quello ES, il contrario accade invece per gli OH fenolici. Tali risultati sono in completo accordo con i dati di analisi elementare (**Tabella 4**) che vedono un aumento del rapporto S/C passando da AS a ES. È noto, infatti che la solfonazione avviene sulle catene alifatiche della lignina. La quantità di gruppi carbossilici diminuisce in modo costante all'aumentare del peso molecolare della frazione (**Tabella 5**).

Infine, la frazione EI, a più alto peso, risulta più povera di gruppi funzionali idrossilici e carbossilici, ma contiene in ogni caso un buon numero di gruppi solfonici; ciò potrebbe giustificare la sua non solubilità nei solventi organici testati, seppur mantenendo un'ottima solubilità in acqua.

Sono poi state condotte analisi NMR bidimensionali per determinare la presenza delle diverse unità caratteristiche della lignina.

Si può osservare che le unità siringiliche α -solfonate- β,γ -insature sono presenti unicamente nelle frazioni NS e AS ($\delta_{H/C}$ 6,7-6,4/107 ppm per S_{2/6}, 6,1-6,3/137 ppm per β e 4,9-5,1/117 ppm per γ). I segnali legati a questa unità sono maggiormente intensi nella frazione NS, dove si denota un'assenza di altri segnali legati a unità guaiaciliche o siringiliche. Questo indica la probabile assenza di oligomeri di lignina, e che questa unità è probabilmente legata con dei carboidrati. Infatti, per la frazione NS compaiono i tipici segnali dovuti alla presenza di zuccheri ($\delta_{H/C}$ 4,7-3,0/60-90 ppm).

Nella frazione AS compaiono i segnali relativi alle unità siringiliche non solfonate ($\delta_{H/C}$ 6,8-6,4/103 ppm) e un segnale legato all'unità guaiacilica ($\delta_{H/C}$ 6,8-6,5/115 ppm). Lo spettro nella zona ossigenata alifatica

risulta essere più pulito di quello della frazione a minore peso molecolare, e quindi con minor contenuto di carboidrati.

La frazione ES presenta un contenuto ancora minore di zuccheri ed è composta da oligomeri con unità guaiaciliche e siringiliche sia solfonate ($\delta_{H/C}$ 6,9-6,2/107 ppm per $S_{2/6}$, 7,2-6,8/117 ppm per $G_{2/5}$ e 6,9-6,6/127 ppm per G_6) che non solfonate ($\delta_{H/C}$ 6,8-6,5/103 ppm per $S_{2/6}$, 6,8-6,4/117 ppm per $G_{2/5}$ e 6,9-6,6/127 ppm per G_6).

La frazione EI risulta essere quella più pulita e contiene oligomeri ad elevato peso molecolare con gruppi guaiacilici e siringilici solfonati e non. In questo spettro non sono presenti i due picchi caratteristici del passaggio di acidificazione ($\delta_{H/C}$ 6,0/126 ppm e 5,6/126 ppm).

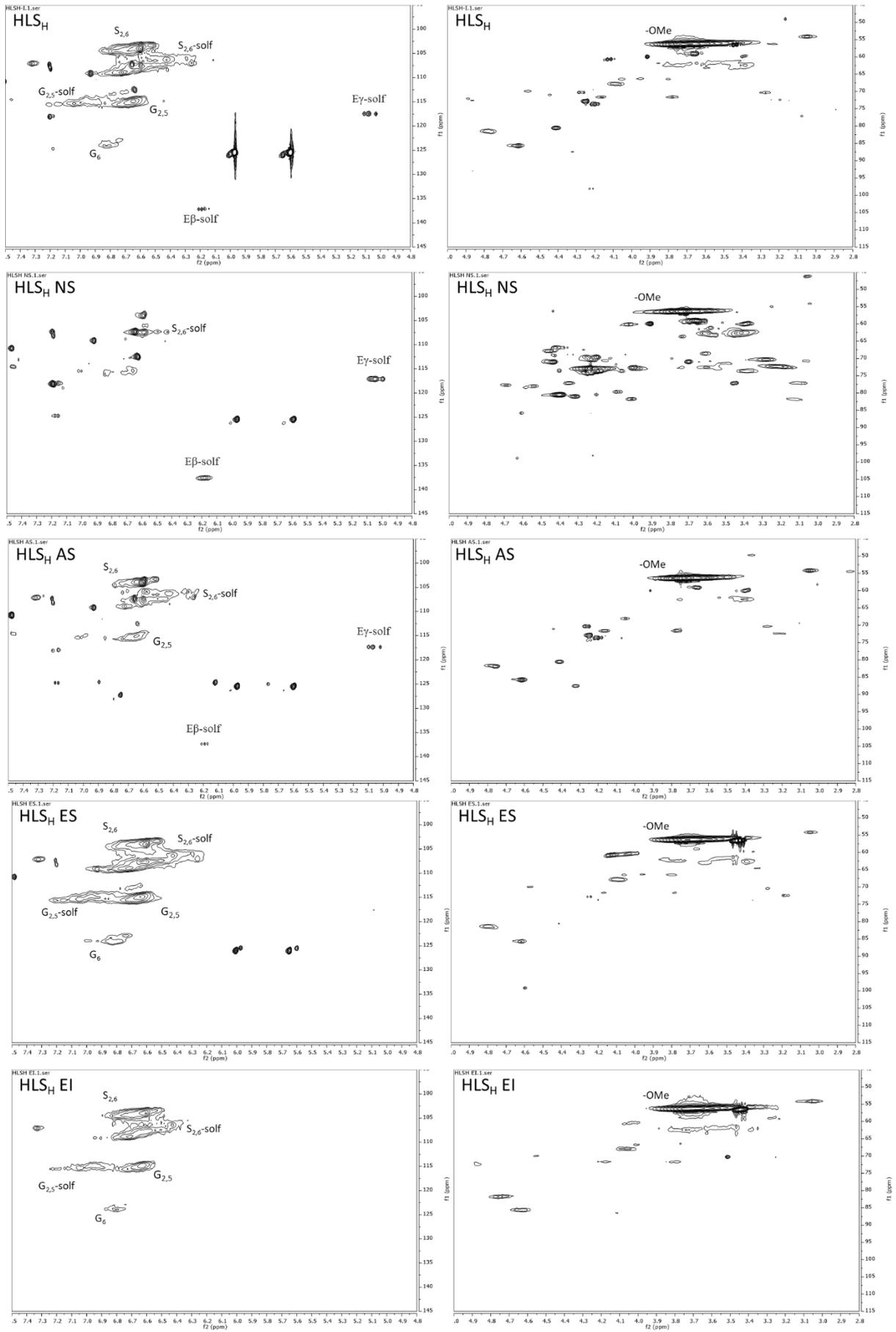


Figura 24: Spettri HSQC NMR delle frazioni SSE di HLS_H

4.4. Sequential Solvent Precipitation (SSP)

Il secondo metodo di frazionamento studiato, rivelatosi particolarmente efficace nel caso di lignine kraft e organosolv, è basato sulla precipitazione frazionata.^{33,46,52} Come per il frazionamento SSE, non sono stati trovati in letteratura esempi applicati al lignosolfonato.

In questo caso, si è partiti direttamente dai lignosolfonati, perché, come già evidenziato, è stato possibile trovare un solvente organico, il metanolo, in grado di solubilizzare parzialmente la matrice di partenza ottenendo così due frazioni: una solubile in metanolo (MS) ed una insolubile (MI). Alla frazione solubile sono state successivamente aggiunte aliquote via via crescenti di un non solvente (miscibile in metanolo) per favorire la precipitazione di frazioni diverse. Prove preliminari (effettuate aggiungendo il non solvente in ugual volume ad una soluzione di HLS in metanolo) hanno permesso di individuare l'acetone come migliore opzione perché non solo meno tossico e più facile da rimuovere rispetto ad altri solventi, ma soprattutto in grado di favorire la precipitazione di una frazione di lignosolfonato con peso molecolare medio molto diverso dalla frazione rimasta in soluzione. Inoltre, la resa del precipitato è risultata superiore a quella ottenuta con altri solventi.

Sulla base di questi risultati preliminari è stato variato il rapporto volumetrico metanolo:acetone in tutto il range di composizione. Frazioni significativamente diverse tra loro (in termini di peso molecolare medio) sono state ottenute per rapporti 50:50 (LS MSAI 50:50), 30:70 (LS MSAI 30:70) e 10:90 (LS MSAI 10:90). In totale, includendo anche la frazione insolubile in metanolo (MI) e quella rimasta in soluzione dopo l'ultima aggiunta di acetone (LS MSAS 10:90), sono state così ottenute 5 frazioni.

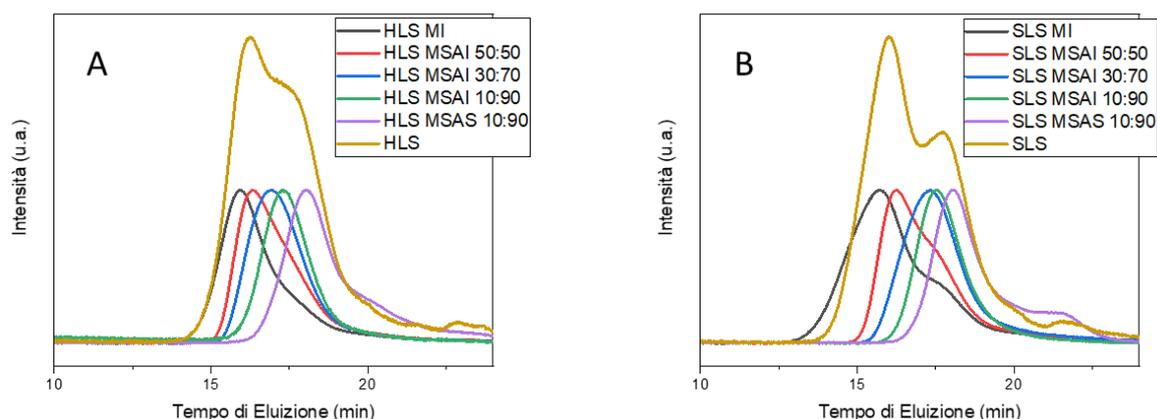


Figura 25: Elugrammi GPC del frazionamento SSP di HLS (A) e SLS (B), in DMSO

Tabella 6: Peso molecolare medio numerale (M_n), polidispersità (PDI) e dati CHNS per le frazioni SSP di HLS e SLS

Campione	Resa(% _{WT})	M_n (Da)	PDI	C(% _{WT})	H(% _{WT})	N(% _{WT})	S(% _{WT})	S/C
HLS	-	1200	3.7	43.4	5.0	<0.1	4.9	0.11
HLS MI	49	3000	2.9	43.1	4.9	<0.1	4.4	0.10
HLS MSAI 50:50	13	1800	1.9	42.1	4.9	<0.1	5.5	0.13
HLS MSAI 30:70	12	1500	1.7	42.8	5.0	<0.1	6.2	0.15
HLS MSAI 10:90	10	1100	1.4	40.7	4.8	<0.1	6.4	0.16
HLS MSAS 10:90	16	600	1.3	45.1	5.8	<0.1	6.7	0.08
SLS	-	1600	5.4	48.6	5.0	<0.1	5.4	0.11
SLS MI	85	3400	3.6	42.5	4.5	<0.1	6.3	0.15
SLS MSAI 50:50	5	1800	2.1	40.1	4.6	<0.1	6.9	0.17
SLS MSAI 30:70	3	1200	1.6	38.1	4.6	<0.1	7.1	0.19
SLS MSAI 10:90	2	900	1.3	35.5	4.7	<0.1	6.2	0.17
SLS MSAS 10:90	5	500	1.3	36.8	5.4	<0.1	2.5	0.07

Le frazioni ottenute sono dei solidi facilmente polverizzabili con mortaio. L'igroscopicità è molto ridotta per la frazione MI, ridotta per le frazioni precipitate con acetone ed elevata per la frazione MSAS 10:90. La

frazione MI ha un colore marrone molto intenso, le frazioni precipitate sono contraddistinte da tinte tenui e la frazione MSAS 10:90 ha un colore tendente all'arancione.

Dagli elugrammi GPC riportati in **Figura 25** e dai dati riportati in **Tabella 6** si può notare che le frazioni ottenute presentano tra loro una significativa differenza per quanto riguarda M_n e PDI. Nello specifico, la frazione MI presenta un peso molecolare medio più elevato rispetto alle altre frazioni. Inoltre, per aggiunta progressiva di acetone vengono precipitate frazioni con M_n e PDI sempre più bassi. In tutti i casi la polidispersità risulta ancora una volta molto inferiore rispetto al lignosolfonato di partenza.

Per quanto riguarda le analisi CHNS, sia nel caso del campione SLS, sia nel caso del campione HLS, il rapporto S/C aumenta al diminuire del peso molecolare medio delle frazioni precipitate e in tutti i campioni (ad eccezione della frazione a più basso peso che invece presenta un drastico calo del rapporto S/C) si osserva un maggior contenuto di zolfo rispetto al lignosolfonato di partenza.

I due solventi impiegati presentano un'identica polarità e momento di dipolo molto simile. Differiscono però per la capacità di formare legami a idrogeno perché il metanolo è in grado di comportarsi sia da accettore sia da donatore di legami a idrogeno, mentre l'acetone è un solvente aprotico. Emerge quindi l'importanza, al fine di ottenere un certo grado di solubilizzazione del lignosolfonato (quantomeno della frazione a più basso peso) non solo di un solvente polare, ma anche in grado di accettare legami a idrogeno. Infatti, nel solo acetone, il lignosolfonato è completamente insolubile. Dunque, aggiunte progressive di quantitativi sempre maggiori di acetone causano la precipitazione di frazioni di lignosolfonato solubili in metanolo.

Anche in questo caso, la resa della frazione MS ottenuta a partire da lignosolfonato *softwood* (e di conseguenza di ciascuna frazione insolubile in acetone) è molto inferiore rispetto a quella del lignosolfonato *hardwood*. La differenza nasce principalmente del primo passaggio di estrazione con metanolo. La giustificazione può quindi essere analoga a quella proposta per le diverse rese nel frazionamento per estrazione con solvente. Ovvero, nel lignosolfonato *softwood*, contraddistinto da un peso molecolare medio maggiore di quello del campione *hardwood*, è presente una concentrazione più bassa di catene di lignina con un peso molecolare sufficientemente basso da poter essere solubilizzate.

Per queste frazioni non è stato possibile eseguire l'analisi quantitativa dei gruppi ossidrilici con spettroscopia ^{31}P -NMR perché, come discusso nella sezione dedicata all'acidificazione, è stata riscontrata una difficoltà notevole nello sciogliere i campioni nella soluzione di piridina/cloroformio deuterato. L'aggiunta di qualche goccia di solventi come DMSO e DMF nel tubo NMR può migliorare la solubilità dei campioni, ma spesso non si ottiene una solubilità completa del campione, inficiando quindi il dato sperimentale. Per ottenere degli spettri in modo riproducibile è quindi necessario ottimizzare un protocollo specifico, attualmente allo studio nel gruppo di ricerca presso cui è stata condotta la presente Tesi.

Dalle analisi HSQC NMR del campione *hardwood* risulta che l'unità siringilica α -solfonata- β,γ -insatura è presente in tutte le frazioni, con intensità maggiore nella frazione a peso molecolare più basso ($\delta_{\text{H/C}}$ 6,7-6,4/107 ppm per $S_{2/6}$, 6,1-6,3/137 ppm per β e 4,9-5,1/117 ppm per γ). Questo ci suggerisce che le molecole a basso peso molecolare tendono a co-precipitare con tutte le frazioni. Analogamente, la stessa considerazione si rivela valida per i carboidrati. È quindi chiaro che il processo di precipitazione ottiene frazioni ad elevato peso molecolare con delle molecole a basso peso molecolare a causa dell'ordine di precipitazione.

Probabilmente è per questo stesso motivo che gli spettri delle varie frazioni precipitate hanno un elevato grado di somiglianza. Si può però affermare che le frazioni a pesi molecolari inferiori presentano spettri con un maggiore grado di impurezze (derivanti dalla presenza di carboidrati) di quelli delle frazioni a pesi molecolari maggiori.

Gli spettri HSQC NMR del frazionamento per precipitazione del lignosolfonato *softwood* evidenziano un andamento simile. Ovvero, lo spettro risulta più ricco di segnali legati alla presenza dei carboidrati al diminuire della massa della frazione. La frazione a più basso peso molecolare ha una ridotta quantità di gruppi guaiacilici ed un elevato numero di carboidrati o complessi lignina-carboidrato.

Inoltre, è possibile riscontrare in tutti gli spettri la presenza di un picco intenso dovuto alla presenza di metanolo ($\delta_{\text{H/C}}$ 3,1/47 ppm).

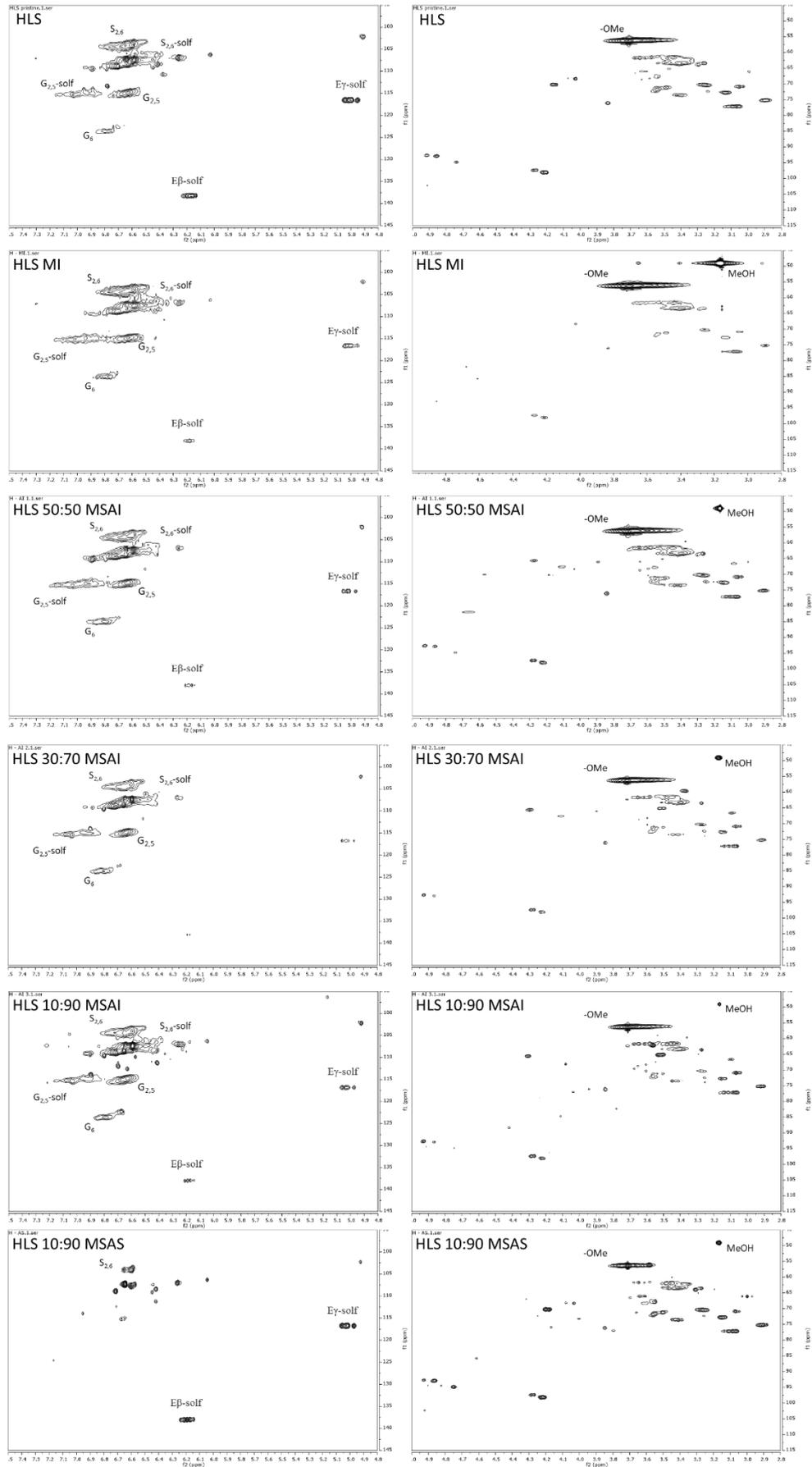


Figura 26: Spettri HSQC-NMR delle frazioni SSP di HLS

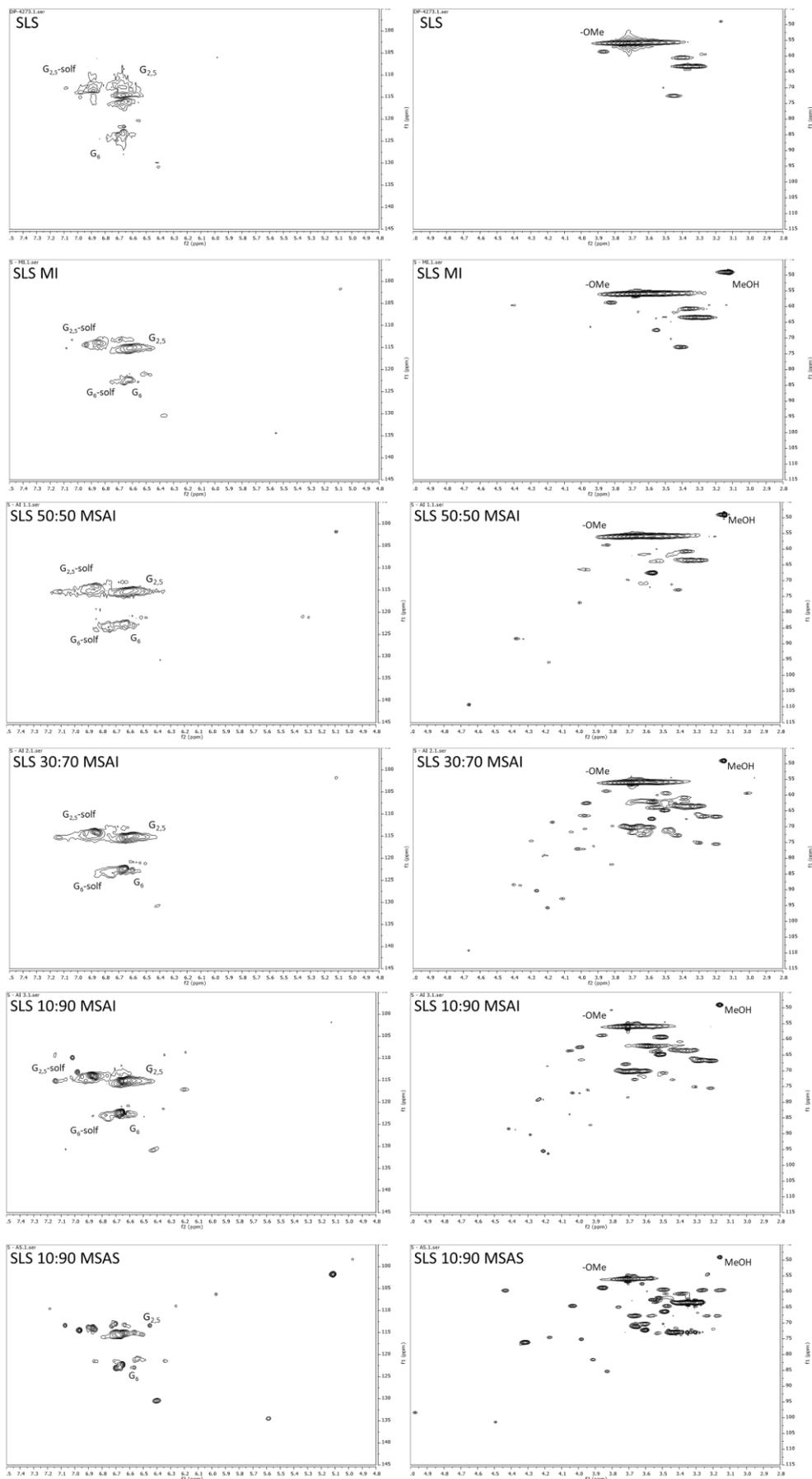


Figura 27: Spettri HSQC-NMR delle frazioni SSP di SLS

Nel tentativo di migliorare la resa delle diverse frazioni nel campione *softwood* sono stati tentati due approcci diversi. Da un lato si è agito sulla concentrazione di lignosolfonato in metanolo, dimezzandola. Si è infatti notato che la percentuale della frazione solubile aumenta diminuendo il rapporto fra lignosolfonato e solvente, ma influisce molto limitatamente sul range di pesi molecolari che passano in soluzione. Dall'altro, si è pensato di modificare le proprietà del solvente usato per solubilizzare la frazione a più basso peso, aumentandone polarità e capacità di formare legami a idrogeno, nello specifico lavorando con una miscela metanolo:acqua 90:10. La metodologia per le successive precipitazioni è invece rimasta invariata. Entrambi i protocolli modificati si sono rivelati efficaci per raggiungere lo scopo desiderato. Infatti, la frazione insolubile è calata dall'85% al 62 e 57%, rispettivamente. Ciò ha consentito poi di incrementare la resa nelle diverse frazioni precipitate, ottenendo in ciascun caso rese superiori al 7%.

Il sistema che prevede l'aggiunta di acqua permette di modulare la resa delle frazioni rendendo possibile operare con gli stessi volumi di solvente e di ottenere rese maggiori. Pertanto, è stata selezionata come opzione migliore. Le frazioni ottenute con questo metodo sono state caratterizzate per indagare possibili differenze con le equivalenti frazioni ottenute con il precedente protocollo SSP.

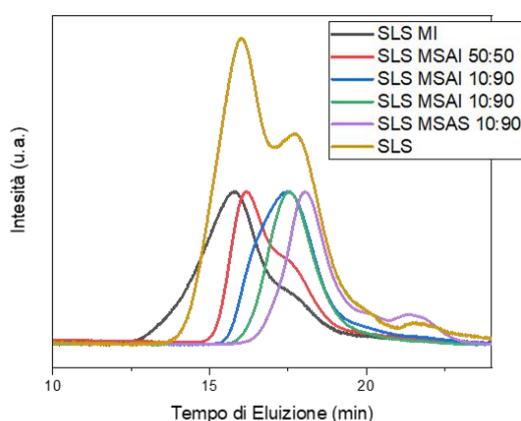


Figura 28: Elugramma GPC del frazionamento SSP di SLS con miscela metanolo/acqua

Tabella 7: Peso molecolare medio numerale (M_n), polidispersità (PDI) e dati CHNS delle frazioni SSP (con 10% di acqua) di SLS

Campione	Resa(% _{WT})	M_n (Da)	PDI	C(% _{WT})	H(% _{WT})	N(% _{WT})	S(% _{WT})	S/C
SLS	-	1600	5.4	48.6	5.0	<0.1	5.4	0.11
SLS MI	57	4500	5.3	42.9	4.6	<0.1	6.1	0.14
SLS MSAI 50:50	16	1800	2.2	39.9	4.7	<0.1	6.6	0.17
SLS MSAI 30:70	8	1200	1.6	37.4	4.5	<0.1	6.5	0.17
SLS MSAI 10:90	9	1000	1.6	34.7	4.8	<0.1	5.5	0.16
SLS MSAS 10:90	10	500	1.3	37.6	5.2	<0.1	3.1	0.08

Confrontando questo sistema con quello che utilizza esclusivamente metanolo, si può vedere che la differenza principale consiste nella resa maggiore del primo passaggio di estrazione. Questo comporta anche un sensibile aumento del peso molecolare medio e della polidispersità della frazione MI ottenuta con l'aggiunta di acqua. Le frazioni ottenute per precipitazione sono invece analoghe a quelle ottenute in assenza di acqua, sia per peso molecolare che per valori di PDI.

Anche la distribuzione di zolfo nelle varie frazioni risulta seguire il medesimo andamento sia in presenza che in assenza di acqua. Le frazioni con maggior tenore di zolfo risultano essere la SLS MSAI 50:50 e la SLS MSAI 30:70, seguite poi dalla frazione SLS MSAI 10:90. Anche in questo caso, la frazione a peso molecolare minore, SLS MSAS 10:90, è anche quella con minor contenuto di zolfo.

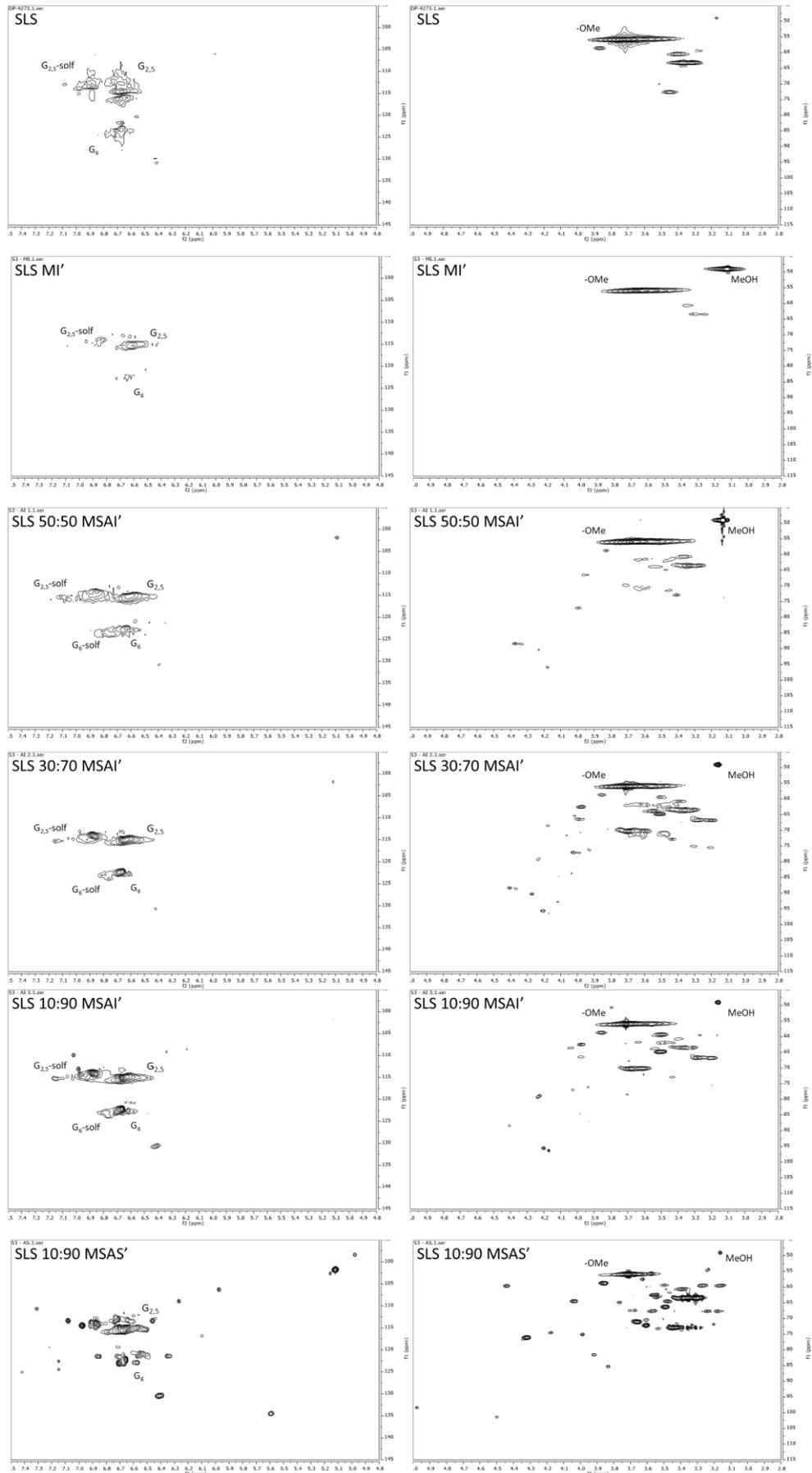


Figura 29: Spettri HSQC-NMR delle frazioni SSP di SLS con miscela metanolo/acqua

Come nel caso precedente, non è stato possibile condurre analisi ^{31}P NMR, bensì soltanto analisi HSQC. Dagli spettri HSQC si può evidenziare anche in questo caso la presenza di molecole di metanolo ($\delta_{\text{H/C}}$ 3,1/47 ppm). Se confrontato con le frazioni ottenute in assenza di acqua, si può riscontrare una notevole somiglianza, con la differenza che gli spettri del campione ottenuto con aggiunta d'acqua risultano più puliti. Nello specifico, hanno una intensità ridotta di picchi identificativi dei carboidrati, che sono principalmente concentrati nel campione a peso molecolare inferiore. L'aggiunta di acqua probabilmente aiuta a solubilizzare la frazione a peso molecolare inferiore e si ha una conseguente diminuzione di co-precipitazione con le frazioni a peso molecolare più elevato. Si può quindi concludere che la strategia che prevede l'aggiunta di acqua è un'opzione molto efficace per aumentare la resa delle frazioni precipitate nel caso in cui il solo metanolo non risulti un solvente sufficientemente performante in tal senso.

5. Conclusioni

Il lavoro di tesi qui illustrato si è concentrato sullo studio sistematico ed estensivo di metodologie per il frazionamento di lignosolfonati basate su solvente. Nello specifico, per la prima volta sono state ottimizzate due diverse strategie: *sequential solvent extraction* (SSE) e *sequential solvent precipitation* (SSP). Entrambe risultano essere valide alternative ai processi di frazionamento con membrana, in quanto le frazioni ottenute non solo differiscono per i pesi molecolari medi, ma presentano anche una diversa composizione chimica. Inoltre, attraverso questo studio, è stato dimostrato che è possibile modulare le caratteristiche delle frazioni ottenute (in termini di contenuto di gruppi funzionali e peso molecolare medio) variando la strategia adottata per la separazione.

Il frazionamento tramite SSE risulta maggiormente laborioso in quanto richiede un primo passaggio di acidificazione e necessita dell'impiego di grandi quantità di solvente, che possono però essere recuperate tramite evaporazione e riciclate. D'altro canto, le frazioni di acido lignosolfonico presentano maggiore solubilità in solventi organici, permettendone non solo la caratterizzazione più agevole attraverso tecniche in soluzione (e.g. ^{31}P NMR), ma anche garantendone una maggiore versatilità di impiego e facilità di post-funionalizzazione. Un vantaggio di questa metodica, come si può riscontrare dalle analisi HSQC NMR, è che il buon grado di purezza dell'acido lignosolfonico, dovuto al processo di acidificazione ed estrazione con resine, si propaga nelle sue frazioni.

Viceversa, il frazionamento tramite SSP è contraddistinto dalla rapidità del processo di precipitazione, grazie al quale è possibile ottenere tutte le frazioni in poco tempo e senza necessità di pretrattamenti. D'altro canto, le varie frazioni risultano meno facilmente caratterizzabili a causa della scarsa solubilità in solventi organici (trovandosi ancora sottoforma di sali). Risulta quindi necessario ottimizzare i protocolli analitici al fine di poterne ottenere una caratterizzazione approfondita (e.g. tramite ^{31}P NMR). Inoltre, gli spettri HSQC NMR delle frazioni presentano un elevato numero di picchi nell'area in cui cadono i segnali dei gruppi ossigenati alifatici, che spesso indicano la presenza carboidrati o emicellulosa talvolta inglobati nella struttura della lignina (e.g. LCC). Risulta evidente che l'intensità di questi segnali è massima nella frazione a più basso peso molecolare, ovvero l'ultima che rimane in soluzione. Questo indica che sono presenti dei composti molto solubili a basso peso molecolare che abbassano il grado di purezza delle frazioni e che, a causa dell'ordine con cui queste vengono ottenute, si ritrovano come co-precipitati anche nelle frazioni a pesi molecolari più alti. L'aggiunta al sistema di un buon solvente (e.g. acqua) può aumentare la resa del primo passaggio di estrazione, andando quindi ad aumentare la resa dei successivi passaggi di precipitazione, e inoltre diminuisce la co-precipitazione delle frazioni a più basso peso molecolare.

È stato inoltre dimostrato che la procedura di acidificazione di lignosolfonato con resine riportata in letteratura²⁹ porta in realtà ad un frazionamento della matrice di partenza. Questa strategia quindi, diversamente da quanto suggerito, non può essere utilizzata per migliorare la solubilità del lignosolfonato in metodiche di caratterizzazione, in quanto ne viene eliminata una frazione a basso peso ed elevato contenuto di zolfo.

Dai risultati ottenuti emerge come le caratteristiche chimico-fisiche del campione di partenza influiscano sulla resa delle diverse frazioni. Infatti, per il campione *softwood*, caratterizzato da pesi molecolari più elevati rispetto a quelli del campione *hardwood*, è stato necessario apportare delle modifiche ai protocolli sperimentali adottati per poter aumentare la resa di ciascuna frazione. Risulta tuttavia di grande interesse il fatto che le diverse frazioni ottenute presentino caratteristiche simili (e.g. contenuto di zolfo, concentrazione di gruppi idrossilici) indipendentemente dalla natura del lignosolfonato di partenza.

Il lavoro di Tesi qui illustrato rappresenta il primo passo verso una piena comprensione della struttura dei lignosolfonati. Inoltre, nel gruppo di ricerca presso il quale è stata svolta l'attività sperimentale sono attualmente allo studio sistemi di valorizzazione delle frazioni ottenute, e.g. attraverso la realizzazione di idrogeli, da frazioni ad elevato peso molecolare (e.g. HLS_H EI), *coatings*, da frazioni con una elevata concentrazione di gruppi ossidrilici (e.g. HLS_H ES), e membrane a scambio cationico, da frazioni con una elevata concentrazione di gruppi solfonici (e.g. HLS MSAI 10:90).

6. Bibliografia

- (1) Brar, S. K.; Sarma, S. J.; Pakshirajan, K. *Platform Chemical Biorefinery: Future Green Chemistry*; Elsevier, 2016.
- (2) Change (Wbgu), G. A. C. O. G. *World in Transition 3: Towards Sustainable Energy Systems*; Routledge: London, 2014. <https://doi.org/10.4324/9781315071961>.
- (3) Aresta, M.; Dibenedetto, A.; Dumeignil, F. *Biorefineries: An Introduction*; Walter de Gruyter GmbH & Co KG, 2015.
- (4) Quideau, S.; Deffieux, D.; Douat-Casassus, C.; Pouységu, L. Plant Polyphenols: Chemical Properties, Biological Activities, and Synthesis. *Angewandte Chemie International Edition* **2011**, *50* (3), 586–621. <https://doi.org/10.1002/anie.201000044>.
- (5) Volf, I.; Popa, V. I. 4 - Integrated Processing of Biomass Resources for Fine Chemical Obtaining: Polyphenols. In *Biomass as Renewable Raw Material to Obtain Bioproducts of High-Tech Value*; Popa, V., Volf, I., Eds.; Elsevier, 2018; pp 113–160. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63774-1.00004-1>.
- (6) Bajwa, D. S.; Pourhashem, G.; Ullah, A. H.; Bajwa, S. G. A Concise Review of Current Lignin Production, Applications, Products and Their Environmental Impact. *Industrial Crops and Products* **2019**, *139*, 111526. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111526>.
- (7) Gigli, M.; Crestini, C. Fractionation of Industrial Lignins: Opportunities and Challenges. *Green Chem.* **2020**, *22* (15), 4722–4746. <https://doi.org/10.1039/D0GC01606C>.
- (8) Fengel, D.; Wegener, G. *Wood: Chemistry, Ultrastructure, Reactions*; Walter de Gruyter, 2011.
- (9) A. Bruijninx, P. C.; Rinaldi, R.; M. Weckhuysen, B. Unlocking the Potential of a Sleeping Giant: Lignins as Sustainable Raw Materials for Renewable Fuels, Chemicals and Materials. *Green Chemistry* **2015**, *17* (11), 4860–4861. <https://doi.org/10.1039/C5GC90055G>.
- (10) Matsushita, Y. Conversion of Technical Lignins to Functional Materials with Retained Polymeric Properties. *J Wood Sci* **2015**, *61* (3), 230–250. <https://doi.org/10.1007/s10086-015-1470-2>.
- (11) Calvo-Flores, F. G.; Dobado, J. A. Lignin as Renewable Raw Material. *ChemSusChem* **2010**, *3* (11), 1227–1235. <https://doi.org/10.1002/cssc.201000157>.
- (12) Gillet, S.; Aguedo, M.; Petitjean, L.; Morais, A. R. C.; Lopes, A. M. da C.; Łukasik, R. M.; Anastas, P. T. Lignin Transformations for High Value Applications: Towards Targeted Modifications Using Green Chemistry. *Green Chem.* **2017**, *19* (18), 4200–4233. <https://doi.org/10.1039/C7GC01479A>.
- (13) Lu, W.; Li, X.; Zhang, H. The next Generation Vanadium Flow Batteries with High Power Density – a Perspective. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2018**, *20* (1), 23–35. <https://doi.org/10.1039/C7CP07456E>.
- (14) Hunter, D. *Papermaking: The History and Technique of an Ancient Craft*; Courier Corporation, 1978.
- (15) Biermann, C. J. *Handbook of Pulping and Papermaking*; Elsevier, 1996.
- (16) Phillips, M. Benjamin Chew Tilghman, and the Origin of the Sulfite Process for Delignification of Wood. *J. Chem. Educ.* **1943**, *20* (9), 444. <https://doi.org/10.1021/ed020p444>.
- (17) Burger, P. *Charles Fenerty and His Paper Invention*; Peter Burger, 2007.
- (18) Sandström, D. A. Hans Höglund – Mr. Mechanical Pulp Basic Research Resulted in Ekman Medal Award. *Nordic Pulp & Paper Research Journal* **2006**, *21* (1), 140–143. <https://doi.org/10.3183/nprj-2006-21-01-p140-143>.
- (19) Sjöström, E.; Alén, R. *Analytical Methods in Wood Chemistry, Pulping, and Papermaking*; Springer Science & Business Media, 1998.
- (20) Aro, T.; Fatehi, P. Production and Application of Lignosulfonates and Sulfonated Lignin. *ChemSusChem* **2017**, *10* (9), 1861–1877. <https://doi.org/10.1002/cssc.201700082>.
- (21) Miles-Barrett, D. M.; Montgomery, J. R. D.; Lancefield, C. S.; Cordes, D. B.; Slawin, A. M. Z.; Lebl, T.; Carr, R.; Westwood, N. J. Use of Bisulfite Processing To Generate High-β-O-4 Content Water-Soluble Lignosulfonates. *ACS Sustainable Chem. Eng.* **2017**, *5* (2), 1831–1839. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.6b02566>.
- (22) Kleinert, Th.; v. Tayenthal, K. Über Neuere Versuche Zur Trennung von Cellulose Und Inkrusten Verschiedener Hölzer. *Angewandte Chemie* **1931**, *44* (39), 788–791. <https://doi.org/10.1002/ange.19310443903>.

- (23) Johansson, A.; Aaltonen, O.; Ylinen, P. Organosolv Pulping — Methods and Pulp Properties. *Biomass* **1987**, *13* (1), 45–65. [https://doi.org/10.1016/0144-4565\(87\)90071-0](https://doi.org/10.1016/0144-4565(87)90071-0).
- (24) Taseli, B. (Kilic); Gokcay, C. F. Biological Treatment of Paper Pulping Effluents by Using a Fungal Reactor. *Water Science and Technology* **1999**, *40* (11), 93–99. [https://doi.org/10.1016/S0273-1223\(99\)00705-2](https://doi.org/10.1016/S0273-1223(99)00705-2).
- (25) Isroi; Millati, R.; Syamsiah, S.; Niklasson, C.; Cahyanto, M. N.; Lundquist, K.; Taherzadeh, M. J. Biological Pretreatment of Lignocelluloses with White-Rot Fungi and Its Applications: A Review. *BioRes* **2011**, *6* (4), 5224–5259. <https://doi.org/10.15376/biores.6.4.Isroi>.
- (26) Howard, G. C. Progress Report on Waste Sulfite Liquor. *Ind. Eng. Chem.* **1930**, *22* (11), 1184–1185. <https://doi.org/10.1021/ie50251a022>.
- (27) Kobe, K. A. Utilization and Disposal of Sulfite Waste Liquor. *Sewage Works Journal* **1937**, *9* (6), 1019–1023.
- (28) Sawyer, C. N. Waste Sulfite Liquor—Sewage Mixtures Activated Sludge Treatment. *INDUSTRIAL AND ENGINEERING CHEMISTRY* **1940**, *32* (11), 5.
- (29) Sumerskii, I.; Korntner, P.; Zinovyev, G.; Rosenau, T.; Potthast, A. Fast Track for Quantitative Isolation of Lignosulfonates from Spent Sulfite Liquors. *RSC Advances* **2015**, *5* (112), 92732–92742. <https://doi.org/10.1039/C5RA14080C>.
- (30) Magina, S.; Marques, A. P.; Evtuguin, D. V. Study on the Residual Lignin in Eucalyptus Globulus Sulphite Pulp. *Holzforschung* **2015**, *69* (5), 513–522. <https://doi.org/10.1515/hf-2014-0218>.
- (31) Marques, A. P.; Evtuguin, D. V.; Magina, S.; Amado, F. M. L.; Prates, A. Structure of Lignosulphonates from Acidic Magnesium-Based Sulphite Pulping of Eucalyptus Globulus. *Journal of Wood Chemistry and Technology* **2009**, *29* (4), 337–357. <https://doi.org/10.1080/02773810903207762>.
- (32) Hocking, M. B. Vanillin: Synthetic Flavoring from Spent Sulfite Liquor. *J. Chem. Educ.* **1997**, *74* (9), 1055. <https://doi.org/10.1021/ed074p1055>.
- (33) Cui, C.; Sun, R.; Argyropoulos, D. S. Fractional Precipitation of Softwood Kraft Lignin: Isolation of Narrow Fractions Common to a Variety of Lignins. *ACS Sustainable Chem. Eng.* **2014**, *2* (4), 959–968. <https://doi.org/10.1021/sc400545d>.
- (34) *Handbook of Wood Chemistry and Wood Composites*; Rowell, R. M., Rowell, R. M., Eds.; CRC Press: Boca Raton, 2005. <https://doi.org/10.1201/9780203492437>.
- (35) Saito, T.; H. Brown, R.; A. Hunt, M.; L. Pickel, D.; M. Pickel, J.; M. Messman, J.; S. Baker, F.; Keller, M.; K. Naskar, A. Turning Renewable Resources into Value-Added Polymer : Development of Lignin - Based Thermoplastic. *Green Chemistry* **2012**, *14* (12), 3295–3303. <https://doi.org/10.1039/C2GC35933B>.
- (36) Argyropoulos, D. S.; Sadeghifar, H.; Cui, C.; Sen, S. Synthesis and Characterization of Poly(Arylene Ether Sulfone) Kraft Lignin Heat Stable Copolymers. *ACS Sustainable Chem. Eng.* **2014**, *2* (2), 264–271. <https://doi.org/10.1021/sc4002998>.
- (37) Pouteau, C.; Dole, P.; Cathala, B.; Averous, L.; Boquillon, N. Antioxidant Properties of Lignin in Polypropylene. *Polymer Degradation and Stability* **2003**, *81* (1), 9–18. [https://doi.org/10.1016/S0141-3910\(03\)00057-0](https://doi.org/10.1016/S0141-3910(03)00057-0).
- (38) Barana, D.; Orlandi, M.; Zoia, L.; Castellani, L.; Hanel, T.; Bolck, C.; Gosselink, R. Lignin Based Functional Additives for Natural Rubber. *ACS Sustainable Chem. Eng.* **2018**, *6* (9), 11843–11852. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.8b02145>.
- (39) Jiang, P.; Li, Q.; Gao, C.; Lu, J.; Cheng, Y.; Zhai, S.; An, Q.; Wang, H. Fractionation of Alkali Lignin by Organic Solvents for Biodegradable Microsphere through Self-Assembly. *Bioresource Technology* **2019**, *289*, 121640. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121640>.
- (40) Ma, M.; Dai, L.; Xu, J.; Liu, Z.; Ni, Y. A Simple and Effective Approach to Fabricate Lignin Nanoparticles with Tunable Sizes Based on Lignin Fractionation. *Green Chemistry* **2020**, *22* (6), 2011–2017. <https://doi.org/10.1039/D0GC00377H>.
- (41) Baker, D. A.; Rials, T. G. Recent Advances in Low-Cost Carbon Fiber Manufacture from Lignin. *Journal of Applied Polymer Science* **2013**, *130* (2), 713–728. <https://doi.org/10.1002/app.39273>.

- (42) Li, Q.; Li, M.; Lin, H.-S.; Hu, C.; Truong, P.; Zhang, T.; Sue, H.-J.; Pu, Y.; Ragauskas, A. J.; Yuan, J. S. Non-Solvent Fractionation of Lignin Enhances Carbon Fiber Performance. *ChemSusChem* **2019**, *12* (14), 3249–3256. <https://doi.org/10.1002/cssc.201901052>.
- (43) Yang, D.; Qiu, X.; Pang, Y.; Zhou, M. Physicochemical Properties of Calcium Lignosulfonate with Different Molecular Weights as Dispersant in Aqueous Suspension. *Journal of Dispersion Science and Technology* **2008**, *29* (9), 1296–1303. <https://doi.org/10.1080/01932690701866534>.
- (44) Zhou, M.; Qiu, X.; Yang, D.; Lou, H. Properties of Different Molecular Weight Sodium Lignosulfonate Fractions as Dispersant of Coal-Water Slurry. *Journal of Dispersion Science and Technology* **2006**, *27* (6), 851–856. <https://doi.org/10.1080/01932690600719164>.
- (45) Le-That, T.-T. Switchable Ionic Liquids for Biomass Treatment. 46.
- (46) Erythropel, H. C.; Zimmerman, J. B.; de Winter, T. M.; Petitjean, L.; Melnikov, F.; Lam, C. H.; Lounsbury, A. W.; Mellor, K. E.; Janković, N. Z.; Tu, Q.; Pincus, L. N.; Falinski, M. M.; Shi, W.; Coish, P.; Plata, D. L.; Anastas, P. T. The Green ChemisTREE: 20 Years after Taking Root with the 12 Principles. *Green Chem.* **2018**, *20* (9), 1929–1961. <https://doi.org/10.1039/C8GC00482J>.
- (47) Huang, C.; He, J.; Narron, R.; Wang, Y.; Yong, Q. Characterization of Kraft Lignin Fractions Obtained by Sequential Ultrafiltration and Their Potential Application as a Biobased Component in Blends with Polyethylene. *ACS Sustainable Chem. Eng.* **2017**, *5* (12), 11770–11779. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.7b03415>.
- (48) Song, Y.; Shi, X.; Yang, X.; Zhang, X.; Tan, T. Successive Organic Solvent Fractionation and Characterization of Heterogeneous Lignin Extracted by P-Toluenesulfonic Acid from Hybrid Poplar. *Energy Fuels* **2020**, *34* (1), 557–567. <https://doi.org/10.1021/acs.energyfuels.9b03508>.
- (49) Meng, X.; Crestini, C.; Ben, H.; Hao, N.; Pu, Y.; Ragauskas, A. J.; Argyropoulos, D. S. Determination of Hydroxyl Groups in Biorefinery Resources via Quantitative ³¹P NMR Spectroscopy. *Nat Protoc* **2019**, *14* (9), 2627–2647. <https://doi.org/10.1038/s41596-019-0191-1>.
- (50) Lutnaes, B. F.; Myrvold, B. O.; Lauten, R. A.; Endeshaw, M. M. ¹H and ¹³C NMR Data of Benzylsulfonic Acids—Model Compounds for Lignosulfonate. *Magnetic Resonance in Chemistry* **2008**, *46* (3), 299–305. <https://doi.org/10.1002/mrc.2184>.
- (51) Balakshin, M.; Capanema, E.; Gracz, H.; Chang, H.; Jameel, H. Quantification of Lignin–Carbohydrate Linkages with High-Resolution NMR Spectroscopy. *Planta* **2011**, *233* (6), 1097–1110. <https://doi.org/10.1007/s00425-011-1359-2>.
- (52) Lange, H.; Schiffels, P.; Sette, M.; Sevastyanova, O.; Crestini, C. Fractional Precipitation of Wheat Straw Organosolv Lignin: Macroscopic Properties and Structural Insights. *ACS Sustainable Chem. Eng.* **2016**, *4* (10), 5136–5151. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.6b01475>.