

Indice

Sommario

| | |
|--|----|
| <i>Indice</i> | 1 |
| <i>Abstract</i> | 3 |
| <i>Introduzione</i> | 4 |
| 1 Economia circolare..... | 4 |
| 2 Biomassa..... | 5 |
| 2.2 Componenti polimeriche della biomassa lignocellulosica | 5 |
| 2.2.1 Cellulosa | 7 |
| 2.2.2 Emicellulose..... | 7 |
| 2.3 Lignina..... | 10 |
| 2.3.1 La struttura chimica della lignina..... | 11 |
| 2.3.2 Isolamento della lignina..... | 17 |
| 2.3.3 Applicazioni della lignina | 21 |
| <i>Scopo della tesi</i> | 23 |
| <i>Parte sperimentale</i> | 24 |
| 4.1 Materiali..... | 24 |
| 4.2 Preparazione della biomassa | 25 |
| 4.3 Preparazione lignina EMAL | 26 |
| 4.4 Preparazione lignina DES..... | 27 |
| 4.5 Preparazione lignina da acidolisi in <i>p</i> -diossano | 28 |
| 4.6 Preparazione lignina organosolv | 29 |
| 4.7 Preparazione lignina cuprammonio..... | 31 |
| 4.8 Preparazione lignina Kraft | 33 |
| 4.9 Determinazione della lignina (metodo secondo Klason)..... | 34 |
| 4.10 Determinazione del contenuto dei gruppi ossidrilici tramite NMR | 35 |
| 4.11 Preparazione campione HSQC..... | 36 |
| 4.12 Preparazione campioni DFRC | 36 |
| 4.13 Preparazione campioni FT-IR..... | 37 |
| 4.14 Preparazione campioni GPC | 37 |
| 4.15 Campioni gas-massa pirolisi | 37 |
| 4.16 Preparazione campioni analisi elementare..... | 38 |
| 5) <i>Risultati e discussione</i> | 39 |

| | |
|--|-----|
| 5.1 Pretrattamento della biomassa | 39 |
| 5.2 Metodologie di estrazione..... | 40 |
| 5.2.1 Processo alcalino | 41 |
| 5.2.2 Processo acido | 45 |
| 5.2.3 Rese | 49 |
| 5.3 Caratterizzazioni | 50 |
| 5.3.1 Spettroscopia infrarossa FT-IR | 50 |
| 5.3.2 GPC | 54 |
| 5.3.3 ³¹ P NMR | 56 |
| 5.3.4 DFRC..... | 64 |
| 5.3.5 HSQC..... | 71 |
| 5.3.6 GC/MS pirolisi | 84 |
| 6 Conclusioni e previsioni future..... | 96 |
| 7 Bibliografia..... | 98 |
| 8 <i>Appendice</i> | 101 |
| <i>Ringraziamenti</i> | 129 |

Abstract

Nell'ottica dell'economia circolare, la chimica degli ultimi decenni si sta concentrando nello sfruttare la biomassa di scarto, in particolare l'oggetto di studio di questa tesi è la biomassa lignocellulosica di legno di gimnosperma (Loblolly Southern Pine). La lignina è un biopolimero molto abbondante, rappresenta circa il 30% della biomassa lignocellulosica; tuttavia, nonostante l'ampia biodisponibilità non trova ancora oggi ampia applicazione. Il motivo è da ricercare nella natura eterogenea dei legami intermonomerici, quali β -O-4', β -5', β -1', 5-5', 4-O-5' e β - β ', che viene significativamente modificata durante il processo di estrazione.

Allo scopo di valutare il diverso impatto della metodologia di estrazione sulla struttura della lignina isolata si è proceduto ad uno studio di valutazione comparativa di lignine estratte con diverse metodiche. Più specificamente, la lignina è stata estratta mediante metodologie che utilizzano approcci con un crescente grado di acidità. Sono stati considerati i processi di frazionamento industriali Kraft ed organosolv, come pure processi alternativi che utilizzino un approccio chemoenzimatico (EMAL: Enzyme mild acidolysis lignin) chimico (Dioxan Lignin), solventi da fonti rinnovabili come i Deep Eutectic Solvents (DES Lignin) per finire con un processo che si basa sulla rimozione mediante complessazione degli zuccheri rilasciati per idrolisi acida (Cuoxam Lignin). I campioni di lignina isolati sono stati caratterizzati strutturalmente mediante ^{31}P NMR, HSQC, GPC, FT-IR e DFRC e GC/MS pirolisi. Ciò ha permesso di ottenere informazioni relative alla polidispersione, \bar{D} , la massa molare media numerica M_n , la natura e l'abbondanza dei diversi gruppi funzionali ed infine circa la natura e l'abbondanza dei diversi legami intermonomerici presenti.

Questo studio rappresenta una mappatura unica delle caratteristiche funzionali e strutturali di una lignina softwood presentate in base alla metodica estrattiva.

Introduzione

1 Economia circolare

Più un paese è ricco, più i suoi abitanti consumano. Più un individuo consuma, maggiore è il suo impatto sul pianeta.

La chimica degli ultimi due secoli è basata su questo concetto. Si tratta di un modello economico definito economia lineare o altresì conosciuto come modello tradizionale “prendi-produci-usa-getta”.¹

Antagonista di questo modello consumistico e dannoso per il pianeta, la chimica basata sull’economia circolare mira a sfruttare la *biomassa* di scarto come materia prima per la produzione di intermedi, sostanze, oggetti, macchinari, combustibili, alimenti che, al termine del proprio ciclo di vita, tornino nell’ambiente come materiale biodegradabile o nell’aria come CO₂.

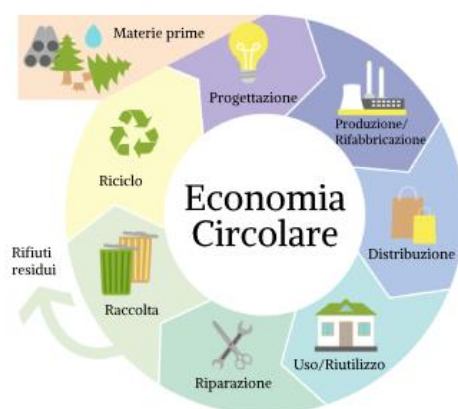


Figura 1- Modello economia circolare (tratto da <https://www.liberidallaplastica.it/economia-circolare>)

2 Biomassa

Con il termine “biomassa” s’intende qualsiasi sostanza di matrice organica animale o vegetale che non abbia subito processi di fossilizzazione da cui si possa trarre energia; una vasta gamma di materiale che si può presentare sotto forma di stati fisici differenti: solida, liquida e gassosa. Può essere altresì definita come qualsiasi sostanza che derivi dalla sintesi clorofilliana, in maniera diretta o indiretta.²

Tra le varie tipologie di biomassa, la biomassa lignocellulosica³ è forse quella più importante. Essa, infatti, ha rappresentato da sempre una fondamentale fonte di risorse per l’umanità. In particolare, si possono ricordare sia il suo valore come vettore energetico - basti pensare al materiale da ardere - od il suo impiego come materia prima per l’ottenimento di derivati cellulosici. Questi ultimi, infatti, non solo rappresentano il cuore dell’industria cartaria, ma anche un’alternativa sostenibile ai derivati petroliferi per la produzione di polimeri ad alto peso molecolare (e.g. eteri ed esteri della cellulosa).

2.2 Componenti polimeriche della biomassa lignocellulosica

La biomassa lignocellulosica è costituita principalmente da tre materiali polimerici: cellulosa, emicellulose e lignina.⁴

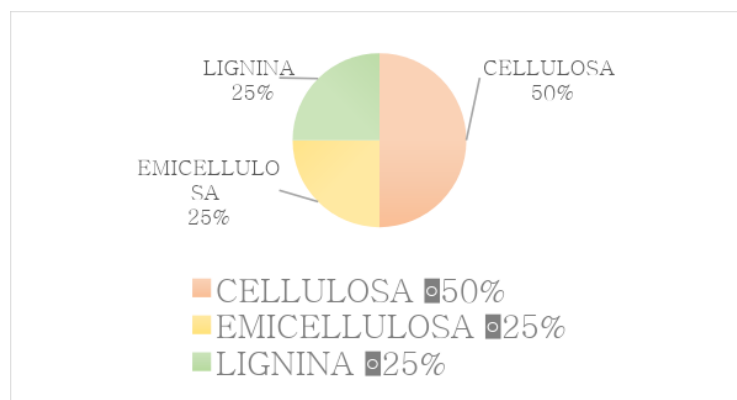


Figura 2- Diagramma della composizione della biomassa lignocellulosica

La composizione della biomassa vegetale varia non solo in base al genere ed alla famiglia da cui deriva ma anche in funzione dell'esposizione solare, della composizione del terreno ed all'area geografica del materiale dove si è sviluppato. In generale, le principali differenze sono dovute al genere della pianta, sia essa una angiosperma od una gimnosperma.

Le gimnosperme sono piante sempreverdi, caratterizzate da foglie aghiformi, prive di fiori, con tronco morbido e morfologia cellulare semplice, unicamente composta da tracheidi.

Le angiosperme, invece, presentano foglie ampie, vanno in contro alla perdita delle foglie nella stagione fredda, hanno durame particolarmente più duro rispetto alle gimnosperme e, dal punto di vista della morfologia tissutale, presentano sia tracheidi che tessuti vascolari.

In *Tabella 1* vengono riportate le sommarie differenze in termini di composizione di angiosperme e gimnosperme. Se le angiosperme sono caratterizzate da un più alto contenuto in polisaccaridi (emicellulose e cellulosa), le gimnosperme, invece, hanno un maggior contenuto in lignina.⁵

*Tabella 1- Variazione percentuale del contenuto di biopolimeri nella biomassa lignocellulosica*²

| | Emicellulosa (%) | Cellulosa (%) | Pentosi (%) | Lignina (%) | Ceneri (%) |
|-------------|----------------------------|-------------------------|-----------------------|-----------------------|----------------------|
| Angiosperme | 71.5 ± 5.7 | 45.4 ± 3.5 | 19.3 ± 2.2 | 23.0 ± 3.0 | 0.5 ± 0.3 |
| Gimnosperme | 64.5 ± 4.6 | 43.7 ± 2.6 | 9.8 ± 2.2 | 28.8 ± 2.6 | 0.3 ± 0.1 |

2.2.1 Cellulosa

La cellulosa rappresenta il più abbondante costituente polimerico e polisaccaridico della biomassa vegetale, variando il suo contenuto dal 40 al 50% in peso.

La cellulosa è un omopolimero lineare formato da unità di cellobiosio ossia il prodotto di disidratazione di due unità β -D-glucopiranosidiche, unite fra di loro per mezzo di legami β 1 \rightarrow 4 glicosidici. L'unità monomerica costituente la cellulosa è rappresentata dal cellobiosio. La struttura è rappresentata in *Figura 6*

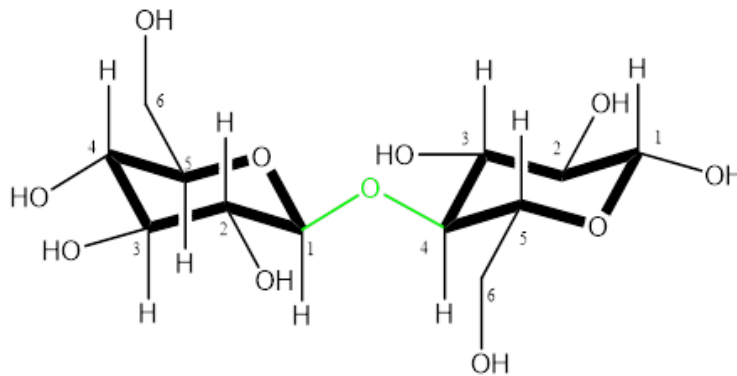


Figura 3- Rappresentazione del legame cellobiosico

Grazie alle sue proprietà di non-tossicità, biocompatibilità e biodegradabilità la cellulosa trova applicazioni in molteplici campi, da quello biomedico (come, ad esempio, la nanocellulosa) a quello del food packaging passando per applicazioni in ambito ambientale.

2.2.2 Emicellulose

Oltre alla cellulosa, nei materiali lignocellulosici sono presenti altri polisaccaridi chiamati emicellulose.⁷ Nonostante il nome suggerisca una certa familiarità con la cellulosa, in realtà si tratta di polimeri strutturalmente diversi. Questi costituiscono tra il 20 e 30% della biomassa.

Le emicellulose sono eteropolimeri costituiti da pentosi ed esosi come D-xilosio, D-mannosio, L-arabinosio, D-glucosio, D-ramnosio e acidi come 4D-O-metil glucuronico,

D-glucuronico, D-galatturonico, Anche la composizione chimica delle emicellulose dipende dal tipo di biomassa. A differenza della cellulosa è molto solubile, il che la rende facilmente soggetta ad attacchi chimici.

Viene riportato in *Tabella 2* il contenuto delle principali emicellulose in angiosperme e gimnosperme.

Tabella 2- Contenuto delle principali emicellulose nel legno di angiosperme e gimnosperme.⁷

| Tipologia | Polisaccaride | % | Composizione | Legame |
|--------------------|---|----------|--|-------------------|
| Gimnosperma | <i>O</i> -Acetil-4- <i>O</i> -metil-glucoron-xilano | 10-35 | β -D-Xilano acido 4- <i>O</i> -Me- α -D-glucoronico <i>O</i> -acetile | 1→4 1→2 |
| Gimnosperma | Glucomannano | 3-5 | β -D-Mannopiranosio β -D-Glucopiranosio | 1→4 1→4 |
| Angiosperma | <i>O</i> -Acetil-4- <i>O</i> -metil-glucoron-xilano | 10-15 | β -D-Xilano acido 4- <i>O</i> -Me- α -D-glucoronico <i>O</i> -Acetile | 1→4 1→2 1→3 |
| Angiosperma | Galacto-glucomannano (solubile in H ₂ O) | 5-10 | β -D-Mannopiranosio β -D-Glucopiranosio α -D-Galattopiranosio <i>O</i> -Acetil | 1→4 1→4 1→6 |
| Angiosperma | Galacto-glucomannano (solubile in sol. alcalina) | 5-10 | β -D-Mannopiranosio β -D-Glucopiranosio α -D-Galattopiranosio <i>O</i> -Acetil | 1→4 1→4 1→6 |

Di seguito, in *Figura 4* viene riportata la struttura di uno xilano.

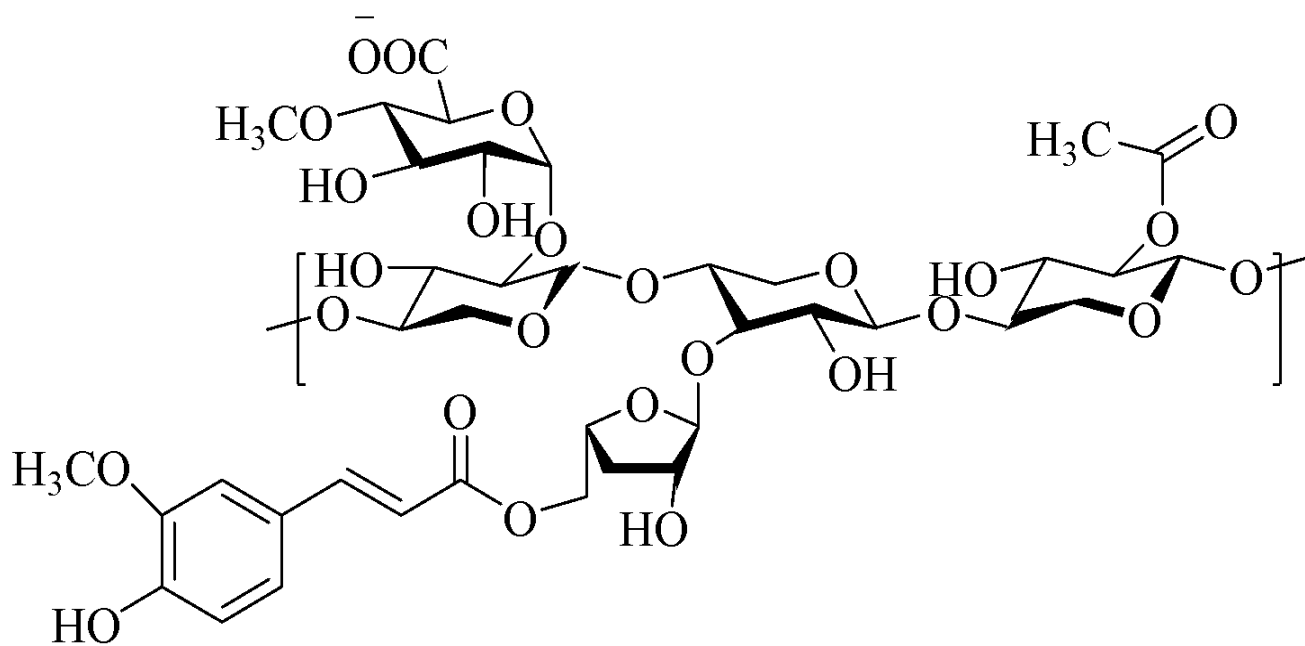


Figura 4- Struttura di uno xilano

2.3 Lignina

La lignina è un composto polifenolico polimerico amorfo con una struttura priva di una struttura primaria definita e che presenta una varietà di legami intermonomerici; il suo nome deriva dal latino “lignum”, significa legno. Essa fornisce struttura e supporto alla vita della pianta.⁸ È presente in tutti i tipi di piante, ed il suo contenuto varia ampiamente tra angiosperme e gimnosperme, andando dal 18 al 33% in peso.

Nell'immagine successiva viene riportata una struttura orientativa della lignina comprendente i più frequenti legami intermonomerici e le più abbondanti unità monomeriche di cui è costituita.

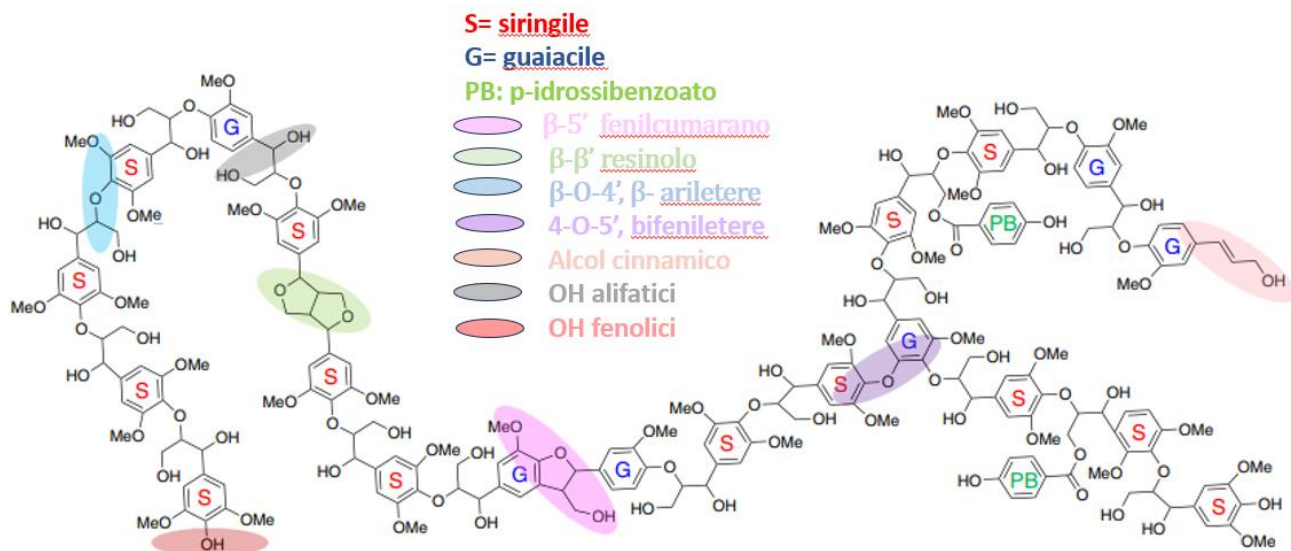
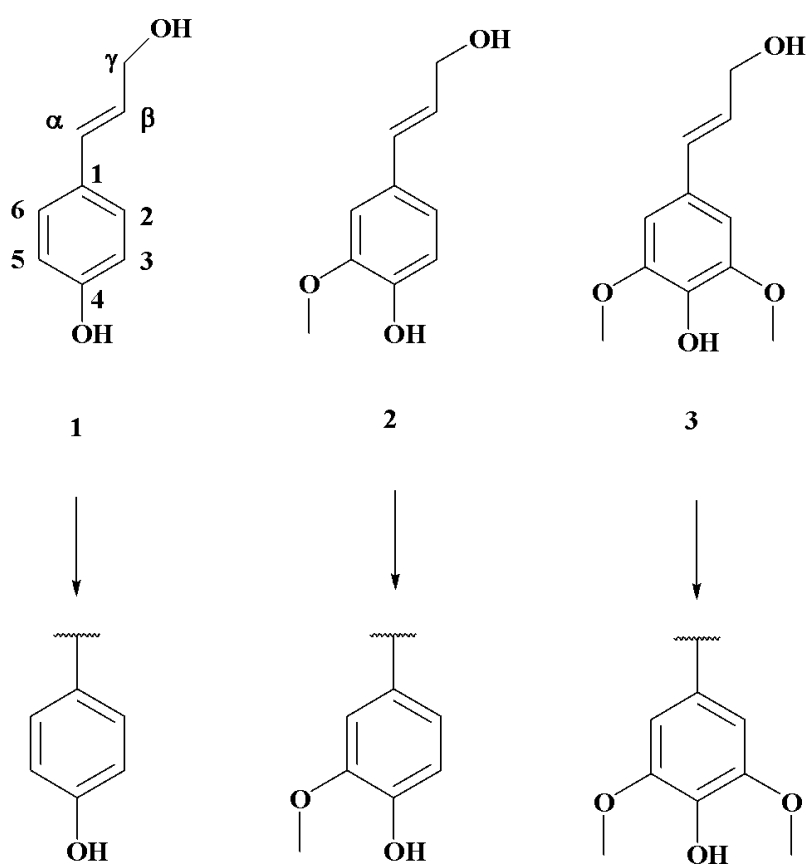


Figura 5- Struttura generale della lignina e relativi legami fondamentali⁹

2.3.1 La struttura chimica della lignina

La lignina risulta dalla polimerizzazione end-wise di tre alcoli fenil-propanoici, detti monolignoli: l'alcol coniferilico (alcol 3-metossi-4-idrossicinammilico), *p*-cumarilico (alcol 4-idrossicinammilico) e sinapilico (alcol 3,5-dimetossi-4-idrocinnammilico) mostrati in *Figura 6*. Ciò che differenzia non solo la struttura, ma anche la reattività di questi tre composti è il numero di gruppi metossilici (-OCH₃) presenti sull'anello aromatico.



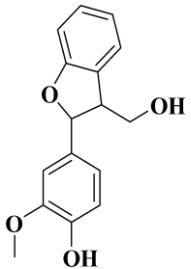
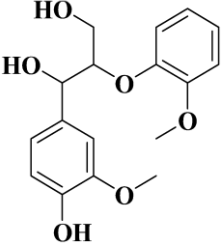
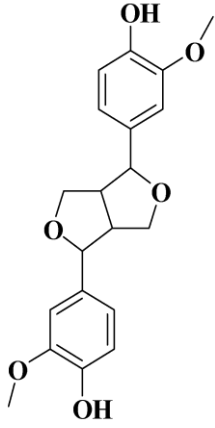
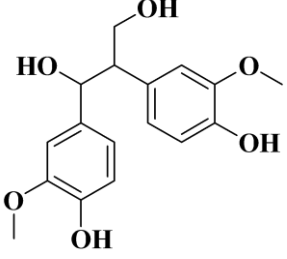
*Figura 6- Strutture chimiche dei monolignoli 1, Alcool *p*-cumarilico; 2, Alcool coniferilico; 3, Alcool sinapilico e relativi residui nella struttura lignocellulosica (rispettivamente unità *p*-idrossifeniliche, guaiaciliche e siringiliche).*

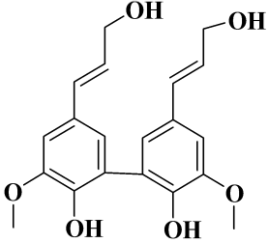
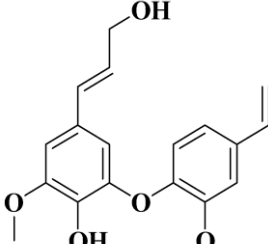
In base alla tipologia di biomassa lignocellulosica, la composizione in monolignoli della lignina varia.

Infatti, se la lignina di gimnosperme contiene solo derivati dell'alcol coniferilico (unità guaiaciliche), la lignina di angiosperma sarà formata in quantità significative anche da alcol sinapilico mentre quella delle piante annuali contiene anche unità *p*-idrossifeniliche.

Sebbene la polimerizzazione *end-wise* della lignina non risulti in una struttura regolare, essa porta alla formazione di caratteristici legami, detti illustrati in *Figura 7* che si ripetono in maniera casuale. Questi *bonding patterns* uniscono molecole di monolignoli sia attraverso legami singoli carbonio-carbonio (alchilico – alchilico od alchilico – arilico) o eteri (alchile - O – alchile od alchile – O – arile), più di 2/3 dei legami sono di tipo etero, mentre la restante parte sono legami di tipo carbonio-carbonio, nello specifico sono β -O-4', β -5', β -1', 5-5', α -O-4', 4-O-5' e β - β '. Il legame maggiormente presente è il β -O-4' e costituisce circa per il 45-65% dei legami totali. In generale, la lignina da angiosperma ha un contenuto di legami β -O-4' circa 1,5 volte maggiore rispetto alla lignina da gimnosperme.¹⁰

Tabella 3- Legami tipici nella lignina in legni di gimnosperme

| Modello di legame | Nome del modello di legame | Gimnosperma % |
|---|---|---------------|
|  | <p>Fenilcumarano</p> <p>β-5'</p> | <p>9-12</p> |
|  | <p>Guaiacil-glicerol-β-guaiacil etere</p> <p>β-O-4'</p> | <p>45-50</p> |
|  | <p>Pinoresinolo</p> <p>β-β'</p> | <p>2-6</p> |
|  | <p>β-guaiacil guaiacil-glicerolo</p> <p>β-1'</p> | <p>1-10</p> |

| | | |
|---|------------------------------------|-------------|
|  | <p>Bifene</p> <p>5-5'</p> | <p>5-25</p> |
|  | <p>Diaryl- etere</p> <p>4-O-5'</p> | <p>4-8</p> |

Considerando ad esempio la formazione dell'unità guaiacilica β -O-4', il processo parte dall'attivazione dell'alcol coniferilico con formazione del radicale coniferilico:



Figura 8- Conversione enzimatica dell'alcol coniferilico a radicale

Il radicale generato è stabilizzato per risonanza sia sull'anello aromatico che sulla parte alifatica:

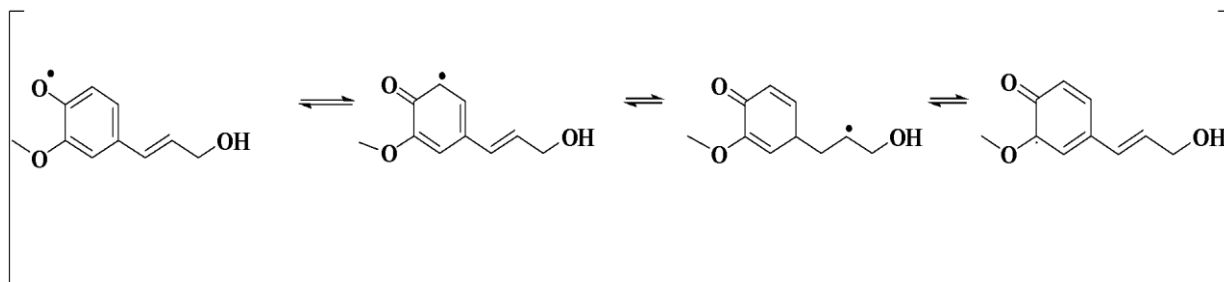


Figura 9- Stabilizzazione del radicale

Il *quinone-methide*, accoppia con un nuovo radicale arilossido da alcol coniferilico, generando un legame etereo alcol-arilico.

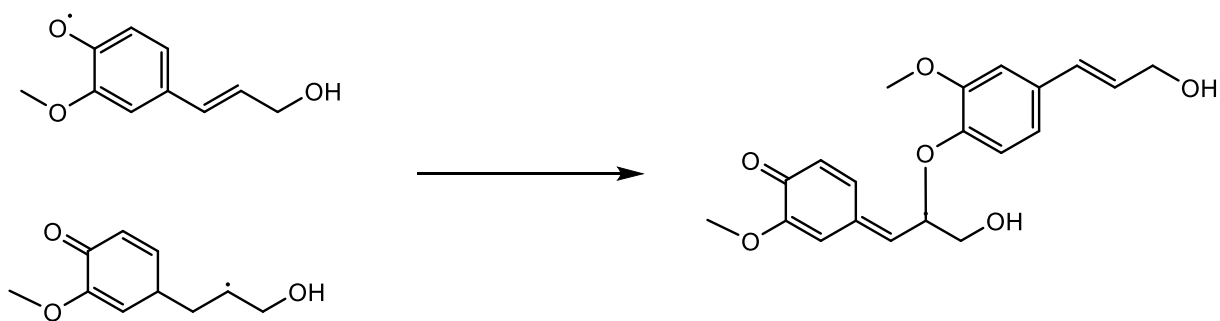


Figura 10- Coupling radicalico

Infine, il prodotto di accoppiamento subisce attacco nucleofilo da parte di una molecola d'acqua sul carbonio in α alla struttura chinonica; questo introduce un ossidril e, contemporaneamente, permette di ripristinare l'aromaticità dell'anello.

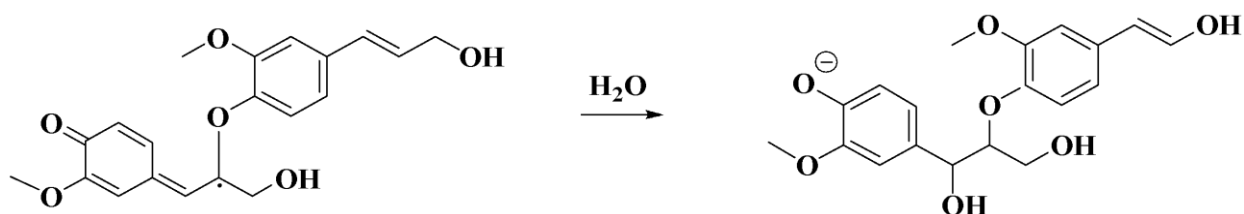


Figura 11 -Quenching del coupling radicalico causato dall'acqua

2.3.2 Isolamento della lignina

Per studiare i legami fra i monolignoli, nonché le proprietà macromolecolari della lignina è necessario procedere con la sua estrazione dalla biomassa seguita poi dalla caratterizzazione attraverso tecniche spettroscopiche magnetiche NMR, *wet-chemistry* come la DFRC (*derivatisation followed by reductive cleavage*) e cromatografiche (cromatografia ad esclusione dimensionale).

L'isolamento della lignina dalla biomassa rappresenta forse l'operazione più complessa nel suo studio. Infatti, per via dello stretto legame tra essa ed i polisaccaridi presenti, è assai difficile separare la lignina senza causarne variazioni strutturali, siccome i processi separativi possono indurre sia la rottura di legami chimici, specialmente eterei, che innescare processi di condensazione e ripolimerizzazione.

Alla luce di questo, sono stati sviluppati negli ultimi due secoli diversi metodi per isolare la lignina dal legno attraverso metodi biologici con funghi e batteri, metodi fisici attraverso, ad esempio, l'estrusione, la pirolisi, le microonde e gli ultrasuoni; infine, attraverso metodi chimici attraverso l'acidolisi, liquidi ionici e solventi organici.¹²

I fattori che caratterizzano i metodi chimici di isolamento sono il pH e la temperatura con cui viene eseguito il processo, l'abilità solvatante del mezzo impiegato, la durata del processo, ed il metodo di separazione del prodotto finale.

In generale, i processi sono stati recentemente catalogati in quattro gruppi:

- Metodi basati sull'idrolisi dei carboidrati;
- Metodi organosolv;
- Metodi di isolamento in condizioni blande;
- Metodi industriali.

Le metodologie dei metodi principali sono riportate nelle *Tablelle 4,5,6 e 7*

Tabella 4- Metodi basati sull'idrolisi dei carboidrati.

| Tipologia | Descrizione |
|-----------------------------------|--|
| Lignina Klason ¹³ | Il legno essiccato viene idrolizzato a temperatura ambiente con acido solforico al 72% per 2 ore e, successivamente, bollito in acido diluito per completare la rimozione dei carboidrati. |
| Lignina Willstätter-Zechmeister | La componente polisaccaridica del legno viene idrolizzata previa trattamento con acido cloridrico concentrato saturato da HCl gassoso a temperatura ambiente. |
| Lignina Cuprammonio ¹⁴ | Il legno viene preidrolizzato con acido solforico diluito e poi trattato con un complesso di idrossido di rame(II) e ammoniaca che permette la rimozione dei carboidrati idrolizzati |

Tabella 5- Metodi basati sul metodo organosolv.

| Tipologia | Descrizione |
|--|--|
| Lignina <i>p</i> -diossano ¹⁵ | Il legno viene fatto reagire a riflusso con una soluzione 0.2 M di acido cloridrico soluzione in 9:1 diossano/acqua. I polisaccaridi vengono idrolizzati dall'azione dell'acido ed il materiale non polisaccaridico viene disciolto grazie al <i>p</i> -diossano. Dalla soluzione, infine, viene precipitata la lignina per diluizione in acqua. |
| Lignina alcol ¹⁶ | Il legno viene posto a riflusso con acido cloridrico 0.2 M in etanolo anidro. La componente ligninica liberata dai polisaccaridi viene disciolta dall'alcol e poi precipitata in acqua. |

| | |
|---------------------------|---|
| Lignina DES ¹⁷ | Il legno essiccato in forno ed estratto con solvente viene posto a reflusso con glicole etilenico, cloruro di colina, acido ossalico. |
|---------------------------|---|

Tabella 6- Metodi che preservano la struttura.

| Tipologia | Descrizione |
|------------------|--|
| 18 | Il legno finemente macinato viene estratto con 96/4 <i>p</i> -diossano/acqua per settimane. La concentrazione della soluzione porta all'ottenimento della lignina. |
| 19 | Il legno macinato viene messo in incubazione con enzima Viscozyme. |

Tabella 7- Metodi industriali

| Tipologia | Descrizione |
|--------------------------------------|---|
| Lignina alcalina ²⁰ | Il legno in scaglie è trattato con idrossido di sodio al 5% (m/V) a 130-170°C. La lignina risultante, depolimerizzata, viene isolata per acidificazione della miscela di reazione. |
| Lignina Kraft ²¹ | Il legno viene trattato con una miscela di idrossido/solfuro di sodio a 130-170°C. Anche qui, la lignina depolimerizzata e ripolimerizzata presente in soluzione, viene isolata per acidificazione. |
| Lignina lignosulfonati ²⁰ | Il legno è trattato con sodio, calcio o magnesio solfito/bisolfito in varie condizioni di pH a 130-170°C. L'isolamento della lignina avviene poi per concentrazione a secchezza. |

Le lignine organosolv vengono isolate tramite una prima fase di riflusso del legno in solventi come etanolo, metanolo, *p*-diossano ed etanolamina. Diversamente dai metodi basati sull'idrolisi dei carboidrati questo tipo di processo non causa importanti modifiche alla struttura della lignina, tuttavia, si possono verificare fenomeni di idrolisi o di ossidazione. Le metodiche che prevedono l'isolamento di lignine EMAL riescono ad isolare la lignina nella sua struttura "nativa" ma con rese decisamente basse e solitamente questi protocolli non sono in grado di eliminare tutti i carboidrati presenti. La lignina Kraft deriva dal processo al solfato, per questi processi sono necessarie temperature comprese tra 130 e 170°C e la lignina viene disciolta in condizioni fortemente alcaline. L'acidificazione delle soluzioni alcaline di lignina avviene mediante l'uso di acidi inorganici forti o tramite gorgogliamento di anidride carbonica. A causa delle estreme condizioni del pulping ²²con il solfato, le lignine tecniche sono caratterizzate da una struttura fortemente modificata rispetto alla lignina nativa.

2.3.3 Applicazioni della lignina

La lignina kraft è un sottoprodotto dell'industria della pasta di legno e della carta. La produzione annua di lignina kraft è di circa 50-70 milioni di tonnellate²³. Questo volume rappresenta un'importante risorsa che può essere valorizzata in diversi modi.

Tra le principali applicazioni della lignina kraft si possono annoverare:

- Biocompositi: la lignina può essere utilizzata per migliorare le proprietà fisiche e termiche di materiali fibrosi naturali, come fibre di legno, canapa o lino. I biocompositi a base di lignina trovano applicazione in diversi settori, tra cui l'edilizia, l'automotive e l'imballaggio.²⁴
- Bio-olio: la lignina può essere trasformata in bio-olio mediante processi termochimici. Il bio-olio è una miscela di composti organici che può essere utilizzata come combustibile o come materia prima per la produzione di biocarburanti e prodotti chimici.²⁵
- Benzene, toluene e xilene (BTX): la lignina può essere utilizzata per produrre BTX, una miscela di composti aromatici che sono utilizzati nella produzione di una vasta gamma di prodotti chimici, tra cui resine, fibre sintetiche e solventi.²⁶
- Alcoli a basso peso molecolare per l'industria dei poliuretani: la lignina può essere utilizzata per produrre polioli, che sono i monomeri dei poliuretani. I poliuretani sono utilizzati in una vasta gamma di applicazioni, tra cui l'isolamento, l'imballaggio e l'edilizia.²⁷
- Resine: la lignina può essere utilizzata per produrre resine fenoliche, che sono utilizzate in una vasta gamma di applicazioni, tra cui l'industria automobilistica, l'edilizia e l'imballaggio.²⁸
- Nanomateriali: la lignina può essere utilizzata per produrre nanomateriali, come nanofibre e nanoparticelle di carbonio. I nanomateriali a base di lignina presentano una serie di potenziali applicazioni, tra cui l'elettronica, la biomedicina e l'industria dei rivestimenti.

- Nanoparticelle a base di lignina (LNP). Le nanoparticelle a base di lignina (LNP) sono un tipo di nanomateriale che presenta una serie di potenziali applicazioni. Le LNP sono ottenute mediante la scissione della lignina in nanoparticelle di dimensioni inferiori a 100 nm. Le LNP presentano una serie di caratteristiche uniche, tra cui:²⁹
 - Aromaticità: le LNP sono costituite da unità ripetitive di fenoli e idrocarburi, che conferiscono loro proprietà chimiche e fisiche uniche.
 - Autoagglomerazione: le LNP hanno la tendenza ad aggregarsi spontaneamente, formando strutture tridimensionali.
 - Compatibilità: le LNP sono compatibili con una vasta gamma di materiali, tra cui polimeri, ceramiche e metalli.

Scopo della tesi

La chimica degli ultimi decenni ha l'obiettivo di valorizzare la biomassa di scarto nell'ottica di un'economia il più circolare possibile. La lignina rappresenta un biopolimero di scarto molto indagato negli ultimi decenni per varie ragioni quali: un'alta biodisponibilità rappresentando essa il 30% della massa legnosa ed una vasta applicabilità in diversi settori. Data la sua natura eterogenea, risulta assai complesso riuscire a isolarla senza alterarne la struttura. tuttora ad oggi esistono protocolli basati su processi acidi ed alcalini in grado di apportare modifiche più o meno massicce alla struttura macromolecolare della lignina.

Il focus di questo lavoro di tesi è un confronto strutturale di lignine ottenute mediante diverse procedure di estrazione.

Le caratterizzazioni che sono state ritenute idonee in questo studio sono di spettroscopia di risonanza magnetica nucleare come ^{31}P NMR e HSQC; spettroscopia infrarossa FT-IR, DFRC, GC-MS pirolisi, e GPC.

Parte sperimentale

4.1 Materiali

p-diossano, puriss.p.a (*Apollo Scientific*); 1-cloro-4,4',5,5'-tetrametil-1,3,2-diossafosfolano, preparato; acetato di sodio, puriss.p.a (*Sigma Aldrich*); acetil bromuro, >98% (*Chemika Fluka*); acido acetico, puriss.p.a (*VWR*); acido cloridrico 37%, (*WVR*); acido ossalico anidro, 98 %(*Thermo Scientific*); acido solforico, 95,0-97,0% (*Sigma Aldrich*); ammoniaca, 30-22% (*Sigma Aldrich*); Ammonio cloruro, $\geq 99,5$ (*Sigma Aldrich*); anidride acetica, puriss.p.a (*Fluka Analytical*); bromuro di potassio, 99,9 %, (*Sigma Aldrich*); cloroformio Deuterato, 99,8 %, (*Sigma Aldrich*); cloruro di colina, ≥ 98 % (*Sigma Aldrich*); cloruro di colina, ≥ 99 % (*Sigma Aldrich*); colesterolo, $\geq 99\%$, (*Sigma Aldrich*); diclorometano, puriss, p.a (*Sigma Aldrich*); dimetilsolfossido, $\geq 99,7$ (*Sigma Aldrich*); etilmetil imidazolio, >99% (*Sigma Aldrich*) glicole etilenico, $\geq 99,5\%$ (*VWR*); Loblolly Southern Pine; metanolo, $\geq 99,8\%$ (*Sigma Aldrich*); piridina, 99,8% (*Sigma Aldrich*); sodio idrossido, $\geq 98\%$ (*Sigma Aldrich*); sodio solfato anidro, 99,0-100,5% (*Sigma Aldrich*); solfato d'ammonio, >99%, (*Sigma Aldrich*); tetracloruro di carbonio, puriss.p.a (*Riedel-de Haen*); toluene, $\geq 99,7\%$ (*Sigma Aldrich*); Viscozyme L, (*Sigma Aldrich*); zinco, puriss. p.a, (*J.I. Baker*).

4.3 Preparazione lignina EMAL ³¹

1L di soluzione acquosa buffer a pH 5.5 è stata preparata aggiungendo 4.1 g di acetato di sodio e 0.57 mL di acido acetico.

20.069 g di legno estratto vengono ulteriormente macinati con un mulino a sfere ottenendo un materiale con granulometria inferiore a 45 mesh. Il prodotto polverulento è trasferito in un reattore incamiciato collegato ad un bagno termostato a 50 °C; 500 mL di soluzione tampone a pH 5.5 sono trasferiti nel reattore con 20 mL di enzima Viscozyme L. Il sistema è mantenuto sotto agitazione meccanica per 5 giorni.

La miscela è stata centrifugata (5000 rpm per 30 minuti) per tre volte isolando il legno idrolizzato.

Il legno idrolizzato viene lavato accuratamente con aliquote di acqua deionizzata è stato posto in stufa a 40 °C per 24 ore.

Il prodotto secco è trasferito in un pallone da 1 L, disperso in 600 mL di acido cloridrico 0.01 M in *p*-diossano/acqua (9:1) e posto a reflusso per un'ora sotto atmosfera di azoto.

Dopo raffreddamento, la miscela è filtrata su *Büchner*. Il filtrato è neutralizzato con NaHCO₃ e concentrato a 50°C a pressione ridotta a circa 50 mL risultando in un composto molto denso ed aranciato. Quest'ultimo è gocciolato in 1 L di acqua acidificata (pH 4) sotto vigorosa agitazione risultando nella precipitazione della lignina.

La sospensione viene fatta coagulare nottetempo a 5°C; è quindi centrifugata per due volte (30 minuti per 5000 rpm) per precipitare la lignina. Quest'ultima è lavata ripetutamente con acqua. Il materiale umido è poi liofilizzato per tre giorni, ottenendo un composto polverulento marrone chiaro che poi è stato seccato completamente in stufa da vuoto a 40°C per una notte.

Lo schema di estrazione viene riportato in *Figura 13*.

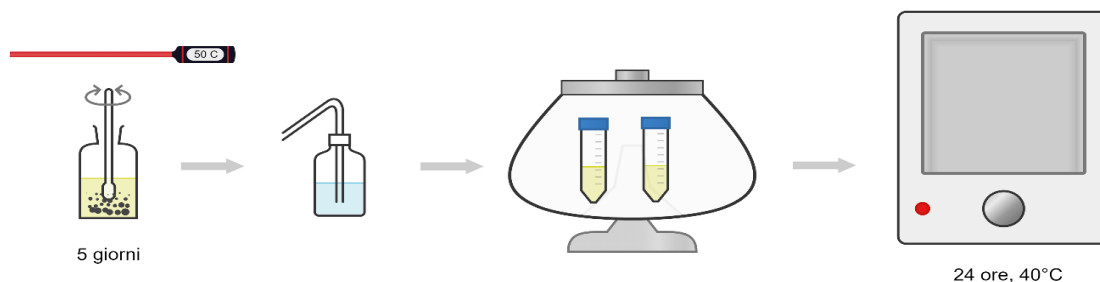


Figura 13 – Schema estrazione lignina EMAL

4.5 Preparazione lignina da acidolisi in *p*-diossano²¹

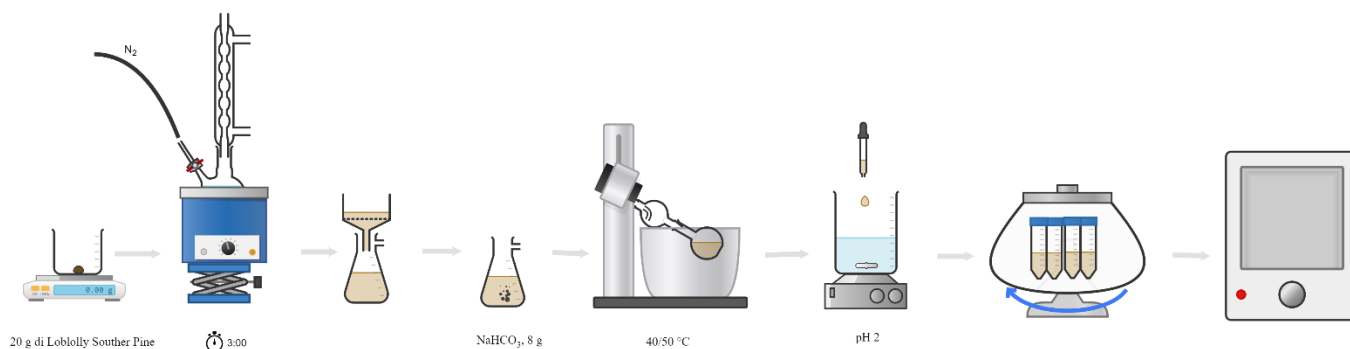
20.13 g di legno estratto con miscela toluene/etanolo (2:1) sono trasferiti in un pallone da 1L a due colli. In un collo è innestato un rubinetto per il flusso di azoto nel pallone, nell'altro un refrigerante di Allihn terminante con in una trappola ad olio.

È preparata una soluzione di acido cloridrico 0.2 M in miscela *p*-diossano/acqua 9:1 mL di quest'ultima sono stati aggiunti nel pallone sotto flusso di azoto.

La miscela viene posta a riflusso per 2 ore poi, dopo raffreddamento, è filtrata su *Büchner*. Il filtrato è neutralizzato con NaHCO_3 e concentrato a 50°C a pressione ridotta a circa 50 mL risultando in un composto denso di colore rosso scuro. Quest'ultimo è gocciolato in 1 L di acqua acidificata (pH 4) sotto vigorosa agitazione risultando nella precipitazione della lignina.

La sospensione è fatta coagulare nottetempo a 5°C ; è quindi centrifugata per due volte (5000 giri al minuto per 30 minuti) per precipitare la lignina. Quest'ultima è lavata ripetutamente con acqua. Il materiale umido è poi liofilizzato per tre giorni, ottenendo un composto polverulento marrone chiaro che poi è stato seccato completamente in stufa da vuoto a 40°C per una notte.

Lo schema di estrazione viene riportato in *Figura 15*.



*Figura 15 – Schema d'estrazione con *p*-diossano*

4.6 Preparazione lignina organosolv³³

Per condurre questa estrazione è stata utilizzata una soluzione 0.2 M di acido cloridrico in etanolo preparata facendo gorgogliare acido cloridrico gassoso, prodotto dalla reazione di cloruro sodico con acido solforico concentrato, in etanolo assoluto.

Lo schema di estrazione viene riportato in *Figura 16*.

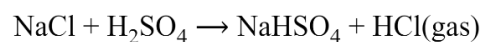
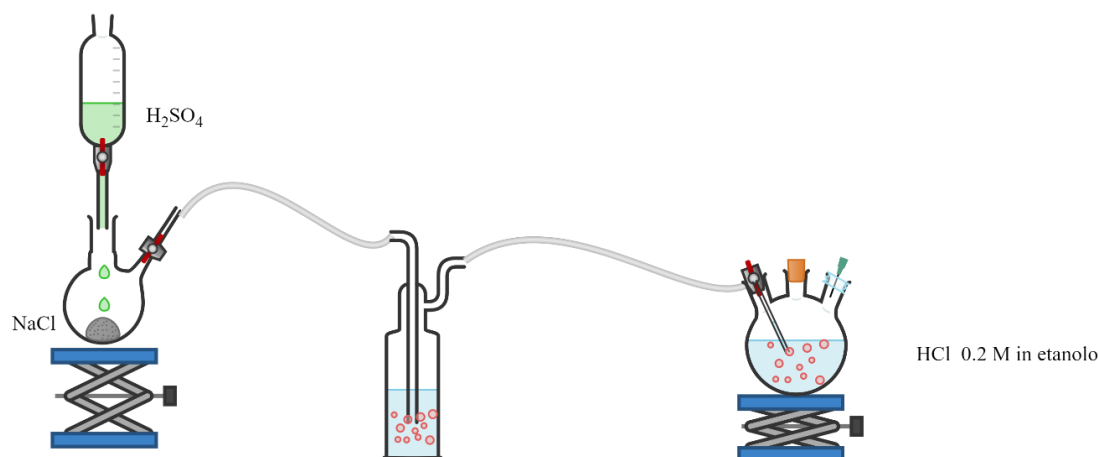


Figura 16 – Schema realizzazione soluzione di Etanolo/HCl 0.2 M.

Il titolo della soluzione etanolica di acido cloridrico così prodotta è stato determinato volumetricamente con idrossido di sodio 0.1 M. La risultante soluzione è stata diluita con altro etanolo assoluto di modo da ottenere una concentrazione finale pari a 0.2 M.

15.00 g di legno estratto sono posti in un pallone da 1 L a 3 colli munito di agitatore meccanico, una coda collegata alla linea d'azoto ed ad un condensatore di Allihn terminante in una trappola ad olio. Sotto flusso di azoto, sono trasferiti nel pallone 600 mL di soluzione 0.2 M di acido cloridrico in etanolo assoluto. La miscela è poi posta a riflusso in atmosfera d'azoto per 48 ore.

Dopo aver raffreddato la miscela di reazione, quest'ultima è filtrata su Büchner; il filtrato è neutralizzato con NaHCO_3 e concentrato a pressione ridotta a 40°C ad un volume finale di circa 50 mL.

La risultante soluzione densa ed ambrata viene gocciolata in 1 L di acqua distillata acidificata con acido cloridrico (pH 4) sotto vigorosa agitazione. La risultante dispersione è fatta coagulare notte tempo. Infine, la lignina precipitata è isolata tramite doppia centrifugazione (5000 giri al minuto per 30 minuti), lavata ripetutamente con acqua. Il materiale umido è liofilizzato per tre giorni, ottenendo un composto polverulento grigio scuro che poi è stato seccato completamente in stufa da vuoto a 40°C per una notte.

4.7 Preparazione lignina cuprammonio³⁴

Per l'isolamento della lignina al cuprammonio è stata inizialmente preparata una soluzione cuproammoniacale contenente 11.35 g di rame metallico in polvere in 750 mL di ammoniaca al 30%.

Questa soluzione è stata ottenuta gorgogliando aria secca nella miscela rame/ammoniaca per quattro ore.



Figura 17 – Foto dell' avanzamento dell' ossidazione del rame

15.06 g di legno precedentemente estratti con miscela toluene/etanolo sono stati ulteriormente polverizzati utilizzando un mulino a sfere risultando in un materiale con pezzatura inferiore a 45 mesh. Il legno risultante è fatto bollire in un pallone da 500 mL per 3 ore in 250 mL di una soluzione al 0.2 M di acido solforico.

Dopo il trattamento acido, il materiale idrolizzato e filtrato viene trasferito in una bottiglia con 250 mL di soluzione cuprammoniacale. La dispersione è agitata per 36 ore avendo cura che non entri aria. Il materiale risultante è filtrato, ed i trattamenti acido e cuprammoniacale sono ripetuti per altre quattro volte.

Il materiale risultante è lavato ripetutamente e liofilizzato per tre giorni, risultante in un prodotto giallo chiaro. Quest'ultimo è seccato in stufa sottovuoto a 40°C per una notte.

Lo schema di estrazione viene riportato in *Figura 18*.

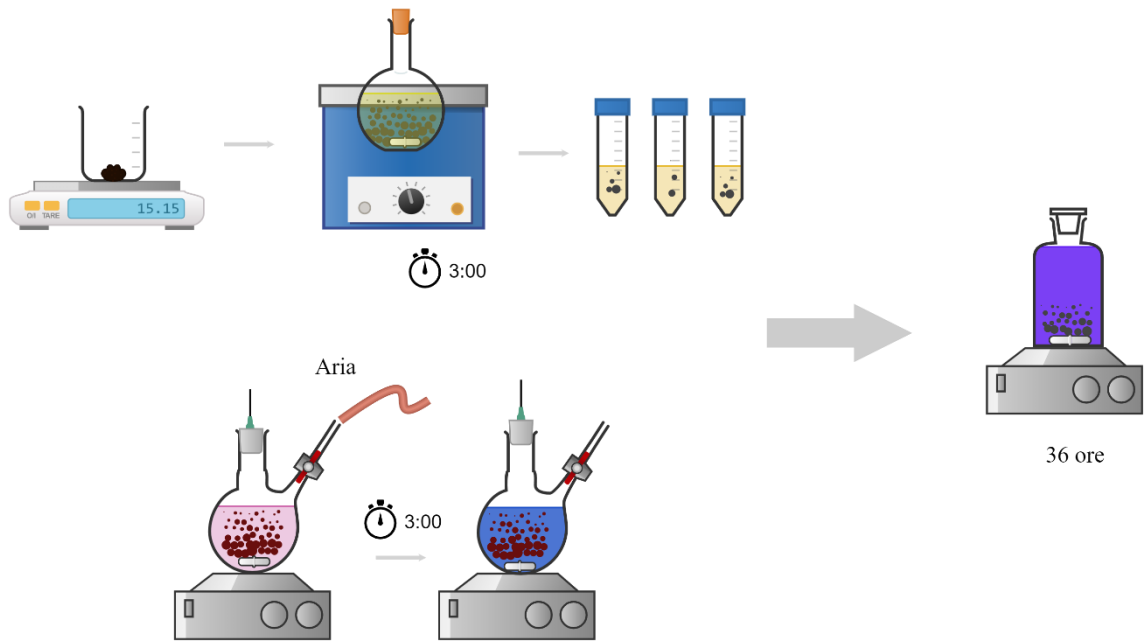


Figura 18 – Schema d' estrazione della lignina cuprammonio

4.8 Preparazione lignina Kraft²⁵

In un becher da 500 mL sono posti 50.06 g di legno non estratto con 57.3 mL di una soluzione di sodio idrossido (192 g L^{-1}) e 33,3 mL di una soluzione solfuro di sodio nonaidrato (329 g L^{-1}).

La miscela è diluita con 209 mL di acqua distillata ed il tutto è caricato in autoclave di acciaio inossidabile. Mantenendo la miscela sotto agitazione magnetica, l'autoclave è scaldata a $180 \text{ }^\circ\text{C}$ per 5 ore.

Dopo aver raffreddato l'autoclave, la miscela di reazione è filtrata su Büchner. Il filtrato è neutralizzato gorgogliando CO_2 gassosa.

La lignina è poi precipitata quantitativamente dalla miscela di reazione tramite acidificazione con H_2SO_4 al 20%.

La dispersione acida è centrifugata due volte (5000 rpm per 15 minuti) isolando la lignina. Quest'ultima viene lavata ripetutamente con acqua; il materiale umido è liofilizzato per tre giorni, ottenendo un composto polverulento grigio scuro che poi è stato seccato completamente in stufa da vuoto a 40°C per una notte.

L'intero processo è stato schematizzato in *Figura 19*.

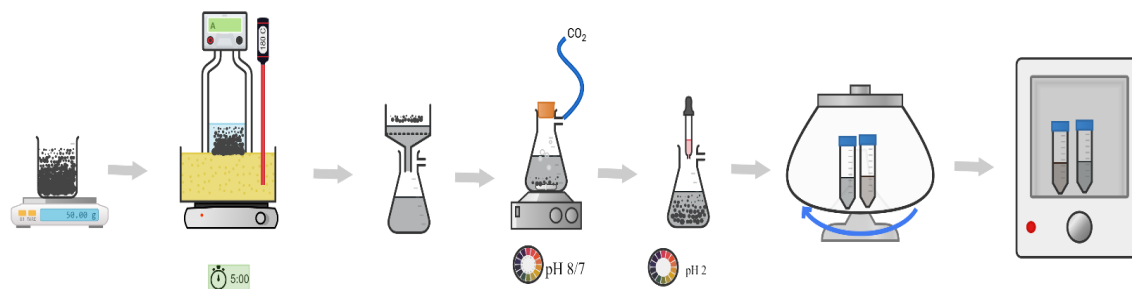


Figura 19 – Schema dell'estrazione lignina Kraft

4.9 Determinazione della lignina nel campione di legno (metodo secondo Klason)¹³

0.1971 g di legno estratto e finemente macinato con mulino a sfere sono posti in un pallone da 100 mL ed umettati con 2 mL di acido solforico al 72%. La miscela è lasciata a temperatura ambiente per un'ora. Sono aggiunti successivamente 54 mL di acqua distillata ed il sistema è stato posto a riflusso per 3 ore. La miscela di reazione è poi filtrata a caldo su imbuto di Gooch precedentemente pesato; il precipitato è lavato ripetutamente con piccole aliquote d'acqua distillata.

Il filtro è seccato in stufa a 80 °C per 72 ore. Successivamente, dopo aver raffreddato in essiccatore il filtro, quest'ultimo è nuovamente pesato. Il contenuto di lignina nel campione di legno è determinato per differenza rispetto alla massa del campione trattato. L'intero processo è stato schematizzato in *Figura 20*.

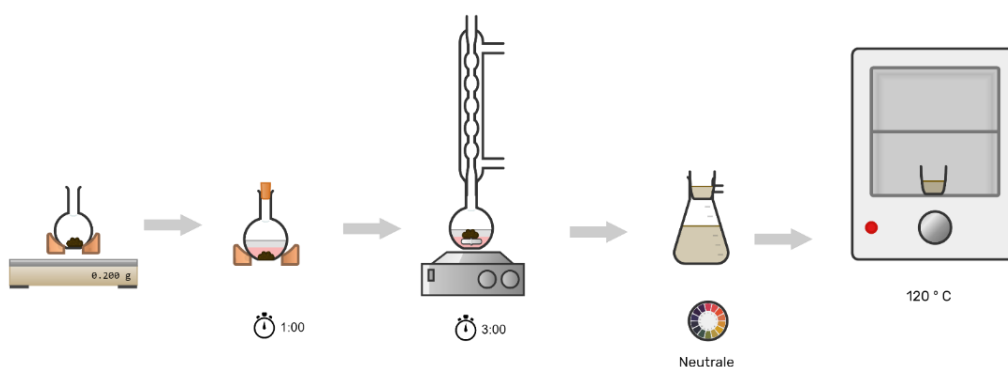


Figura 20 – Schema quantificazione lignina Klason

4.10 Determinazione del contenuto dei gruppi ossidrilici nei campioni tramite ^{31}P NMR³⁵

Gli spettri ^{31}P NMR sono stati registrati impiegando uno spettrometro *Bruker Avance III HD Ascend*TM 400 operante a 162 MHz.

Per la preparazione dei campioni da analizzare tramite ^{31}P NMR si è proceduto nel modo seguente: circa 100 mg di campione sono stati essiccati per tutta la notte in un forno a vuoto a 40 °C.

In una fiala da 20 mL è stata preparata una miscela di solventi piridina anidra/cloroformio deuterato in rapporto 1,6:1 (v/v); ad essa sono aggiunti 5-8 g di setacci molecolari.

Successivamente, in un vial da 2 mL, è stato preparato lo standard con una soluzione 0,1 M di cromo(III) acetilacetato (circa 10 mg) e di standard interno (77,3 mg di colesterolo).

Sono pesati accuratamente 30 mg di lignina e trasferiti in un vial da 1,8 mL.

Successivamente, sono aggiunti 100 μL di soluzione standard e 500 μL di miscela di solvente. Dopo aver sciolto completamente la lignina, sono aggiunti 100 μL di reattivo al fosforo; il campione è trasferito in un tubo per spettroscopia NMR e lo spettro è acquisito entro 2 ore dall'aggiunta.

I parametri di acquisizione impiegati sono riportati in *Tabella 8*.

I dati NMR sono stati elaborati con *MestreNova* (versione 8.1.1, *Mestrelab Research*).

Tabella 8- programma di acquisizione dello spettro ^{31}P

| | |
|-----------------------|-----------------|
| PROGRAMMA IMPULSI | Zgig |
| NUCLEO | ^{31}P |
| LARGHEZZA SPETTRO | 100 p.p.m. |
| TEMPO DI ACQUISIZIONE | -0.8 s |
| TEMPO DI RILASSAMENTO | >10 s |
| SCANSIONI | 64 o più |
| CENTRO SPETTRO | 140 p.p.m. |

4.11 Preparazione campione HSQC³⁶

Gli spettri HSQC sono stati registrati impiegando uno spettrometro *Bruker Avance III HD Ascend*TM 400.

In un vial da 1,5 mL vengono posti 200 mg di campione ed un'ancoretta; contemporaneamente in un vial da 1,5 mL è stata preparata una miscela 1:1 di piridina deuterata e dimetilsolfossido deuterato (0,6 mL di piridina deuterata con 0,6 mL di dimetilsolfossido deuterato).

0,6 mL di questa miscela sono stati aggiunti al vial contenente il campione e il tutto viene mantenuto sotto agitazione per una notte. Il campione è trasferito in un tubo per spettroscopia NMR; gli spettri sono stati acquisiti a 303 K. Sono state acquisite 32 scansioni ottenendo una matrice composta da 256×2048 punti.

I dati NMR sono stati elaborati con Mestrelab Research (versione 8.1.1, Mestrelab Research)

4.12 Preparazione campioni DFRC¹⁹

L'acetilbromuro in acido acetico (1:9 v/v; 12,5 mL) è stato aggiunto a 50 mg di lignina. La miscela di reazione è stata agitata a 50 °C per 3 h. Il solvente è stato poi evaporato a secco sotto pressione ridotta ed il residuo è stato disciolto in 12,5 mL di miscela solvente di *p*-diossano/acido acetico/acqua 5:4:1 v/v/v. Sono stati aggiunti 250 mg di polvere di zinco e la miscela è stata agitata a temperatura ambiente per 30 minuti. Il composto di reazione è stato poi trasferito su un pallone da 100 mL con 50 mL di una soluzione saturata di cloruro di ammonio. Lo strato acquoso è stato estratto tramite imbuto separatore con ulteriore diclorometano (2 × 10 mL). Gli estratti combinati sono stati evaporati a secco sotto pressione ridotta e posti nell'essiccatore per 24 ore.

4.13 Preparazione campioni FT-IR³⁷

3 mg di campione sono stati finemente macinati in un mortaio d'agata con 300 mg di bromuro di potassio di grado spettroscopico. Gli spettri sono stati acquisiti con uno spettrometro FT-IR *Perkin Elmer Spectrum One*. I seguenti parametri d'acquisizione sono stati impiegati: intervallo di scansione 4000-450 cm⁻¹, 16 scansioni, risoluzione: 2 cm⁻¹.

4.14 Preparazione campioni GPC³⁸

Le analisi cromatografiche sono state condotte su un sistema HPLC *Shimadzu* con colonna "PL gel MiniMIX-C (Agilent)". Come fase mobile è stato utilizzato dimetilsolfossido per HPLC contenente 0.1% di LiCl. Si è tenuta per tutte le prove un flusso costante di 0.5 mL/min e l'eluizione è stata svolta ad una temperatura di 70°C.

La retta di calibrazione è stata ottenuta impiegando standard di polistirene solfonato nel range 2.6 – 4.3 kDa opportunamente acidificati. I campioni iniettati sono stati sciolti in DMSO e filtrati su membrana di PTFE con pori di 0.2 µm.

I campioni di lignina sono sciolti in dimetilsolfossido per HPLC con una concentrazione finale di 0.2 mg/mL.

Tutti i campioni vengono poi filtrati con filtri da 0.2 µm e iniettati con siringa di vetro Hamilton da 25 µL.

4.15 Campioni gas-massa pirolisi³⁹

Per quest'analisi è stato utilizzato un pirolizzatore Multi-Shot EGA/3030 D con il seguente programma di temperatura: 40°C per due minuti con gradiente di temperatura 16 °C/min fino a raggiungere i 600 °C. Il sistema è composto da un gas cromatografo Thermo scientific Trace 1300, elio come gas carrier con flusso di 1 mL/min. È stata applicata la seguente rampa di temperatura: 40°C iniziale per 5 minuti, gradiente di temperatura 10°C/min fino a 250°C. L'analizzatore impiegato è ISQ 7000 Single Quadrupole Mass Spectrometer.

Viene pesato 1 g di campione e iniettato nel sistema di campionamento.

4.16 Preparazione campioni analisi elementare⁴⁰

L'analisi elementare dei campioni di lignina è stata condotta utilizzando l'analizzatore UNICUBE® trace (Elementar, Germany). Per minimizzare interferenze dovute alla presenza di acqua, il campione è stato precedentemente seccato in stufa da vuoto a 40°C per un totale di 24 ore prima dell'analisi.

5) Risultati e discussione

5.1 Pretrattamento della biomassa

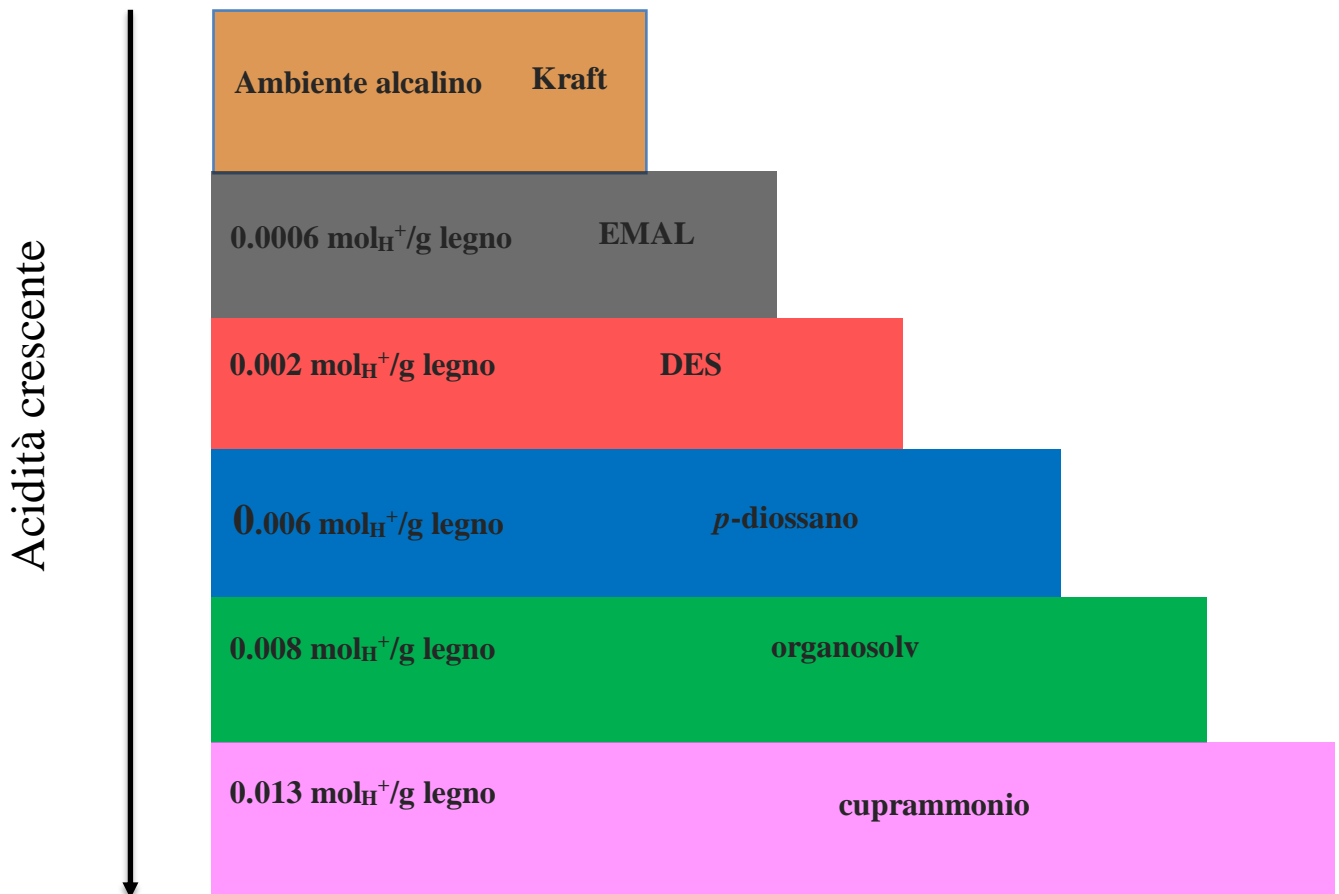
L'indagine delle variazioni strutturali della lignina a seguito di metodi estrattivi acidi ed alcalini ha richiesto il pretrattamento della biomassa lignocellulosica di pino in modo da separare gli estrattivi, come i tannini, i terpeni e gli acidi grassi che inficerebbero i risultati ottenuti.

Il pretrattamento è stato anticipato da un processo di macinazione del legno, dopo essere stato seccato in stufa da vuoto a 40°C, in modo da favorire la successiva estrazione.

Il pretrattamento della biomassa, rappresentato da estrazione in continuo solido-liquido, ha reso 4,18 g di estrattivi a partire da 75 grammi di biomassa secca, corrispondente al 5,57 % in massa.

5.2 Metodologie di estrazione

Per classificare i processi d'estrazione impiegati nel presente lavoro è stata considerata l'acidità dell'ambiente di reazione. In particolare, sono state considerate le moli di idrogenioni presenti nell'ambiente di reazione per grammo di biomassa trattata. In accordo con questa considerazione è stato creato lo *Schema 1*.



Schema 1- Quantificazione di idrogenioni in ambiente di reazione

5.2.1 Processo alcalino

Quando ci si riferisce alla lignina Kraft⁴¹ s'intende il prodotto della precipitazione del black liquor derivante dagli scarti della separazione della cellulosa durante l'omonimo processo⁴². Il trattamento prevede lo spapolamento della biomassa lignocellulosica in condizioni alcaline a 165-175 °C per 2-4 ore.

I legami intermonomerici della lignina intaccati dal processo Kraft sono:

- Eteri interni β -aril glicerolo con gruppi idrossili liberi in posizione C_{α} ;
- Eteri terminali β -aril glicerolo con idrossili occupati in posizione C_{α} ;
- Legame β - aril-glicerol- β -sostituiti ($\beta,1'$);
- Legami α - eteri ($\beta,5'$ e β, β');
- Gruppi metossilici.

In *Figura 21* viene riportata la degradazione del legame β -O-4' durante un processo alcalino. In particolare, *in primis* si ha la deprotonazione dell'ossidrilile in posizione benzilica. L'ossigeno dell'alcolato così formato compie poi un attacco nucleofilo sul carbonio in β , risultando nell'eliminazione del sostituente ossigenato precedentemente legato (un nucleo guaiacilico o siringilico) e nella formazione di un epossido.

L'ambiente alcalino in cui si svolge il processo, infine, compie l'apertura dell'anello epossidico, risultando in una molecola di aril-glicerolo. Tale reazione è comunque più lenta rispetto alla degradazione dei legami terminali.

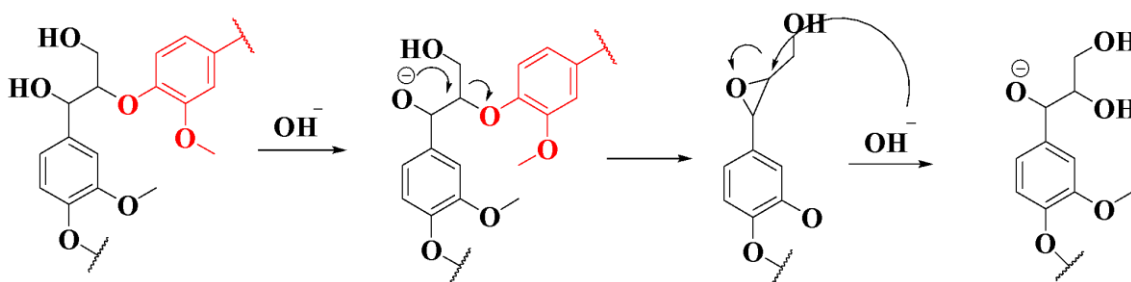


Figura 21- Degradazione legame β -O-4' durante il processo alcalino

Nel caso degli eteri β -aril glicerolici con gruppi liberi OH in C_{α} , la via degradativa cambia leggermente. L'iniziale deprotonazione del gruppo fenolico porta alla formazione

dell'anione arilossi che prontamente si riarrangia a formare il metilen chinone. Successivamente l'addizione nucleofila dell'anione idrosolfuro, presente nell'ambiente di reazione, al quinone methide ripristina l'aromaticità del sistema; questo intermedio tramite sostituzione C β vede la formazione di un episolfuro. Tramite riarrangiamento si ottiene, ancor una volta, il quinone methide. Date la condizione drastiche di reazione, il sistema perde i solfuri come zolfo elementare con relativa conversione della struttura quinone methide in arilenolo. Quest'ultima struttura non è stabile ,perciò quello che può succedere è:

- 1) la struttura aril-enolo viene convertita in apocinina o vanillina;
- 2) l'episolfuro è convertito in 1-guacil-2- mercapto-propan-3-olo oppure alternativamente in 1- guaiacil-glicerolo.

Questo è il processo di reazione predominante durante il trattamento Kraft. In *Figura 22* è riportato il processo a carico del legame interno guaiacil-glicerol- β -guaiacil etere con gruppi liberi OH in C α

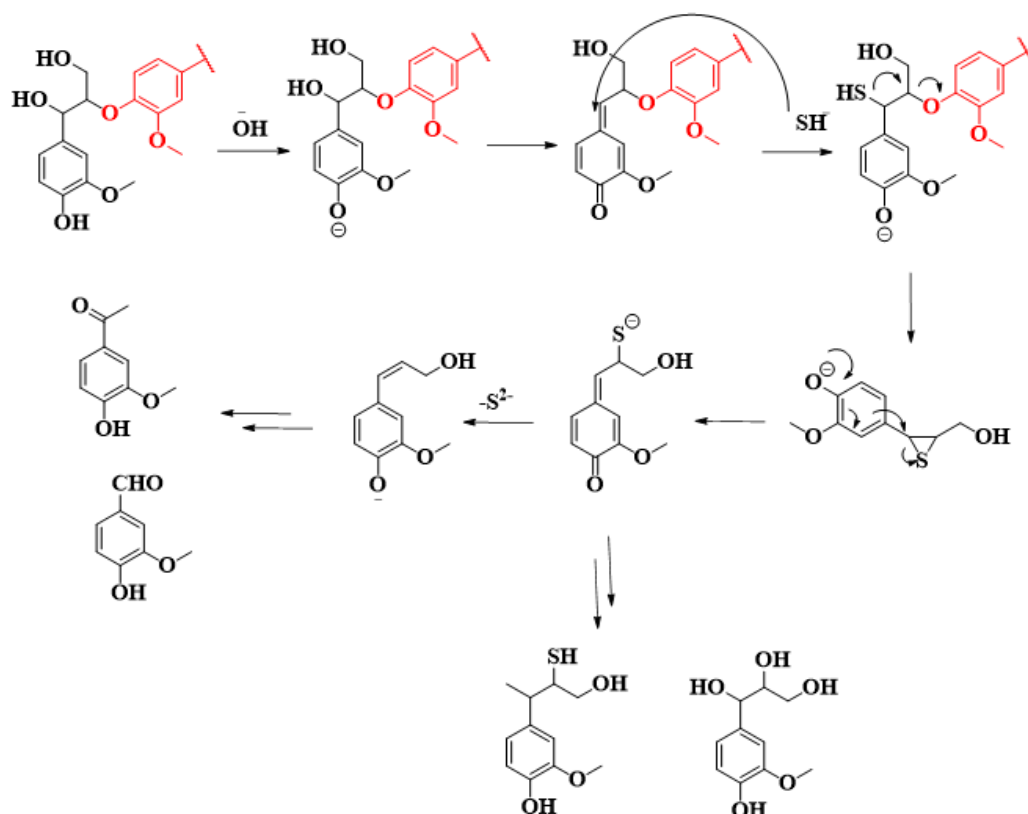


Figura 22- Processo a carico del legame interno β -aril glicerolo con gruppi liberi OH in C α nel processo alcalino

La via di degradazione del legame guaiacilglicerol- β -guaiacile, differentemente dalla precedente, porta alla formazione di una unità stilbenica, come rappresentato in *Figura 23*.

Spesso, durante il processo kraft, l'attacco nucleofilo da parte di ossidrili o ioni idrogenosolfuro porta alla formazione di unità chinon-metileniche; queste, successivamente, si degradano poi con la perdita del C γ sottoforma di gruppo formile e conseguente ripristino dell'aromaticità del sistema.

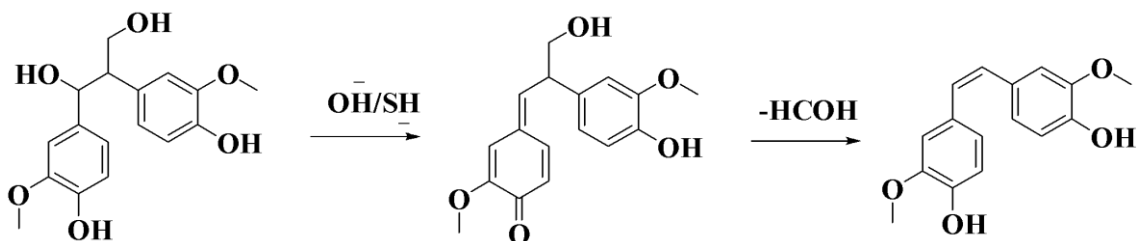


Figura 23- Processo a carico del legame β -1' nel processo alcalino

I legami β - β' e β -5', tipici delle unità fenilcumarano e pinoresinolo, non vengono completamente degradati durante il processo di Kraft; infatti, subiscono i riarrangiamenti raffigurati in *Figura 24* che portano alla formazione di unità stilbeniche

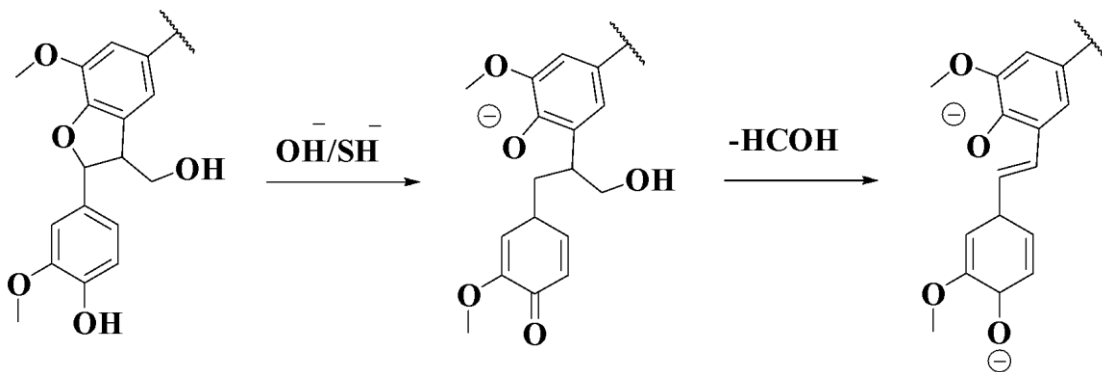


Figura 24- Processo a carico del legame β - β' e β -5' nel processo alcalino

La formazione, in quantità minori, di aril enol eteri nel processo di kraft pulping deriva alla perdita di formaldeide dalla struttura chinonemetilenica come riportato in *Figura 25*.

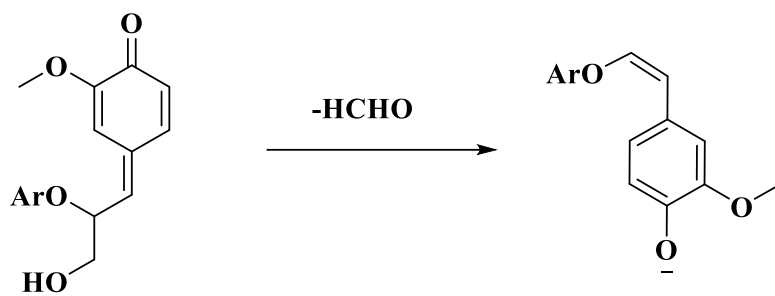


Figura 25 – perdita di benzaldeide con formazione di struttra aril enol etere

5.2.2 Processo acido⁴³

I processi acidi che sono stati messi a confronto in questo lavoro di tesi sono rappresentati dall'isolamento di lignina tramite i processi Cuoxam, Organosolv, acidolisi in diossano, estrazione in DES ed EMAL.

Le trasformazioni chimiche a carico della lignina in condizioni acide sono comuni a tutti i già menzionati processi d'estrazione e vengono schematizzate in *Figura 24*. In particolare, durante l'isolamento della lignina in ambiente acido, a seconda della severità del trattamento possono aver luogo le rotture acido-catalizzate del legame β -O-4'.⁴⁴

Quello che può succedere a carico del legame β -O-4':

- Percorso A: formazione di chetoni chiamati chetoni di Hibbert;
- Percorso B: perdita di formaldeide;

Negli studi modello⁴⁵, fino al 50% dei prodotti può corrispondere alla scissione tramite il percorso B. Tuttavia, i prodotti monomerici osservati dopo l'acidolisi della lignina sono costituiti quasi esclusivamente da chetoni di Hibbert, (cerchiati di rosso in *Figura 24*) probabilmente in seguito all'acidolisi della lignina avviene il coinvolgimento di questi frammenti nelle reazioni di ricondensazione per dare prodotti a più alto peso molecolare (cerchiati di blu in *Figura 26*).

La degradazione inizia con la protonazione del gruppo ossidrilico benilico C_α, seguita da disidratazione con formazione di un carbocatione benilico che a sua volta a seguito dell'idrolisi produce fenoli e strutture chetoniche.

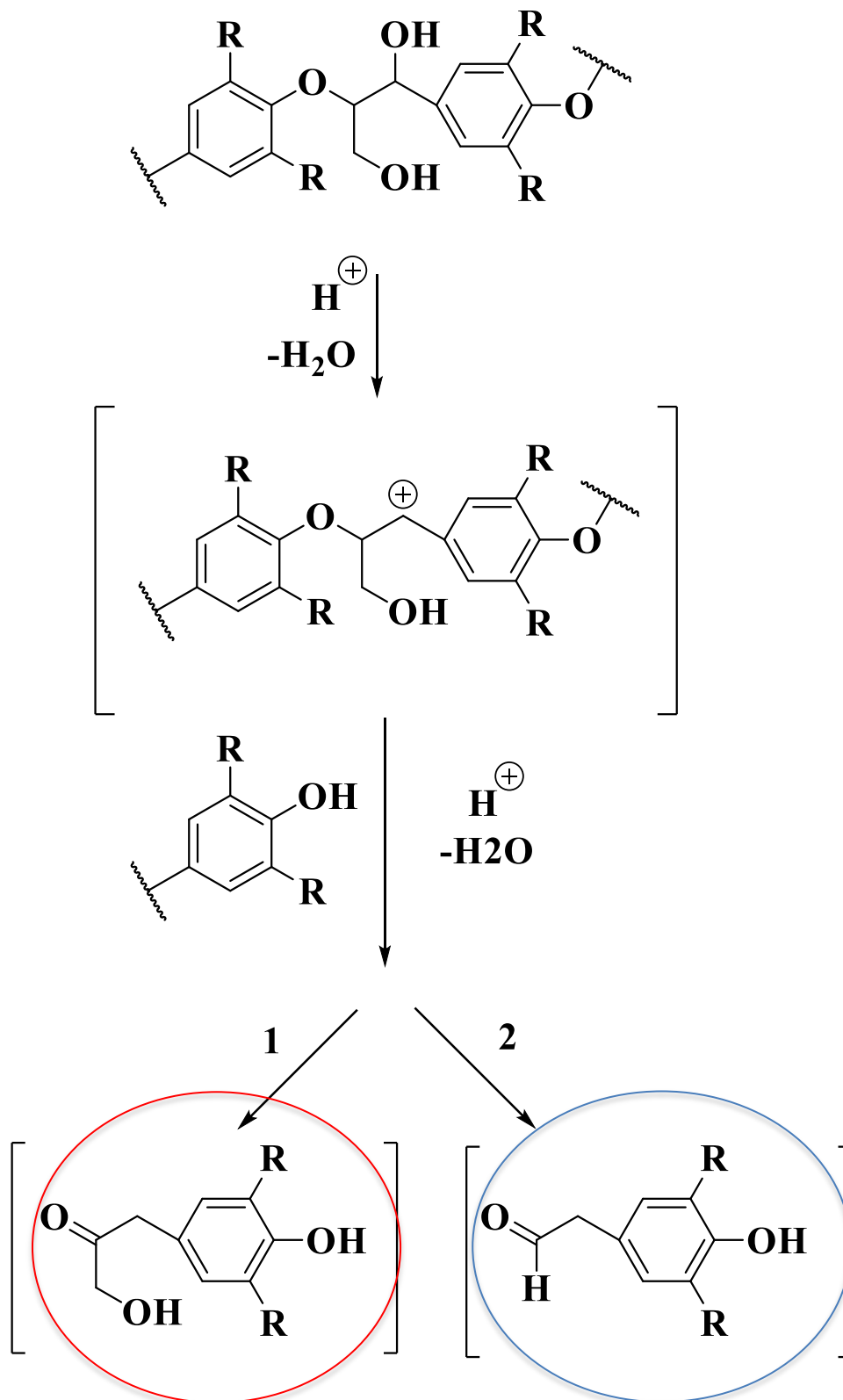
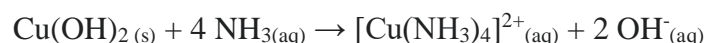


Figura 26- Vie di degradazione dei legami β -O-4' in ambiente acido

Riassumendo tutti i processi che sono stati affrontati, si può riassumere dicendo che il processo Kraft è un metodo alcalino che estrae lignina tecnica altamente modificata, con un elevato contenuto di gruppi fenolici liberi e basso contenuto di metossili a causa delle reazioni di idrolisi che si verificano durante il processo di pulping; durante questo processo la maggior parte dei legami β -O-4' viene scissa, alcune strutture si convertono in enolo senza scissione mentre alcune strutture non reagiscono ma riarrangiano a stilbene.

Il cuprammonio chiamato anche reattivo di Schweizer è una soluzione di idrossido rameico ed ammoniaca, in cui il rame è disciolto sotto forma di ione complesso $[\text{Cu}(\text{NH}_3)_4(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$. Si forma sciogliendo idrossido rameico in. Il risultato sarà una soluzione di colore blu intenso.



Questo reattivo viene utilizzato per sciogliere la cellulosa durante l'estrazione della lignina, si ottiene una lignina insolubile.

Vengono elencati i test di solubilità:

- 10 mg di campione in 200 μL di soluzione piridina/cloroformio deuterato (rapporto 1,6:1 v/v);
- 10 mg di campione in 200 μL di soluzione piridina/DMSO (rapporto 1:1 v/v);
- 50 mg di campione in 2 mL di soluzione cirene/acqua, (rapporto 8:2 v/v);
- 30 mg di campione in 1 mL di soluzione piridina/cloroformio deuterato/etil metil imidazolio (rapporto 1:2:1);
- 15 mg di campione in 2 mL di soluzione di liquido ionico etil metil imidazolio/piridina /DMF, (rapporto 1:1:2 v/v);
- 30 mg di campione in 1.5 mL di soluzione DMF/piridina (rapporto 1:0.5 v/v);

Tutte queste soluzioni sono state poste sotto agitazione per una notte, ma nessuna di queste ha permesso di ottenere una soluzione, dunque, non è stato possibile effettuare analisi ^{31}P -NMR, GPC e HSQC.

Il processo di idrolisi acida organosolv procede come descritto in precedenza. Il carbocatione benzilico può riarrangiare con l'aggiunta di specie etossido in posizione benzilica presenti nell'ambiente di reazione. Durante questo processo i legami β -O-4' ed esteri vengono scissi, portando alla degradazione della macrostruttura della lignina ottenendo un prodotto con un più basso peso molecolare.

L'estrazione con *p*-diossano³⁴ anch'essa in ambiente acido risulta un metodo di estrazione con ottime rese e scarse modifiche alla struttura della lignina "nativa"; questo è possibile grazie alla struttura del *p*-diossano che essendo priva di OH non interagisce con la lignina. Durante l'estrazione si possono generare dei perossidi pericolosi che vengono poi neutralizzati con l'aggiunta di HCl.

La ragione che rende il DES (deep eutetic solvent) così interessante per la solubilizzazione della lignina è la forte rete di legami idrogeno che può interagire facilmente con la struttura polifenolica del biopolimero. Il cloruro di colina è comunemente utilizzato non solo perché grazie alla presenza dello ione Cl⁻ forma legami idrogeno con i gruppi idrossilici e quindi riesce, assieme all'acido, a scindere il β -O-4' ma anche perché ha proprietà di biocompatibilità, biodegradabilità ed economicità. La qualità delle estrazioni di lignina con il DES dipende strettamente dalla temperatura, dal tempo e dal rapporto molare del DES tra i componenti.

L'ultimo processo, EMAL, il cui acronimo sta per *enzymatic mild acidolysis lignin*, è il metodo estrattivo che opera in condizioni di pH più blande tra tutti i processi presi in considerazione. È caratterizzato da rese molto basse e capacità di estrazione della lignina senza alterarne profondamente la struttura, e non è un processo caratterizzato da reazioni di condensazione. In questo caso l'enzima utilizzato per scindere la lignina dai carboidrati è stato Viscozyme L, con un range di acidità tra 3.3 e 5.5.

5.2.3 Rese

Il contenuto di lignina nella biomassa impiegata nel presente lavoro è stato stimato tramite il protocollo standard identificato dall'Associazione Tecnica dell'Industria dello

Spappolamento (Pulp) e della Carta (Technical Association of Pulp and Paper Industry).⁹

In particolare, la biomassa finemente polverizzata ed estratta è stata sottoposta ad una doppia idrolisi acida con acido solforico al 72% e 28%, risultando nella dissoluzione completa della componente polisaccaridica. Il materiale solido risultante dal doppio trattamento acido, accuratamente lavato, è poi pesato dopo essiccazione; la massa di questo materiale insolubile, poi, raffrontata alla massa di campione trattata, fornisce il contenuto di lignina nella biomassa.

In questo lavoro di tesi è stato calcolato un contenuto di lignina nel campione di legno estratto e finemente macinato pari al 31%.

Vengono riportate in *Tabella 9* le rese di ogni estrazione, calcolate tramite le formule subito sotto riportate.

Tabella 9- rese calcolate sia sul legno trattato che sulla lignina Klason.

| | Resa % su legno trattato | Resa % su lignina Klason |
|----------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| Lignina Kraft | 18,72 | 60,40 |
| Lignina cuprammonio | 13,41 | 4,16 |
| Lignina organosolv | 4,97 | 16,06 |
| Lignina <i>p</i> -diossano | 10,74 | 34,63 |
| Lignina DES | 5,41 | 17,44 |
| Lignina EMAL | 2,10 | 6,79 |

$$\text{Resa \% su legno trattato} = \left(\frac{g \text{ lignina}}{g \text{ biomassa}} \right) \times 100$$

$$\text{Resa \% su lignina Klason} = \left(\frac{g \text{ lignina}}{(g \text{ biomassa} \times 0,31)} \right) \times 10$$

5.3 Caratterizzazioni

5.3.1 Spettroscopia infrarossa FT-IR

L'analisi tramite spettrometro FT-IR (Fourier transform infrared spectroscopy) dei campioni di lignina ha permesso l'identificazione dei principali gruppi funzionali caratteristici.

Questo tipo di caratterizzazione permette di evidenziare qualitativamente cambiamenti strutturali dovuti alla modalità di estrazione della biomassa in oggetto della presente ricerca (Loblolly Southern Pine).

Le bande caratteristiche della lignina sono riportate in *Tabella 10*⁴⁶

Tabella 10- Bande di riferimento FT-IR per l'assegnazione dei picchi caratteristici di lignina estratta da Loblolly Southern Pine.

| | Cm⁻¹ | Banda assegnata |
|--|------------------------|---|
| | 3400 | Stretching OH |
| | 2941 | Stretching CH gruppi alchilici |
| | 2830 | Stretching CH in sostituenti alchilici |
| | 1725 | Gruppi carbonilici in esteri e acidi |
| | 1650 | Gruppi carbonilici in aldeidi e chetoni |
| | 1590 | Stretching anello aromatico |
| | 1450 | Bending CH |
| | 1425 | Bending OH |
| | 1330 | Stretching CO in metossili aromatici |
| | 1130 | Legami eteri dialchilici |
| | 1035 | Legami eteri alifatici |

I valori numerici riportati nella *Tabella 10* vanno considerati come limiti per l'assegnazione delle bande tenendo conto della letteratura scientifica esistente. Per riportare un esempio, la banda che rappresenta lo stretching O-H dei gruppi idrossilici

alifatici e fenolici è stata assegnata con certezza ai valori compresi tra 3400-3300 cm^{-1} , mentre la regione spettrale al di sotto dei 1700 cm^{-1} , più complessa, è ricca di bande poco intense di più difficile interpretazione.

In *Figura 27* è stato riportato il confronto tra gli spettri FT-IR delle varie lignine.

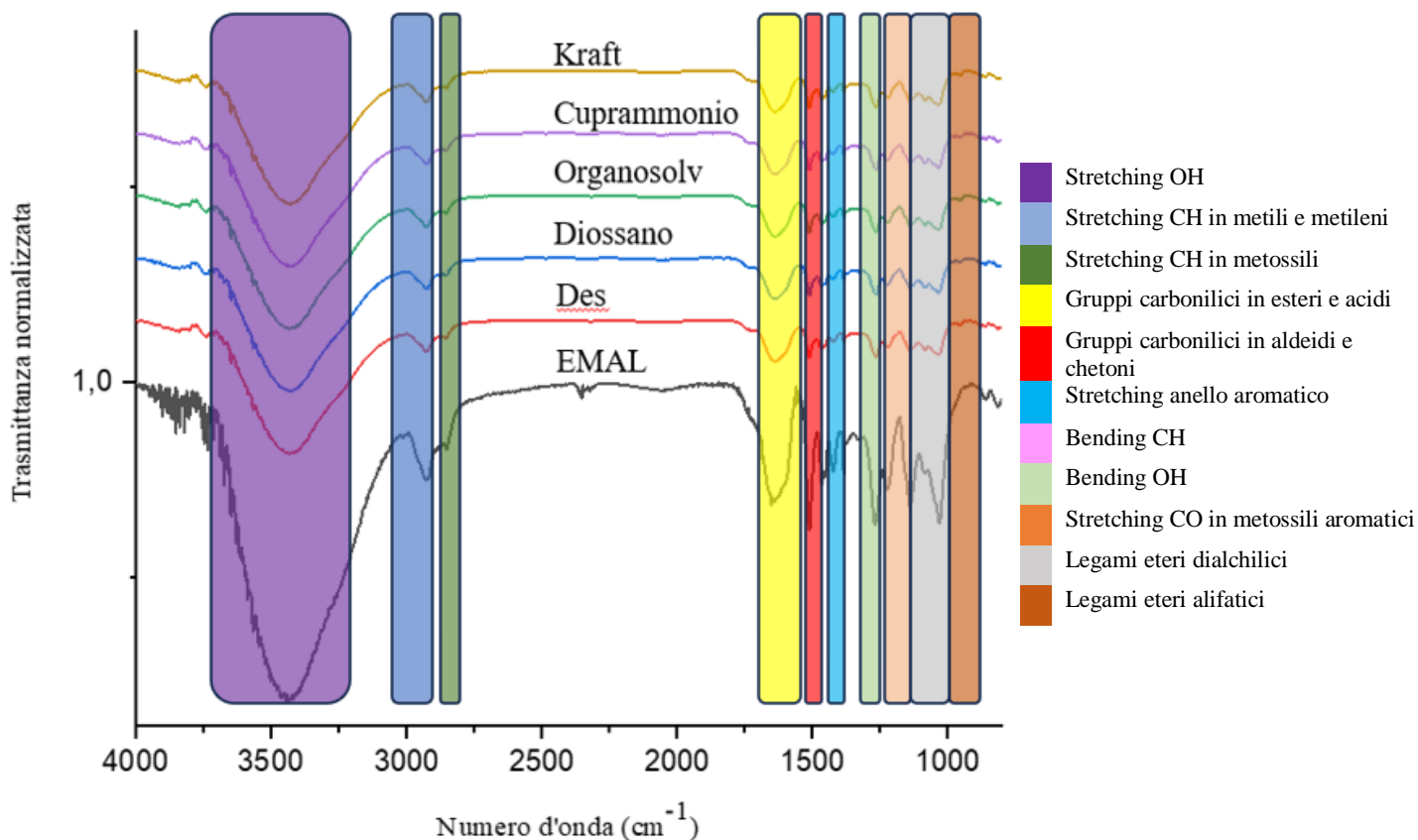


Figura 27 - Confronto FT-IR lignine estratte

La lignina “milled wood” (MWL), detta anche lignina Björkman, ottenuta tramite finissima polverizzazione del legno e successiva macerazione in una miscela di *p*-diossano/acqua, è il prodotto ideale sul quale affrontare studi strutturali; tuttavia, le basse rese del processo estrattivo nonché i lunghi tempi richiesti per la sua estrazione, fanno sì che questa sia poco utilizzata.

Pearl⁴⁷ ha osservato che, sebbene la MWL sia il prodotto meno degradato e più simile alla lignina nelle piante, essa non è completamente priva di contaminazioni derivanti dalla componente polisaccaridica.

Infatti, sottoponendo ad analisi infrarossa diversi campioni di MWL da differenti fonti, viene rilevata la presenza di bande a 1730 e 900 cm^{-1} tipiche della contaminazione di carboidrati, specialmente residui emicellulosici. Queste impurezze sono state riscontrate praticamente in tutte le preparazioni in oggetto del presente lavoro (spalla a sinistra della banda evidenziata in giallo in *Figura 27*).

Sebbene lo spettro della EMAL non sia identico rispetto a quelli di MWL⁴⁸ di pino riportati in letteratura, è stato considerato come il più simile, rispetto alle altre lignine, a quello della MWL, e quindi usato come materiale per il confronto.

La principale regione caratteristica della EMAL è rappresentata dagli stretching C-H è particolarmente significativa della tipologia del trattamento enzimatico applicato, come osservato da Hata³⁵. Infatti, in base alla tipologia ed alla durata del trattamento idrolitico della componente polisaccaridica, queste bande possono essere fortemente influenzate in intensità. Il confronto della lignina al *p*-diossano con la EMAL e spettri riportati in letteratura per delle MWL di gimnosperme evidenzia invece la notevole variazione in intensità delle bande a 1710 e 1660 cm^{-1} : queste, infatti, sono rispettivamente intensificata ed indebolita. Tali variazioni, accoppiate anche al maggior contenuto di gruppi ossidrilici fenolici della lignina al *p*-diossano, sono in linea con gli studi di Hergert. Questi, infatti, confrontando gli spettri FT-IR di MWL e lignina al *p*-diossano, ha concluso che l'azione acidolitica causa la rottura di legami guaiacil-glicerol- β -guaiacil eterei che corrisponde sia all'idrolisi e rilascio di unità aldeidiche (coniferaldeide, decrescita della banda a 1660 cm^{-1}), che all'incremento di carbonili in posizione β nelle catene propanoidiche (formazione di guaiacil-acetone, incremento della banda a 1710 cm^{-1}).

La lignina organosolv, rispetto alla EMAL, presenta bande più intense tra 2960 e 2850 cm^{-1} ; questo è in accordo coi risultati di Bolker dimostranti che durante il processo organosolv si ha la contemporanea alchilazione dei gruppi idrossilici benzilici ed in α - in unità guaiacil-acetoniche⁴⁹.

Interessante è anche il confronto tra la lignina al *p*-diossano e la lignina organosolv: queste due non differiscono se non per l'intensificazione delle bande dovute ai nuovi gruppi alcossilici introdotti nel sistema.⁴⁹

La lignina Kraft, infine, è la lignina che subisce maggiormente trasformazioni durante il processo di isolamento; pertanto, il confronto degli spettri della EMAL con essa permette di evidenziare notevoli trasformazioni. Le bande a 1715, 1600, 1370 e 1230 cm^{-1} s'intensificano, corrispondendo al processo di liberazione di gruppi ossidrilici fenolici,

come dimostrato anche da *Tabella 10*. Le bande a 1085 e 1035 cm^{-1} , invece, si indeboliscono per via della rottura dei legami eteri, anche metossilici, precedentemente esistenti.⁵⁰ Infine, è interessante notare la presenza della debolissima banda a 630 cm^{-1} ; questa, come riportato da Bolker, caratteristica dello stretching del legame C-S, è sintomo della minima incorporazione dello zolfo nella lignina Kraft⁵¹. È stata condotta anche l'analisi elementare a conferma di quanto appena detto circa il processo Kraft, confermando la presenza di zolfo al 4%. Non si nota, tuttavia, la banda corrispondente al gruppo mercapto libero (-SH), testimoniando quindi l'assenza di unità terminali mercaptaniche e lasciando supporre l'esistenza marginale di mercapto-eteri.

5.3.2 GPC

La determinazione del peso molecolare di un biopolimero dipende sia dalla natura della biomassa che dalla tecnica di estrazione impiegata. Dunque, al fine di ottenere informazioni circa la distribuzione dei pesi molecolari nei campioni di lignina si è deciso di indagare fattori quali l'indice di polidispersità, \mathfrak{D} e la massa molare media numerica M_n tramite cromatografia a permeazione su gel, (GPC) ³⁸

Questo tipo di tecnica analitica, nata nel 1964, sfrutta le interazioni di natura chimico-fisiche tra soluto e il gel. Il campione (soluto), viene eluito in base alla sua massa molecolare. Dal confronto dell'elugramma del campione con una curva di calibrazione ottenuta con appositi standard è possibile ricavare sia la massa molecolare dell'analita che la sua distribuzione.

Il rapporto tra la massa molecolare media ponderale (M_w) la massa molecolare media numerica (M_n) è detto indice di polidispersità \mathfrak{D} , ed è una misura della distribuzione delle masse molecolari in un campione:

$$\mathfrak{D} = \frac{M_w}{M_n}$$

I dati raccolti durante l'analisi sono stati riportati in *Tabella 11*.

Tabella 11- indice di polidispersità \mathfrak{D} e massa molare media numerica M_n delle lignine estratte.

| Campione | M_n | \mathfrak{D} |
|--------------------|-------------------------|----------------------------------|
| Kraft | 2181 | 2,26 |
| organosolv | 986 | 1,40 |
| <i>p</i> -diossano | 2276 | 1,90 |
| DES | 1548 | 1,83 |
| EMAL | 2280 | 3,29 |

I risultati ottenuti da questa tecnica sono in linea con la chimica dei processi che avvengono in ambiente acido e alcalino.

Come si nota dal grafico riportato in *Figura 28* la lignina EMAL, subendo una blanda acidolisi, risulta caratterizzata da un maggiore peso molecolare; di contro la lignina

organosolv, che utilizza una quantità di acido nettamente superiore e quindi subisce un'acidolisi spinta, è caratterizzata da un peso medio molto basso relativo dovuto all'importante degradazione delle catene polimeriche. La lignina estratta tramite acidolisi con *p*-diossano presenta valori più bassi della EMAL, poiché, analogamente alla lignina organosolv, essa subisce un processo di depolimerizzazione che, tuttavia, è più moderato dovuto alla minor acidità. L'eterogeneità della struttura originale della lignina si riflette nella lignina EMAL, la quale risulta altamente polidispersa con un valore \bar{D} più alto della serie; questo testimonia una maggiore eterogeneità nella lunghezza delle catene che costituiscono questo campione rispetto ad altre preparazioni.

La lignina alcalina Kraft presenta M_n molto elevato questo; è imputabile al fatto che la lignina (Kraft) forma aggregati in soluzione⁵², dando così origine a molecole con valori di massa molare media erroneamente elevati.

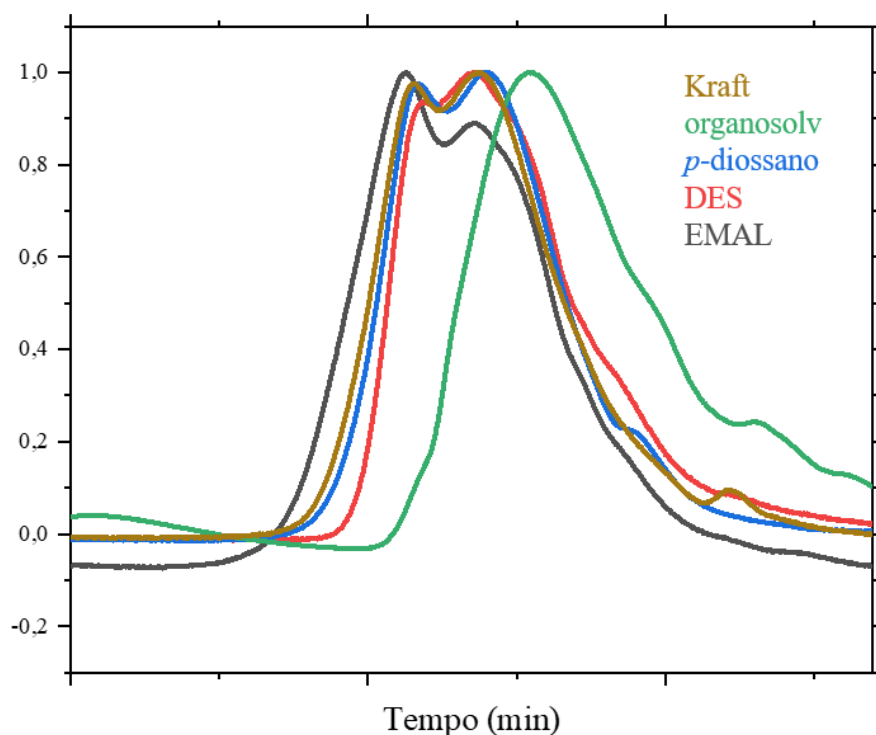


Figura 28- Cromatogrammi GPC delle lignine estratte

5.3.3 ^{31}P NMR

Come è stato detto in precedenza, la struttura della lignina varia con il variare della tecnica di estrazione, influenzando dunque anche sulla qualità e sulla quantità di gruppi funzionali presenti. Tra i vari gruppi funzionali, sono di particolare interesse i gruppi ossidrilici che non solo caratterizzano un campione di lignina, ma anche ne impartiscono maggiormente la reattività. Per investigare il contenuto di questi gruppi è stata impiegata la spettroscopia magnetica nucleare ^{31}P -NMR, che non solo ci consente di ottenere informazioni di tipo quantitativo e qualitativo ma riesce anche ad identificare unicamente i gruppi ossidrilici liberi. Nello specifico, questa metodologia è stata messa appunto tra gli anni 80/90 del secolo scorso da D.S. Argyropoulos⁵³ e ci permette di indagare in modo rapido i gruppi idrossilici, alifatici e fenoli condensati e non condensati.

Questa metodologia sfrutta la reattività dei vari gruppi idrossilici con il reattivo al fosforo 2-cloro-4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-diossafosfolano (TMDP)^{35/9}

In *Figura 29* ne viene illustrato il meccanismo di reazione.

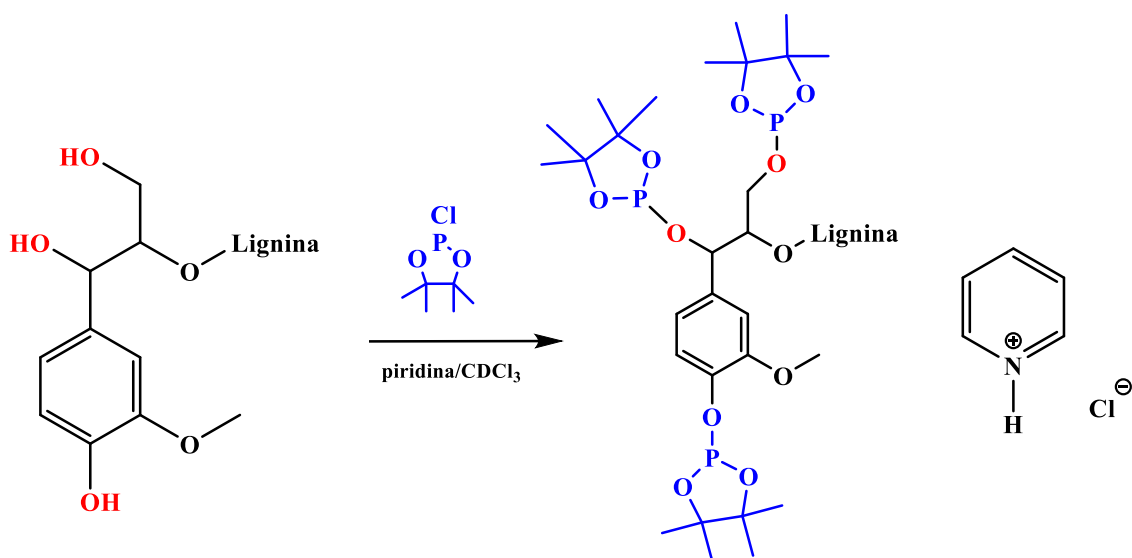


Figura 29- Meccanismo di reazione tra il legame β -O-4 della lignina ed il reattivo TMDP

L'utilizzo di questo reattivo ci permette non solo di derivatizzare i gruppi idrossilici alifatici, fenolici e i gruppi carbossilici ma anche di discriminare altri gli ossidrili fenolici in base alla loro natura, quali condensati (siringilici, 4-O-5' e 5,5') e non condensati (guaiacilici e p-idrossifenilici) poiché caratterizzati da chemical shift (*Tabella 12*).

Tabella 12- Chemical shift relativi ai gruppi funzionali derivatizzati con TMDP e analizzati con ³¹P NMR.

| GRUPPO FUNZIONALE | SPOSTAMENTO CHIMICO (ppm) |
|--------------------------|----------------------------------|
| OH, alifatico | 149,0-146,0 |
| OH, fenolico | 144,0-137,4 |
| 5-5' OH, fenolico | 141,7-140,2 |
| OH, siringile | 143,2-142,7 |
| 4-O-5'OH | 142,8-141,7 |
| OH, guaiacile | 140,2-138,8 |
| OH, p-idrossifenile | 138,8-137,4 |
| COOH · | 136,0-133,6 |
| Tricina | 137.0-136.0 |

Una schematizzazione dello spettro ³¹P NMR delle regioni caratteristiche per la lignina di gimnosperma è riportata in *Figura 30*.

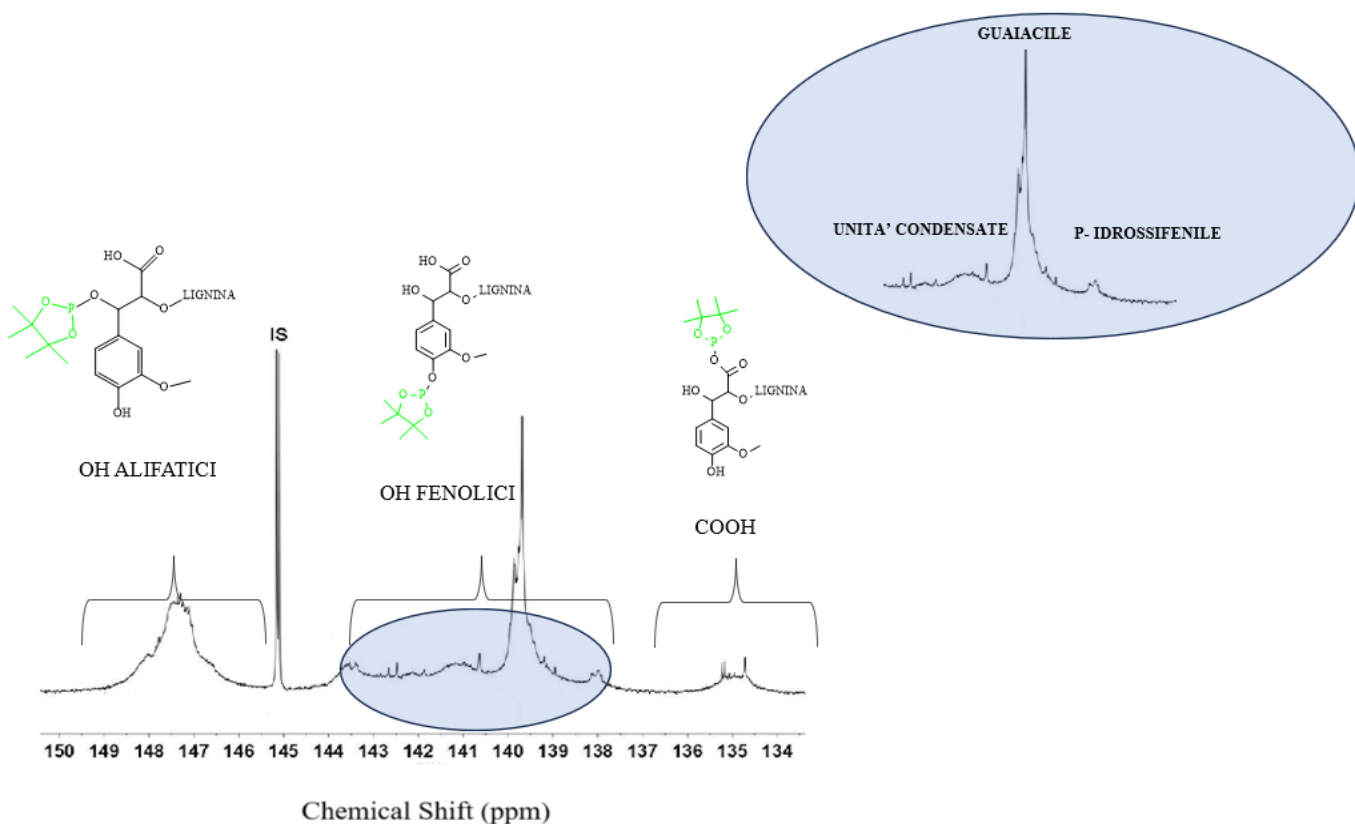


Figura 30- ^{31}P Chemical Shift tipici della lignina da gimnosperma

Al fine di ottenere informazioni quantitative per la caratterizzazione dei gruppi idrossilici, l'analisi è stata svolta in presenza di colesterolo come standard interno.⁵⁴

Tabella 13- Quantificazione dei gruppi idrossilici espressa in mmol/g.

| | g | OH alifatico | 5-5' 4-O- 5' OH | OH guaia cile | p-idrossifenil OH | OH fenolici | COOH |
|------------|--------|--------------|-----------------|---------------|-------------------|-------------|------|
| Kraft | 0,0307 | 2,11 | 0,06 | 1,10 | 0,05 | 1,21 | 0,62 |
| EMAL | 0,0294 | 4,34 | - | 0,57 | 0,09 | 0,67 | 0,10 |
| DES | 0,0286 | 2,47 | - | - | 0,07 | 0,60 | 0,01 |
| p-diossano | 0,0302 | 2,89 | 0,26 | 1,10 | 0,06 | 1,41 | 0,04 |
| Organosolv | 0,0336 | 2,32 | - | 1,36 | 0,08 | 1,46 | 0,09 |

Gli spettri ^{31}P NMR presentano gli stessi segnali, tuttavia un'analisi quantitativa rivela le differenze strutturali dovute a diversi contenuti in gruppi ossidrilici alifatici, carbossilici e fenolici.²⁰

Viene riportato in *Figura 31* il confronto tra gli spettri ^{31}P NMR.

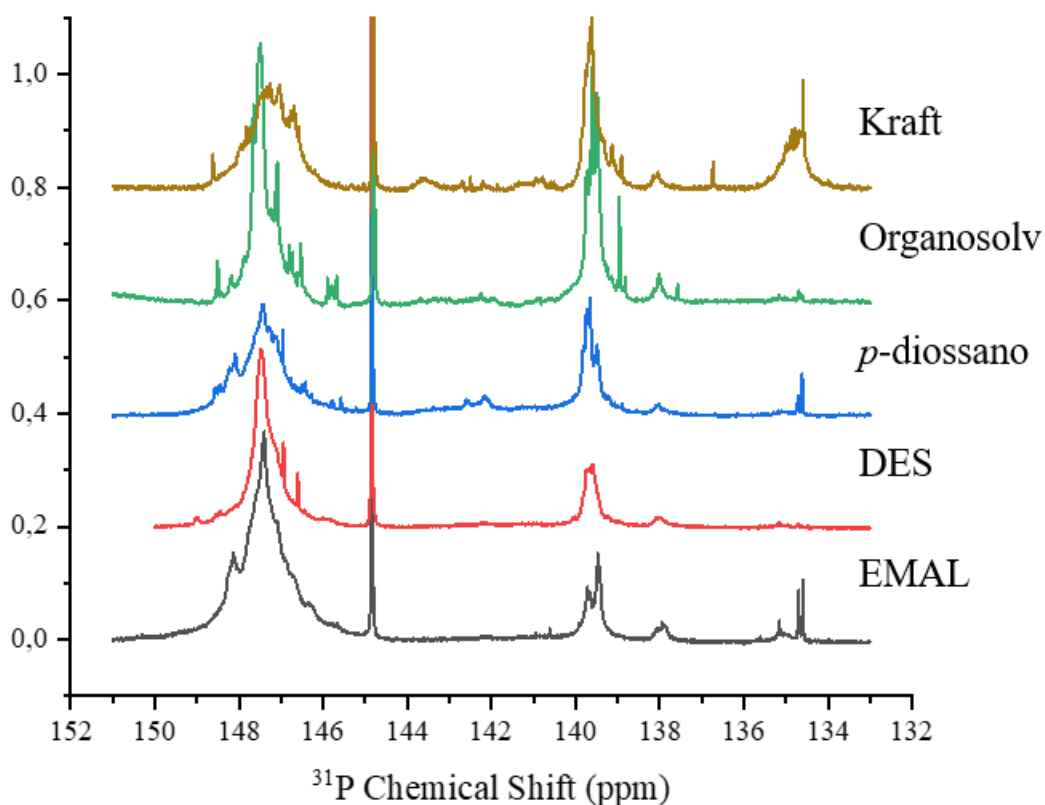


Figura 31- ^{31}P NMR confronto

Quello che emerge inizialmente dallo spettro ^{31}P riportato in *Figura 31* è la presenza in tutte le lignine dei segnali tipici relativi alle unità guaiaciliche, *p*-idrossifeniliche e idrossiliche alifatiche. Per quanto riguarda le unità condensate, esse sono presenti in particolar modo nella lignina diossanica e nella lignina Kraft. Infine, i segnali relativi ai gruppi carbossilici sono presenti principalmente nelle lignine kraft, EMAL e *p*-diossano. Come si evince dalla *Figura 31*, i segnali relativi ai gruppi OH alifatici sono presenti in tutte le lignine. In particolar modo la concentrazione in termini di mmol/g è più elevata

nella lignina EMAL, implicando una quantità importante di OH alifatici nelle catene laterali. In confronto agli altri campioni, la lignina kraft presenta un segnale molto più debole degli OH alifatici: ciò è in linea con la letteratura, in quanto questo tipo di lignina subisce, durante il processo di estrazione, la frammentazione attraverso la reazione con gli ioni idrossido e idrosolfuro ad alte temperature in condizioni alcaline. L'estrazione con il *p*-diossano, noto per le sue caratteristiche di inerzia nei confronti della struttura della lignina, garantisce la presenza di gruppi OH alifatici.

I picchetti che si possono vedere nel segnale dei OH alifatici sono attribuibili a cellulose ed emicellulose non degradate dal processo di isolamento, nel caso della lignina DES invece, potrebbero essere relativi al glicole etilenico non del tutto eliminato durante la purificazione.

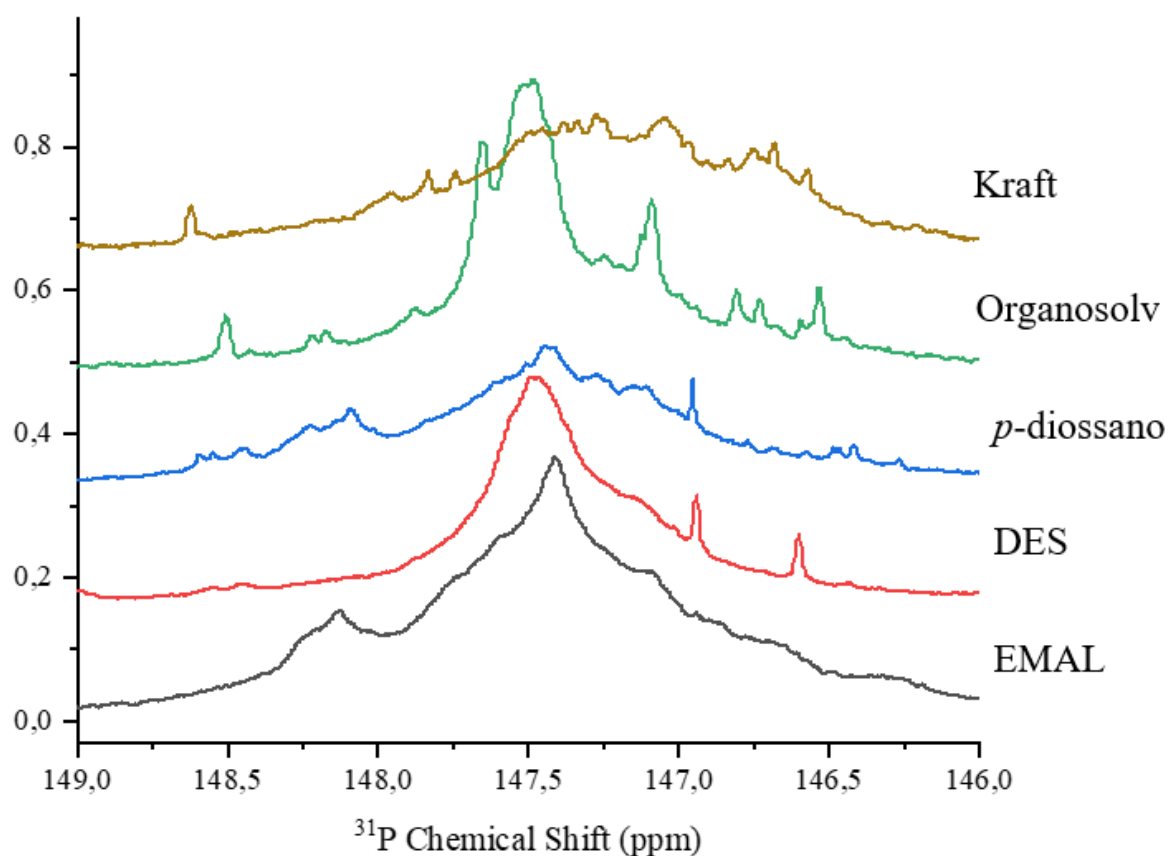


Figura 31- Zoom di confronto ^{31}P NMR della zona degli OH alifatici

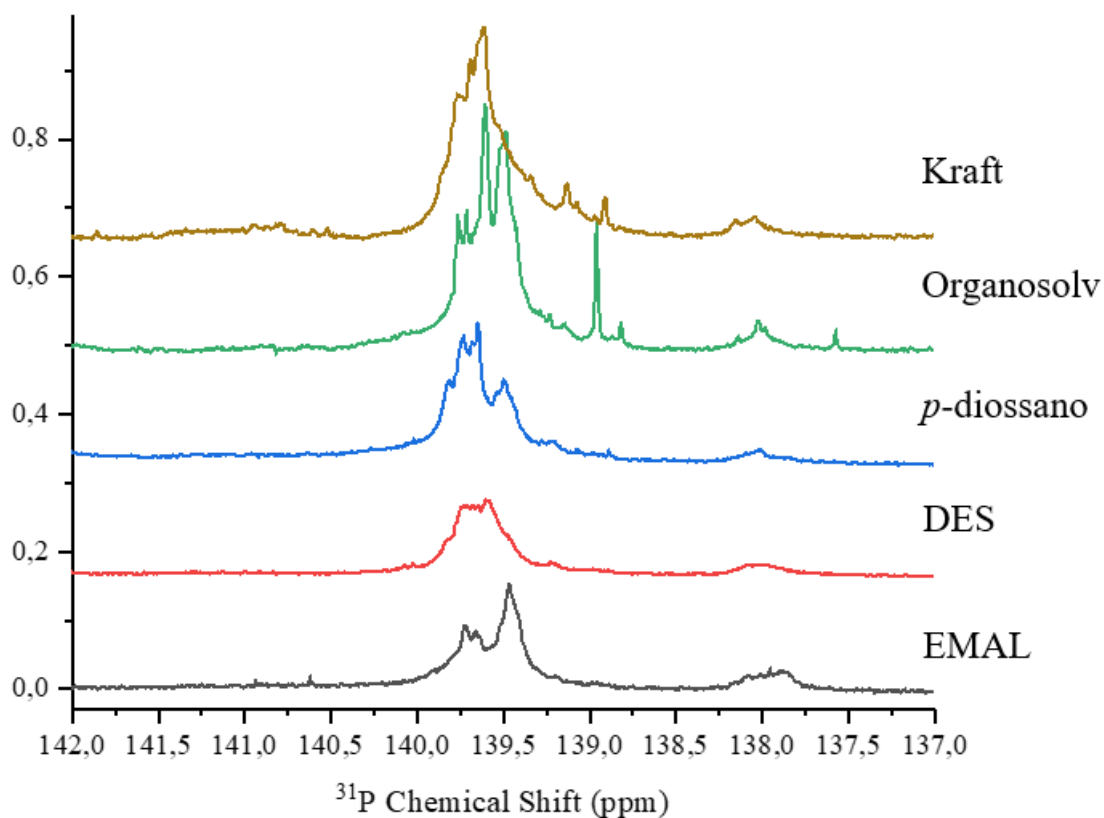


Figura 33- ^{31}P NMR confronto zoom zona OH fenolici, unità non condensate

Dallo spettro si nota come tutte le lignine presentino picchi nelle zone dei non condensati, in corrispondenza delle unità G e H, a conferma del fatto che è una lignina di angiosperma. La lignina organosolv contiene un gran numero di legami eteri β -O-4, che giustifica la presenza di picchi sia nella zona degli OH alifatici che nella zona degli OH fenolici. Un discorso analogo può essere fatto per la lignina *p*-diossano. La non reattività del *p*-diossano con i gruppi idrossilici permette il mantenimento della struttura della lignina. Viene riportata in fine in *Figura 34* lo zoom sui segnali dei gruppi carbossilici.

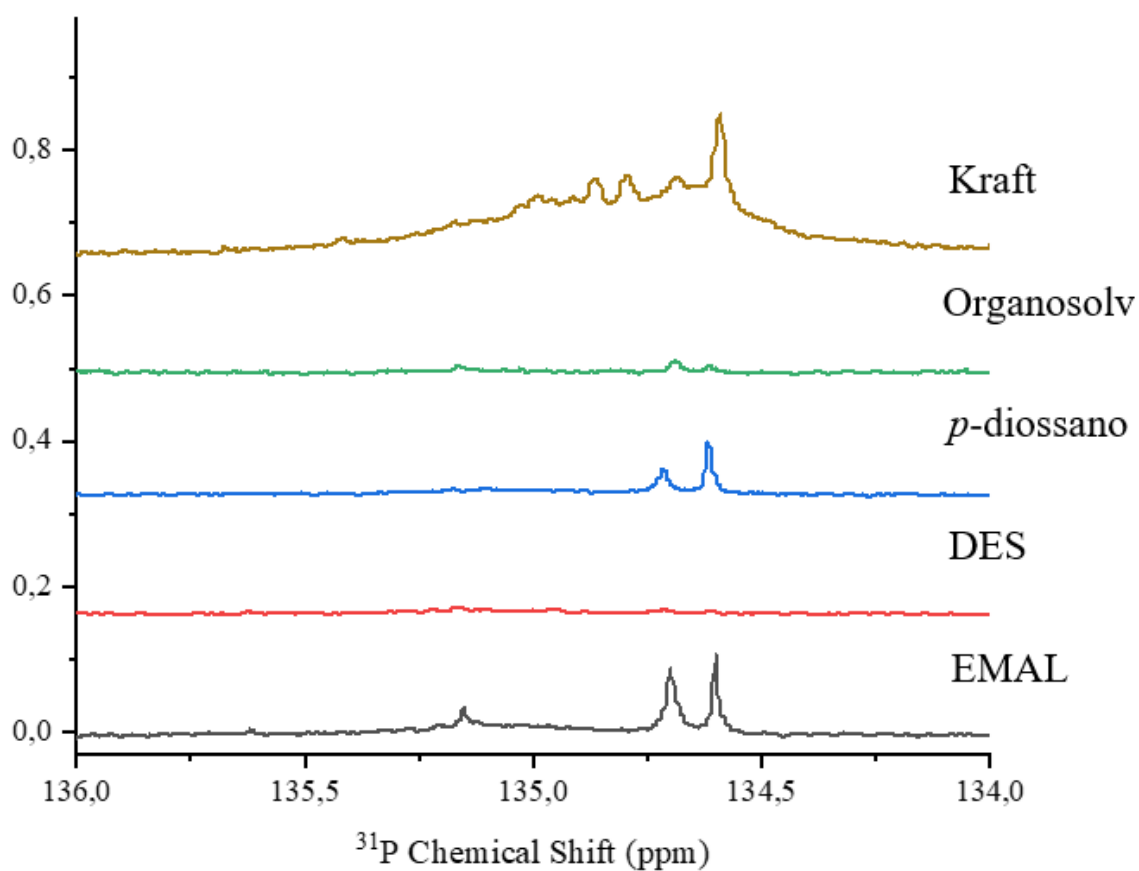


Figura 34- ^{31}P NMR confronto zoom zona carbossilici

La lignina Kraft presenta la più alta concentrazione di gruppi carbossilici, attribuibile al processo Kraft stesso che ne prevede la progressiva formazione.

Per quanto riguarda la lignina al cuprammonio, non è stato possibile caratterizzarla tramite NMR per problemi di scarsa solubilità.

5.3.4 DFRC

Nel legno di angiosperma come quello di pino preso in esame nel presente lavoro, l'abbondanza percentuale di legami β -O-4' è tra il 40/50 %.⁵⁵

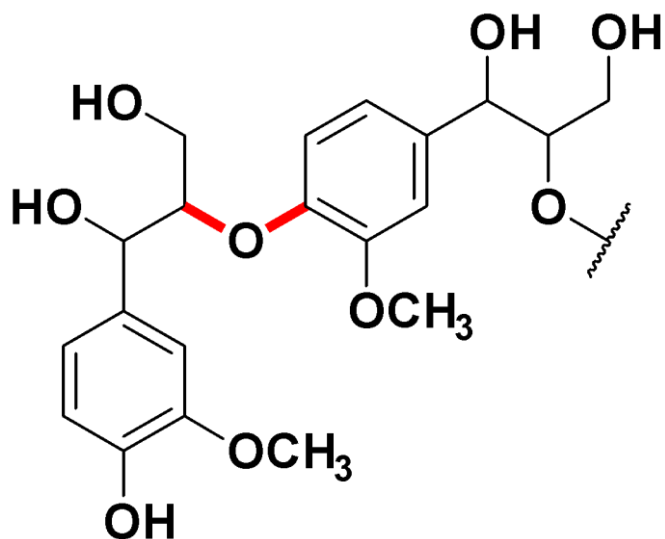


Figura 35-Rraffigurazione del legame β -O-4' (in rosso)

Al fine di indagare la natura dei sostituenti eterei nelle unità β -O-4' è stata largamente impiegata una tecnica di *wet-chemistry* definita Derivatization Followed by Reductive Cleavage (DFRC).⁵⁶

Questa metodica analitica è stata descritta per la prima volta da Lu e Ralph nel 1997 e prevedeva la funzionalizzazione della lignina con una miscela di bromuro d'acetile in acido acetico seguita dalla scissione zinco-catalizzata di queste strutture e l'analisi gascromatografica dei prodotti di decomposizione. Grazie allo sviluppo della tecnica ³¹P NMR, però, la DFRC oggi approfitta dell'analisi NMR in accordo con il protocollo sperimentale descritto da Argyropoulos, ottenendo così informazioni sul grado di ramificazione delle unità arilglicerol- β -aril eteree.⁵⁷

Sia nel protocollo originale della DFRC che nel protocollo modificato da Argyropoulos, la derivatizzazione con bromuro di acetile (AcBr) converte le strutture β -aril eteree in β -bromo eteri; nelle stesse condizioni, i gruppi γ -idrossilici e fenolici vengono acetilati. Segue poi la scissione dei gruppi bromurati, grazie all'idrogeno nascente generato dal

trattamento con acido acetico dello zinco. Le specie risultanti, infine, vengono convertite in acetati. Questo meccanismo è schematizzato in *Figura 36*.⁸

La presenza delle unità condensate non interferisce con la determinazione, poiché tutti i gruppi fenolici sono protetti durante la fase d'acetobromurazione. I frammenti così generati, poi, vengono stati sottoposti all'analisi ³¹P NMR come condotta in precedenza.

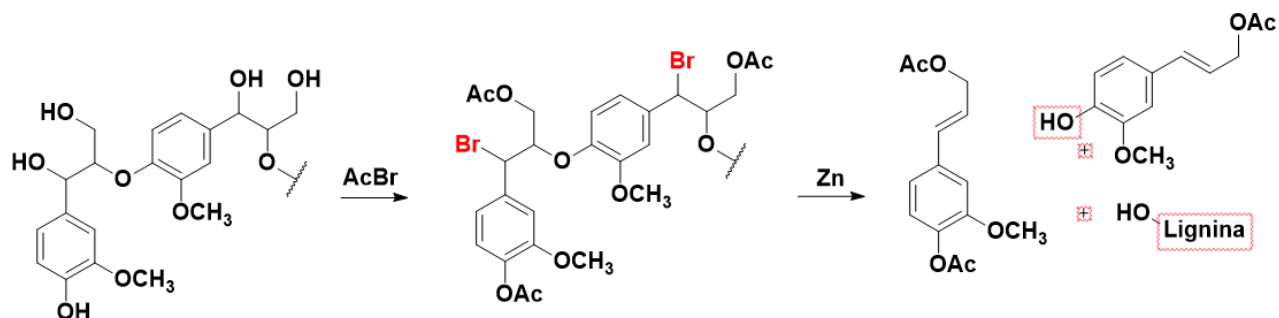
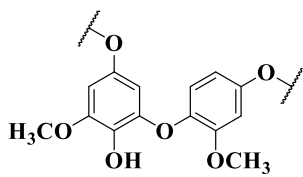
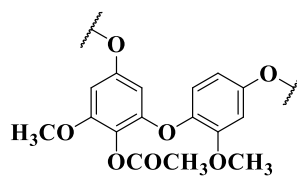
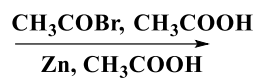


Figura 36- processo di derivatizzazione DFRC e scissione riduttiva del legame β -O-4'.

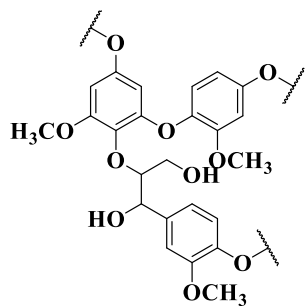
I frammenti tipici attendibili dall'applicazione della DFRC sono riassunti in *Figura 37*.



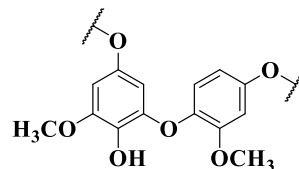
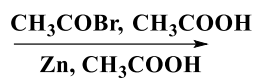
4-O-5', 142 ppm



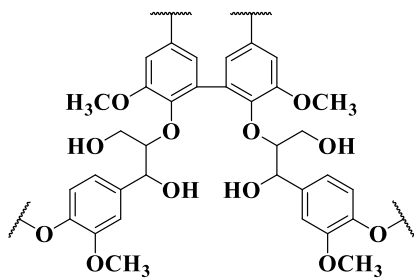
No fenoli- No ³¹P



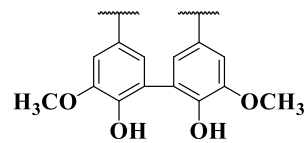
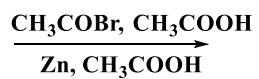
No fenoli - No ³¹P



4-O-5', 142 ppm



No fenoli - No ³¹P



141 ppm

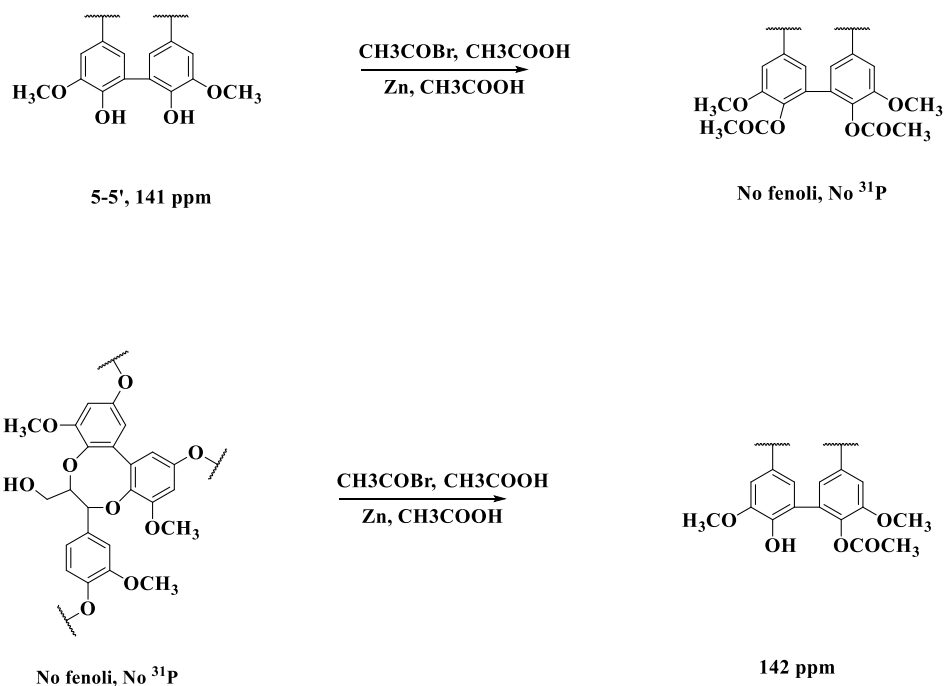


Figura 37- Frammenti tipici rilasciati dal sistema a seguito della DFRC.⁵⁸

In Figura 38 vengono riportati gli spettri ^{31}P NMR dei prodotti derivanti dall'applicazione della DFRC delle varie lignine isolate.

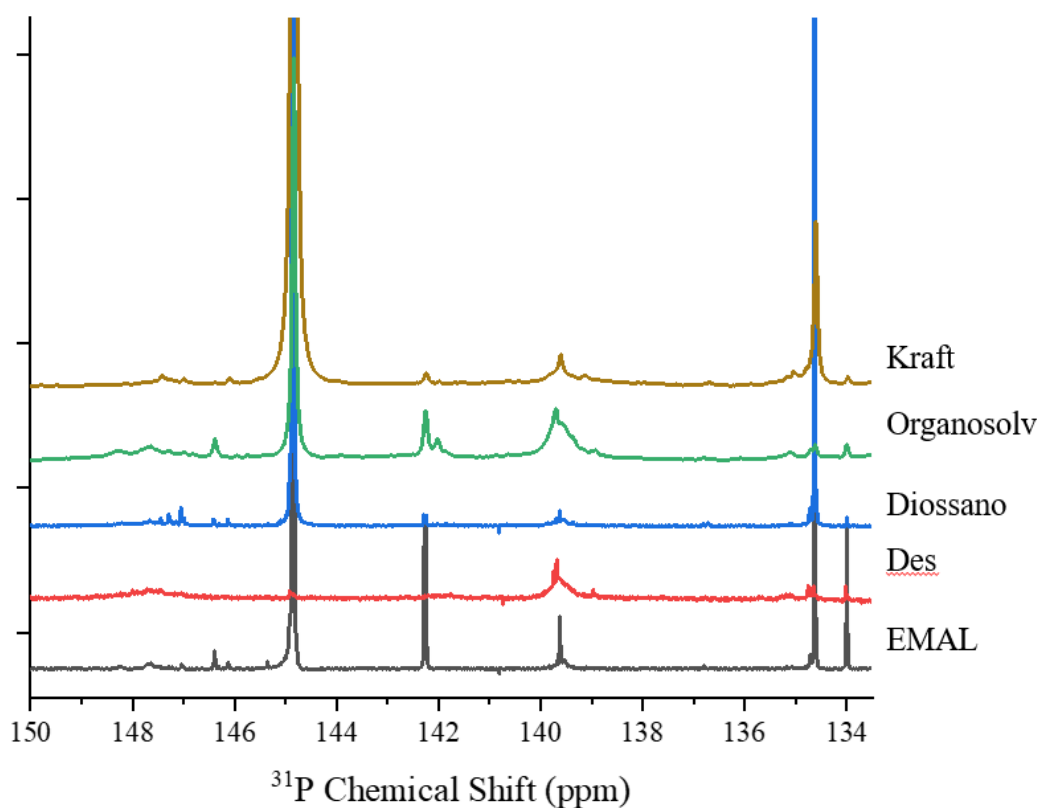


Figura 38- Spettro ^{31}P DFRC a confronto

Dall'integrazione dei picchi, sono state ottenute informazioni quantitative circa il contenuto, espresso in mmoli di unità condensate e non condensate per grammo di lignina. Questa tecnica non è stata applicata con successo alla lignina DES per problematiche dovute allo standard impiegato.

In *Tabella 14* sono riportati i contenuti d'unità condensate e non condensate per grammo di lignina determinate tramite DFRC. I risultati non derivano dall'integrazione diretta dei picchi a causa della presenza di acido acetico nei campioni, dovuta alla procedura, è stato considerato il rapporto colesterolo/condensati.

Tabella 14- Contenuto di unità condensate e non condensate dopo il trattamento DFRC

| | CONDENSATE (mmol) | NON CONDENSATE (mmol) |
|--------------------|-----------------------|--------------------------|
| EMAL | 6.60×10^{-3} | 3.30×10^{-3} |
| Kraft | 6.46×10^{-4} | 1.29×10^{-3} |
| <i>p</i> -diossano | 6.39×10^{-6} | 3.20×10^{-6} |
| organosolv | 2.53×10^{-3} | 9.43×10^{-3} |

La bassissima concentrazione relativa alla presenza di gruppi OH alifatici è giustificata dal fatto che questa procedura si basa sull'acetilazione di questi gruppi; dunque, quei picchi sono relativi a gruppi non reagiti, considerabili trascurabili. Le unità 4-O-5' vengono acetilate durante la DFRC e non interferiscono dunque durante l'analisi perché non presentano gruppi OH disponibili a reagire con il reattivo 2-cloro-4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-diossafosfolano (TMDP).

I picchi significativi sono compresi a 139 e 142 ppm. I picchi a 142 ppm sono relativi ai frammenti monoacetilati delle unità 5-5', 4-O-5' mentre le unità 5-5-O-4' reagiscono per dare le unità 5-5' monoacetilate⁴². I picchi a 139 sono relativi alla presenza di unità condensate nel campione. Le unità fenoliche 5-5' sono acetilate con la procedura DFRC e non appaiono nello spettro 31P NMR che ne consegue.

I valori di integrazione della lignina Kraft, ci confermano la struttura condensata del campione. Interessante è stato notare come le lignine organosolv e *p*-diossano, presentino un rapporto di proporzionalità tra unità condensate e non molto diverso tra loro.

La lignina organosolv subendo un trattamento più acido rispetto alla lignina *p*-diossano presenta molte più unità condensate: questo valore è coerente con il processo di ricondensazione della struttura che aumenta con l'aumentare dell'acidità del processo. Conseguentemente, la lignina EMAL, che subisce un blandissimo trattamento acido presenta molte più unità non condensate rispetto a quelle condensate. A conferma di quanto appena detto, l'andamento relativo alla concentrazione delle unità condensate è stato plottato in *Figura 39*.

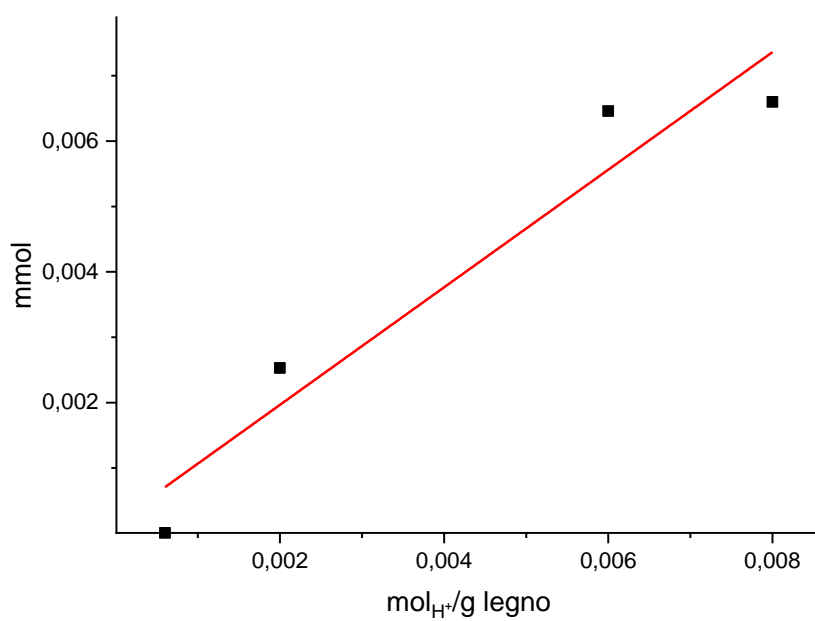


Figura 39- Andamento della concentrazione delle unità condensate in rapporto alle moli di acido utilizzate nel processo di estrazione

5.3.5 HSQC

Un'importante tecnica analitica capace di caratterizzare a livello qualitativo e semi-quantitativo l'intricata natura della lignina è la risonanza magnetica nucleare bidimensionale 2D-HSQC (*Heteronuclear single quantum coherence spectroscopy*).⁵⁹

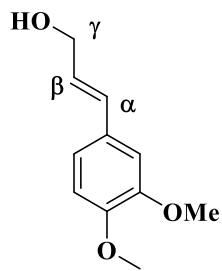
Dopo estrazione, questa tecnica permette di riconoscere i principali legami intermonomerici β -O-4', β -5' e β - β' che legano le varie unità fenilpropanoidiche nella lignina; inoltre, l'analisi dettagliata della regione aromatica permette di individuare particolari strutture tipiche come il fenilcumarano e i ferulati.

Tabella 15- Assegnazione picchi HSQC ^{13}C - ^1H ⁴³ nei campioni di lignina⁶⁰

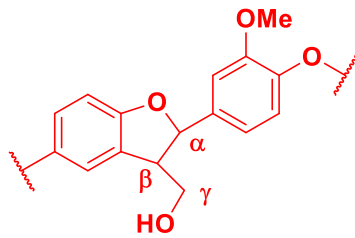
| Etichetta | $\delta_{\text{C}}/\delta_{\text{H}}$ (ppm) | Struttura |
|--------------------------------|---|--|
| B $_{\beta}$ | 53.1/3.43 | Fenilcumarano (B) |
| C $_{\beta}$ | 53.5/3.05 | β - β' in pinoresinolo (C) |
| -OCH ₃ | 55.6/3.73 | Metossili |
| A $_{\gamma}$ | 59.4/3.40 e 3.72 | β -O-4' (A) |
| F $_{\beta}$ | 59.5/2.75 | Spirodienone (F) |
| I $_{\gamma}$ | 61.3/4.08 | Alcol cinnamico (I) |
| B $_{\gamma}$ | 62.6/3.67 | Fenilcumarano (B) |
| A' $_{\gamma}$ | 63.5/3.83 e 4.30 | β -O-4' acetilato (A') |
| A $_{\alpha(\text{G})}$ | 70.9/4.71 | β -O-4' in unità G |
| C $_{\gamma}$ | 71.0/3.81 e 4.17 | β - β' in pinoresinolo |
| E $_{\alpha}$ | 79.5/5.50 | α -O-4' substrutture (E) |
| A' $_{\beta(\text{G})}$ | 80.8/4.52 | γ acetilazione in β -O-4' in unità G |
| F $_{\alpha}$ | 81.2/5.01 | Spirodienone (F) |
| A $_{\text{ox}\beta}$ | 82.7/5.12 | α ossidazione β -O-4' in A $_{\text{ox}}$ |
| A $_{\beta(\text{H})}$ | 82.9/4.48 | β -O-4' in unità H |
| D $_{\alpha}$ | 83.3/4.81 | Dibenzodiosocina (D) |
| A $_{\beta(\text{G})}$ | 83.4/4.27 | β -O-4' in unità G |
| C $_{\alpha}$ | 84.8/4.65 | β - β' in pinoresinolo |
| F $_{\alpha'}$ | 84.6/4.75 | Spirodienone (F) |
| DB | 85.3/3.85 | Dibenzodiosocina (D) |
| B $_{\alpha}$ | 86.8/5.43 | Fenilcumarano (B) |
| G ₂ | 110.9/6.99 | Unità G |
| Fer ₂ | 111.0/7.32 | Ferulato (FA) |
| PCA $_{\beta}$ e FA $_{\beta}$ | 113.5/6.27 | In paracumarato (PCA) e ferulato (FA) |
| G ₅ /G ₆ | 114.9/6.72 e 6.94 | Unità G |

| | | |
|------------------------------------|------------------------|---------------------------------------|
| | 118.7/6.77 | |
| PCA _{3,5} | 115.5/6.77 | In paracumarato |
| FA ₆ | 123.2/7.15 | Ferulato (FA) |
| J _β | 126.3/6.76 | Aldeide cinnamica (J) |
| PB _{2,6} | 127.8/7.22 | Paraidrossifenile (H) |
| I _β | 128.4/6.23 | Alcol cinnamico (I) |
| I _α | 128.4/6.44 | Alcol cinnamico (I) |
| PCA _{2,6} | 130.1/7.45 | In paracumarato |
| PCA _α e FA _α | 144.7/7.41 | In paracumarato (PCA) e ferulato (FA) |
| J _α | 153./7.61 | Aldeide cinnamica (J) |
| F | 179/9.6 124/7.5 | |
| HA | 74.3/4.4 | Acido arilidrossi acetico |
| HK | | Chetoni di Hibbert |
| SB | 128.2/7.2 128.0/7.1 | Stilbeni |
| K | 112.1/6.2 109.0/5.6 | Aril enol eteri |

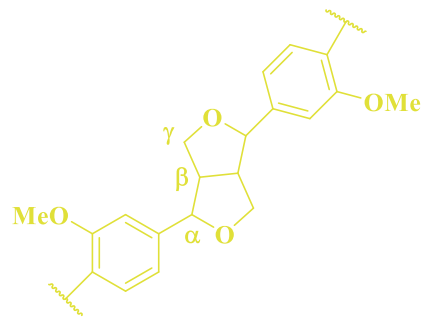
Le strutture chiave d'assegnazione che sono riportate in *Tabella 15* sono raffigurate in *Figura 40*.



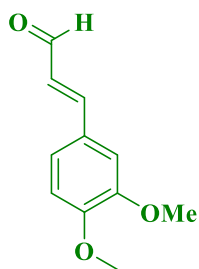
Alcol coniferilico



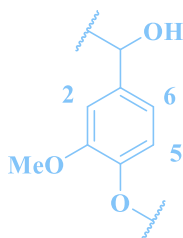
Fenilcumarano



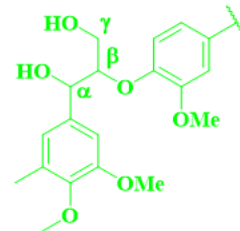
Pinoresinolo



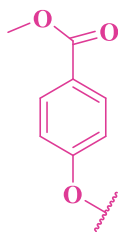
Cinamaldehyde



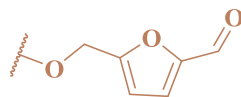
Unità guaiaciliche



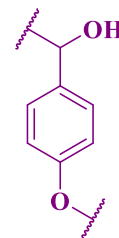
Aryl-glicerol-beta-aryl etere



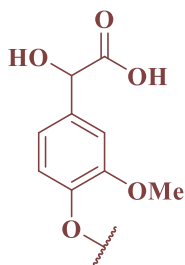
p-idrossibenzoato



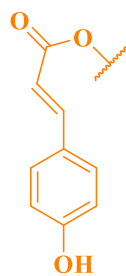
5-metilossi furfurale



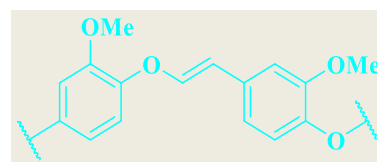
p-idrossifenile



Acido idrossi aril acetico



p-cumarato



Aryl enol etere

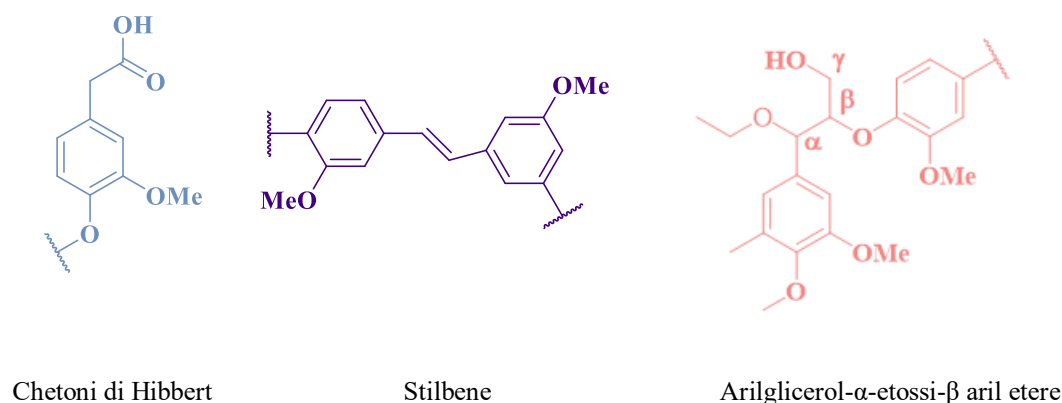


Figura 40- Strutture indagate nella spettroscopia magnetica nucleare HSQC ^{13}C - ^1H ⁴³

Viene proposta l'assegnazione dei gruppi funzionali nella lignina EMAL in *Figura 41*. Questo tipo di lignina, caratterizzata da un trattamento blando presenta parecchi picchi associati agli zuccheri, probabilmente poichè il processo di estrazione non permette di separare bene la lignina dal resto della biomassa lignocellulosica. La presenza di zuccheri viene confermata anche dallo studio tramite GC/MS pirolisi.

La zona alifatica, ovvero compresa tra i 2.5 e 6 ppm δ ^1H e compresa tra i 50 e i 90 ppm δ ¹³C, presenta le strutture tipiche della lignina MWL⁶¹; β -O-4', β - β' , β -5' con relative sottostrutture α , β , γ , alcol coniferilico e metossili. La presenza di zuccheri è anche confermata dal picco F, 5-metilossi furfurale nella zona aromatica. I principali segnali incrociati nella regione aromatica degli spettri HSQC 2D EMAL rivelano la presenza di acido coniferilico, *p*-idrossibenzoato, gruppi terminali nella cinnamaldeide e *p*-idrossifenile.

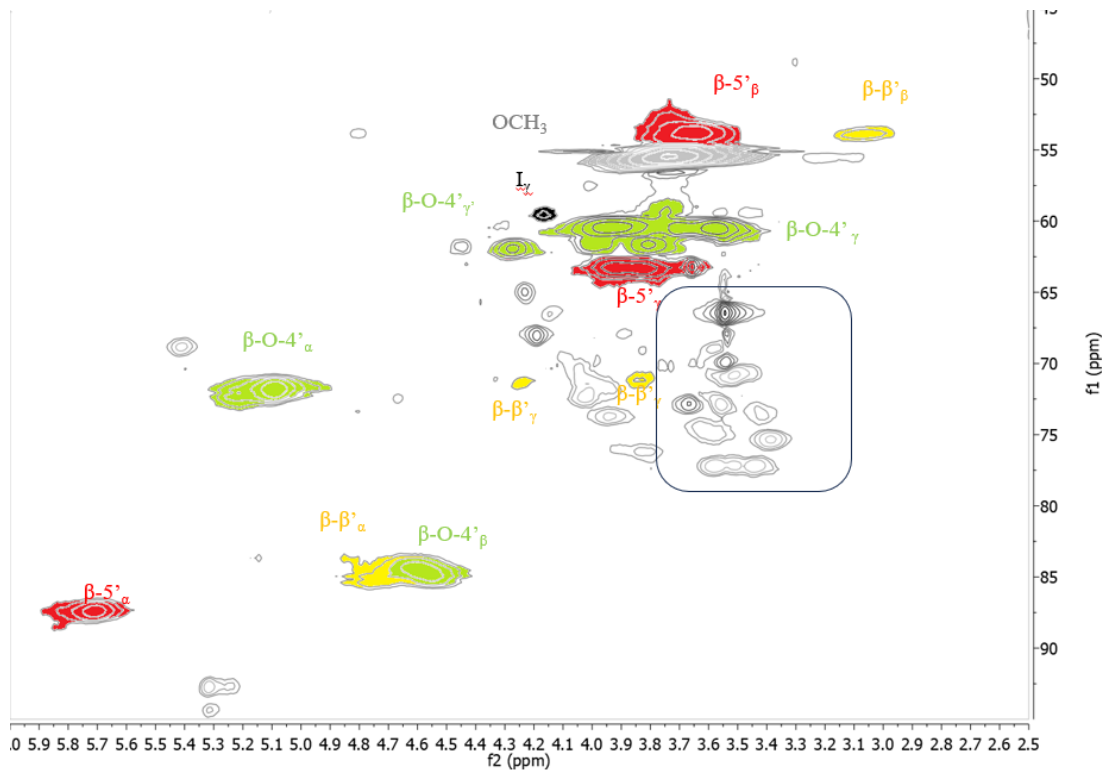


Figura 41- HSQC $^{13}\text{C}-^1\text{H}$ lignina EMAL, zona alifatica

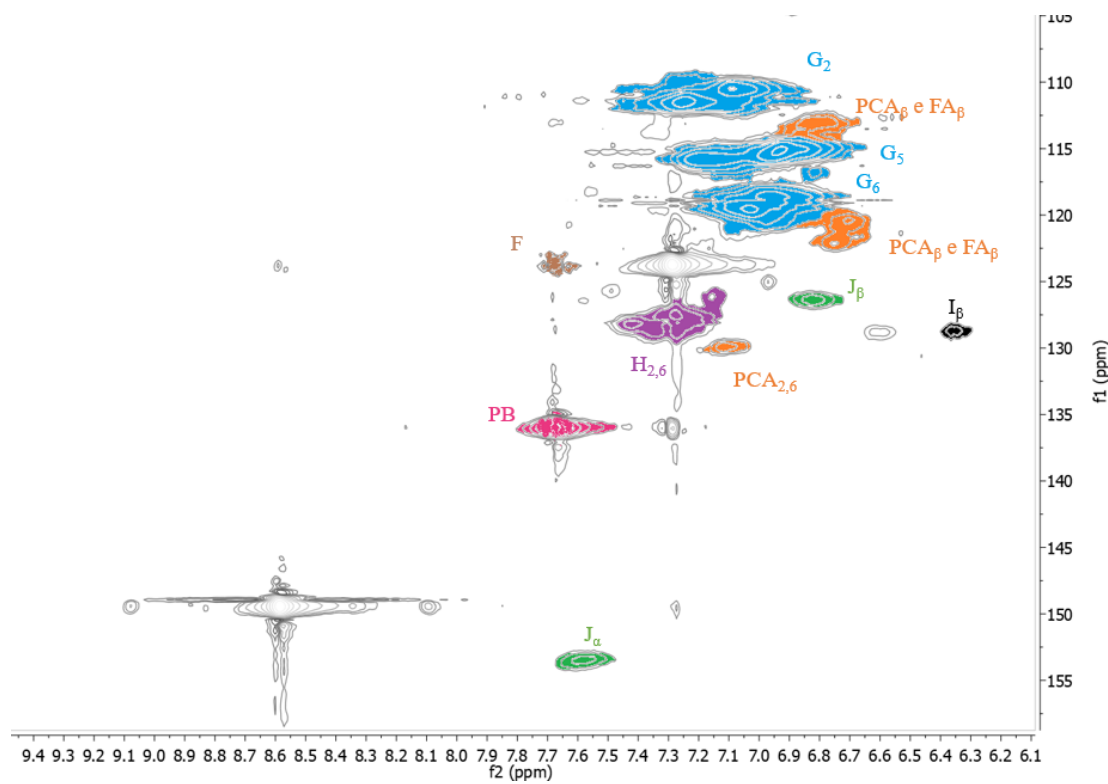


Figura 42- HSQC $^{13}\text{C}-^1\text{H}$ lignina EMAL, zona aromatica

Nel caso della lignina DES la presenza del glicole etilenico come gruppo funzionale nel legame β -O-4' è visibile nella regione corrispondente alle strutture $A\gamma'$ ($C\gamma$ - $H\gamma$ in strutture γ -acilate β -O-4'(A')), cerchiata di nero in *Figura 43*. Questo metodo di estrazione è interessante poiché, estraendo in un ambiente di reazione con un eccesso di glicole etilenico, è favorita la funzionalizzazione della lignina nella posizione α del legame β -O-4'. Infatti, è possibile notare come il picco relativo alla struttura β -O-4' _{α} più piccolo rispetto a quello relativo alla EMAL di riferimento.

Il picco a 45 /3.8 contrassegnato con etichetta HK⁶², queste strutture si formano in condizioni acide motivo per il quale negli spettri EMAL e Kraft non sono presenti. Il legame β -O-4' è l'unico legame della lignina che può dare origine a una struttura HK al momento della scissione. Pertanto, se sono state utilizzate condizioni di pretrattamento che hanno portato alla reazione (e quindi alla perdita) delle unità β -O-4' ci si aspetta un aumento proporzionale del contenuto di HK e così è stato.

I legami β - β' e β -5' rimangono relativamente invariati, cosa che suggerisce che queste unità non sono sensibili agli acidi e all'aumentare della concentrazione di acido.

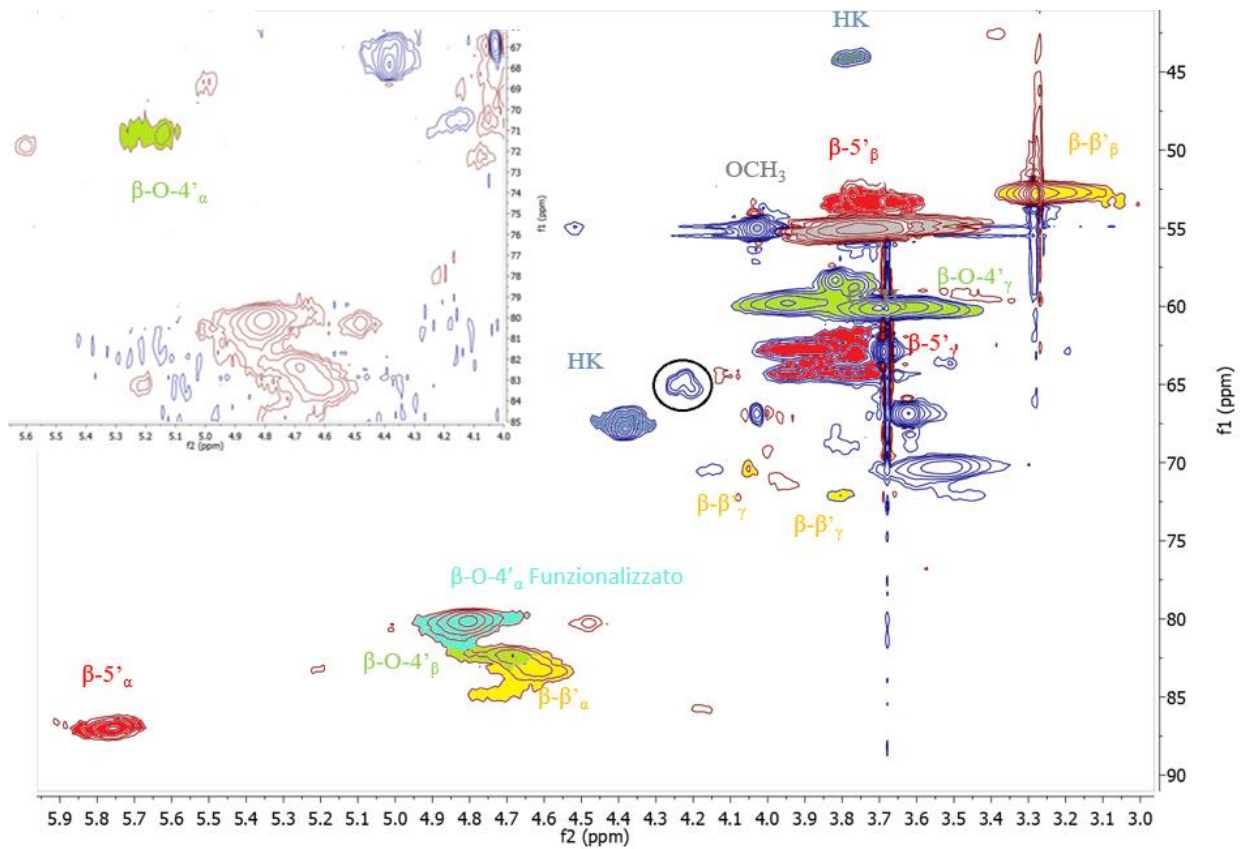


Figura 43- HSQC $^{13}\text{C}-^1\text{H}$ lignina DES, zona alifatica

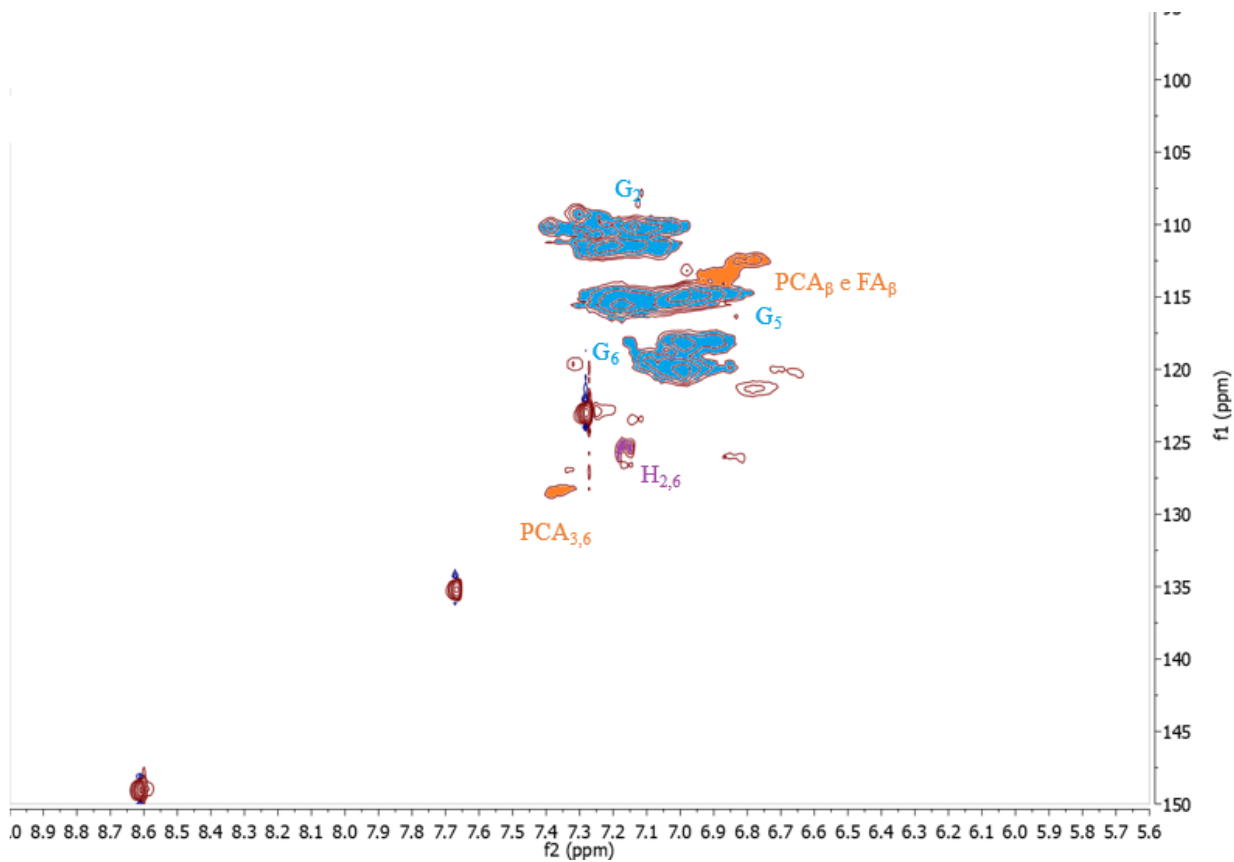


Figura 44- HSQC $^{13}\text{C}-^1\text{H}$ lignina DES, zona aromatica

Lo spettro HSQC della zona alifatica della lignina organosolv riportato in *Figura 45* mostra chiaramente la funzionalizzazione del legame β -O-4' $_{\alpha}$, segnale evidenziato in rosa, a seguito della reazione con etanolo in ambiente acido, sono presenti i segnali presenti anche nella lignina EMAL e DES ovvero β -O-4', β - β' , β -5' con relative sottostrutture α , β , γ , alcol coniferilico e metossili. La zona aromatica, riportata in *Figura 44*, evidenzia la presenza di *p*-cumarati, unità guaiaciliche e *p*-idrossifeniliche.

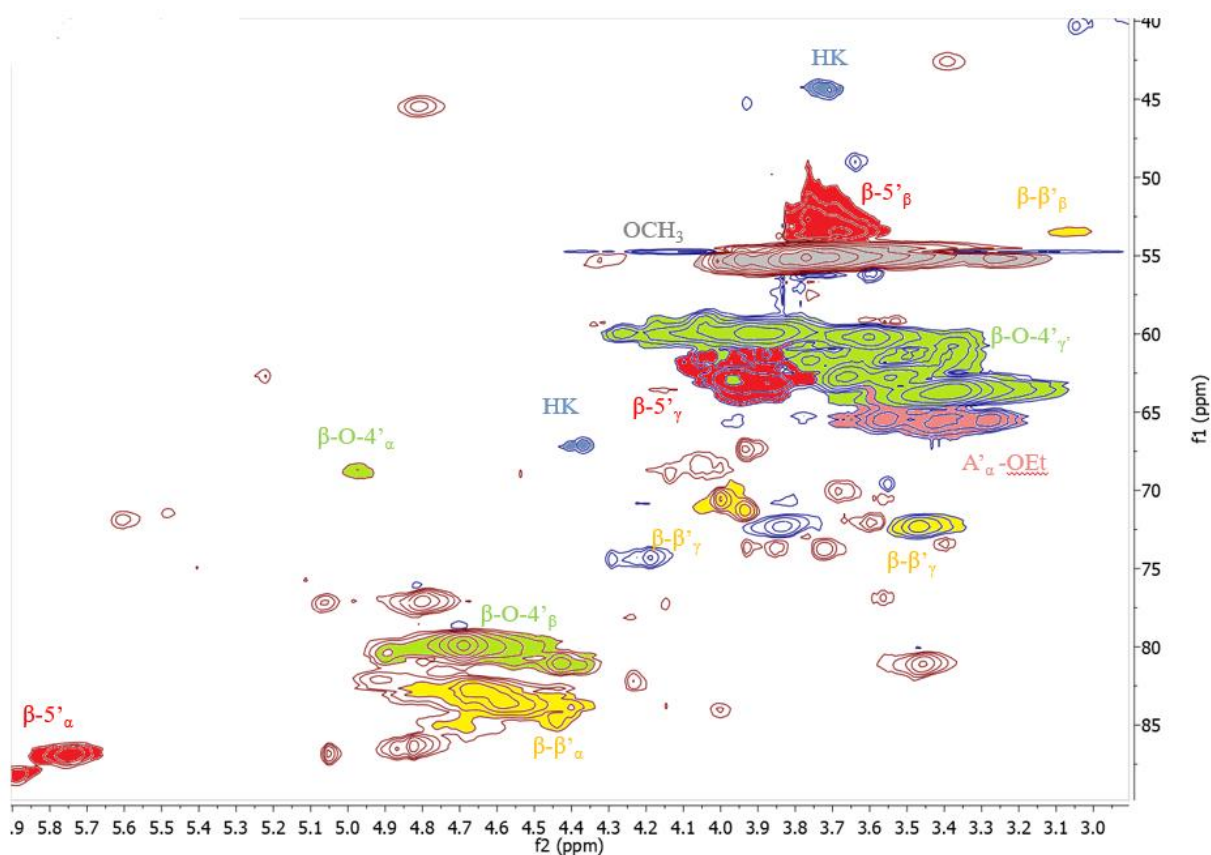


Figura 45- HSQC ^{13}C - ^1H lignina organosolv, zona alifatica

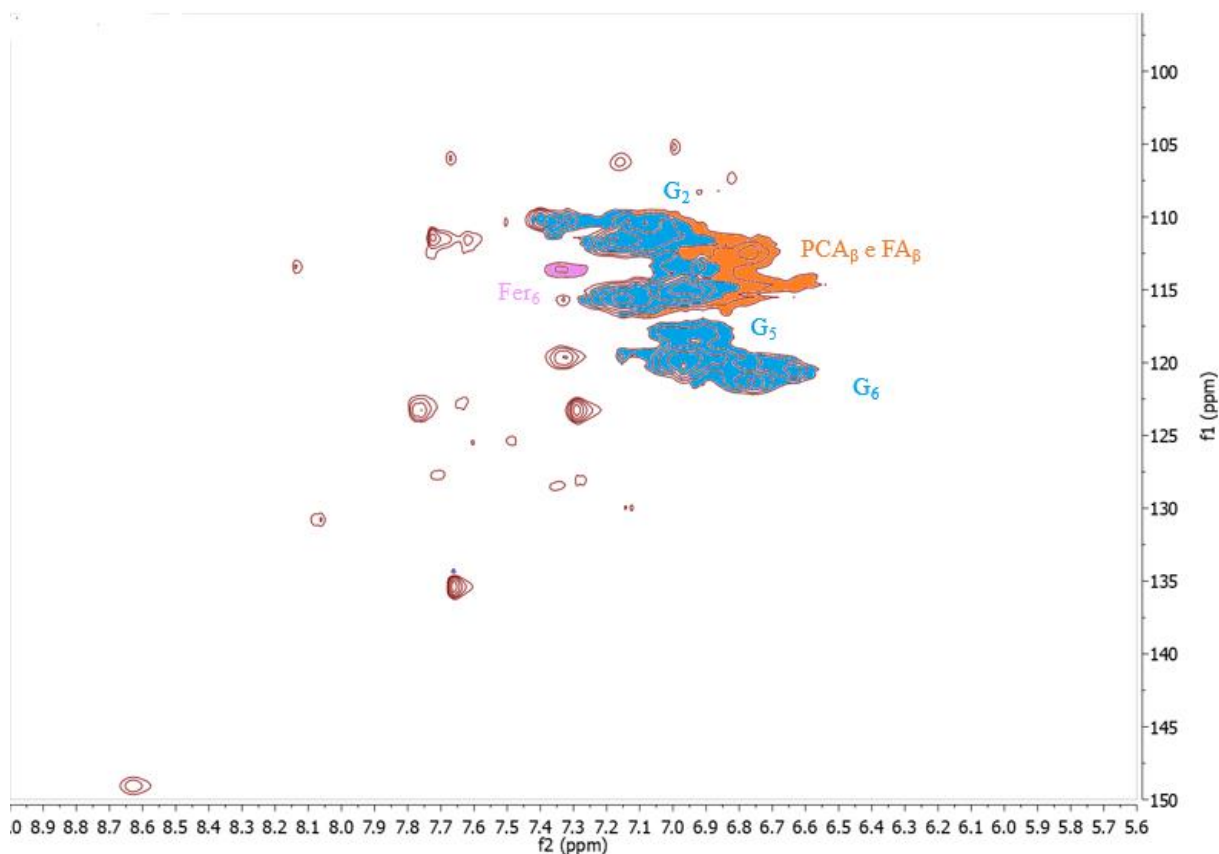


Figura 46- HSQC ^{13}C - ^1H lignina organosolv, zona aromatica

Lo spettro HSQC relativo alla zona alifatica della lignina estratta con *p*-diossano, mostrato in *Figura 47*, non mostra alcuna funzionalizzazione del legame β -O-4' a conferma dell'inerzia del solvente nei confronti della struttura della lignina. Anche in questo trattamento acido si sono generate strutture chetoniche, ma in minori quantità in quanto le mmol di acido usate sono minori rispetto al trattamento DES. Sono presenti anche β -O-4', β - β' , β -5' con relative sottostrutture α , β , γ , alcol coniferilico e merossili. La zona aromatica presenta i picchi relativi alle unità guaiaciliche, *p*-cumarato e *p*-idrossibenzoato.

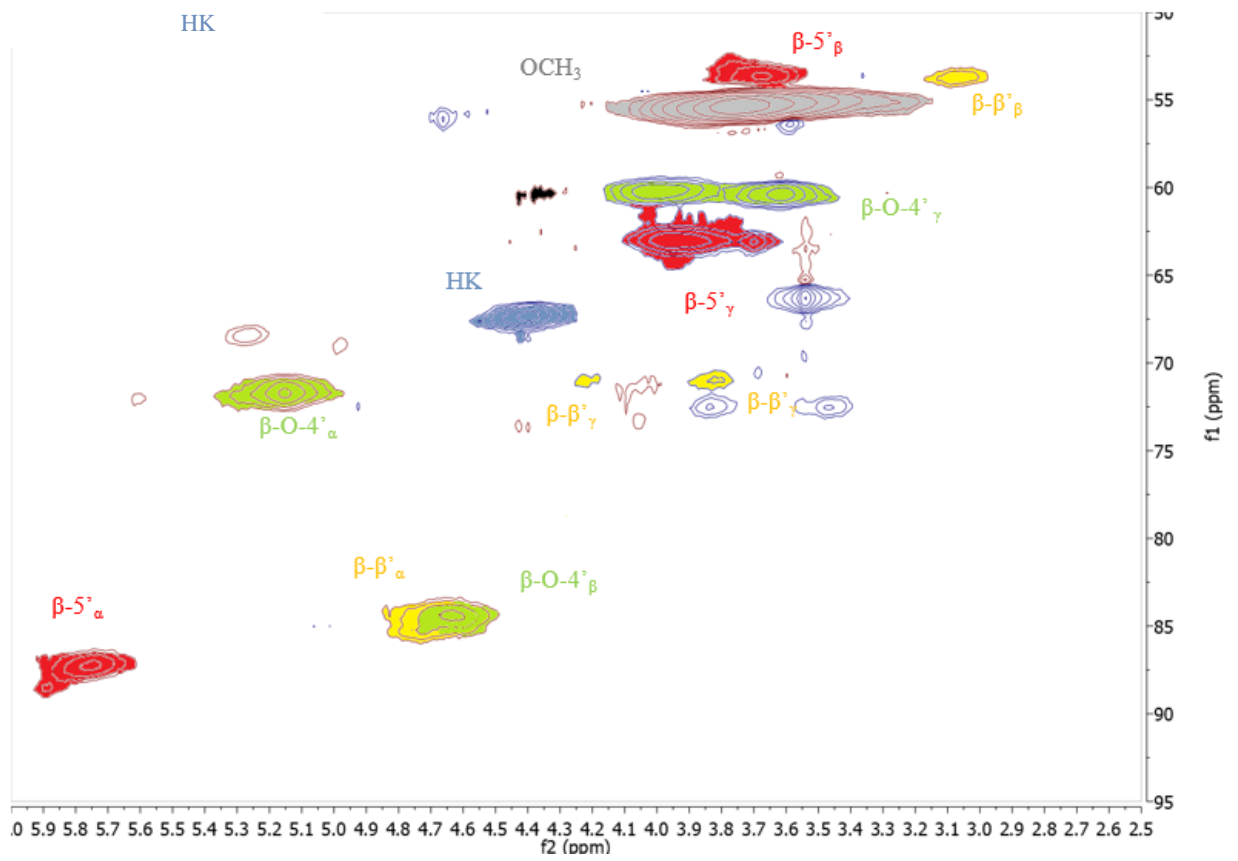


Figura 47- HSQC ¹³C-¹H lignina p-diossano, zona alifatica

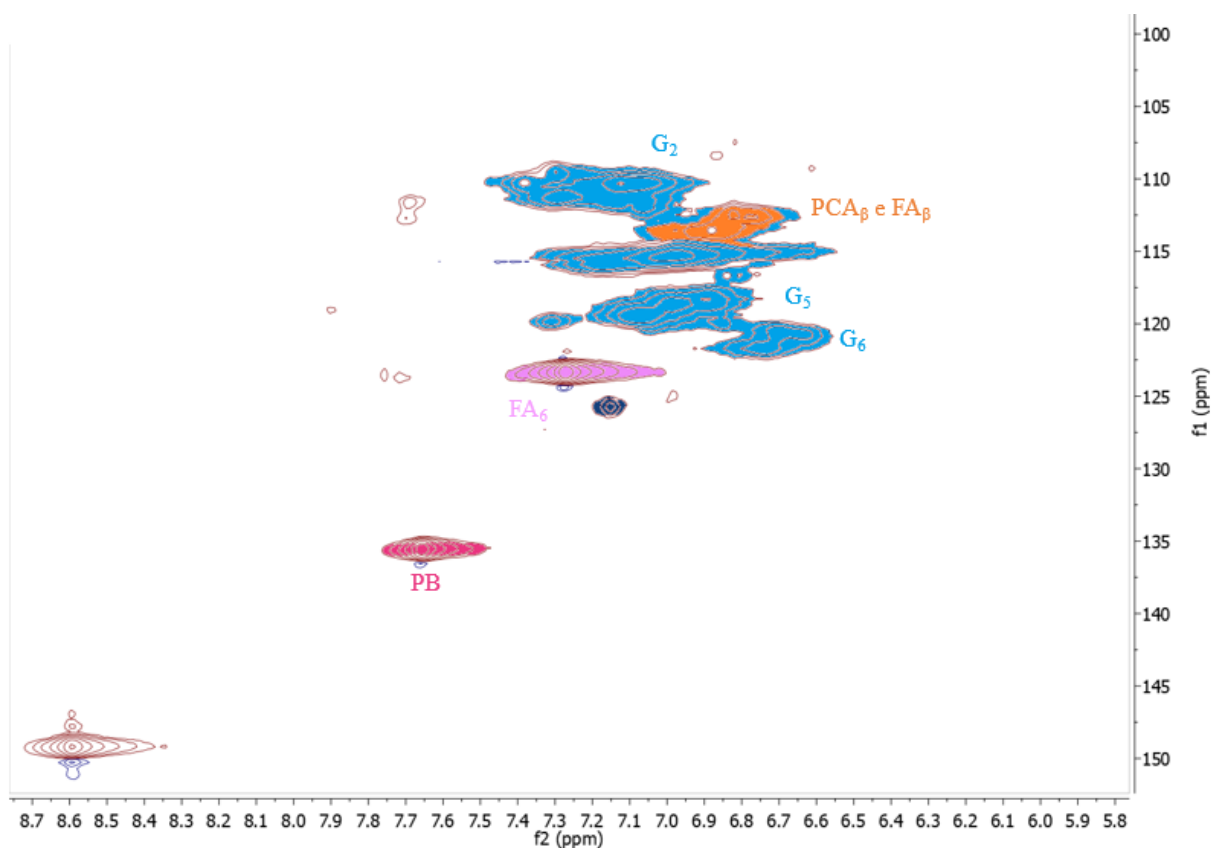


Figura 48- HSQC ^{13}C - ^1H lignina p-diossano, zona aromatica

Sfruttando i vantaggi della risoluzione bidimensionale è stato possibile indagare anche la struttura della lignina Kraft, *Figure 49/50*, in particolare è stata evidenziata l'assenza di arilglicerolo- β -aril etere γ (β -O-4') e la presenza di fenil-cumarano (β -5'), pinoresinolo (β - β'), p-idrossibenzoato (PB) e le unità guaiaciliche; le unità di difenil etano (β -1'), dibenzodiossocina (DBDO) e spirodienoni (F) sono praticamente assenti; il perché va ricercato nella chimica del processo pulping, riportato al Capitolo 5.2.1 di questa tesi. L'efficienza di questa tecnica ci ha permesso di trovare anche tracce di stilbeni (SB) e di unità K, aril enol eteri, la cui presenza deriva alla perdita di formaldeide, la reazione è riportata in *Figura 25*.

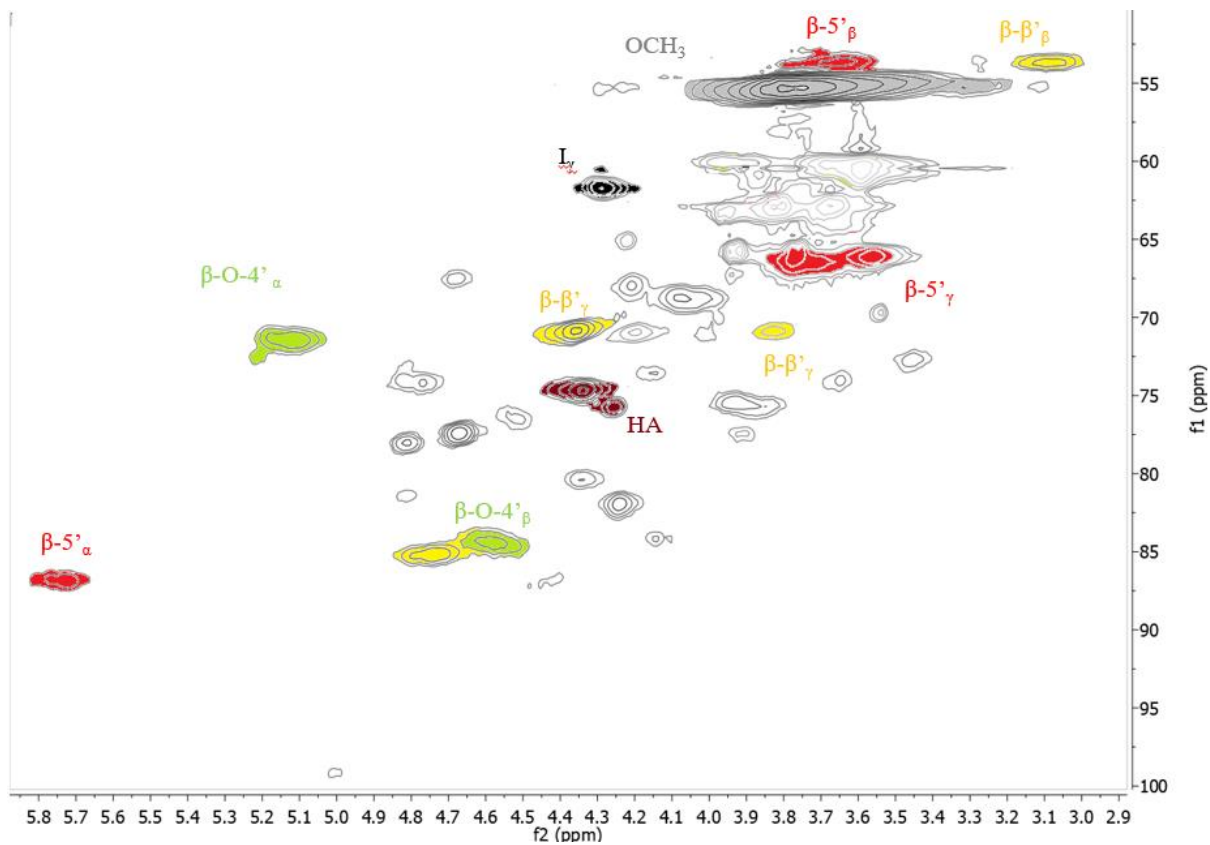


Figura 49- HSQC ^{13}C - ^1H lignina Kraft, zona alifatica

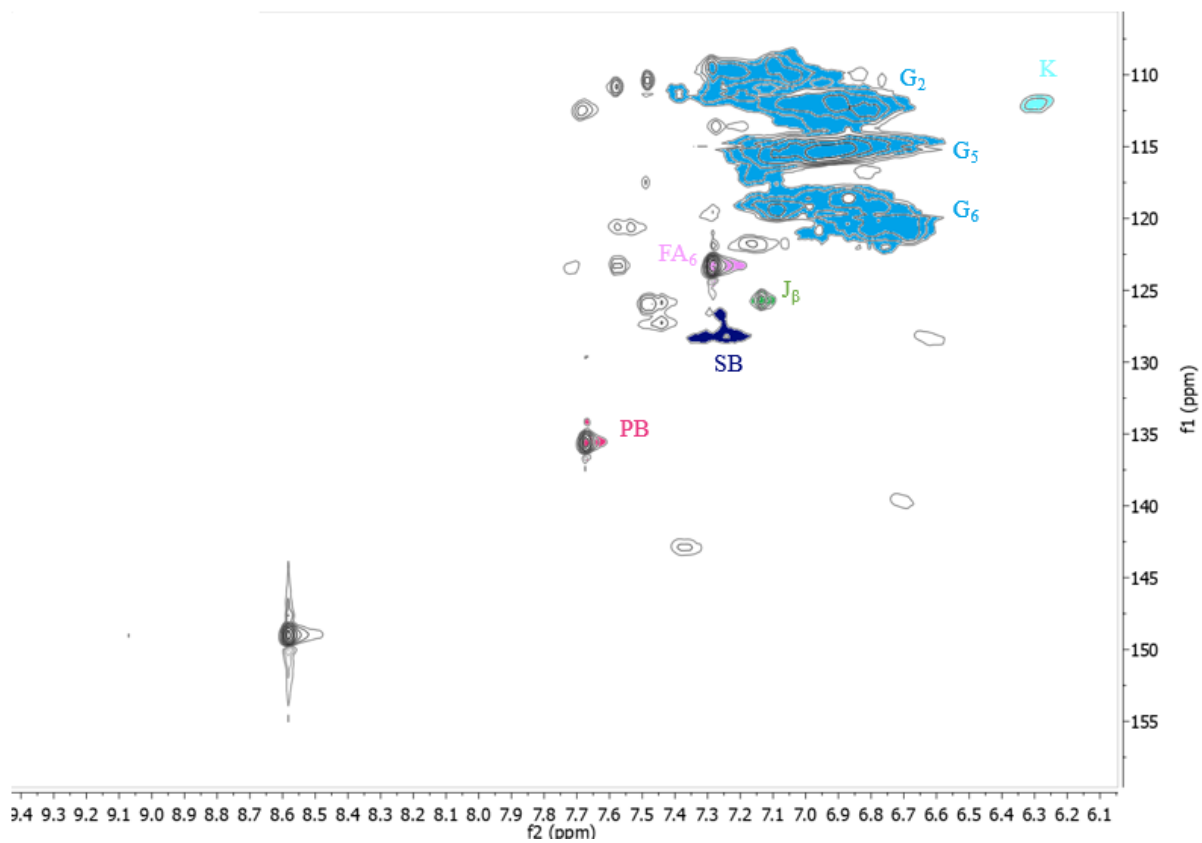


Figura 50- HSQC ^{13}C - ^1H lignina Kraft, zona aromatica

Le abbondanze relative dei principali legami interunitari e dei gruppi terminali della lignina, come gli eteri alchilici β -O-4' (A), gli eteri alchilici β -O-4' con strutture γ -OH acilate (A'), le strutture β -O-4' ossidate con C α (AOX), i fenilcumarani, i resinoli dibenzodiossocini, gli eteri α , β -diarilici, gli spirodienoni, sono stati stimati dall'integrazione dei segnali delle unità G₂ negli spettri 2D-HSQC.

Tabella 16- Valori di integrazioni mmol/g.

| | kraft | organosolv | p-diossano | DES | EMAL |
|-----------------------------|--------------|-------------------|-------------------|------------|-------------|
| β -O-4' α | 0.18 | 0.01 | 0.24 | 0.05 | 0.48 |
| β -O-4' β | 0.14 | 0.42 | 0.10 | 0.69 | 0.26 |
| β -O-4' γ | 0 | 0.83 | 0.50 | 3.15 | 1.09 |
| β - β' α | 0.15 | 0.30 | 0.07 | 0.33 | 0.09 |
| β - β' β | 0.09 | 0.01 | 0.02 | 3.30 | 0.04 |
| β - β' γ | 0.34 | 0.06 | 0.04 | 0.05 | 0.02 |
| β -5' α | 0.05 | 0.01 | 0.15 | 0.25 | 0.18 |
| β -5' β | 0.12 | 0.18 | 0.10 | 0.44 | 0.47 |
| β -5' γ | 1.20 | 0.11 | 0.24 | 0.36 | 0.27 |

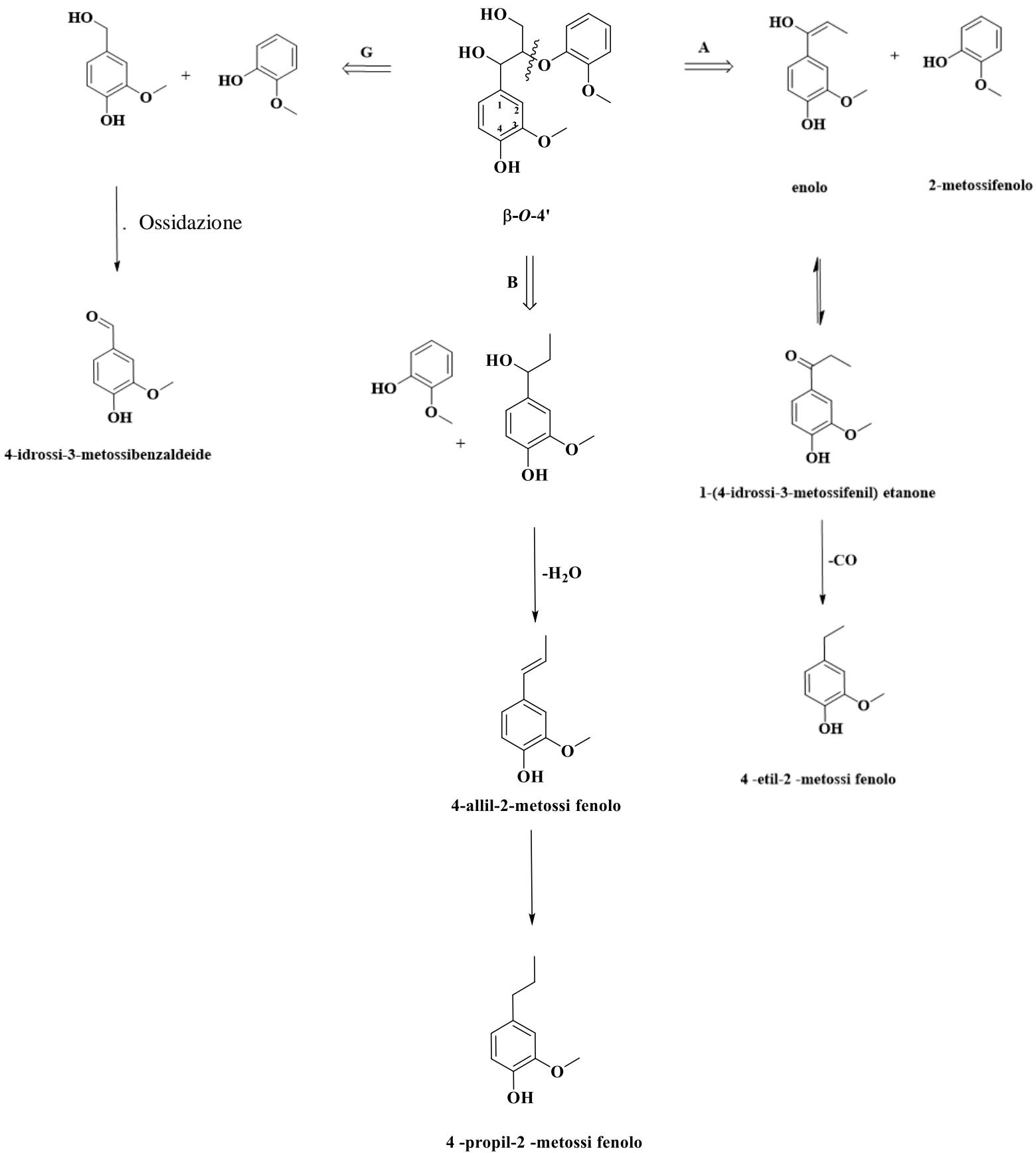
5.3.6 GC/MS pirolisi

Ad ulteriore conferma della struttura macromolecolare, le diverse preparazioni di lignina sono state sottoposte a degradazione termica tramite gascromatografia-spettrometria di massa - pirolisi⁶³

La pirolisi della biomassa ha un forte interesse negli ultimi decenni ⁶⁴, in quanto rappresenta un metodo termochimico semplice per trasformare la lignina in composti a basso peso molecolare. I composti risultanti dalla degradazione termica delle lignine studiate sono principalmente prodotti aromatici monomerici con gruppi idrossilici fenolici e metossilici aromatici a seconda dei diversi legami tra le singole unità della lignina.

Uno studio del 1963 presentato alla quarta conferenza internazionale sulla degradazione termica a Budapest⁶⁵ viene ripreso e calato nel contesto della biomassa lignocellulosica. Il risultato di questo lavoro sinergico fu pubblicato dal dipartimento di Ingegneria Chimica del Massachusetts⁶⁶ nel 1983: riportava la frammentazione in condizione di pirolisi del legame β -O-4'.

Viene riportata, nello *Schema 2*, la frammentazione del legame β -O-4' in accordo con quanto appena detto. La via di degradazione A viene definita primaria e porta alla formazione delle specie 2-metossifenolo, 4-etil-2-metossi fenolo e 1-(4-idrossi-3-metossifenil) etanone. La via B di degradazione porta alla prima formazione del 4-allil-2-metossi fenolo, successivamente a causa della perdita d'acqua si ha la formazione del 4-propil-2-metossifenolo. L'ultima via di degradazione, denominata G vede come prodotto finale di degradazione termica il 4-idrossi-3-metossibenzaldeide. Tutti questi frammenti, comuni a tutti i campioni, sono abbondantemente presenti nei pirogrammi; tuttavia, non è stata eseguita una valutazione quantitativa dei prodotti di pirolisi.



Schema 2- frammentazione del legame β -O-4' durante la pirolisi

In *Figura 51* vengono riportati tutti i pirogrammi della lignina.

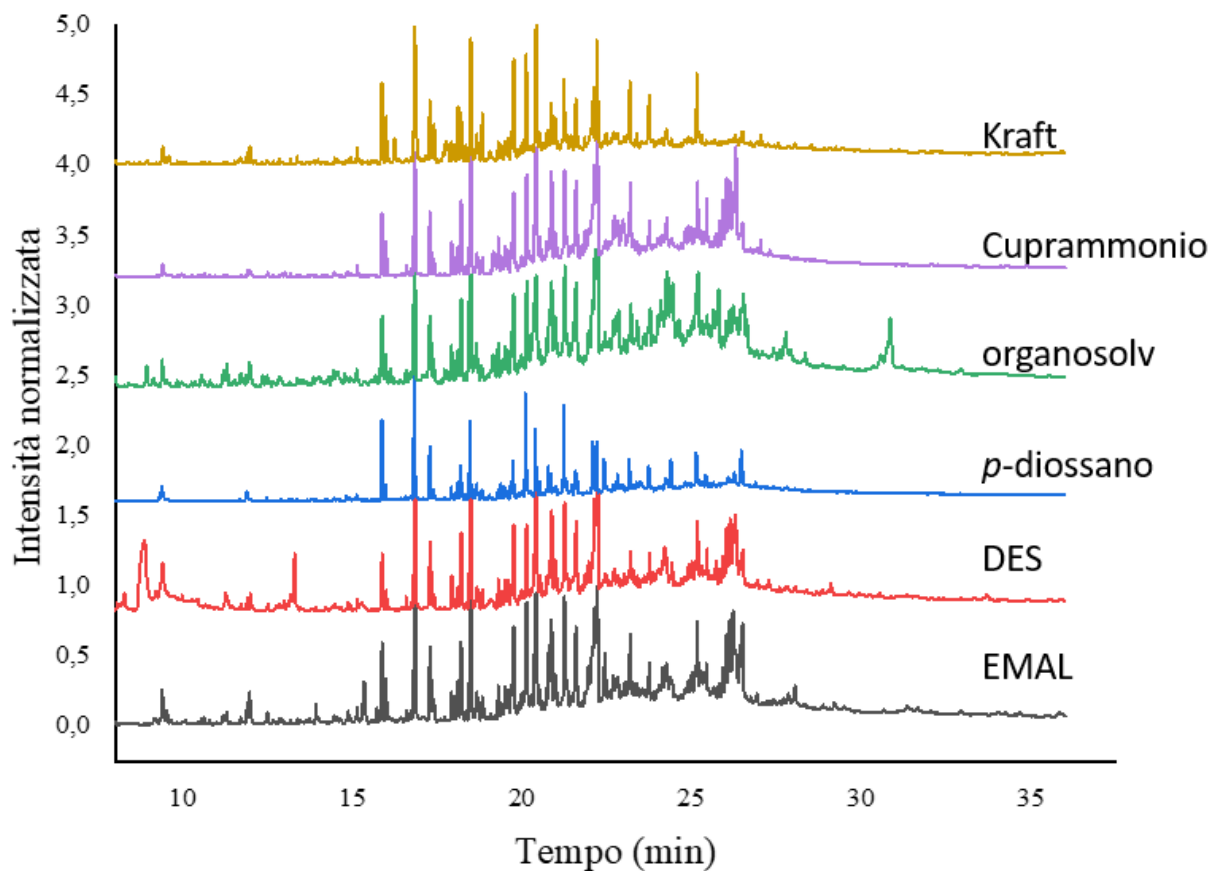
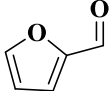
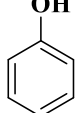
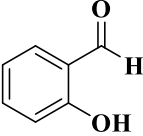
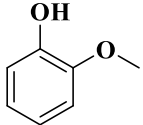
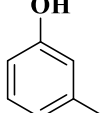
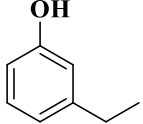
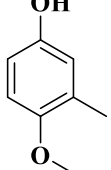
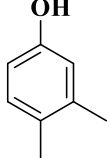
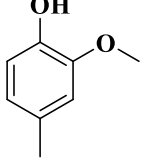
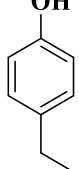
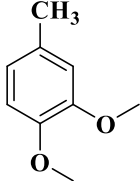
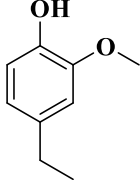
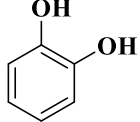
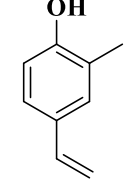
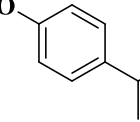
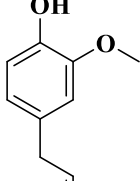
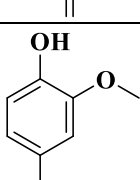
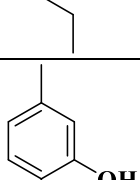
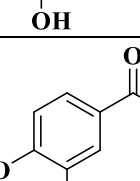
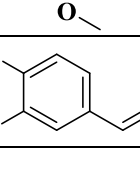


Figura 51- Pirogrammi delle lignine

I pirogrammi delle lignine sono piuttosto simili e rilasciano prevalentemente composti fenolici che derivano da unità *p*-idrossifeniliche (H) e guaiaciliche (G) della lignina e da *p*-idrossicinnamati (*p*-cumarati e ferulati). È stata presa come lignina modello la EMAL, considerata tra tutte quella più affine, per struttura, alla lignina nativa. I fenoli sono i prodotti di pirolisi più abbondanti.

Tabella 17- Assegnazione frammenti caratteristici

| n. | Composto | |
|----|--------------------------|---|
| 1 | Furfurale |  |
| 2 | Fenolo |  |
| 3 | 2- idrossibenzaldeide |  |
| 4 | 2-metossifenolo |  |
| 5 | 3-metilfenolo |  |
| 6 | 3-etilfenolo |  |
| 7 | 4 -metossi-3-metilfenolo |  |
| 8 | 3,4 dimetilfenolo |  |
| 9 | 2 -metossi-4-metilfenolo |  |
| 10 | 4-etilfenolo |  |

| | | |
|----|--------------------------------|---|
| 11 | 3,4 -dimetossitoluene |  |
| 12 | 4 -etil-2 -metossifenolo |  |
| 13 | 1,2- diidrossibenzene |  |
| 14 | 2-metil-4- vinilfenolo |  |
| 15 | 4-(2-propil) fenolo |  |
| 16 | 4-allil-2-metossifenolo |  |
| 17 | 2-metossi-4-propil fenolo |  |
| 18 | 3,4-diidrossitoluene |  |
| 19 | 4-idrossi-3-metossibenzaldeide |  |
| 20 | 2 metossi-4-(1propenil) fenolo |  |

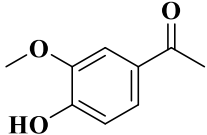
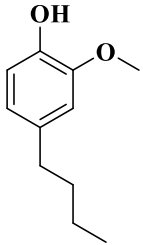
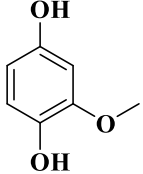
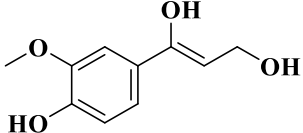
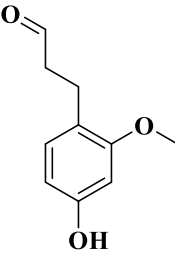
| | | |
|----|--|--|
| 21 | 1-(4-idrossi-3-metossifenil) etanone |  |
| 22 | 4-butil guaiacolo |  |
| 23 | 4-idrossi-3-metossifenolo |  |
| 24 | 4-(3-idrossiprop-1-en-1-il) -2-metossifenolo |  |
| 25 | 3-(4-idrossi-2-metossifenil) -propanale |  |

Tabella 18- Contenuto percentuale dei frammenti caratteristici.

| ## | Composto | Lignina p -diossano | Lignina kraft | Lignina organosolv | Lignina EMAL | Lignina DES | Lignina Cuprammonio |
|----|---|---------------------|---------------|--------------------|--------------|-------------|---------------------|
| 1 | Furfurale | 0,79 | 0,8 | 0,56 | 1,73 | 2,47 | |
| 2 | Fenolo | 6,03 | 3,45 | 1,67 | 1,74 | 1,44 | 1,69 |
| 3 | 2- idrossibenzaldeide | 0,97 | 2,65 | 0,47 | 1,15 | 0,38 | 0,76 |
| 4 | 2- metossifenolo | 12,01 | 6,57 | 3,8 | 4,54 | 3,89 | 5,23 |
| 5 | 3- metilfenolo | 5,72 | 7,58 | 2,44 | 2,81 | 2,83 | 2,62 |
| 6 | 3- etilfenolo | | | | 0,952 | 0,07 | 0,4 |
| 7 | 4 -metossi-3- metil fenolo | 1,49 | 2,5 | 0,83 | 0,66 | 0,62 | 0,6 |
| 8 | 3,4 dimetilfenolo | 2,83 | 2,08 | 1,74 | 1,72 | 1,98 | 1,99 |
| 9 | 2 -metossi-4- metilfenolo | 6,22 | 5,98 | 4,54 | 4,01 | 5,18 | 5,16 |
| 10 | 4- etilfenolo | 1,72 | 1,74 | 1,39 | 0,96 | 0,77 | 0,85 |
| 11 | 3,4 -dimetossitoluene | 0,86 | 2,68 | 1,35 | 0,72 | 1,5 | 0,52 |
| 12 | 4 -etil-2 -metossifenolo | 3,02 | 5,36 | 3,25 | 3,27 | 2,37 | 3,8 |
| 13 | 1,2- diidrossibenzene | 8,02 | 3,86 | 2,39 | 4,93 | 1,61 | 2,39 |
| 14 | 2- metil-4- vini lfenolo | 5,47 | 7,81 | 5,03 | 5,45 | 5,08 | 5,54 |
| 15 | 4-(2- propil) fenolo | | 1,93 | 0,2 | 2,34 | 0,54 | 1,12 |
| 16 | 3- allil-6- metossifenolo | | 1,79 | 1,82 | 2,61 | 2,7 | 2,38 |
| 17 | 2- metossi-4- propilfenolo | 0,47 | 1,01 | 0,76 | 1,82 | 1,33 | 0,9 |
| 18 | 3,4- diidrossitoluene | 6,9 | 3,68 | 2,65 | 2,94 | 3,21 | 3,09 |
| 19 | 4- idrossi-3- metossibenzaldeide | 4,87 | 5,67 | 2,38 | 5,99 | 5,24 | 7,57 |
| 20 | 2 metossi-4-(1 propeni) fenolo | 9,91 | 7,66 | 8,19 | 8,37 | 6,19 | 12,9 |
| 21 | 1-(4- idrossi-3- metossifenil) etanone | 2,21 | 4,4 | 2,25 | 2,16 | 2,1 | 3,94 |
| 22 | 4- butilguaiacolo | 6,6 | 4,46 | 13,15 | 4,85 | 7,03 | 4,5 |
| 23 | 4- idrossi-3- metossifenolo | 3,62 | 2,97 | 6,21 | 2,08 | 3,03 | 3,88 |
| 24 | 4-(3- idrossiprop- 1- en- 1- il)-2- metossifenolo | 1,29 | 0,17 | 7,27 | 2,48 | 3,45 | 2,9 |
| 25 | 3-(4- idrossi-2- metossifenil) -propanale | 4,49 | 1 | 5,59 | 6,09 | 3,15 | 1,89 |

Sono stati assegnati i picchi del pirogramma della lignina EMAL come guida per l'assegnazione degli altri spettri.

In *Figura 52* viene riportato il grafico della lignina EMAL con l'assegnazione dei frammenti più significativi. La presenza di 3-furfuraldeide (picco 1),⁶⁰ evidenziata in *Figura 53* indica la presenza di zuccheri residui nei campioni; la lignina cuprammonio non presenta il segnale caratteristico, dunque è possibile ipotizzare che tale procedura riesca bene a separare le cellulose ed emicelulosa della lignina, la lignina DES contiene, tra tutte le legnine trattate la maggior quantità di zuccheri.

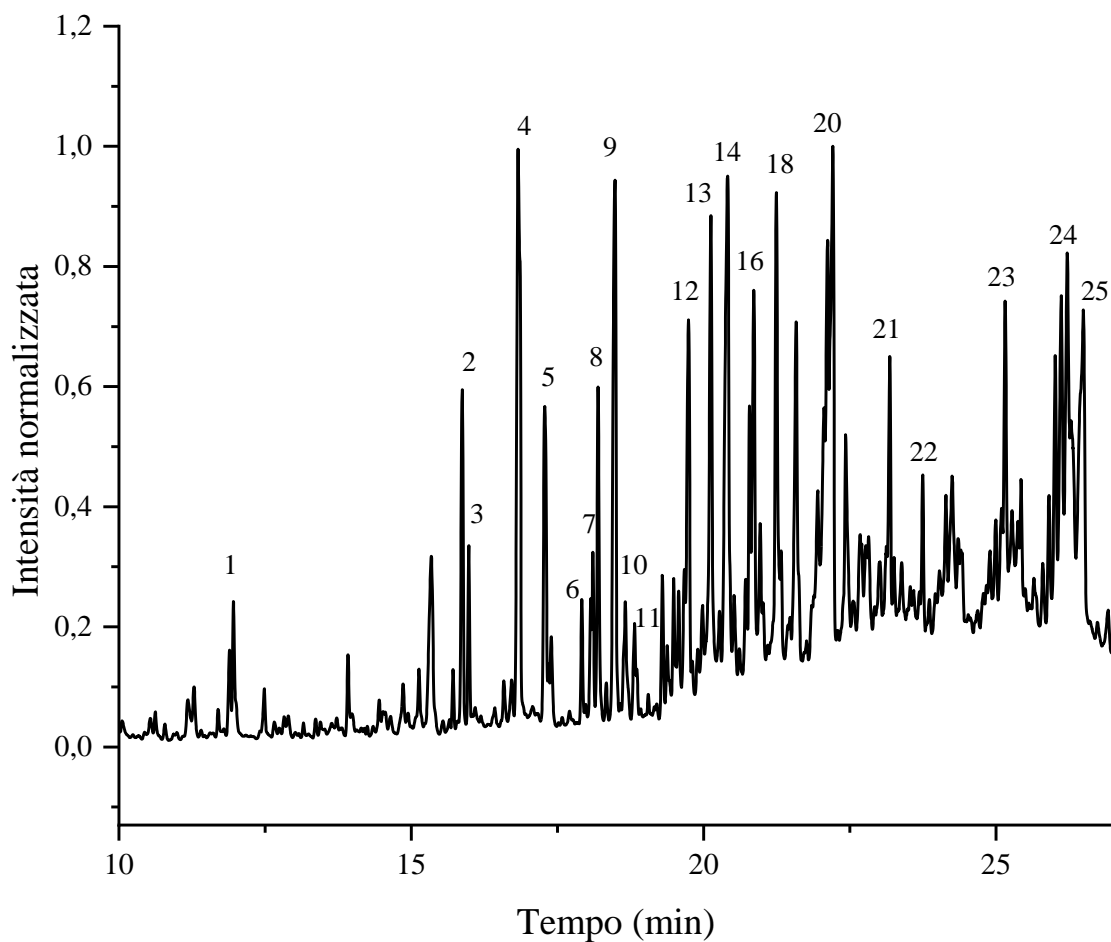


Figura 52 – pirogramma lignina EMAL con frammenti assegnati

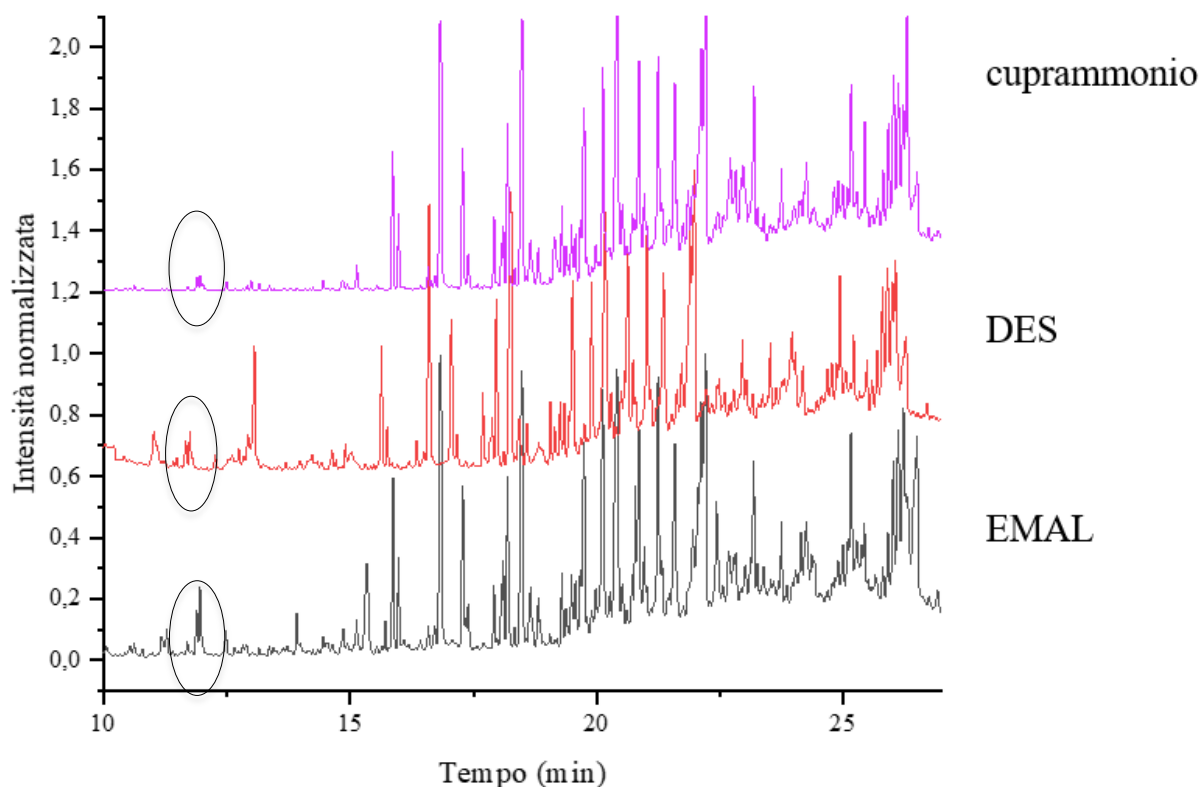


Figura 53- Confronto tra lignina EMAL, cuprammonio e DES sul contenuto di zuccheri.

Il confronto riportato in *Figura 54* rappresenta probabilmente il confronto per eccellenza in tema di GC/MS pirolisi. Uno studio (1984) del dipartimento di ingegneria chimica dell'Università di Delaware⁶⁷ propose un modello per la conversione di macropolimeri (lignina) durante il trattamento termico sfruttando appunto il confronto tra lignina EMAL e Kraft. Si può notare, appunto, come la lignina EMAL abbia molti più segnali rispetto la Kraft, questo per svariati motivi. Fondamentalmente l'assenza di specie β -O-4' γ nella lignina Kraft (fare riferimento anche agli HSQC) giustifica l'assenza di picchi nell'analisi di GC/MS pirolisi in quanto sono assenti i relativi prodotti di degradazione, inoltre risultano mancanti anche tutti i picchi caratterizzanti la presenza di zuccheri che invece sono presenti nello spettro della lignina EMAL.

Il picco 24 ad esempio, corrispondente a 4-(3-idrossiprop-1-en-1-il) -2-metossifenolo, contenente un gruppo metossilico non è presente nel pirogramma della lignina Kraft perché il processo alcalino ne prevede la degradazione.

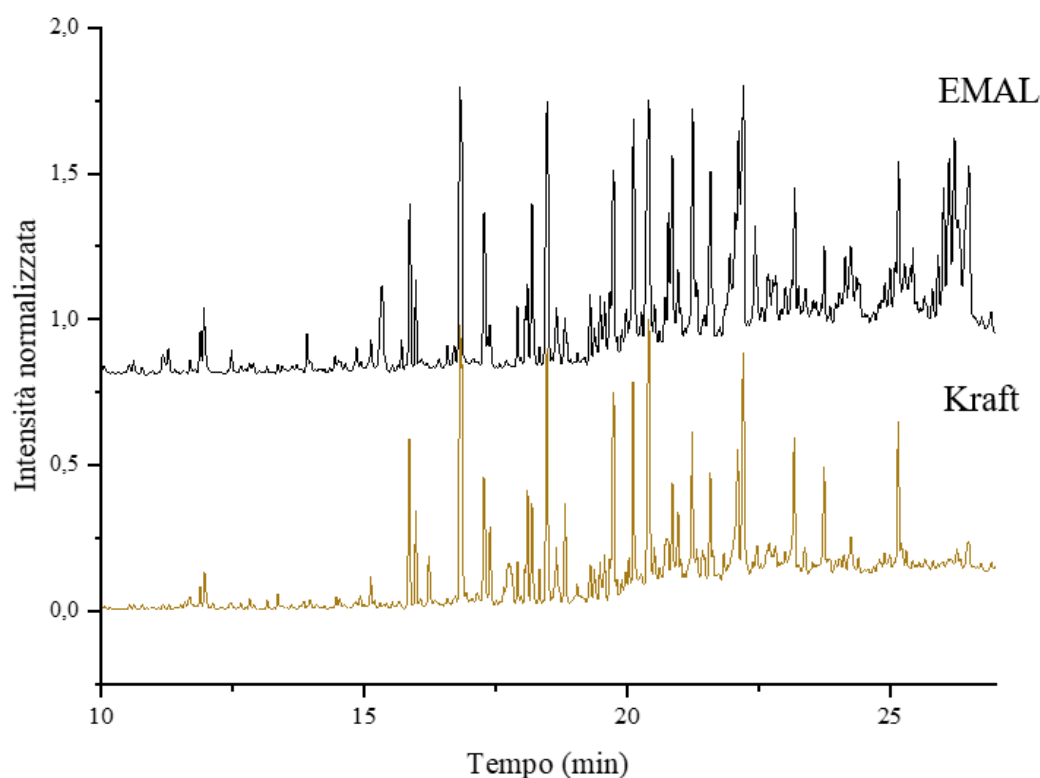


Figura 54- Confronto tra lignina EMAL e Kraft.

Nel pirogramma della lignina diossanica si notano subito molti picchi in meno rispetto alla EMAL, probabilmente la causa è da ricercare negli spettri HSQC, nello specifico, nel contenuto di zuccheri che rende lo spettro della lignina EMAL molto più articolato a differenza dell spettro della lignina *p*-diossano che risulta più pulito grazie al trattamento acido subito. Non solo, ad esempio, il picco 13, evidenziato in *Figura 55*, rappresenta il 1,2- diidrossibenzene, meglio conosciuto come catecolo che è il risultato di demetilazione causato dalla pirolisi. L'abbondanza percentuale nella lignina *p*-diossano è di 8.02 % mentre nella EMAL solo del 4.93%, probabilmente dovute alla presenza di β -O-4' come struttura ricondensata.

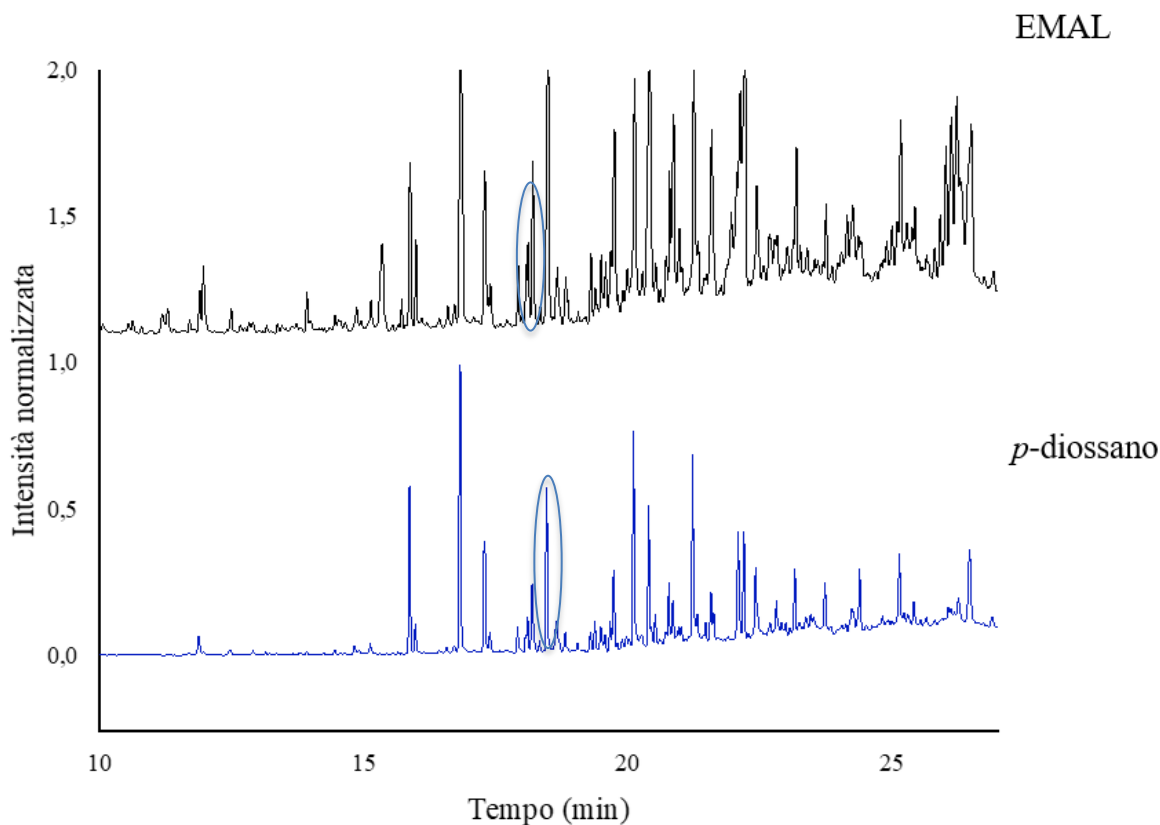


Figura 55- Confronto tra lignina EMAL e *p*-diossano

Interessante è stato notare come nonostante la lignina al cuprammonio, *Figura 56*, abbia dato problemi di solubilità dovuti all'alto grado di ramificazione, presenti frammenti analoghi alle altre lignine, probabilmente la pirolisi ha frammentato tutta la struttura condensata della lignina cuprammonio. Per riportare un esempio, il picco 11 corrispondente al 3,4 dimetossitoluene ha la stessa intensità, come per 2-metossi-4 vinilfenolo (picco 14), fenolo (picco 1), guaiacolo (picco 22), 3-Alil,6- metossifenolo ecc. Questo permette di speculare sul fatto che, probabilmente, la lignina al cuprammonio ha caratteristiche comuni alle altre preparazioni ma, per via dell'alto grado di reticolazione, che ne rende impossibile la caratterizzazione allo stato liquido, tale similitudini non possono essere evidenziate facilmente.

Tali similitudini, in realtà, sono già state evidenziate in un interessante studio allo stato solido ^{13}C NMR CP-MAS da Bartuska.⁵⁷ In particolare, sono stati confrontati gli spettri di lignine *p*-diossano, MWL, cuprammonio ed al periodato ed è stato evidenziato che non emerge alcuna sostanziale differenza in termini di segnali attribuiti a strutture

fondamentali della lignina tra il campione ottenuto con la procedura al cuprammonio e le preparazioni. Da ciò si può speculare sulla differenza strutturale di questa lignina che può risiedere o nell'alto grado di ramificazione, o nel suo alto peso molecolare, simile a quello della lignina nativa, che ne impedisce la dissoluzione.

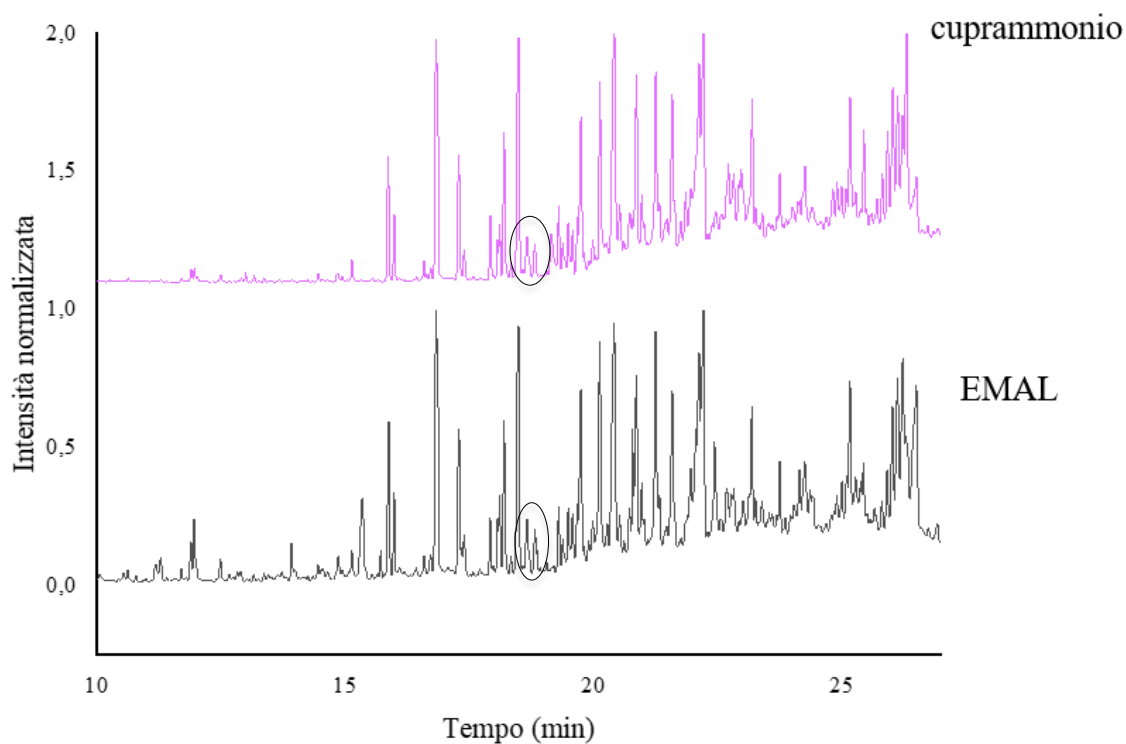


Figura 56 - Confronto tra lignina EMAL e cuprammonio

6 Conclusioni e previsioni future

Il presente studio ha investigato come le caratteristiche strutture tipiche della lignina, come β -O-4', β - β ', β -5, β -1', 5-5' e 4-O-5' vengono modificate durante l'estrazione impiegando diverse metodologie caratterizzate da acidità via via crescente.

L'analisi GPC ha permesso di trarre informazioni circa l' M_n e la \bar{D} delle lignine estratte. In particolare, se da un lato, il campione di EMAL risulta essere quello caratterizzato da M_n e \bar{D} maggiori rispetto alle altre preparazioni, dall'altro, la lignina organosolv è risultata quella con minore M_n e \bar{D} . Questi dati hanno permesso di concludere che se il processo enzimatico al cuore della EMAL permette di preservare maggiormente la struttura polimerica della lignina nativa nel prodotto estratto, la acidolisi operata in etanolo, con condizioni d'acidità più spinta tra tutte le altre preparazioni, oltreché portare all'ottenimento di una lignina *etossilata*, ha causato anche una forte depolimerizzazione. Questa depolimerizzazione, tuttavia, è particolarmente omogenea, come testimoniato dalla bassa \bar{D} del prodotto ottenuto.

Lo studio FT-IR, oltreché evidenziare qualitativamente le differenze strutturali derivanti dai vari processi estrattivi, ha permesso di confermare, tramite lo stiramento C-S, l'incorporazione di zolfo nella struttura finale della lignina, come conseguenza del processo alcalino. Tale dato è anche stato successivamente confermato anche tramite l'analisi elementare.

L'analisi ^{31}P NMR eseguita dopo la procedura DFRC ha permesso la quantificazione delle unità condensate e non condensate, che, sinergicamente ai risultati dell'analisi ^{31}P NMR tradizionale, ha permesso di identificare nella lignina organosolv il prodotto più condensato oltreché depolimerizzato.

Grazie all'analisi GC-MS pirolisi, tecnica in solido, è stato possibile caratterizzare anche la lignina al cuprammonio, l'unica preparazione che non è stato possibile analizzare coi metodi basati sulla dissoluzione del campione. In questo caso, è stato interessante notare che dal pirogramma di questa preparazione sono stati evidenziati prodotti principalmente riconducibili alla lignina EMAL con completa assenza di specie amminate che avrebbero potuto contaminare il prodotto durante la sua estrazione. La similitudine dei prodotti di frammentazione pirolitica con quelli derivanti dalla EMAL ha permesso di ipotizzare

chela struttura della lignina al cuprammonio, ancora incognita allo stato attuale della ricerca, sia simile alla lignina nativa.

Al fine di ottenere una struttura più chiara delle preparazioni ottenute, sarebbe interessante procedere con analisi con la quantificazione dei gruppi metossilici. Tale determinazione permetterebbe poi, accoppiata a dati di analisi elementare, di giungere a formule C₉, comunemente impiegate nel settore della chimica della lignina, che danno un'idea generale della struttura della lignina in base alla sua unità formula più semplice. Analogamente interessante sarebbe poi procedere con l'analisi di microscopia elettronica a scansione dei campioni per approfondire il rapporto tra acidità e microstruttura.

7 Bibliografia

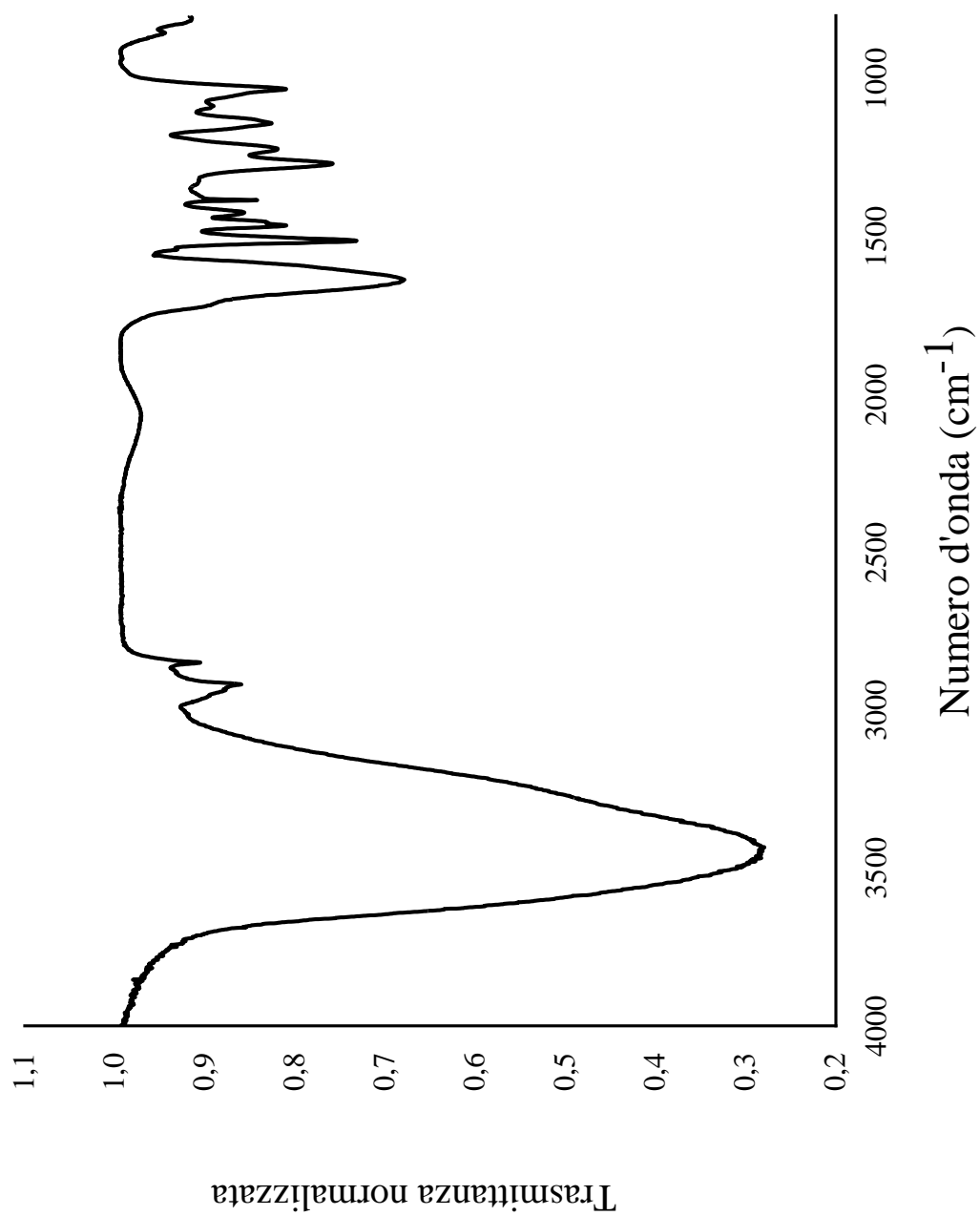
- (1) Lacy, P.; Rutqvist, J.; Lamonica, B. Circular economy: Dallo spreco al valore; EGEA spa, 2016.
- (2) Brunori, G. Biomass, EuroChoices, 2013, 12 (1), 48.
- (3) Konstantinavičienė, J.; Vitunskienė, V, Sostenibilità 2023 , 15 , 9311.
- (4) Demirbaş A, Energy Sources 2005, 27 (8),
- (5) Rowell, R., Ed.; Advances in Chemistry; American Chemical Society: Washington, DC, 1984; Vol. 207.
- (6) Klemm, D.; Heublein, B.; Fink, H.-P.; Bohn, A. Angew Chem Int Ed Engl 2005, 44 (22), 3358
- (7) Timell, T. E. Wood Sci.Technol. 1967, 1 (1), 45.
- (8) Sjostrom, E. Wood Chemistry: Fundamentals and Applications; Elsevier, 2013.
- (9) Meng, X.; Crestini, C.; Ben, H.; Hao, N.; Pu, Y.; Ragauskas, A. J.; Argyropoulos, D. S.. Nat Protoc 2019, 14 (9), 2627.
- (10) Sjöström, E., Ed. Front Matter. In Wood Chemistry (Second Edition); Academic Press: San Diego, 1993.
- (11) Leary, G. J. Wood Sci. Technol. 1980, 14 (1), 21.
- (12) Figueiredo, P.; Santos, H. A. Lignin-Based Materials for Biomedical Applications; Elsevier, 2021; pp 195.
- (13) Nicholson, D. J.; Leavitt, A. T.; Francis, R. C. Three-Stage Klason method for more accurate determination of hardwood lignin content, Scientific Consultant, Syracuse, NY 13210, USA, 2013.
- (14) Karl Freudenberg und G'ustav Dietrich. Vergleichende Untersudiung Des Fichten- Und Buchen -Lignins. 1948.
- (15) Saha, M.; Saynik, P. B.; Borah, A.; Malani, R. S.; Arya, P.; Shivangi; Moholkar, V. S. Bioresource Technology Reports 2019, 5, 206.
- (16) El Hage, R.; Brosse, N.; Chrusciel, L.; Sanchez, C.; Sannigrahi, P.; Ragauskas. Polymer Degradation and Stability 2009, 94 (10), 1632.
- (17) Liu, Q.; Wang, Y.; Bian, J.; Li, M.-F.; Ren, J.-L.; Hao, X.; Green Chem. 2023, 25 (12), 4808.
- (18) Björkman, Svensk Papperstidning-nordisk Cellulosa, 1956.
- (19) Argyropoulos D, J Nat Prod, 2008.

- (20) Pepper, J.; Baylis, P.; Adler, E. *Can. J. Chem.* 1959, 37 (8), 1241.
- (21) Pepper, J. M.; Baylis, P. E. T.; Adler. *Can. J. Chem.* 1959, 37 (8), 1241.
- (22) Gierer, J. *Chemical Aspects of Kraft Pulping. Wood Sci. Technol.* 1980, 14 (4), 241.
- (23) Keyoumu, *Colture industriali e prodotti* 2004, 20 (2), 143.
- (24) Väisänen, T.; Das, O.; Tomppo, L. *Journal of Cleaner Production* 2017, 149, 582.
- (25) Collard, F.-X.; Blin, J. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 2014, 38, 594.
- (26) Weissermel, K.; Arpe, H.-J. *Industrial Organic Chemistry*; John Wiley & Sons, 2008.
- (27) Wang, Y.-Y.; Wyman, C. E.; Cai, C. M.; Ragauskas, A. J; *ACS Appl. Polym. Mater.* 2019, 1 (7), 1672.
- (28) N Mahmood, Z Yuan, J Schmidt; *Bioresource Technology* 2013, 139, 13.
- (29) Kumar, M.; Hietala, M.; Oksman, K. *Lignin-Based Electrospun Carbon Nanofibers. Frontiers in Materials* 2019, 6.
- (30) Buchanan, M. SUBJECT CATEGORY Chemical Properties.
- (31) Hao R, Zhu L, HSQC NMR spectra of bamboo EMAL (a,b) and lignin oil, 2018.
- (32) Li, P.; Zhang, Z.; Zhang, X.; Li, K.; Jin, Y.; Wu, W. *RSC Advances* 2023, 13 (5), 3241.
- (33) Sannigrahi, P.; Ragauskas, A. J.; Miller, S. J. *Energy Fuels* 2010, 24 (1), 683.
- (34) Siegel, S. M. *The Quarterly Review of Biology* 1956, 31 (1), 1.
- (35) Argyropoulos, D. S.; Pajer, N.; Crestini, C. *JoVE* 2021, No. 174, 62.
- (36) Del Rio J, Rencoret J, Prinsen P, Gutiérrez A; *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 2012, Vol. 60,5922.
- (37) Åkerholm, M.; Salmén. *Polymer* 2001, 42 (3), 963.
- (38) Lange, H., Rulli, F., Crestini, C; *ACS SUSTAINABLE CHEMISTRY & ENGINEERING*,2016, 4 (10), 5167.
- (39) Brebu, M.; Tamminen, T.; Spiridon, I. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 2013, 104, 531.
- (41) Komatsu, T.; Yokoyama, T. *Journal of Wood Science* ,2021, 67 (1), 45.
- (42) Baptista, C.; Robert, D.; Duarte, A. P. *Chemical Engineering Journal*, 2006, 121 (2), 153.
- (43) Wu, Z.; Hu, L.; Jiang, Y.; Wang, X.; Xu, J.; Wang, Q.; *Biomass Conv. Bioref*, 2023, 13 (1), 519.
- (44) Deuss, P. J.; Scott, M.; Tran, F.; Westwood, N. J.; de Vries, J. G.; Barta, K. J. *Am. Chem. Soc.* 2015, 137 (23), 7456.

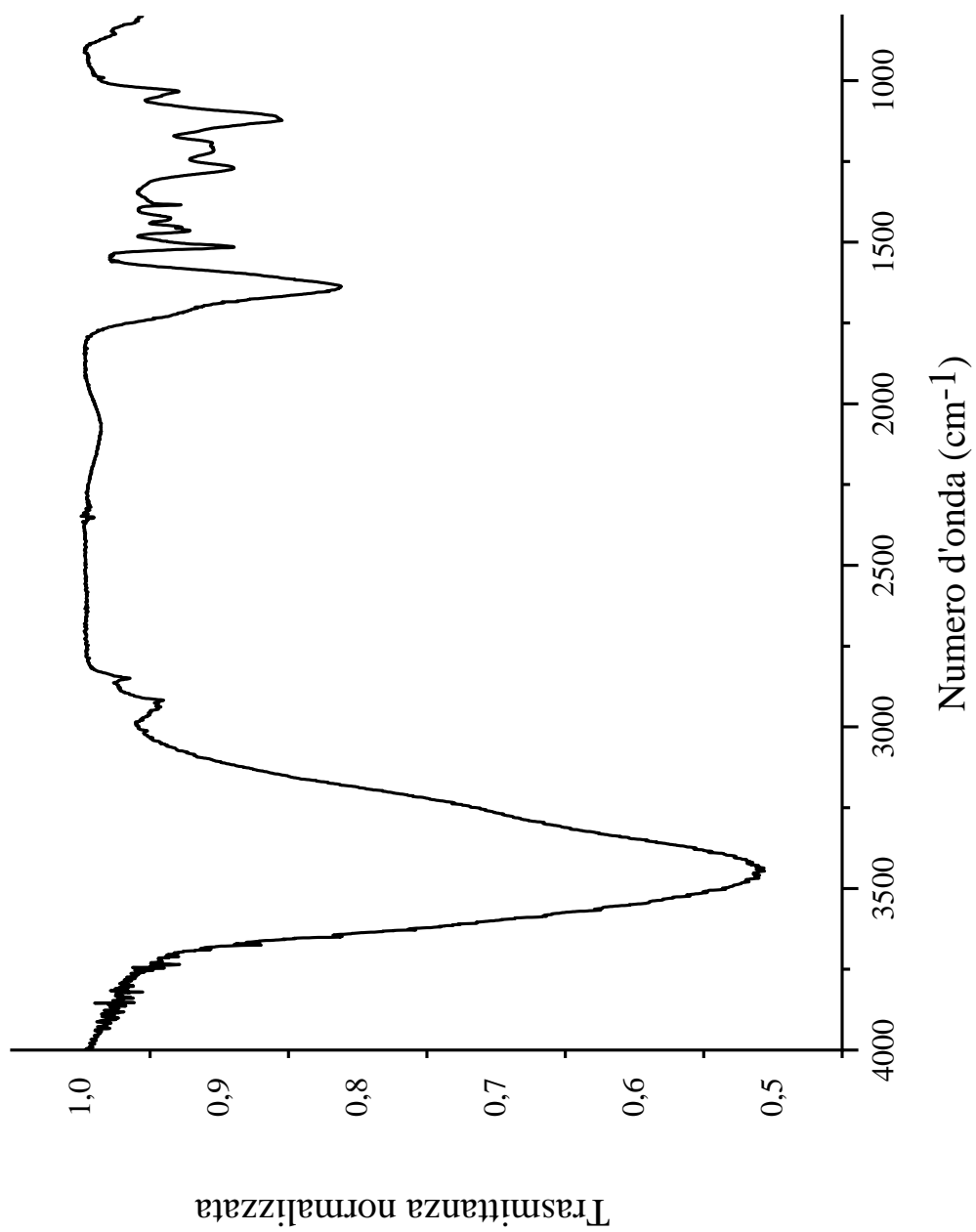
- (45) Sturgeon, M. R.; Kim, S.; Lawrence, K.; Paton, R. S.; Chmely, S. C.; Nimlos, M.; Foust, T. D.; Beckham, G. T. *ACS Sustainable Chem. Eng.* 2014, 2 (3), 472.
- (46) Derkacheva, O.; Sukhov, D, *Macromol. Symp.* 2008, 265 (1), 61.
- (47) Zimbarti P, Cardinale G, DEMICHELE M, Nanna F; Dipartimento Energia Centro Ricerche Trisaia, Policoro (MT).
- (48) Guerra, A.; Filpponen, I.; Lucia, L. A.; Argyropoulos, D. S, *J Agric Food Chem* 2006, 54 (26), 9696.
- (49) Kunaver M, Crestini C, National Institute of Chemistry,2012
- (50) Mitchell A.J., Watson A.J., Higgins H.B. *Pulp Paper Mag. Chem.*
- (51) Bolker H.I., Sommerville N.G. *Pulp and Paper Magazine of Canada.*
- (52) Norgren, M.; Edlund, H.; Wågberg, *Nordic Pulp and Paper Research Journal* ,2002, 17 (4), 370.
- (53) Granata, A.; Argyropoulos, D. S. *Agric. Food Chem.* 1995, 43 (6), 1538.
- (54) Argyropoulos, D.; Pajer, N.; Crestini, C; *Journal of Visualized Experiments* 2021.
- (55) (56) Lu, F.; Ralph, J. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1997, 45 (12), 4655.
- (57) Tohmura, S.; Argyropoulos, D. S. *J Agric Food Chem* 2001, 49 (2), 536.
- (58) Melone F, *BIOTECHNOLOGICAL PROCESSES FOR PLANT POLYPHENOLS UPGRADING*, 2013.
- (59) Crestini, C.; Lange, H.; Sette, M.; Argyropoulos, D. S. *Green Chem.* 2017, 19 (17), 4104.
- (60) Del Río, J. C.; Lino, A. G.; Colodette, J. L.; Lima, C. F.; Gutiérrez, A.; Martínez, Á. T.; Lu, F.; Ralph, J.; Rencoret, J. 2015, 81.
- (61) Yuan TQ, Sun SN, Xu F, *J Agric Food Chem*, 2011, 10604.
- (62) Miles-Barrett, D. M.; Neal, A. R.; Hand, C.; Montgomery, J. R. D.; Panovic, I.; Ojo, O. S.; Lancefield, C. S.; Cordes, D. B.; Slawin, A. M. Z.; Lebl, T.; Westwood, N. J. *Org. Biomol. Chem.* 2016, 14 (42), 10023.
- (63) Wang, T.-P.; Li, H.; Yuan, J.-M.; Li, W.-X.; Li, K.; Huang, Y.-B.; Xiao, L.-P.; Lu, Q. *Industrial Crops and Products* 2021, 171.
- (64) Picó, Y.; Barceló, D. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 2020, 130, 115964.
- (65) Dorbung, G.E. *Thermal Analysis*, 1974.
- (66) Klein, M. T.; Virk, P. *Ind. Eng. Chem. Fund.* 1983, 22 (1), 35.
- (67) Petrocelli, F. P.; Klein, M. T. *Chemical Engineering Communications* 1984, 30 (6), 343.

8 Appendice

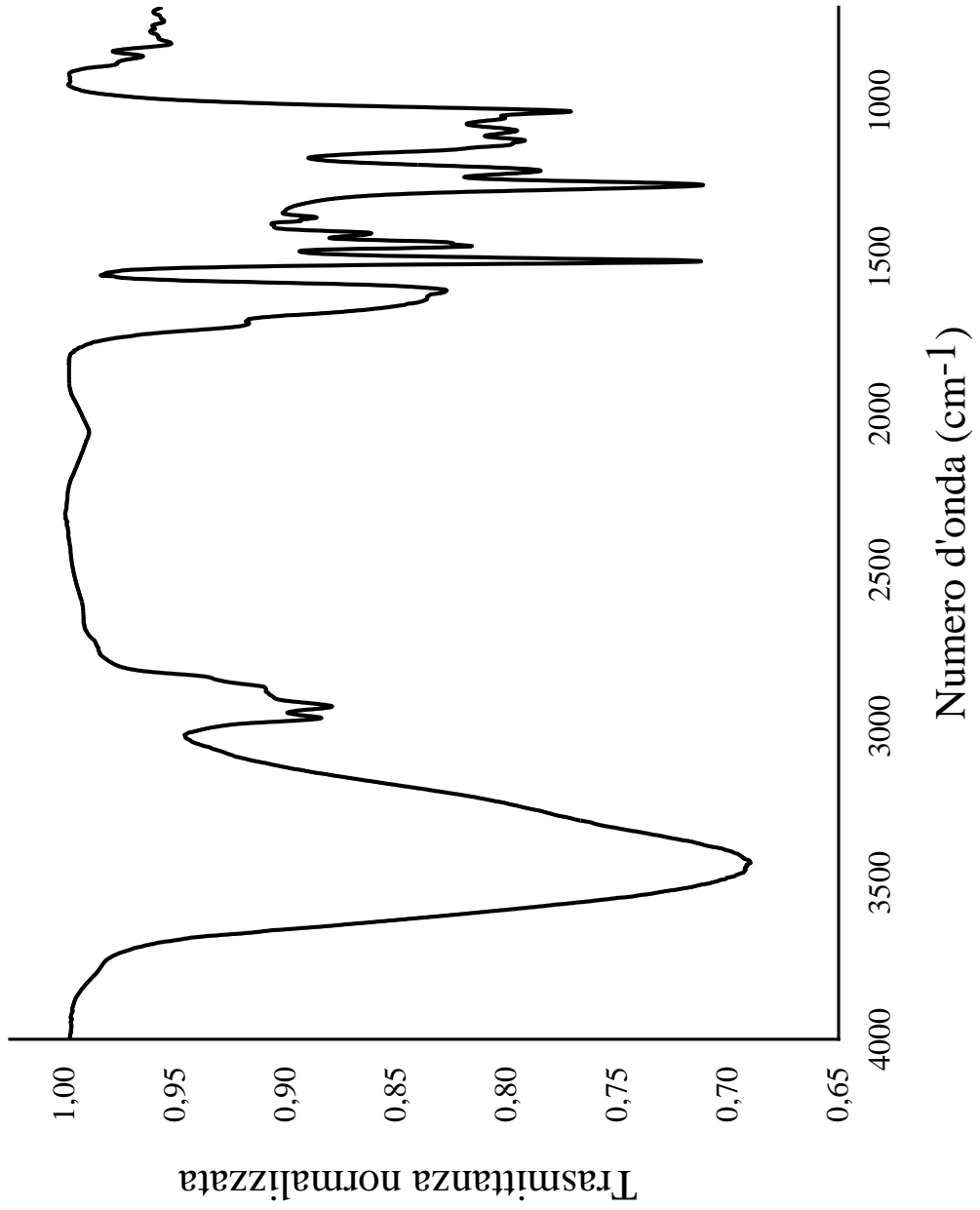
1. FT-IR lignina *p*-diossano

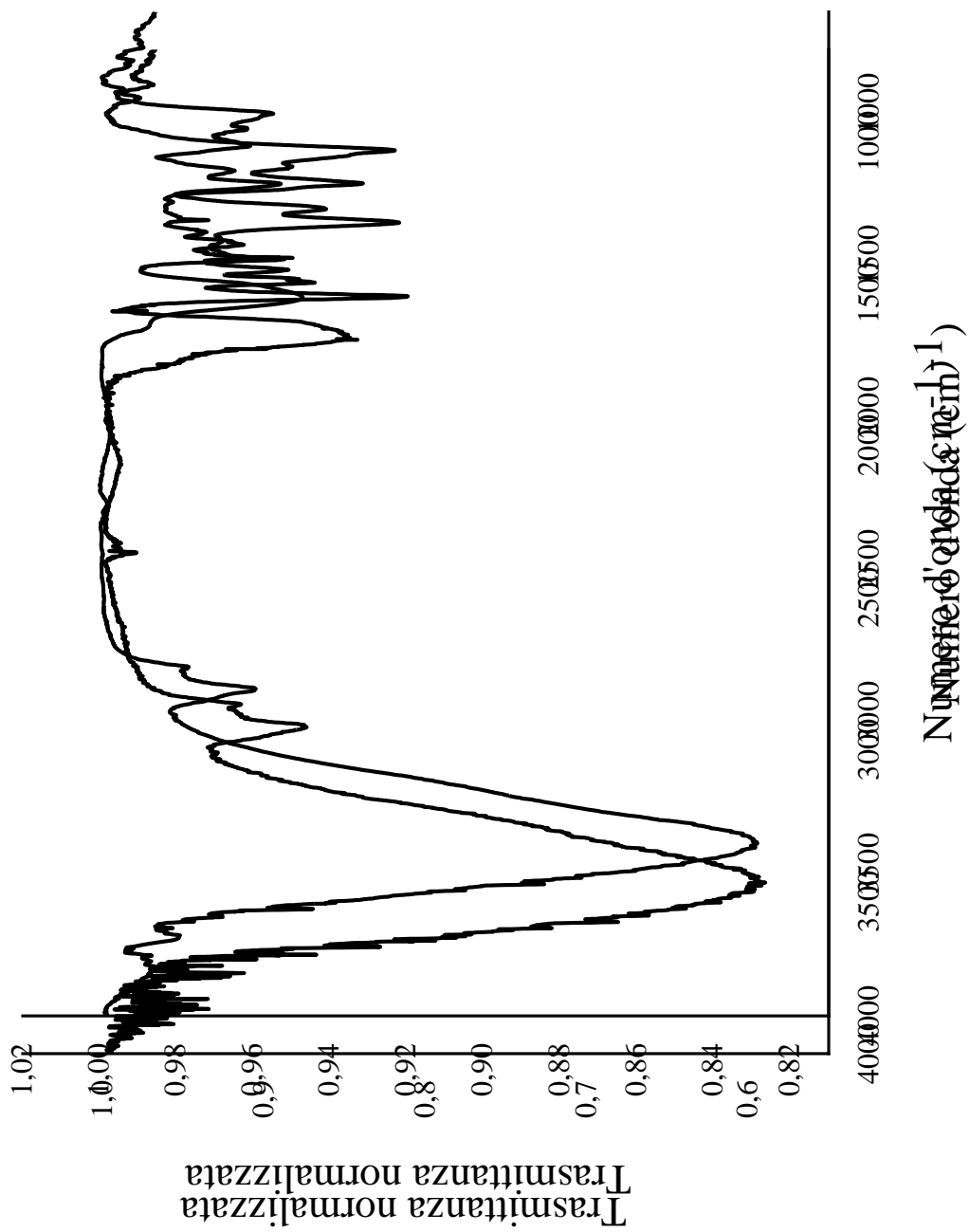


2. FT-IR lignina Kraft



3. FT-IR lignina organosolv

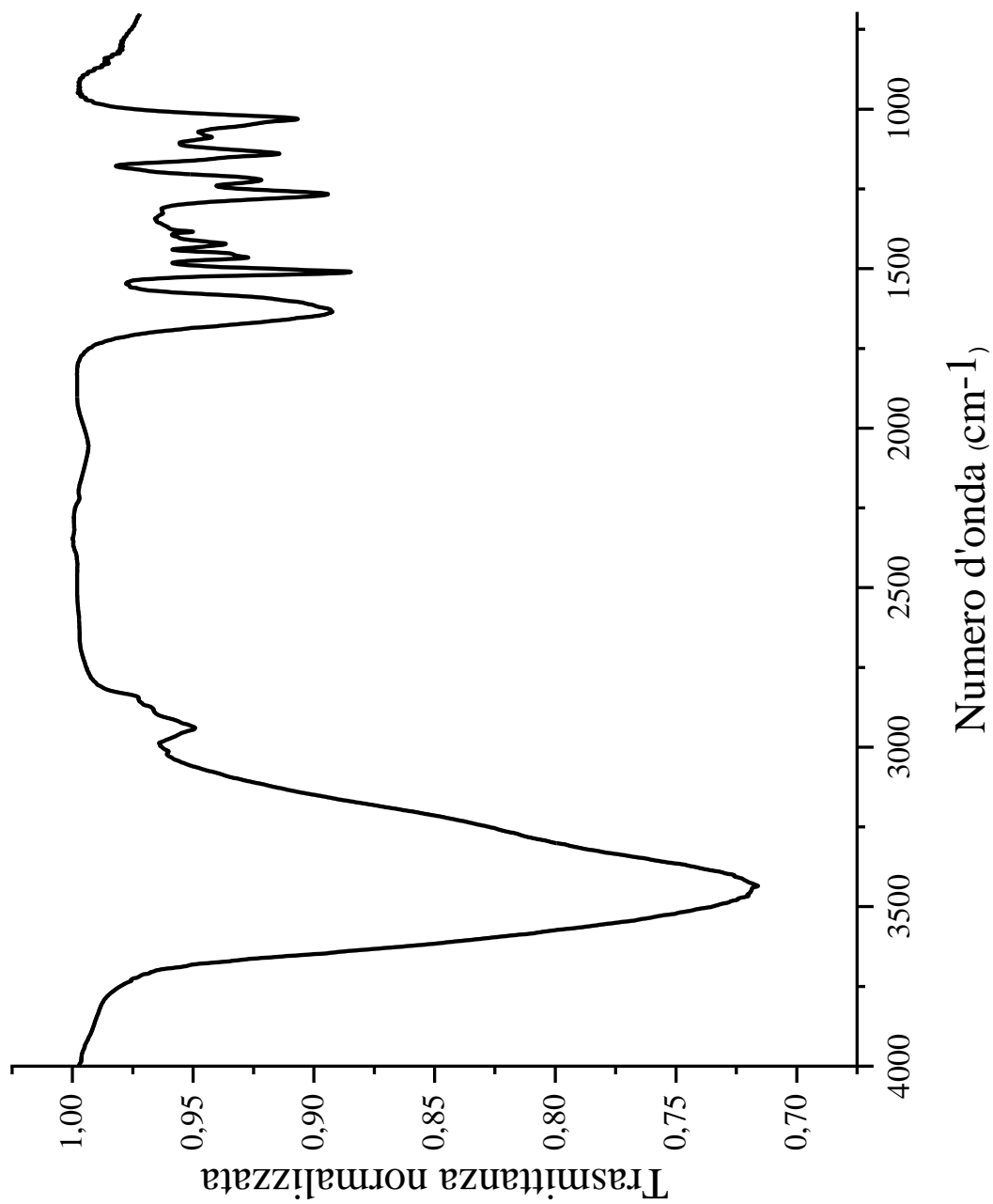




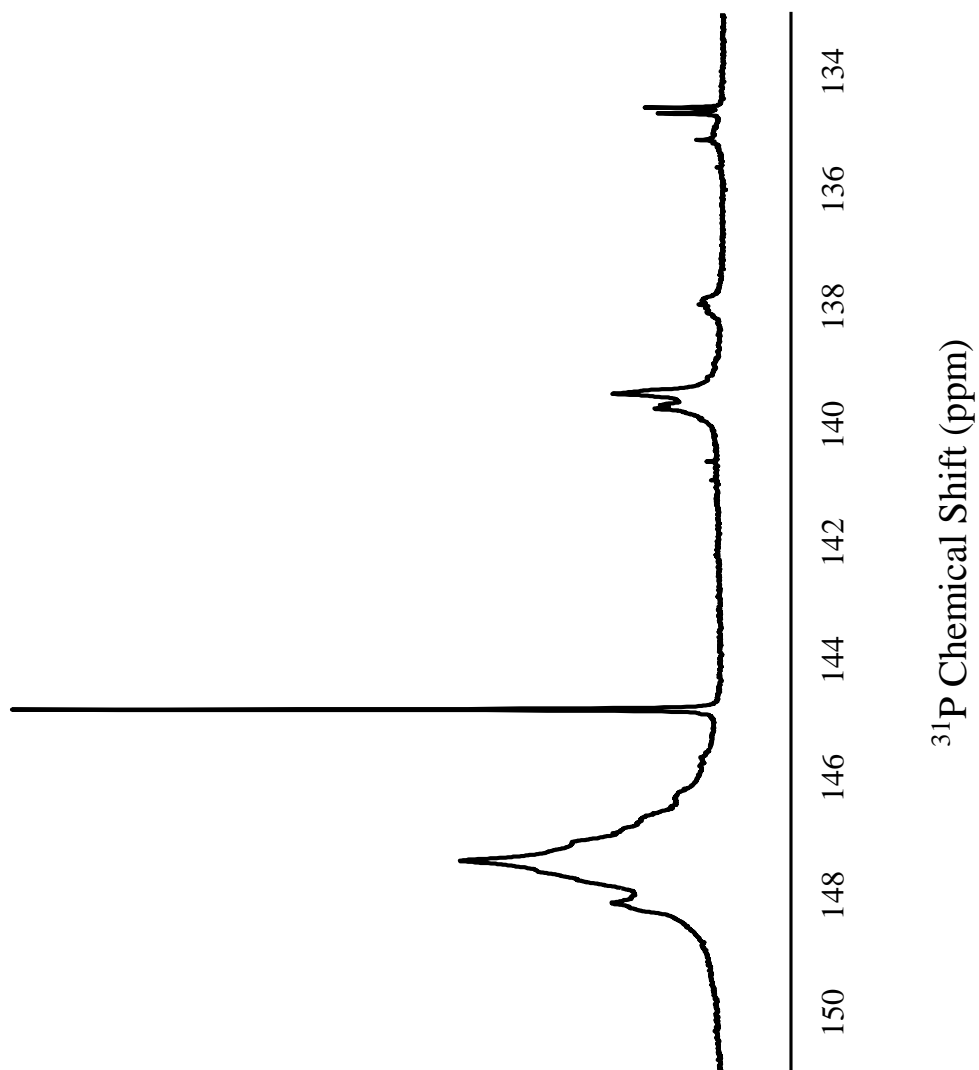
4. FT-IR lignina DES

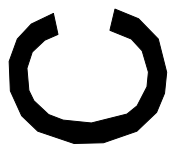
5. FT-IR lignina EMAL

6. FT-IR lignina cuprammonio

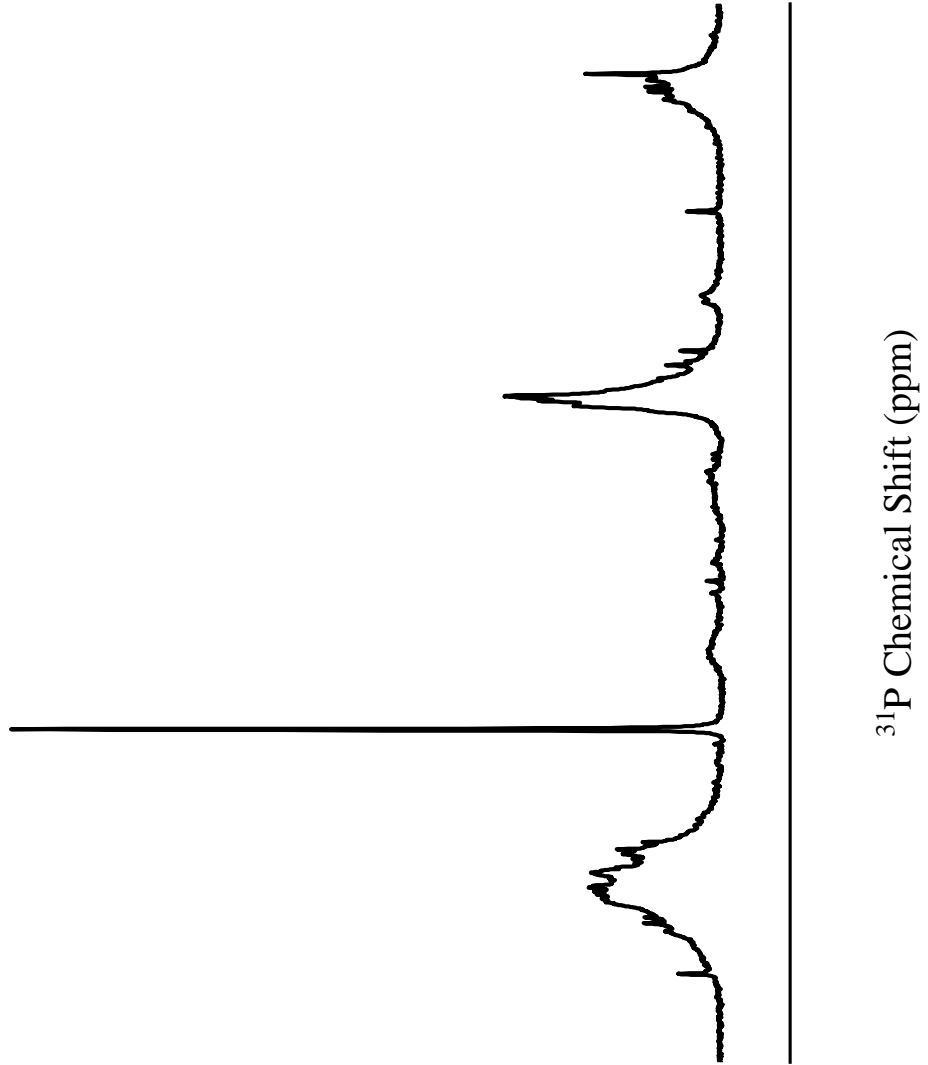


7. ^{31}P NMR lignina EMAL

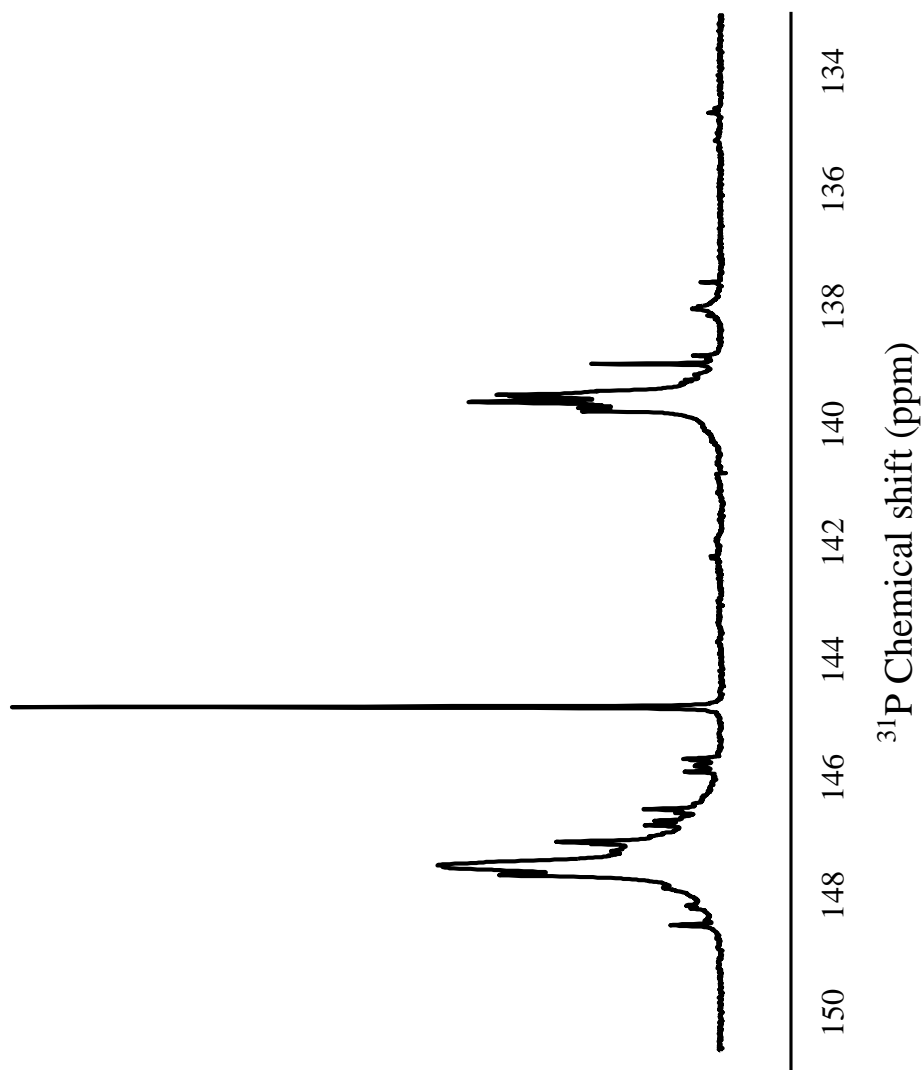




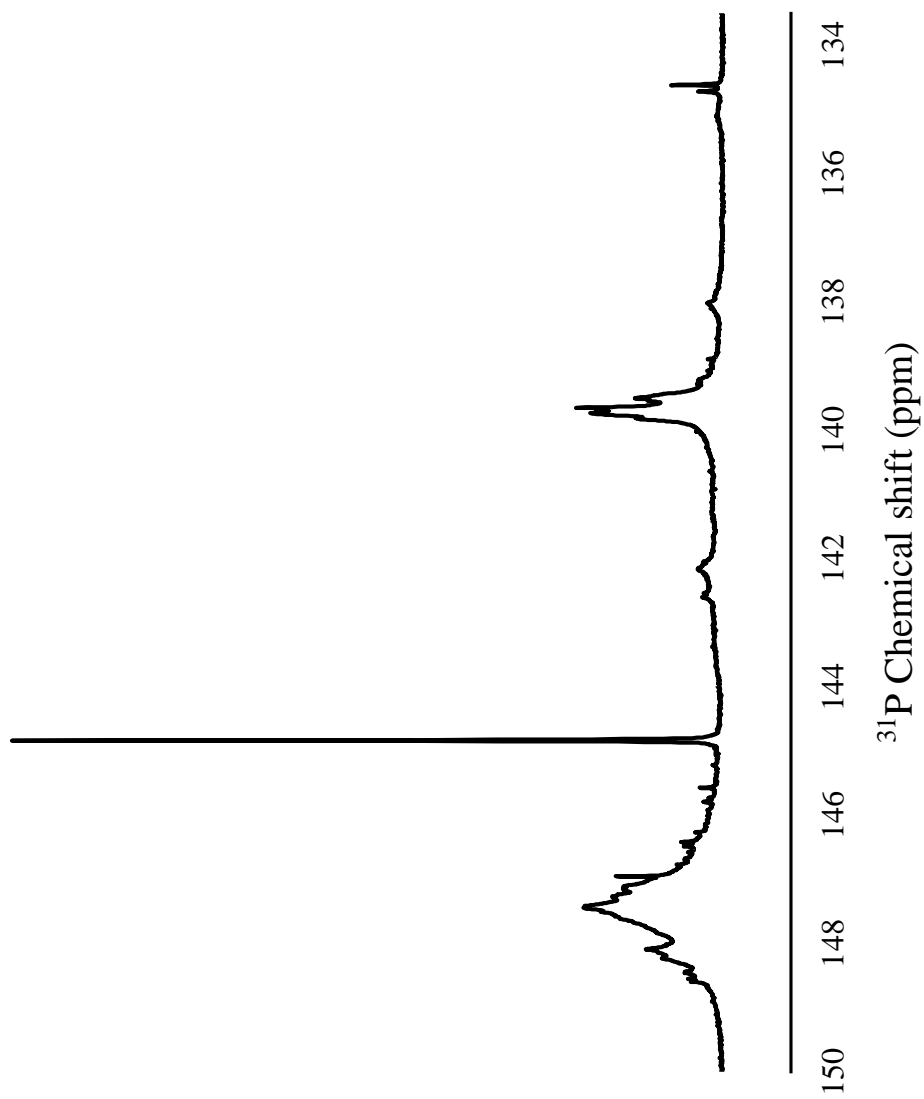
8. ^{31}P NMR lignina Kraft

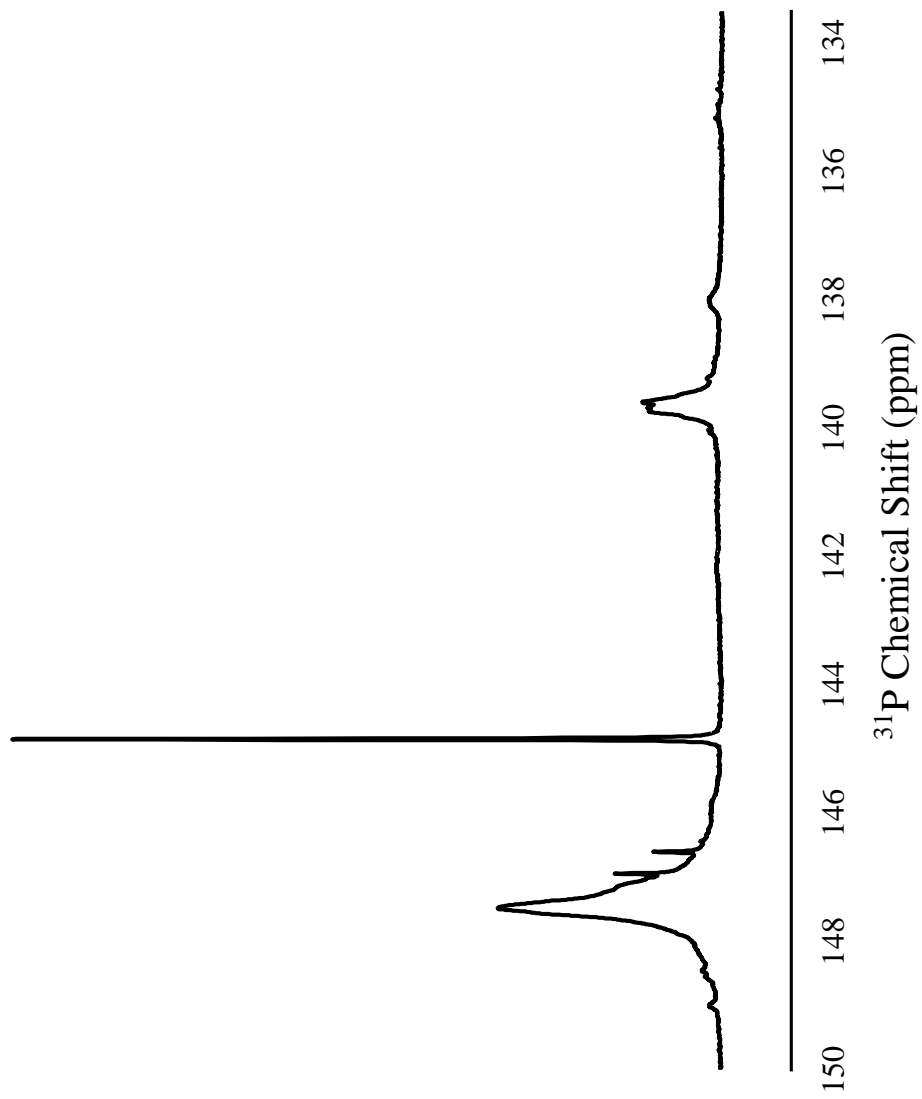


9. ^{31}P NMR lignina organosolv

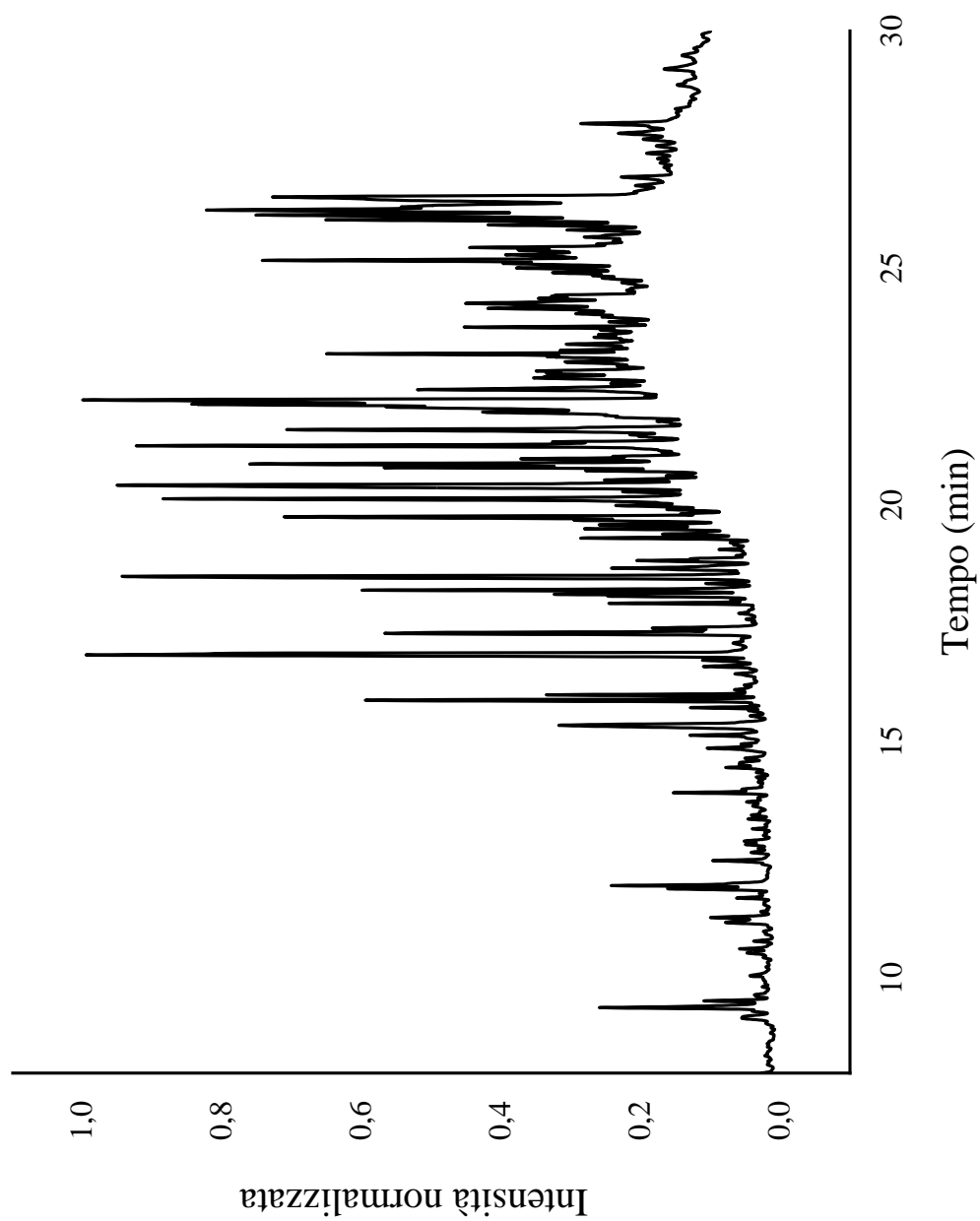


10. ^{31}P NMR lignina *p*-diossano

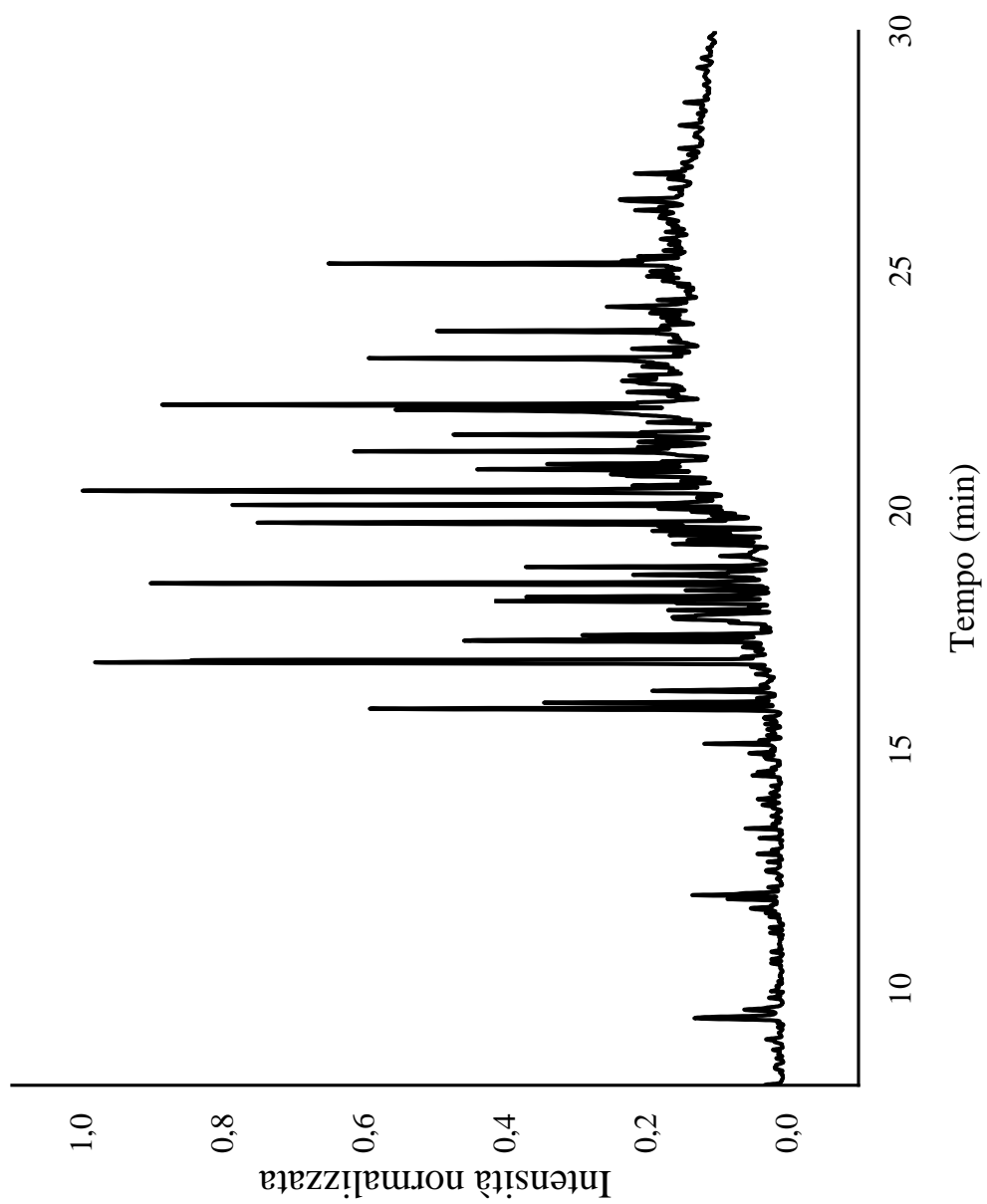




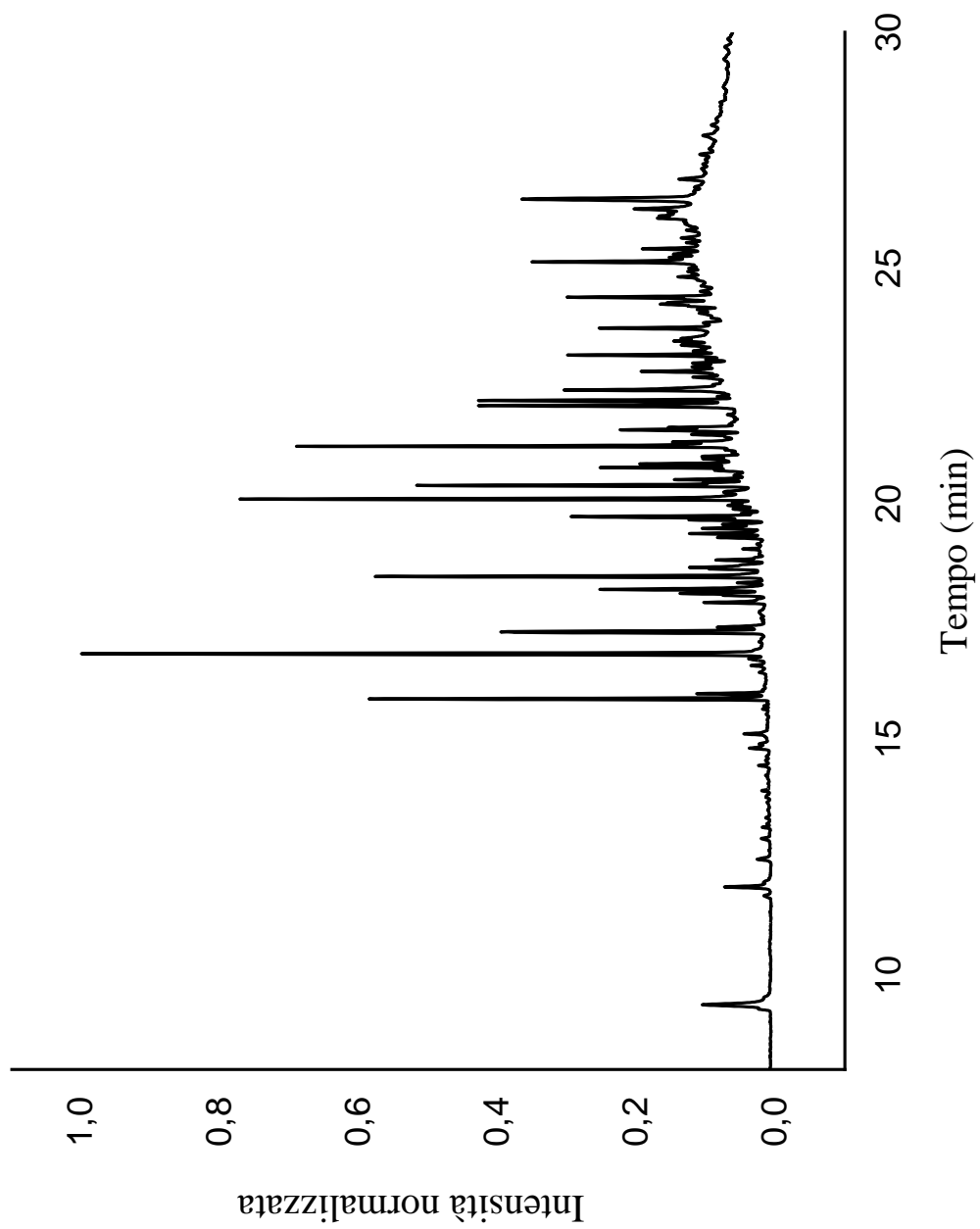
11. ^{31}P NMR lignina DES



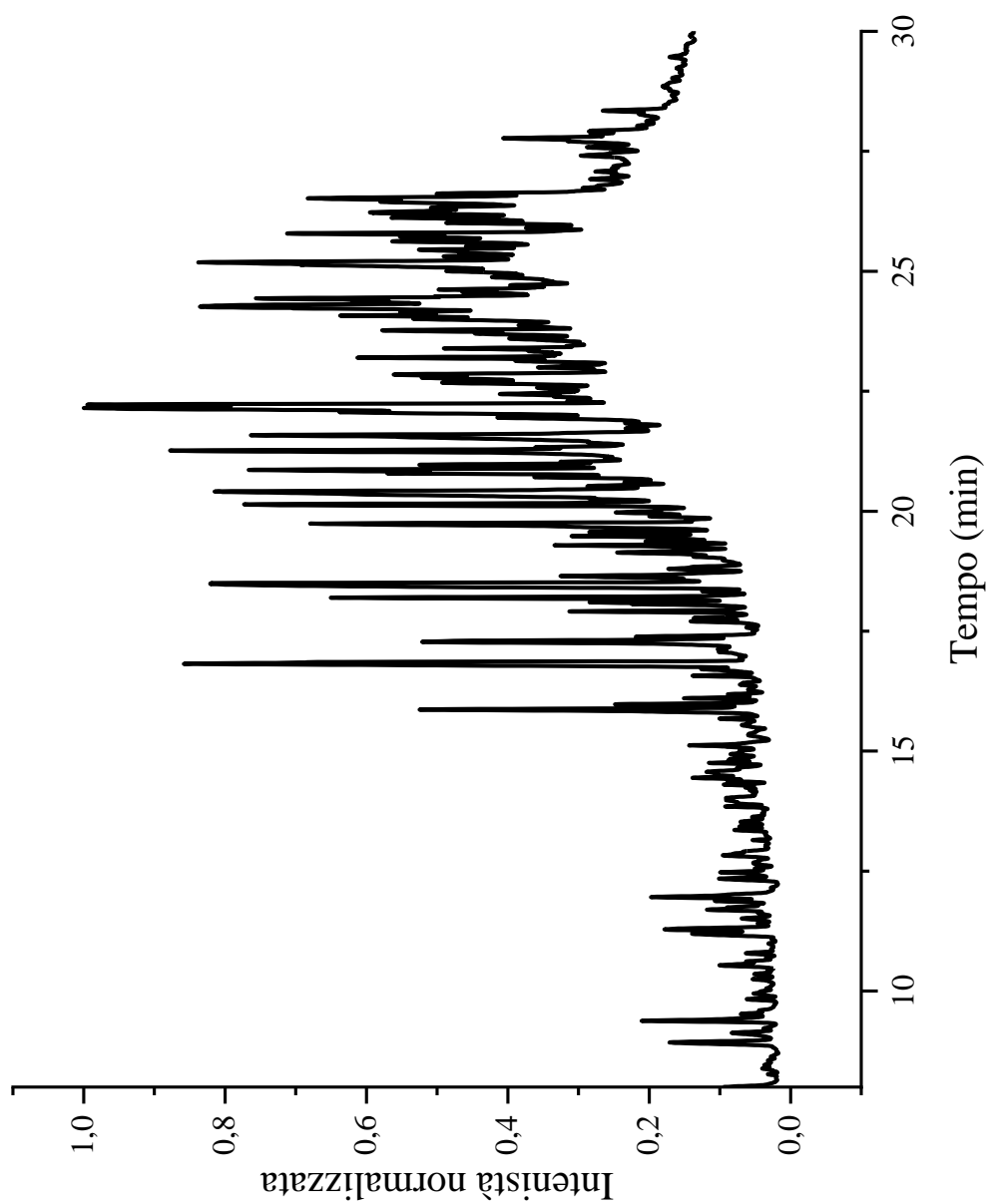
12. pirogramma GC/MS lignina EMAL



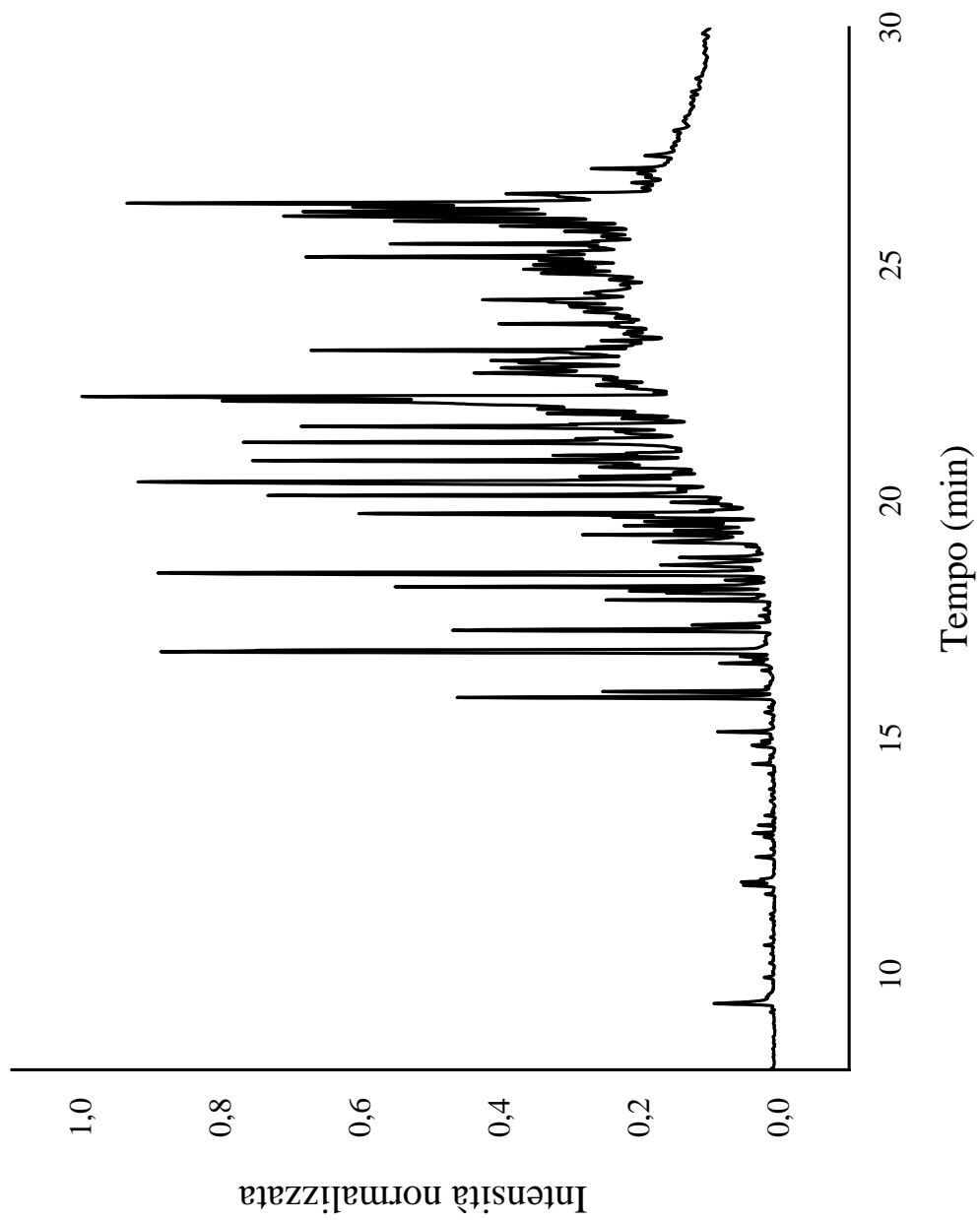
13. pirogramma GC/MS lignina Kraft



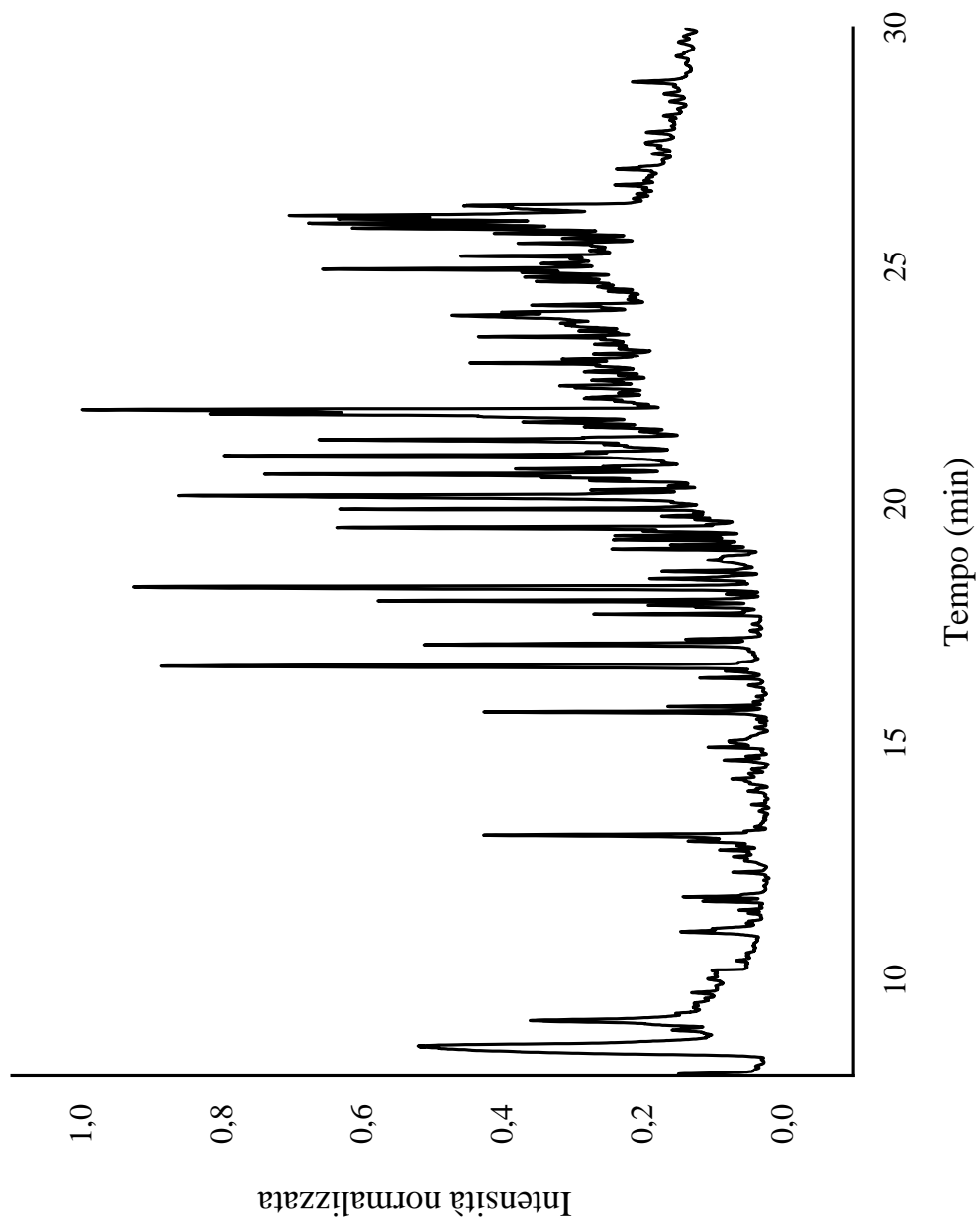
14. pirogramma GC/MS lignina *p*-diossano



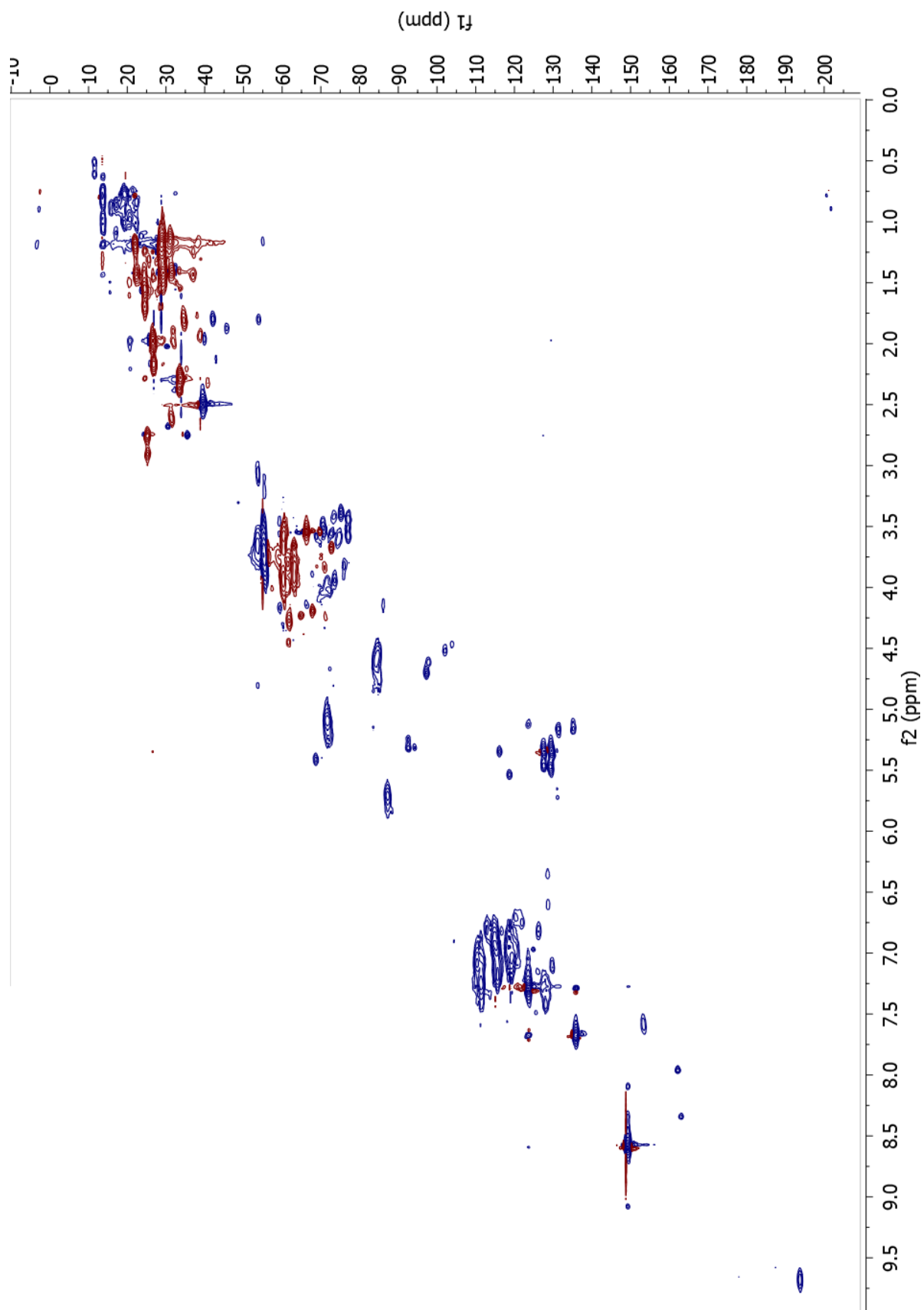
15. pirogramma GC/MS lignina organosolv



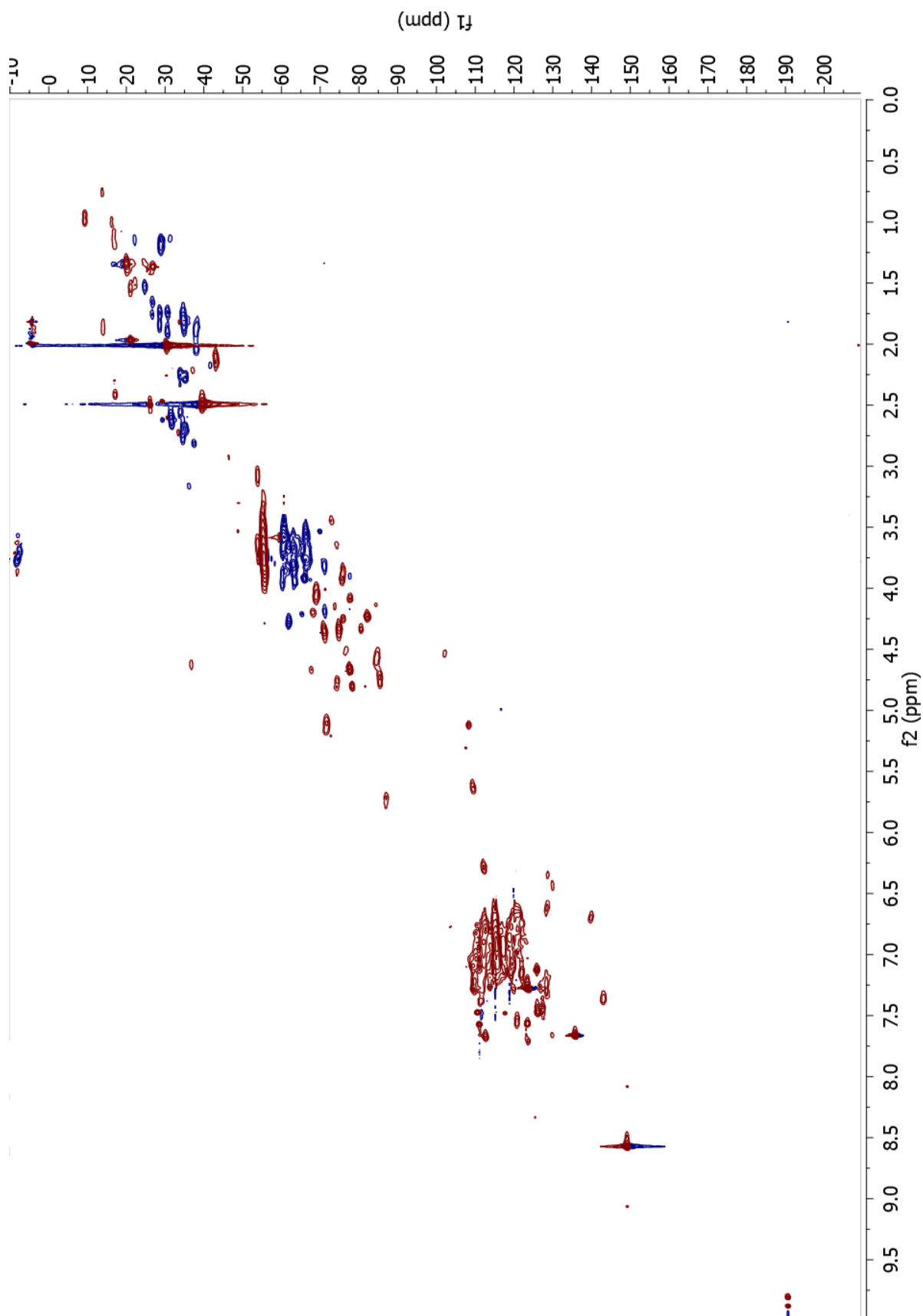
16. pirogramma GC/MS lignina cuprammonio



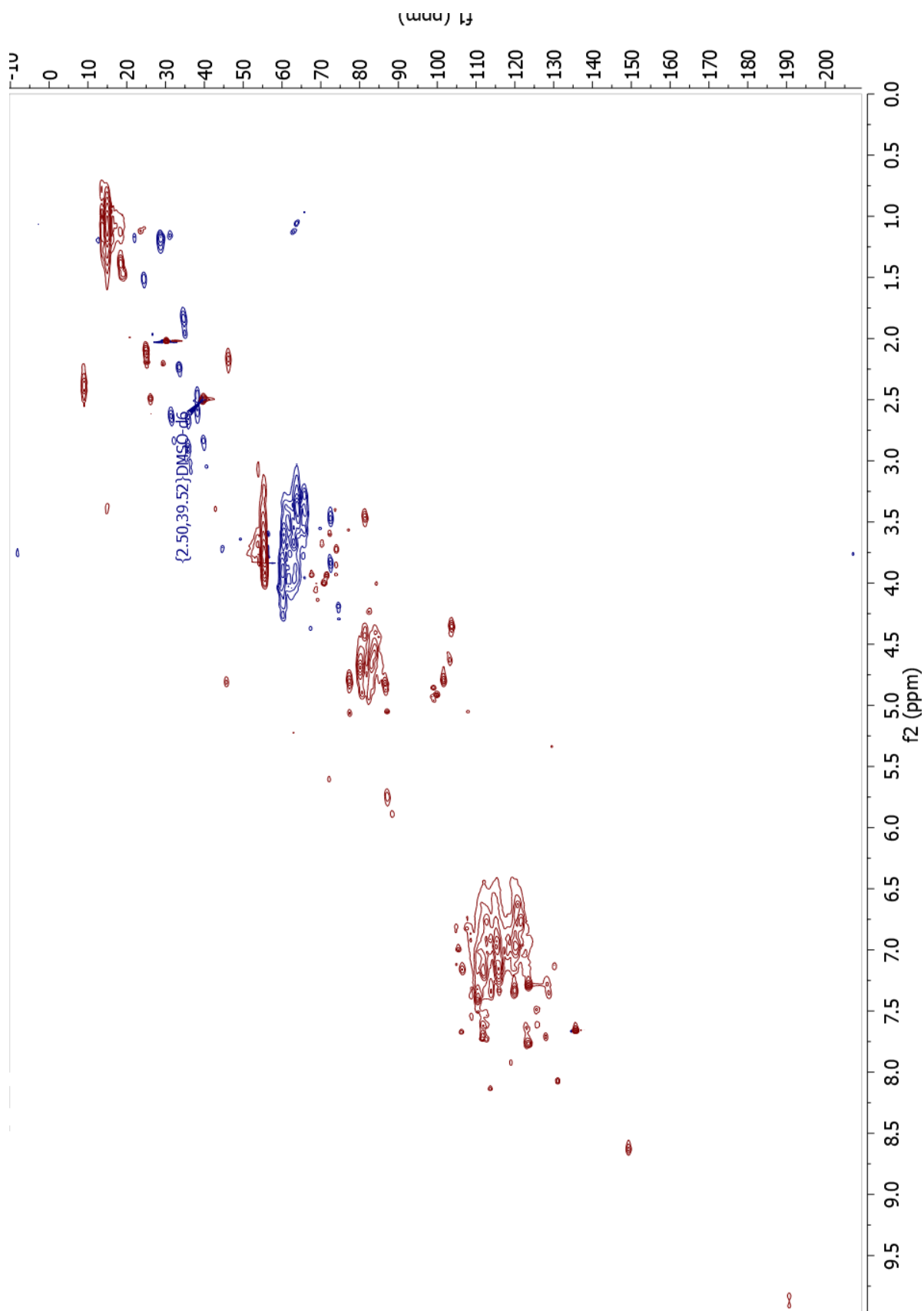
17. pirogramma GC/MS lignina DES



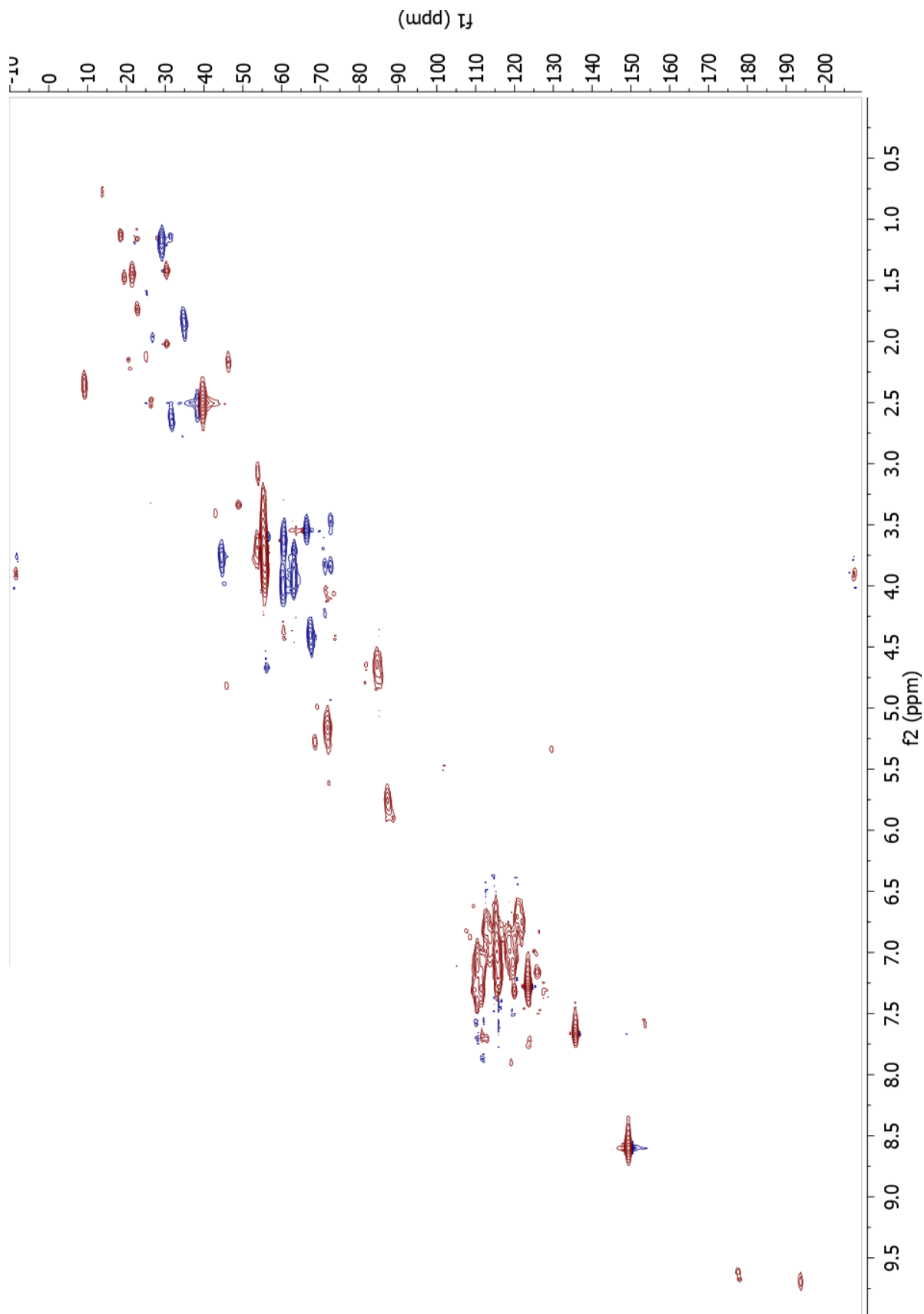
18. HSQC lignina EMAL



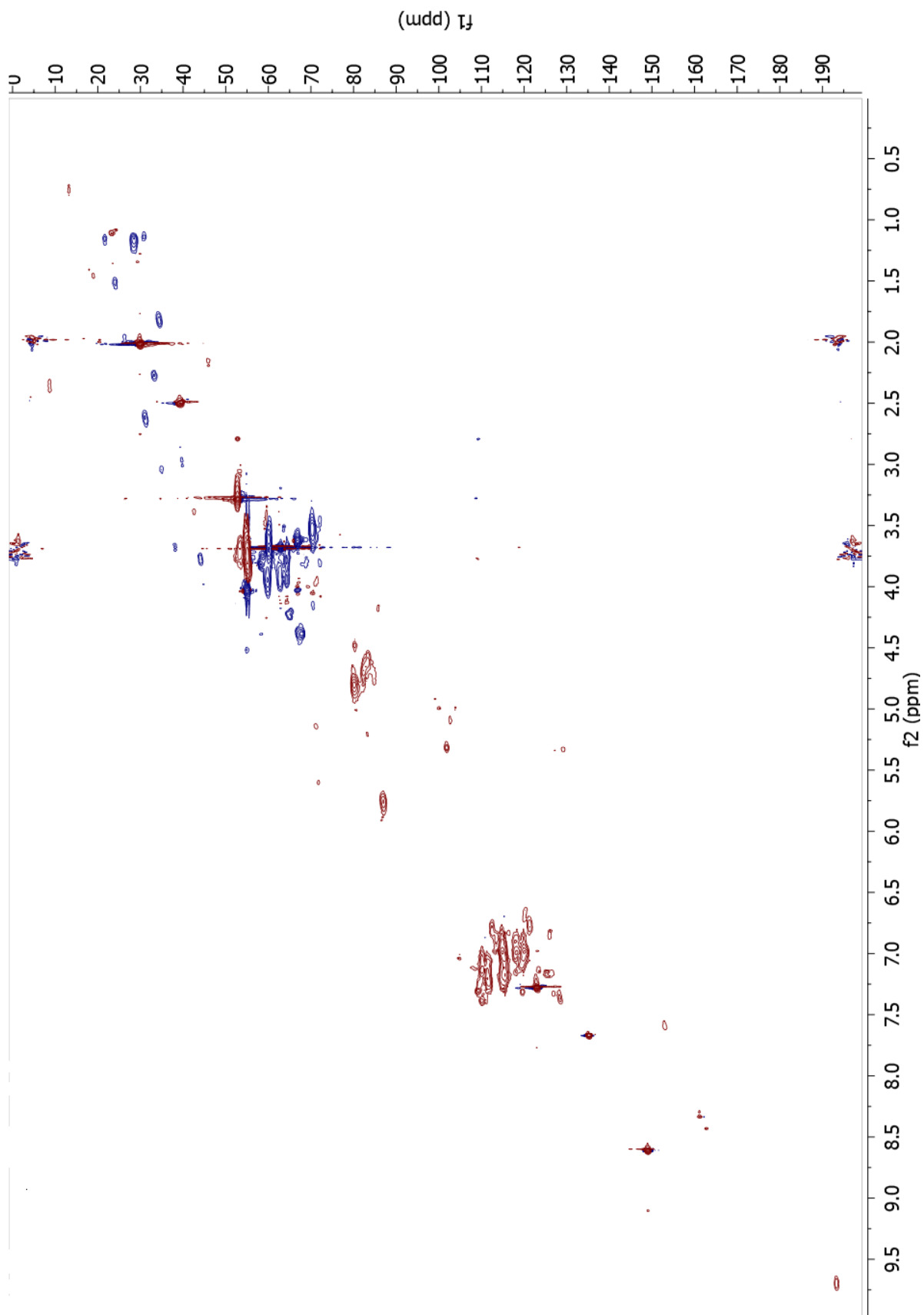
19. HSQC lignina Kraft



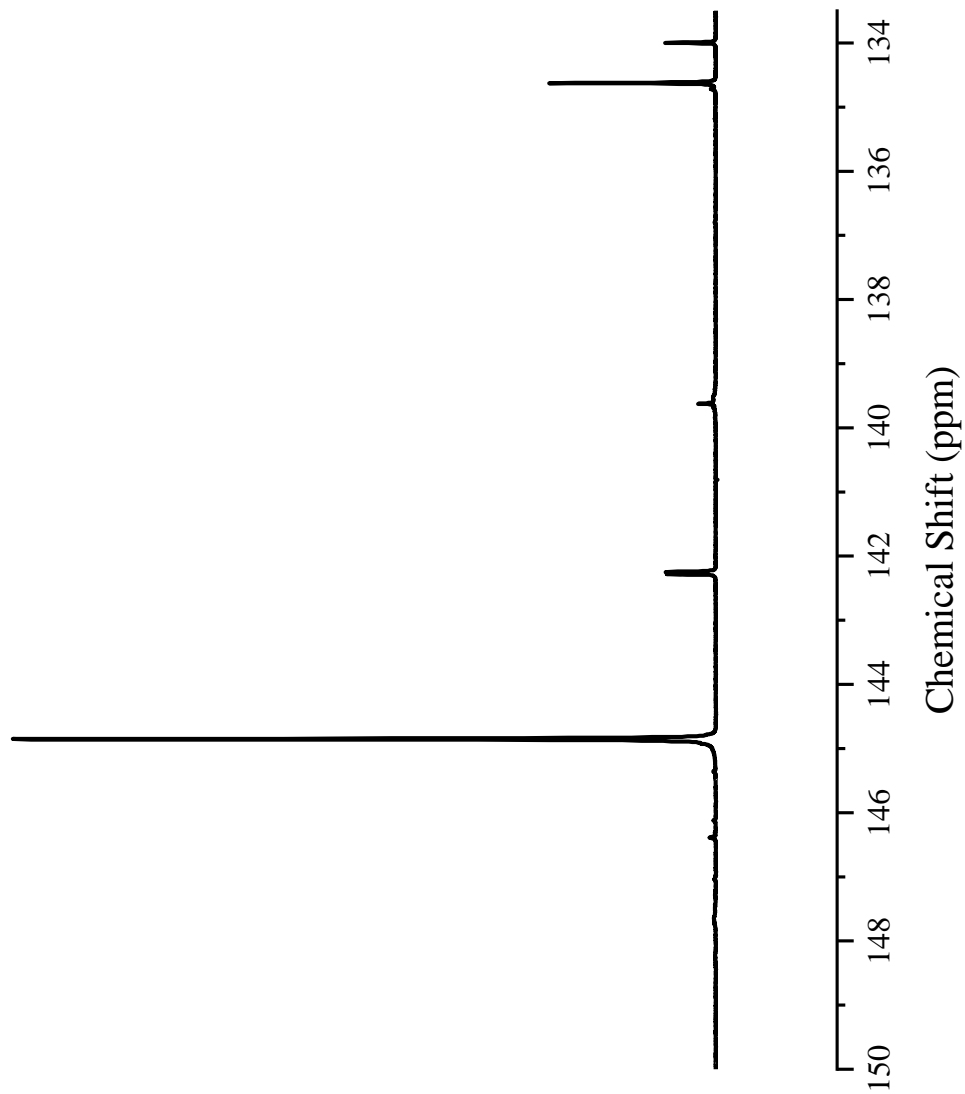
20. HSQC lignina organosolv



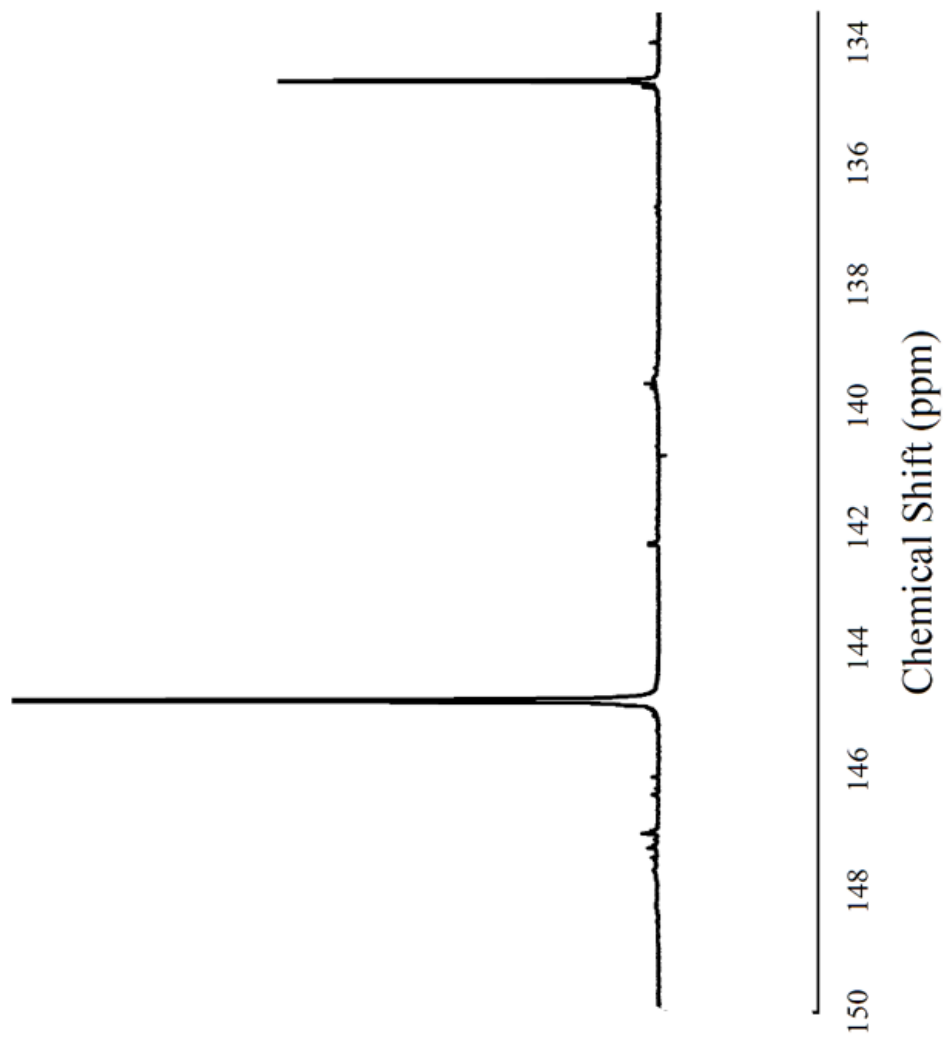
21. HSQC lignina *p*-diossano



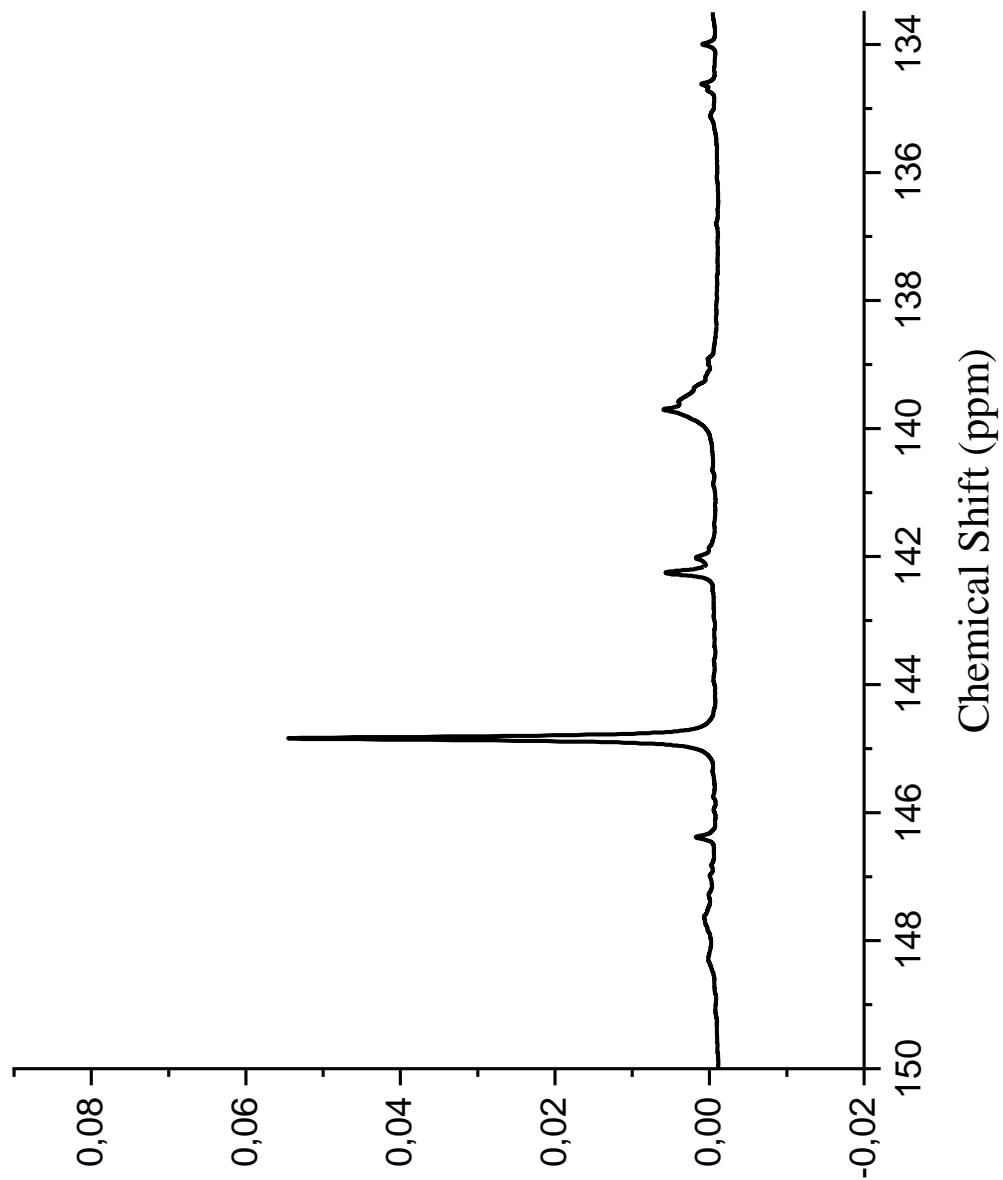
22. HSQC lignina DES



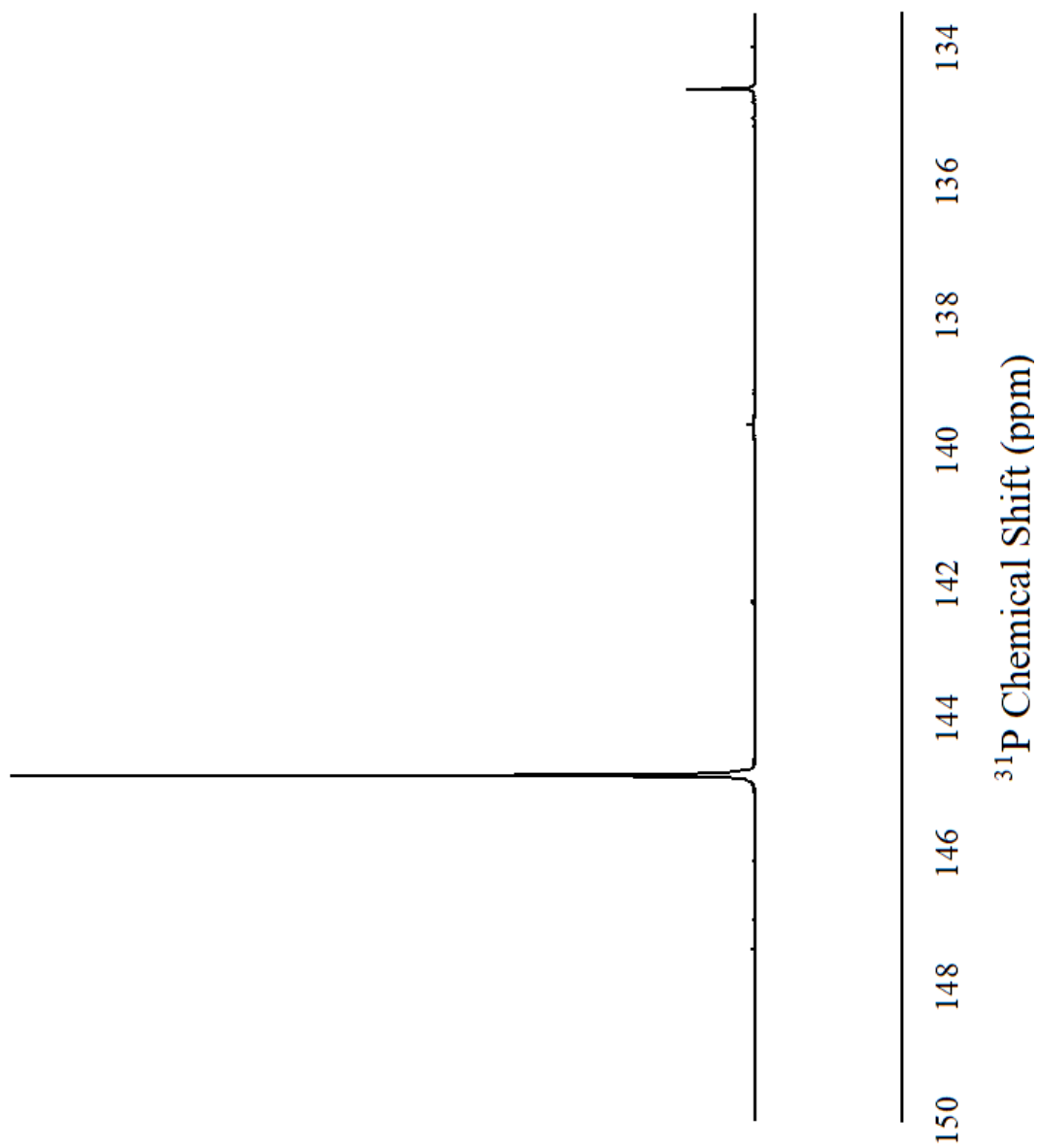
23. ^{31}P NMR DFRC lignina EMAL



24. ^{31}P NMR DFRC lignina *p*-diossano



25. ^{31}P NMR DFRC lignina organosolv



25. ^{31}P NMR DFRC lignina Kraft

Ringraziamenti

Innanzitutto, desidero ringraziare il Dottore Massimo Sgarzi, nonché relatore di questa tesi per la disponibilità dimostrata, ringrazio sinceramente anche la Professoressa Claudia Crestini ed il Professore Matteo Gigli per l'aiuto ed i consigli datomi, vi ringrazio per avermi dato la possibilità di entrare a far parte del vostro gruppo di ricerca.

Un ringraziamento va anche al mio tutor, il Dottore Nicolò Pajer, che è stato croce e delizia di questi mesi, grazie perché ho potuto vedere in prima persona cosa vuol dire lavorare con passione e dedizione.

In questi mesi non solo ho avuto la possibilità di perfezionare le mie competenze ma ho avuto anche il piacere di lavorare accanto a persone preparate e di cuore, per questo motivo sono tenuta a ringraziare Jacopo, Valeria, Maryam, Daniele, Umberto, Lara, Andrea, Francesca, Jessica, Chiara, Mattia, Shazal ed Anna, grazie per il tempo speso a correggermi l'inglese, grazie per i consigli, le risate e soprattutto grazie per avermi accolta con disponibilità e gentilezza; resterete per sempre un bellissimo ricordo... auguro ad ognuno di voi un futuro all'altezza delle vostre aspettative qualsiasi esse siano.

Ringrazio la mia preziosa famiglia, che negli ultimi anni si è allargata ed i miei amici di sempre, perché nonostante gli alti e bassi la vostra presenza è stata costante e positiva, di questo posso solo ringraziarvi. Ringrazio il mio Simone, che è stato impeccabile dall'inizio alla fine, grazie perché hai sempre creduto in me, ed io, facendomi forza di questo ho sempre dato il meglio di me.

Immane, i ringraziamenti ai miei genitori che sono stati la benzina in questo viaggio; non so come poter esprimere la mia riconoscenza. Mi auguro solo un giorno di poter contraccambiare dandovi tutto l'appoggio che voi avete continuamente ed incondizionatamente, dato a me. Grazie.