

LIGNINAS – MÉTODOS DE OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA

LIGNINS – ISOLATION METHODS AND CHEMICAL CHARACTERIZATION

Eloísa de Oliveira Simões Saliba¹ Norberto Mário Rodriguez¹ Sérgio Antônio Lemos de Moraes²
Dorila Piló-Veloso³

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

RESUMO

Esta revisão apresenta uma pequena história sobre os estudos de ligninas. São apresentados também vários métodos de isolamento e quantificação de grupos funcionais de ligninas por métodos químicos e físicos.

Palavras-chave: *ligninas, isolamento de ligninas, caracterização de ligninas.*

SUMMARY

This review presents a short history of the study of the lignins. There are also various methods for isolation and quantification of functional groups in lignins by chemical and physical methods being presented.

Key words: *lignins, lignins isolation, lignins characterization.*

INTRODUÇÃO

A palavra lignina vem do latim *lignum*, que significa madeira. Trata-se de um dos principais componentes dos tecidos de gimnospermas e angiospermas, ocorrendo em vegetais e tecidos vasculares. Sabe-se que a lignina tem um importante papel no transporte de água, nutrientes e metabólitos, sendo responsável pela resistência mecânica de vegetais, além de proteger os tecidos contra o ataque de microorganismos. Vegetais primitivos como fungos, algas e líquens não são lignificados (FENGEL & WEGENER, 1984).

Em estudos realizados há aproximadamente 150 anos, foi possível verificar o interesse científico e econômico sobre a lignina, concluindo-se que a lignina é uma substância amorfa, de natureza aromática e muito complexa, e faz parte da parede celular e da lamela média dos vegetais.

Apesar de todos os estudos realizados até hoje sobre lignina, muitos pontos, relativos principalmente à sua estrutura, permanecem em dúvida. Isto decorre da grande diversidade da estrutura das ligninas quando se passa de uma espécie vegetal para outra ou, até mesmo, dentro da mesma espécie, quando são analisadas partes diferentes do vegetal. Pode-se observar em eucaliptos cultivados na Europa ou no Brasil diferenças na constituição de suas ligninas, devidas, principalmente, às diferentes condições de solo e de clima. A lignina é um polímero de constituição difícil de ser estabelecida, por causa não somente da complexidade de sua formação, baseada em unidades fenilpropanóides interligadas por diferentes tipos de ligações, como também porque sofre modificações estruturais durante seu isolamento das paredes celulares (MORAIS 1987, 1992).

Devido a abundância de resíduos de cultura disponíveis e a natureza recalcitrante da lignina, que de alguma maneira inibe o aproveitamento dos carboidratos estruturais pelo animal, este trabalho tem como objetivo apresentar

¹Departamento de Zootecnia, Escola de Veterinária da Universidade Federal Minas Gerais (UFMG), CP 567, 30161-970, Belo Horizonte, MG. E-mail: saliba@vet.ufmg.br. Autor para correspondência.

²Departamento de Química, Universidade Federal de Uberlândia.

³Departamento de Química, ICEX, UFMG.

uma revisão geral sobre os principais aspectos relativos ao estudo de ligninas

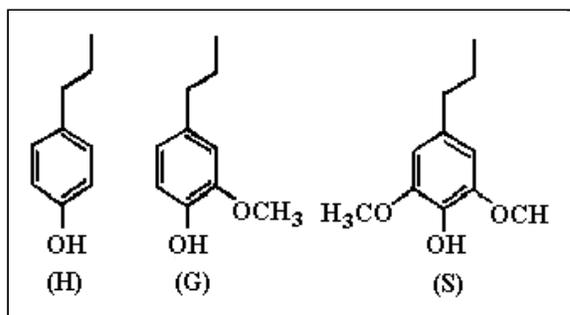
2. LIGNINAS

2.1 Definição

Cabem aqui outras definições encontradas na literatura, além da definição puramente química. Lignina é um polímero derivado de unidades fenilpropanóides denominadas C_6C_3 ou, simplesmente, unidades C_9 , repetidas de forma irregular, que têm sua origem na polimerização desidrogenativa do álcool coniferílico. A lignina deve ser definida claramente de acordo com o trabalho em questão, devido à grande diversidade de maneiras de tratamento para seu isolamento. LAPIERRE (1993) classificou a lignina em *core* e *não core*, com base em sua susceptibilidade relativa à hidrólise.

- Lignina *não core*: consiste de compostos fenólicos de baixo peso molecular, liberados da parede celular por hidrólise, que é representada por ácidos *p*-hidroxicinâmico éster-ligados.

- Lignina *core*: consiste de polímeros fenilpropanóides da parede celular, altamente condensados e muito resistentes à degradação. Eles são compostos de unidades *p*-hidroxifenila (H), guaiacila (G) e siringila (S), em proporções diferentes, de acordo com sua origem.



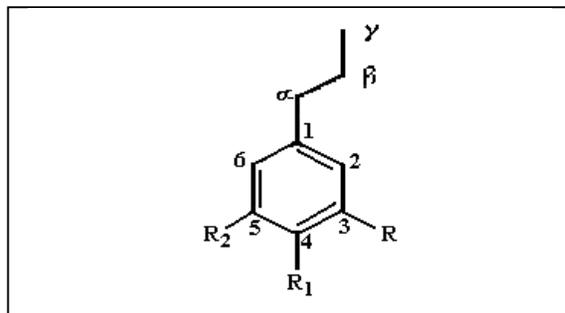
SARKANEM & LUDWIG (1971) observaram que a quantidade relativa da fração molar de aldeídos produzidos pela reação de oxidação com nitrobenzeno é um indicador da abundância relativa das unidades C_9 (H, G e S). Assim, numa classificação inicial de ligninas segundo a presença dessas unidades, tem-se que: ligninas de madeiras duras, ou angiospermas, são formadas principalmente de unidades G e S; ligninas de madeiras moles, ou gimnospermas, são formadas fundamentalmente de unidades G; ligninas de gramíneas compreendem G-S-H. Porém, existem ligninas de certas espécies de gimnospermas e de gramíneas que apresentam abundância de G e S (CHEN, 1991).

Ligninas de plantas herbáceas são do tipo S-G, sendo mais parecidas com a ligninas de angiospermas que de gimnospermas (SARKANEN & LUDWIG, 1971). Portanto, em uma conceituação mais precisa, as ligninas são classificadas nos seguintes grupos: Tipo G; Tipo G-S; e Tipo H-G-S (CHEN, 1991; PILO-VELOSO *et al.*, 1993). Em estudos realizados por SALIBA *et al.* em 1999a, pode se verificar que a lignina da folha do milho é do tipo H-G-S.

Em plantas herbáceas, a lignina não pode ser definida apenas como proveniente de derivados ácidos fenólicos. Deve-se trabalhar com as definições *core* e *não core* para descrever o material residual e os componentes ácidos hidrocínâmicos liberados durante a hidrólise, respectivamente. Assim, essas definições, segundo RALPH & HELM (1993), são convenientes para investigações dentro do aspecto nutricional das forragens, bem como para comparar a composição das plantas, pois esta terminologia discute aspectos moleculares da estrutura da lignina. Portanto, somente derivados do ácido hidrocínâmico, que estão covalentemente ligados aos polímeros da parede celular, são liberados durante a hidrólise, constituindo a chamada lignina *não core*. Conseqüentemente, derivados de ácidos hidrocínâmicos que compõem a lignina através de ligações inter-resistentes a hidrólise, pela definição, constituem as ligninas *core*.

2.2 Nomenclatura

O sistema mais comum de nomenclatura na química da lignina é o que se fundamenta na unidade básica fenilpropanóide, C_6C_3 , designando os carbonos da cadeia alifática, C_3 , como α , no caso do carbono benzílico, e β e γ , seqüencialmente, para os demais átomos. O anel aromático é numerado, iniciando-se a contagem pelo carbono ligado à cadeia alifática¹, C_3 .



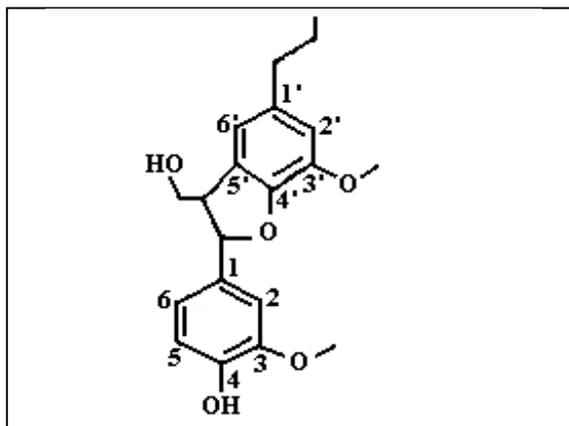
O anel aromático é denominado, de acordo com seus substituintes, como:

Guaiacila (G) $\rightarrow R_1 = OH, R_2 = H$ e $R_3 = OCH_3$

Siringila (S) $\rightarrow R_1 = OH$ e $R_2 = R_3 = OCH_3$ e

p-Hidroxifenila (H) $\rightarrow R_1 = OH$ e $R_2 = R_3 = H$

As ligações entre os monômeros para formar dilignóis e trilignóis podem ser identificadas baseando-se na numeração dos monômeros, utilizando-se para distingui-los números marcados. Como exemplo, o dilignol abaixo apresenta ligações β -5' e α -0-4

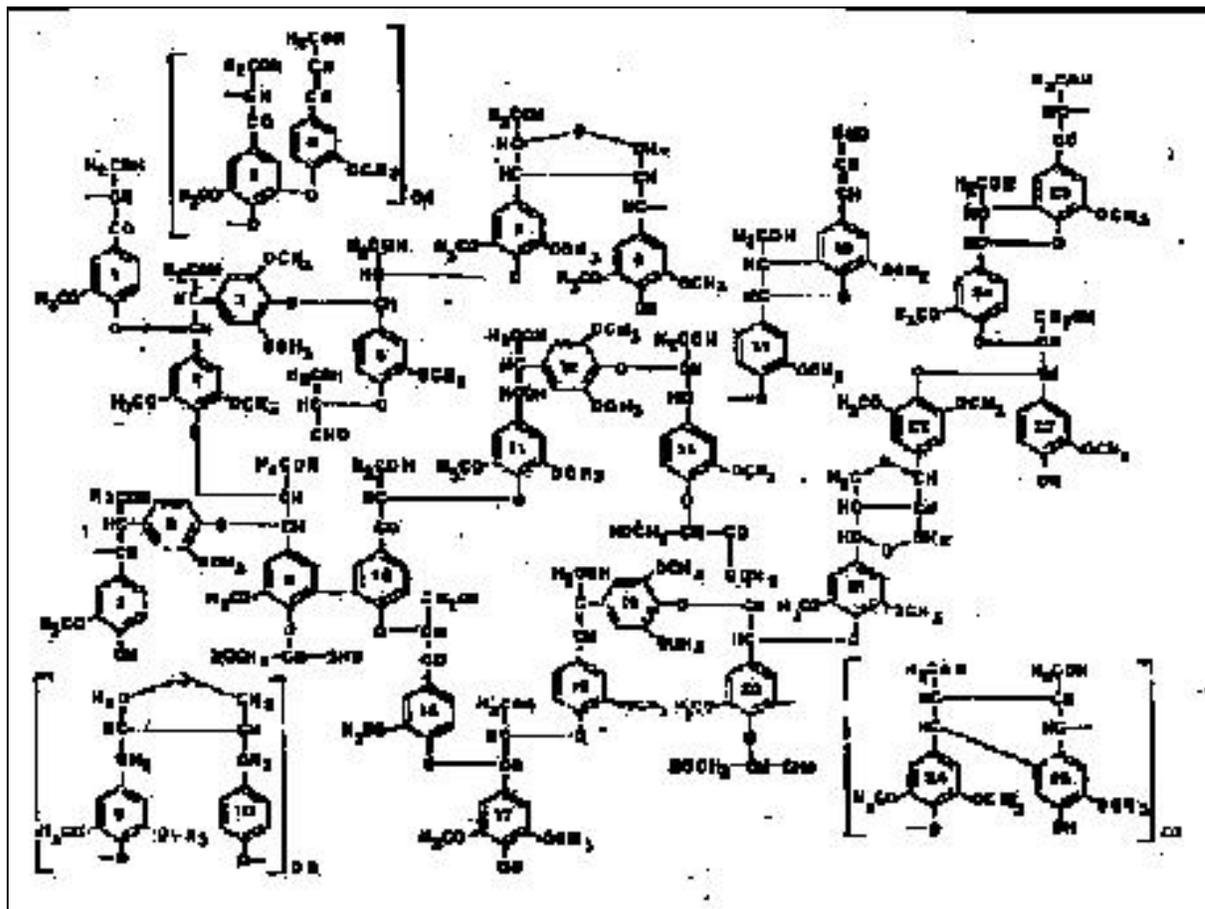


As primeiras tentativas de proposição de uma estrutura para a lignina foram feitas por FREUDENBERG & NEISH (1968), combinando

resultados da reação de polimerização desidrogenativa do álcool coniferílico com dados analíticos obtidos até então.

GLASSER & GLASSER (1981) também propuseram um esquema e estrutura para a lignina de madeiras moles. Para tal, foram necessárias análises elementares, determinação de açúcares e cinzas, determinação de grupos funcionais por espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^1H e reação de oxidação com permanganato seguida da análise dos produtos formados por cromatografia gasosa ligada à espectrometria de massa (CGMS) e por cromatografia de permeação em gel (CPG). Os resultados dessas análises, associados aos dados da literatura e à simulação por computador dos modos possíveis de acoplamento dos radicais dos derivados do álcool cinamílico, possibilitaram a formulação de um esquema para a estrutura dessas ligninas.

Foi publicado por NIMZ (1974) um esquema estrutural para a lignina da faia (*Fagus silvatica*), incluindo dados obtidos por RMN de ^{13}C . PILÓ-VELOSO *et al.* (1993) propuseram um esquema estrutural para a lignina da madeira moída de *Eucalyptus grandis*, apresentado a seguir, a partir dos estudos de seus grupos funcionais e análise elemental.



2.3 MÉTODOS DE OBTENÇÃO

A avaliação da lignina *core in situ* é normalmente feita através do extrato livre de parede celular, o qual pode ser obtido após extração prévia com solventes orgânicos para eliminar os componentes solúveis. Isto é importante para minimizar os problemas de interferência entre a lignina *core* e outros fenólicos solúveis (MORAIS *et al.* 1991).

A preparação da lignina livre de contaminantes pode ser obtida por vigoroso tratamento, o qual modifica a estrutura da lignina (SARKANEN & LUDWIG, 1971). A mais freqüente fração de lignina solúvel usada para estudos analíticos é a preparada de amostras moídas (Björkman 1954, apud LAPIERRE 1993; SARKANEN & LUDWIG, 1971). SALIBA *et al.* (1998) verificaram que a lignina moída e isolada com solventes orgânicos é a ideal para estudos de caracterização, pois sofre poucas modificações.

2.3.1 Hidrólise

A lignina de hidrólise é obtida durante a hidrólise da madeira a uma temperatura de 180-190°C, sob pressão de 12-14atm, e com solução de H₂SO₄ de 0,5 a 1,0%. Devido às condições de extração, ocorre uma transformação da matéria-prima vegetal, na qual os polissacarídeos são convertidos a monossacarídeos (pentoses e hexoses), restando um produto insolúvel (rendimento de 25 - 40%) denominado *lignina técnica bruta* (LTB).

2.3.2 Isolamento

O isolamento de lignina envolve o preparo de amostras livres de extrativos. A técnica empregada não deve causar alterações de natureza química, ocasionando mudanças estruturais, em que a lignina resultante difere da original presente no vegetal, chamada *protolignina*.

São três os processos básicos de isolamento (FENGEL & WEGENER, 1984):

- como resíduo;
- como derivado;
- como extrativo;

a) **como resíduo** - É o método de Klason, no qual pela hidrólise ácida, os polissacarídeos são removidos e a lignina é liberada como resíduo.

b) **como derivado** - neste método, o vegetal, ao ser tratado com determinados reagentes, forma produtos solúveis que serão separados.

b)1. Processo organossolve - Envolve reação com um álcool (metanol, isobutanol, ciclo hexanol ou álcool benzílico) e ácido acético. Os álcoois combinam com a lignina na presença de ácidos minerais formando a lignina alcoólica, solúvel, com rendimento de 30%.

b)2. Processo do ácido tioglicólico - Este ácido reage com a lignina na presença de HCl diluído formando o ácido ligno-tioglicólico. O componente

principal da lignina que participa desta reação é o álcool benzílico (reação de substituição nucleofílica).

b)3. Derivado da indústria de celulose - Da indústria de papel são obtidos dois tipos de lignina como subprodutos. a lignina sulfítica e a Kraft (sulfática). A lignina sulfítica é obtida pelo tratamento da madeira com hidróxido de sódio e sulfito de sódio; a sulfática é produzida pela reação da madeira com sulfeto de sódio em meio básico.

c) **como extrativo** - A lignina é obtida pela extração com solventes orgânicos a partir do vegetal finamente moído. Como mencionado anteriormente, a lignina obtida por este método assemelha-se mais com a protolignina. Os principais tipos de ligninas obtidas por extração são:

- lignina nativa, ou de Brauns;
- lignina liberada enzimaticamente;
- lignina de madeira moída (LAI & SARKANEN, 1971).

c)1. Lignina nativa (LN), ou de Brauns (LB) - No procedimento original, a madeira do vegetal era finamente moída e a extração inicial era feita com éter, seguindo-se uma extração com água fria e, após, com etanol 95%. Neste último extrato, a lignina era precipitada pela adição de H₂O. A purificação final consistia na dissolução do precipitado em dioxano e na reprecipitação por adição de éter etílico. O rendimento dessa lignina é muito baixo, representando de 2 a 4% da lignina total presente na madeira.

c)2. Lignina liberada enzimaticamente - Em partículas do vegetal com dimensões de 60 mesh, faz-se a extração com éter e água. Posteriormente, o material pré-extraído é submetido a uma cultura de determinados tipos de fungos por um período de 13 a 15 meses. Os fungos atacam somente os polissacarídeos, propiciando uma hidrólise enzimática e liberando a lignina intacta. A lignina é, então, extraída do meio com etanol 95% e purificada, como no caso da lignina nativa, tendo-se um rendimento de 20% do teor da lignina total da madeira.

c)3. Lignina de madeira moída (LMM) - Esta é uma das mais estudadas para a análise estrutural, pois a lignina não sofre grandes transformações químicas, representando, assim, a composição média da lignina do vegetal. Sua obtenção é feita a partir do vegetal livre de extratos finamente triturado em moinho de bolas por dois ou três dias. Faz-se, então, a extração desse pó com mistura dioxano-água (9:1) ou acetona: água (9:1), que resulta em solução contendo a LMM. Após remoção do solvente, o extrato é purificado pela solubilização em ácido acético e precipitado por adição de água. Essa lignina pode ainda ser purificada por solubilização em NaOH 0,1 N e por precipitação por adição de HCl 0,3 N. Por este método, é possível extrair até

cerca de 50% da lignina total do vegetal (FENGEL & WEGENER, 1984).

3 CARACTERIZAÇÃO DE LIGNINAS

A estrutura das ligninas deve ser determinada a partir de uma amostra pura, ou seja, livre de carboidratos e outros extrativos. É importante também definir a escolha do procedimento de extração para que a lignina resultante tenha propriedades físicas e químicas semelhantes à protolignina *in situ* original, presente no vegetal. A seguir, determina-se o percentual de grupos metoxílicos e outros grupos funcionais, por métodos químicos e espectroscópicos no infravermelho (IV), de ressonância magnética nuclear (RMN de ^1H e ^{13}C). Faz-se também o estudo de reações de degradação e oxidação com permanganato de potássio e nitrobenzeno, assim como de degradação por pirólise. Os produtos da degradação e oxidação são, então, analisados por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa. Emprega-se ainda cromatografia de permeação em gel, para determinar a distribuição dos pesos moleculares de fragmentos que compõem a lignina (NASCIMENTO *et al.*, 1992).

3.1 ESTUDO DE LIGNINAS NO INFRAVERMELHO (IV)

A chamada radiação IV corresponde à região do espectro eletromagnético situada entre a região do visível e a das microondas. A porção de maior utilidade para o estudo de moléculas orgânicas situa-se entre 4000 e 400 cm^{-1} . O espectro no IV é característico da substância como um todo, mas certas ligações de grupos de átomos dão origem a bandas que ocorrem mais ou menos na mesma frequência, independentemente da estrutura da molécula. É justamente a presença dessas bandas características de ligações de determinados grupos que permite a obtenção, mediante simples exame do espectro e consulta a tabelas, de informações estruturais úteis (SILVERSTEIN *et al.*, 1979).

A espectroscopia no infravermelho é muito utilizada para a caracterização dos constituintes da cadeia polimérica, pois, permite determinar os tipos de ligações e grupos funcionais. A região de interesse no espectro IV de ligninas é também a mais comum para substâncias orgânicas em geral, compreendida entre 4000 e 700 cm^{-1} (2,5 a 14,3 μm). A literatura também mostra trabalhos feitos no IV próximo, entre 7000 - 4000 cm^{-1} (1,42 - 2,5 μm). (SARKANEN & LUDIWIG, 1971). A caracterização de picos de absorção no IV se faz principalmente de modo qualitativo, por comparação com dados tabelados. Entretanto, alguns estudos têm sido desenvolvidos a fim de avaliar

quantitativamente alguns picos de absorção observados (TAI *et al.*, 1990; MORAIS *et al.*, 1994; SALIBA *et al.*, 1998).

Devido ao fato de ser a da lignina material amorfo e constituído de monômeros de estrutura química de grande complexidade, de distribuição variável no polímero ou, mesmo formada de diferentes frações de macromolécula, não é possível aplicar a teoria de grupo para a interpretação de seus espectros IV (MORAIS, 1987). Na metodologia de interpretação de espectros IV de ligninas, são empregados compostos-modelo que podem ser usados como padrões ou então para relacionar alguns picos de absorção. Assim, atribuições dos picos de absorção IV de ligninas não são feitas apenas a partir de um simples espectro mas, sim, estudando comparativamente também os espectros IV de alguns de seus derivados e de compostos-modelo (TAI *et al.*, 1990). Esses derivados são obtidos por reações de metilação, acetilação e redução com borohidreto de sódio e hidreto de lítio e alumínio.

Na tabela 1, são mostrados os principais picos de absorção característicos no IV para ligninas de madeira dura, que são do tipo guaiacila-siringila, ligninas de madeiras moles, que são do tipo guaiacila (G); e gramíneas, que são do tipo guaiacila-siringila-*p*-hidroxifenila (G-S-H).

Tabela 1 - Principais atribuições dos picos de absorção no IV de ligninas.

COMPRIMENTO DE ONDA (CM^{-1})			
Madeira Mole (G)	Madeira Dura (G-S)	Gramínea (G-S-H)	Atribuição
3400	3400	3400	Grupos hidroxílico
3000	3000	3000	C-H aromático
2936	2936	2936	C-H alifático
2850	2850	2850	C-H alifático
1720-1700	1720-1690		C = O não conjugada
1675-1660	1660-1650		C = O conjugada
		1656	C = O Cetonas conjugadas <i>p</i> -substituídas
		1673	Ácido <i>p</i> -cumárico
1470-1460	1470-1460	1470-1460	C-H de grupos metílicos
1430-1415	1430-1415		C-C de anéis aromáticos
			C-H de grupos metílicos
1270	1275	1265	C-O de anéis guaiacílicos
	1240-1230		C-O de anéis siringílicos
			C-O de anéis guaiacílicos
			C-O de fenóis
		1235	Unidades sinapila e <i>p</i> -cumarila
1140	1085		C-O de álcoois secundários
865-815	915-815	870	C-H aromáticos

Tabela adaptada de:

- SARKANEN & LUDWIG (1971)
- JUNG & HIMMELSBACH (1989)
- MORAIS (1992)

H = *P* - hidroxifenila
G = Guaiacila
S = siringila

3.2 ESTUDO DE LIGNINAS POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN):

Os maiores comprimentos de onda da radiação eletromagnética estão envolvidos no chamado *espectro de RMN*. As amostras são submetidas a campos magnéticos fortes e irradiadas por radiofrequências cujos valores dependem do núcleo do átomo estudado. O estudo do espectro RMN dá uma idéia das vizinhanças e dos arranjos relativos desses componentes.

A espectroscopia de RMN tem sido grandemente utilizada em muitos estudos de análise estrutural de ligninas (HIMMELSBACH & BARTON II, 1980; HIMMELSBACH *et al.*, 1983; BARTON II, 1988; JUNG & HIMMELSBACH, 1989; SALIBA, 1998).

ANÁLISE DE LIGNINAS POR RMN DE ¹H

As ligninas são substâncias de alto peso molecular (PM). Portanto, assim como os polímeros, são problemáticas para a análise por RMN. Formam soluções viscosas, nas quais as moléculas possuem pouca mobilidade, não permitindo a obtenção de um bom sinal. Seus espectros apresentam bandas bastante largas e de difícil identificação, podendo conter em suas constituições hidrogênios blindados por determinados grupos químicos. A RMN de ¹H aplicada ao estudo de ligninas tem sua principal vantagem na possibilidade do cálculo, a partir do espectro, do número total de hidrogênios ligados a cadeias alifáticas e aos núcleos aromáticos. Pode-se, ainda, obter uma estimativa do número de hidrogênios hidroxílicos alifáticos e aromáticos, assim como do número de hidrogênios metoxílicos (PILÓ-VELOSO *et al.*, 1991; CHEN & ROBERT, 1988). Devido à dificuldade de solubilização de ligninas nos solventes usualmente empregados para a obtenção de espectros de RMN de ¹H, procede-se à sua acetilação. Uma vez acetilada a lignina, o derivado obtido torna-se totalmente solúvel nos solventes orgânicos (MORAIS, 1992). Em espectrômetros que operaram em altas frequências (270-400 MHz), podem-se observar segmentos de estruturas presentes em pequenas proporções e, portanto, os sinais de hidrogênios de grupos aldeídicos e de estruturas formadas por ligações comuns em ligninas do tipo β-5, β-β, β-4, etc.

A tabela 2 mostra as oito regiões principais do espectro de RMN de ¹H de ligninas.

Tabela 2 - Atribuição dos sinais de hidrogênio em oito regiões do espectro de RMN de ¹H de ligninas.

Região	δ	Tipo de hidrogênio responsável pelo sinal
1	8,00 - 11,50	Carboxílico e aldeídico
2	6,28 - 8,00	Aromáticos e vinílicos
3	5,74 - 6,28	β-vinílico e benzílicos
4	5,18 - 5,74	Benzílico
5	2,50 - 5,18	Metoxílicos e muitos outros hidrogênios ligados à cadeia C ₃ , que podem ser α,β e γ
6	2,10 - 2,50	Acetoxílicos aromáticos
7	1,58 - 2,10	Acetoxílicos difáticos e acetocílicos aromáticos orto à ligação bifenólica
8	0,38 - 1,53	Alifáticos altamente blindados

Fonte: MORAIS (1992)

3.2.2 ANÁLISE DE LIGNINAS POR RMN DE ¹³C

Nimz (1976) apud MORAIS, 1992, em estudos de lignina de madeira moída (LMM) da Faia (*Fagus silvatica*), introduziu a RMN de ¹³C para auxiliar na caracterização de ligninas. Como na RMN de ¹H, para um estudo da atribuição dos deslocamentos químicos em unidades δ, relativos aos sinais de ¹³C da molécula, foi necessário o uso de compostos-modelo, os quais possibilitam caracterizar os vários tipos de ligações encontradas na estrutura das ligninas. Esta metodologia tem sido de grande emprego na caracterização de ligninas por RMN (FERREIRA *et al.*, 1993 e 1995; PILÓ-VELOSO *et al.*, 1993; DRUMOND, 1992, ALVES, 1995; SALIBA, 1998).

Na tabela 3, estão relacionados os valores de deslocamentos químicos ¹³C em δ e suas respectivas atribuições para ligninas.

Na figura 1, apresentam-se os compostos-modelo, juntamente com a proposta estrutural para a lignina da Faia, onde são representados carbonos que possibilitam as atribuições da tabela 1.4. Mantive-se a numeração estabelecida pelos autores para unidades estruturais e compostos-modelo.

3.3 ESTUDO DE GRUPOS FUNCIONAIS E DE FÓRMULAS MÍNIMAS

Os grupos funcionais presentes na macromolécula da lignina que sobressaem são: hidroxílicos alifáticos e aromáticos, éteres, carbonilas e metoxilas, além de unidades dos tipos siringila, guaiacila e *p*-hidroxifenila. Para o estudo de cada um desses grupos funcionais e unidades, envolve-se a combinação de métodos químicos e espectroscópicos. Como a lignina, por definição, é um polímero composto de unidades do tipo fenilpropanóides (C₉),

Tabela 3 - Lista de atribuições dos sinais de RMN de ^{13}C para ligninas.

DESLOCAMENTOS (δ)	ATRIBUIÇÕES
195,2	C- α - em 1, 5', 10, 16, 25; C- γ em 15
192,7	C- α em vanilina
174,4	-COOH alifático em 26, 27, 28
172,6	-COOH alifático em 29, 30
171,8	O-C=O em ésteres alifáticos em 13 e 20
162,0	C ₄ em 10'; C ₅ em 25
154,5	C ₃ e C ₅ em 2,3, 5, 5', 9', 11, 12, 19, 21, 22, 24; C ₄ em 16,; C- α em 15
152,9	C ₄ em 6', 18
150,6	C ₄ em 4, 8, 13, 14, 20, 24; C ₃ em 1, 16
148,5	C ₃ em 4, 6', 7, 8, 9, 13, 14, 18, 20, 23, 24, C ₃ e C ₅ em 6,17; C ₄ em 9
146,6	C ₃ em 7, 15, 23, 25'
144,8	C ₃ em 25, 25'; C ₄ em 5'
138,7	C ₄ em 2, 3, 5, 11, 12, 9', 21, 22, 24, C ₁ em 2, 11, 21, 24', 25'; C ₃ em 15; C ₆ em 25'
136,0	C ₁ em 4, 9, 13, 14, 20, 24; C ₄ em 6, 7
133,6	C ₁ em 3, 5, 6, 7, 9, 12, 17, 19, 23
132,7	C ₁ em 1, 6', 8, 10, 10', 18; C- β em 15, 8; C ₂ em 10, C- α em 18
130,2	C ₁ em 15, 16, 15', C- α em 6'
129,0	C ₅ em 9; C ₂ e C ₆ em 10'; C ₆ em 10
126,7	C ₆ em 1, 16; C ₁ em 25
120,1	C ₆ em 4, 7, 13, 14, 20, 23, 24
117,5	C ₆ em 15
115,6	C ₅ em 7, 23; C ₂ em 8; C ₃ e C ₅ em 10'
113,8	C ₅ em 8, 6'; C ₂ em 1
112,0	C ₂ em 6', 7, 9, 18, 23, 25'
107,1	C ₂ e C ₆ em 3, 5', 12, 24'; C ₆ e, 25
105,1	C ₂ em C ₆ em 2, 5, 6, 9', 11, 17, 19, 21, 22
88,1	C α em 14, 24
86,8	C β em 4, 9, 13, 17, 20, 23; C α em 6, 21, 22, 25
81,0	C β em 1, 5', 10, 16, 25
75,0	C α em 2, 7, 11
73,3	C α em 4, 9, 13, 17, 20, 23; C γ em 6, 9', 10', 21, 22
63,8	C γ em 1, 5', 6', 10, 16, 18, 25; C β em 2, 7, 11
61,3	C α em 4, 9, 13, 17, 20, 23
56,3	OCH ₃ ; C α em 24'
54,5	C β em 6, 21, 22, 25'
54,0	C β em 14, 24, 24'
46,8	C β em 9', 10'
34,5	C α - (em G-CH ₂ -CH ₂ -COOH) em 32
31,5	C β - (em G-CH ₂ -CH ₂ -COOH) em 32
28,6	-CH ₂ (em C ₅ -CH ₂ -C ₃) em 33
26,5	-CH ₂ - ou -CH ₃
24,6	-CH ₂ - ou -CH ₃
20,5	-CH ₃ ou CH ₃ -C=O
17,8	C γ em 34
13,6	C γ em 34

Adaptada de MORAIS, 1987

determina-se a sua fórmula mínima tomando como base tais unidades (FENGEL & WEGENER, 1984). É necessário o conhecimento da porcentagem de C, H, O e de grupos metoxila (OCH₃) presentes na lignina para se ter a fórmula mínima em termos dessas unidades fenilpropanóides (PILÓ-VELOSO *et al.*, 1991).

3.3.1 DETERMINAÇÃO DE GRUPOS METOXÍLICOS

As ligninas são formadas a partir de três precursores básicos, que são os álcoois *p*-cumarílico, coniferílico e sinapílico.

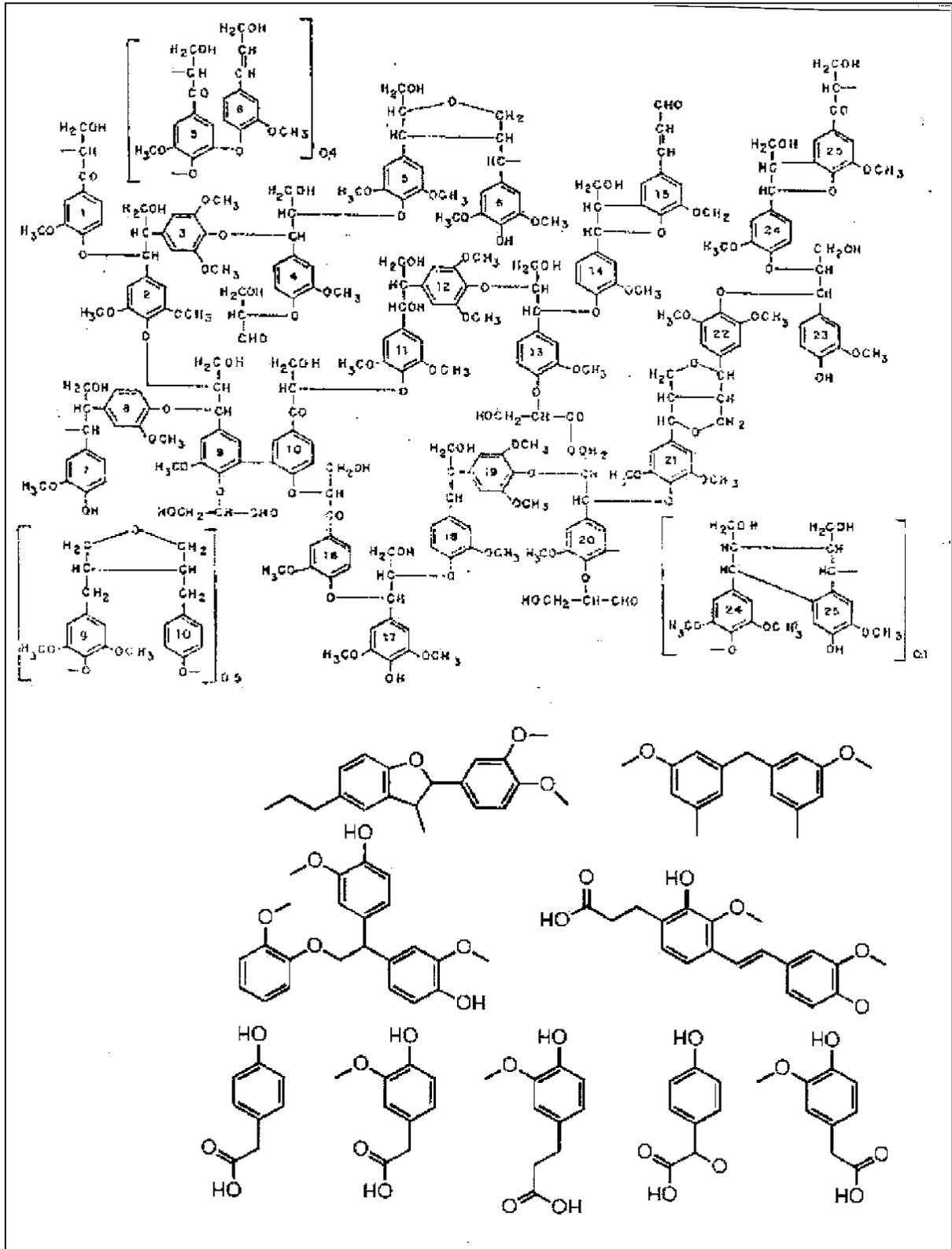


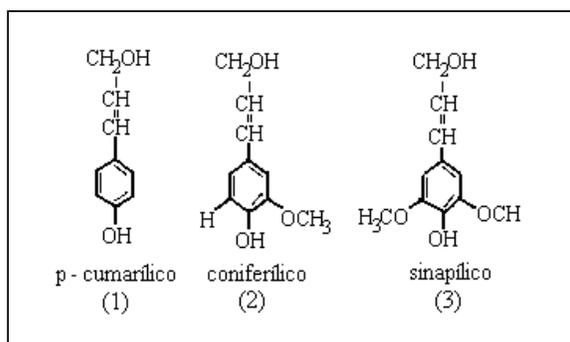
Figura 1 - Fragmentos de esquema estrutural de lignina e compostos-modelo utilizados para atribuições dos sinais de RMN de ¹³C, na tabela 3.

As razões molares entre esses três constituintes dependem do tipo de vegetal. O composto (1) não possui metoxila, o (2) e o (3) possuem, respectivamente, 1 e 2 grupos por mol. O grupo metoxílico é considerado um grupo funcional característico de ligninas e seus derivados, sendo de grande importância a determinação do seu conteúdo na análise da macromolécula (Sarkanen & Fengel, 1984 apud FENGEL & WEGENER, 1984; MORAIS, 1992).

A presença marcante dos grupos metoxílicos na maioria das unidades fenilpropanóides da lignina leva a que sejam expressos como parte integrante da fórmula mínima de ligninas, a qual é baseada na unidade fenilpropanóide. A porcentagem de metoxilas em madeiras moles varia de 12 a 16% e nas madeiras duras de 18 a 22%. Segundo SALIBA *et al.* (2000), a porcentagem de metoxila para a lignina da palha de milho é 6,67 e 1,79% para a da palha de soja.

Zeisel (1985) apud PILÓ-VELOSO *et al.* (1993) desenvolveu um dos primeiros métodos para a determinação de grupos metoxílicos. Por outro lado, Viebock e colaboradores desenvolveram uma técnica para a determinação de metoxilas, a qual pode ser utilizada para amostras com enxofre.

Segundo NASCIMENTO (1989), os sinais devidos a grupos metoxila são claramente observados na região do espectro RMN de ^1H compreendida entre $\delta = 3,5 - 4,0$. Através da curva de integração desses sinais, as metoxilas podem ser avaliadas semiquantitativamente. A presença de grupos metoxila em ligninas pode também ser avaliada por RMN de ^{13}C . Esses grupos apresentam sinais de ressonância do ^{13}C situados na região compreendida entre $\delta = 55$ a 57.



3.3.2 METODOLOGIA USUAL PARA O ESTUDO DA FÓRMULA MÍNIMA DE LIGNINAS

Freudenberg & Neih (1968) desenvolveram uma série de cálculos que permitem o estudo de fórmulas mínimas de ligninas. Os grupos metoxila são expressos como uma unidade separada dos demais átomos de C, H e O da molécula. Por esta razão, subtrai-se o conteúdo de C, H e O correspondente à metoxila do total encontrado para esses átomos.

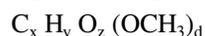
Denominam-se C_p , H_p e O_p as porcentagens individuais dos elementos contidos na metoxila. O conteúdo total na macromolécula desses elementos é expresso por %C, %H e %O, as porcentagens resultantes são dadas pelas relações:

$$\%C' = \%C - C_p$$

$$\%H' = \%H - H_p$$

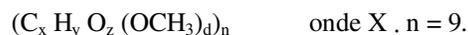
$$\%O' = \%O - O_p$$

Se essas relações são expressas em números relativos, resultantes da divisão pelas respectivas massas (M), tem-se a fórmula mínima representada por:

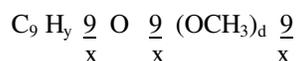


$$\text{Onde: } X = \frac{\%C'}{MC}, \quad Y = \frac{\%H'}{MH}, \quad Z = \frac{\%O'}{MO} \text{ e } d = \frac{\% \text{OCH}_3}{\% \text{OCH}_3}$$

Se a fórmula mínima para a lignina for considerada como função de sua unidade básica C_6 , C_3 , ou C_9 , pode ser escrita:



que, reescrita em termos de unidades C_9 , resulta em:



Substituindo x , y , z e d na equação acima, tem-se:

HIDROGÊNIO:

$$H = \frac{276,60 (\% H) - 27,00 (\% \text{OCH}_3)}{2,584 (\% C) - \% \text{OCH}_3}$$

OXIGÊNIO:

$$O = \frac{17,46 (\% O) - 9 (\% \text{OCH}_3)}{2,584 (\% C) - \% \text{OCH}_3}$$

METOXILA :

$$\text{OCH}_3 = \frac{9 (\% \text{OCH}_3)}{2,584 (\% C) - \% \text{OCH}_3}$$

A partir das porcentagens de C, H e O, determinadas pela análise elementar, é possível

determinar a fórmula mínima para a lignina, baseada em unidades C₉.

3.3.3 DETERMINAÇÃO DE HIDROXILAS TOTAIS

As hidroxilas são o segundo grupo funcional mais estudado em ligninas, que podem estar presentes tanto como hidroxilas fenólicas quanto como hidroxilas alifáticas (MORAIS, 1987).

A técnica de titulação condutivimétrica é bastante conveniente para a determinação da concentração de hidroxilas em ligninas, por ser de utilização fácil e rápida (Sarkanen & Schuerch, 1955) apud PILÓ-VELOSO *et al.*, 1993. A reação envolvida nesta titulação constitui-se em uma reação de neutralização de carboxilas e de fenóis com hidróxido de lítio. O ponto de equivalência é determinado facilmente (MORAIS, 1987).

3.3.4 DETERMINAÇÃO DE CARBONILAS EM LIGNINAS

Este grupo funcional está presente em todos os tipos de ligninas, podendo ser determinado por várias técnicas:

- redução com boroidreto de sódio em meio alcalino, estimando-se o consumo de boroidreto de sódio durante a reação;
- estudo da absorção no IV de compostos-modelo;
- hidrogenação;
- reação de oximação.

Na figura 2, constam as principais subestruturas que contêm carbonilas, presentes em ligninas.

3.3.5 ESTUDOS QUÍMICOS DE DEGRADAÇÃO DE LIGNINAS POR OXIDAÇÃO COM NITROBENZENO

ADLER (1977), em revisão, cita que a oxidação de ligninas com nitrobenzeno foi introduzida por Freudenberg e colaboradores em 1939. Segundo a literatura, a oxidação de madeiras moles produz como produto principal a vanilina (4). A oxidação de madeiras duras tem como produtos a vanilina e o siringaldeído (5). No caso das gramíneas, além desses dois aldeídos, é produzido o *p*-hidroxibenzaldeído (6).

Além dos aldeídos, a oxidação com nitrobenzeno dá origem também, em quantidades muito inferiores, aos respectivos ácidos:

A relação molar dos aldeídos e ácidos produzidos depende da natureza, espécie e constituição da macromolécula da lignina.

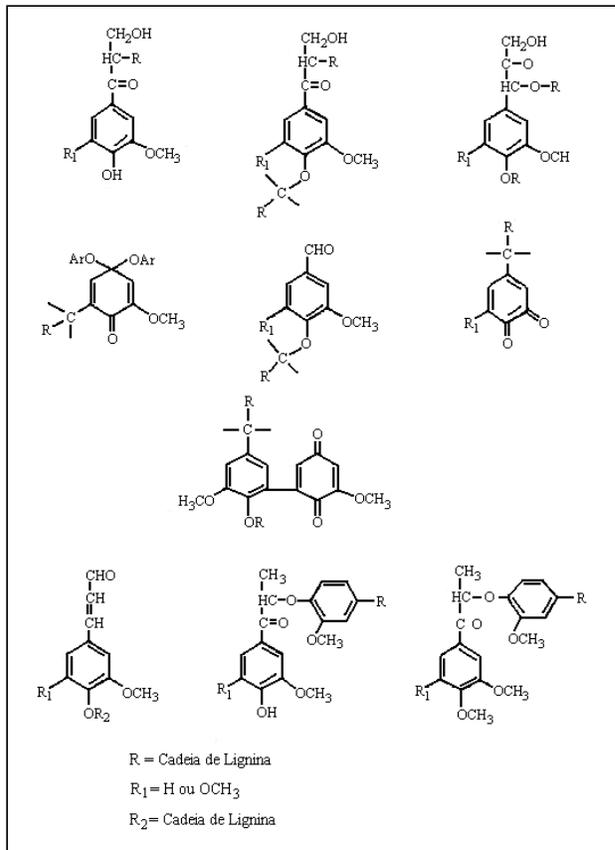
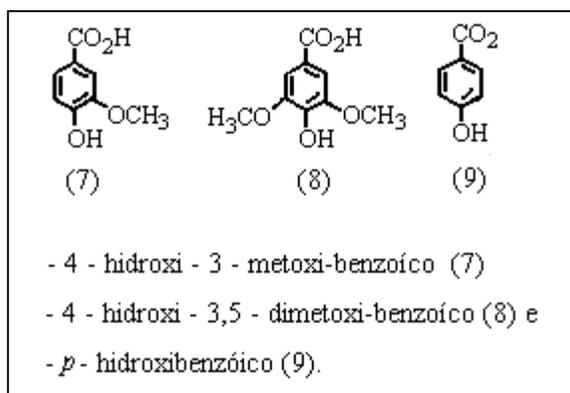
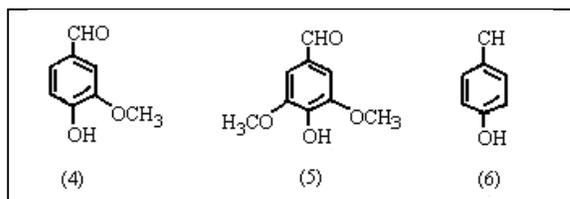


Figura 2 – Principais subestruturas que contêm carbonila, presentes em lignina.

Em estudos feitos por Lapiere *et al.* (1987) apud MORAIS (1992), foi verificado que nesta reação, sob catálise básica, ocorre inicialmente o rompimento das ligações alquil-árida, formando os íons fenolatos e, na sequência, acontece a quebra das ligações C α C β, dando origem a aldeídos. Entretanto, o mecanismo dessa reação não é bem entendido. Uma informação importante que se pode tirar dessa oxidação refere-se ao teor total de aldeídos e ácidos formados. Verificado por SALIBA *et al.* (1999b) os aldeídos obtidos através da oxidação com nitrobenzeno, interferem diferentemente na digestão dos carboidratos das plantas nos animais.

A análise de grupos funcionais tais como metoxilas, hidroxilas e carbonilas e a determinação de grupos siringila, guaiacila e *p*-hidroxifenila, presentes na estrutura da macromolécula, são fundamentais para um conhecimento aprofundado da natureza de uma lignina. A partir desse conhecimento, pode-se interferir quimicamente, se necessário, em seus grupos funcionais, a fim de se obter derivados que possam ser utilizados em diferentes aplicações (MORAIS, 1992).

Parte dos objetivos deste trabalho foi caracterizar quimicamente as ligninas dos resíduos agrícolas de milho (RM) e de soja (RS) e verificar como as mesmas afetam a digestibilidade dos carboidratos estruturais.



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADLER, E. Lignin chemistry - past, present and future. *Wood Sci Technol*, v.11, n., p.169-218, 1977.
- ALVES, V.L., DRUMOND, M.G., PILÓ-VELOSO, D. *et al.* Synthesis and ¹³C NMR studis of New Trienesic lignin model compounds containing 5-51 and B-0-4 substructures. In: SYMP CHEM LIGNINIS and OTHER WOOD COMP, 15, 1995, Recife. *Proceedings...* Recife: n.i., 1995, p.26-28.
- BARTON II, F.E. Chemistry of lignocellulose: Methods of analysis and consequences of structure. *Anim Feed Sci Technol*, v.21, p.279-286, 1988.
- CHEN, C.L. Lignins: Occurrence in wood tissues isolation reactions, and structure. In: LEWIS, M., GOLDSTEIN, I.S. (ed.). *Wood structure and composition*. N.i. : Marcel Dekker, 1991p.
- CHEN, C.L., ROBERT, D. Characterization of lignin by ¹H and ¹³C NMR spectroscopy. In: WOOD, W.A., FELLOG, S. (Ed.). *Methods in enzymology 161B*. Orlando : Academic, 1988.
- DRUMOND, M.G., PILÓ-VELOSO, D., COTA S.D.S., *et al.* *Bitohenyl type lignin model compounds: synthesis and ¹³C NMR substituent chemical schift addivity rerle*. *Holzforschung*: n.i., 1992. p.127-134.
- FENGEL, D., WEGENER, G. *Wood, chemistry, ultrastructure, reactions*. New York : Waster & Grugter, 1984. 613p.
- FERREIRA, M.A., DRUMOND, M.G., PILÓ-VELOSO, D. Estudo de substâncias emodelo de ligninas do tipo bifênile por RMN de BC. In: ENCONTRO DE USUÁRIOS DE RMN, 5, 1995, Angra dos Reis. *Anais...* Angra dos Reis : 1995. p.181-185.
- FERREIRA, M.A., DRUMOND, M.G., PILÓ-VELOSO, D. *et al.* Synthesis of tetrameric lignin model compounds containing B-0-4 and 5-51 substructure. In: BRAZILIAN SYMPOSIUM CHEMISTRY LIGNIN and..., 3, 1993, Belo Horizonte. *Proceedings...* Belo Horizonte: n.i., 1993. 273-277p.
- FREUDENBERG, K., NEISH, A.C. *The constitution and biosynthesis of lignin*. Berlin : Springer-Verlag, 1968. 129p.
- HIMMELSBACH, D.S., BARTON II, F.E. ¹³C Nuclear magnetic resonance of grass lignins. *J Agric Food Chem*, v.28, p.1203-1208, 1980.
- HIMMELSBACH, D.S., BARTON II, F.E., WINDHAM, W.R. Comparison of carbohydrate, lignin and protein ratios between grass species by cross polarization-magic angle spinning carbon-13 nuclear magnetic resonance. *J Agric Food Chem*, v.31, p.401-404, 1983.
- JUNG, H.J.G., HIMMELSBACH, D.S. Isolation and characterization of wheat strow lignin. *J Agric Food Chem*, v.37, p.81-87, 1989.
- LAI, Y.Z., SARKANEN, K.V. Isolation and strutral studies. In: SARKAMEN, K.V., LUDWIG, C.H. *Lignins: occurrence, formation, structure and reaction*. New York : Wiley, 1971. p.165-230.
- LAPIERRE, C. Application of new methods for the investigation of lignin structure. In: JUNG, H.G., BUXTON, D.R., HATFIELD, R.D., *et al.* *Forage cell wall structure and digestibility*. Madison: American Society for Agronomy, 1993. p.133-163.
- MORAIS, S.A., NASCIMENTO, E.A., PILÓ-VELOSO, D. Determinação do grau de condensação e do número de grupos metoxila por unidade monomérica de Ligninas do *Eucalyptus grandis* por espectroscopia FTIR. *Química Nova*, v.17, p.5-8, 1994.
- MORAIS, S.A.L. *Contribuição ao estudo químico de Ligninas de Eucalyptus grandis*. Belo Horizonte, 1987. 175p. Dissertação (Mestrado em Química) - UFMG/ICEx, 1987.
- MORAIS, S.A.L. *Contribuição ao estudo químico e espectroscópico da lignina de madeira moída do Eucalyptus grandis: Isolamento, quantificação e análise estrutural*. Belo Horizonte, 1992. 260p. Tese (Doutorado em Química) - UFMG/ICEx, 1992.
- MORAIS, S.A.L., NASCIMENTO, E.A., PILÓ-VELOSO, D. Determinação do grau de condensação e do número de grupos metoxila por unidade monomérica de ligninas do *E. grandis* por Espectroscopia FTIR. *Química Nova*, v.17, p.5-8, 1994.
- MORAIS, S.A.L., NASCIMENTO, E.R., PILÓ-VELOSO, D. Studies of Eucalyptus grandis lignin and Polyphenols content in Eucalyptus grandis by infrared spectroscopy. *J Bot Chem Soc*, v.2, p.129-131, 1991.
- NASCIMENTO, E.A. *Obtenção e caracterização do coque da lignina hidrolética do E. grandis*. Belo Horizonte, 1989. Tese (Doutorado) - UFMG/ICEx, 1989.

- PILÓ-VELOSO, D., MORAIS, S.A.L., NASCIMENTO, E.A. Carbon-13 Cross Polarization NMR study of Lignin Pyrolysis Tappi. In: WOOD AND PING CHEMISTRY, 1989, n.i. **Proceedings...** n.i.: n.i., 1989. p.233-236.
- PILÓ-VELOSO, D. NMR study of lignin from *Eucalyptus grandis*. In: BRAZILIAN SYMPOSIUM ON THE CHEMISTRY OF FIRST BRAZILIAN SYMPOSIUM ON THE CHEMISTRY OF LIGNIN AND OTHER WOOD COMPONENTS, 1, 1989, São Carlos. **Proceedings...** São Carlos : n.i., 1989. 95-113.
- PILÓ-VELOSO, D., NASCIMENTO, E.A., MORAIS, S.A.L. **Analysis of Eucalyptus grandis Milled Wood Lignin, Proceedings of second Brazilian Symposium on the Chemistry of lignin and Other Wood Components.** Campinas : n.i., 1991. p.12-23.
- PILÓ-VELOSO, D., NASCIMENTO, E.A., MORAIS, S.A.L. Isolamento e análise estrutural de ligninas. **Química Nova**, v.16, p.435-448, 1993.
- PILÓ-VELOSO, D., NASCIMENTO, E.A., MORAIS, S.A.L. **Quantitativa Chemical and ¹³C NMR analysis of Eucalyptus grandis Lignin. Proceeding of the Third Symposium on the Chemistry of lignin and other wood components.** Belo Horizonte : Química Nova, 1993. p.150-154.
- RALPH, J., HELM, R.F. Lignin/Hydroxycinnamic acid/Polysaccharide complexes: syntetic models for regiochemical. In: JUNG, H.G., BUXTON, D.R., HATFIELD, R.D. *et al.* **Forage cell wall structure and digestibility.** Madison : American Society of Agronomy, 1993. p.201-241.
- SALIBA, E.O.S., RODRIGUEZ, N.M., GONÇALVES, L.C., *et al.* Effect of corn and soybean lignin residues submitted to the ruminal fermentation on structural carbohydrates digestibility. **Arq Bras Med Vet Zootec**, v.51, n.1, p.85-88, 1999b.
- SALIBA, E.O.S. **Caracterização química e microscópica das ligninas dos resíduos agrícolas de milho e de soja expostas a degradação ruminal e seu efeito sobre a digestibilidade dos carboidratos estruturais.** Belo Horizonte, 1998. 252p. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – EV-UFMG, 1998.
- SALIBA, E.O.S., RODRIGUEZ, N.M., PILÓ-VELOSO, D., *et al.* Estudos de caracterização química das ligninas dos resíduos agrícolas de milho e de soja. In: REUNIÃO ANUAL DA SBZ, 37, 2000, Viçosa. **Anais...** n.i : n.i, 2000. p.n.i.
- SALIBA, E.O.S., RODRIGUEZ, N.M., BARRETO, S.L.T., *et al.* Isolation and infrared spectroscopic characterization of lignin from boter corn and soybean agricultural residues. **Arq Bras Med Vet Zootec**, v.50, n.6, p.727-730, 1998.
- SALIBA, E.O.S., RODRIGUEZ, N.M, GONÇALVES, L.C., *et al.* Caracterização microscópica da lignina dos resíduos agrícolas de milho e de soja submetidos à fermentação ruminal e seus efeitos sobre a digestibilidade da fibra. **Arq Bras Med Vet Zootec**, v.51, n.1, p.89-96, 1999a.
- SILVERSTEIN, R.M., BASSLER, G.C., MORRILL, T.C. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos.** Rio de Janeiro : Guanabara Koogan, 1979. 299p.
- TAI, D.S., CHEN, C.L., GRATZL, J.S. **Wood Chem Technol**, v.10, p.111, 1990.