

Dorila Piló-Veloso

Departamento de Química-Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais - 31270 - Belo Horizonte - MG
 Evandro Afonso do Nascimento e Sérgio Antônio Lemos de Moraes
 Departamento de Química da Universidade Federal de Uberlândia - 38000 - Uberlândia - MG

Recebido em 31/7/92; cópia revisada em 27/4/93

A short history of the study of the chemical structure and biogenesis of lignins, as well as the principle structures obtained from different types of wood are presented. Various methods for isolation of lignins by extraction and chemical treatment are given. The quantification of functional groups in lignins by chemical and physical methods, with special emphasis in nuclear magnetic resonance, and the results obtained with different types of wood are discussed.

Keywords: lignins; lignins isolation; structural analysis.

INTRODUÇÃO

A palavra lignina vem do latim *lignum*, que significa madeira. Foi introduzida por Schultz, em 1857, para designar o material que hoje se sabe ser o segundo mais abundante do reino vegetal, logo depois da celulose. As ligninas só não estão presentes em vegetais primitivos como fungos, algas e líquens não lignificados¹⁻³. Além da proteção contra a ação de microorganismos, nas plantas vasculares, elas são responsáveis pela resistência mecânica, pelo transporte de nutrientes, água e metabólitos. Seus estudos vem despertando interesse a partir dos trabalhos de Payen, em 1838, e, principalmente, após o desenvolvimento dos processos de polpação da madeira iniciados em 1860⁴⁻⁶. Desde então, diferentes tipos de estudos foram desenvolvidos para elucidar suas constituições química, biossíntese e distribuição nos vegetais^{1-3,7-12}. O conhecimento de suas estruturas químicas é de fundamental importância para a evolução dos processos de polpação e de branqueamento da polpa.

Sendo um constituinte cuja abundância na madeira pode variar de 15 a 30%, dependendo da espécie vegetal², as ligninas são obtidas em larga escala, em todo o mundo, como subproduto da indústria de polpação, cujo principal aproveitamento ainda é como fonte de energia, pela queima, existindo uma forte tendência mundial para dar-lhes um aproveitamento mais nobre.

Nas florestas brasileiras de *Eucalyptus*, o corte pode ser feito após sete a dez anos do plantio e o rendimento em madeira alcança até trinta e cinco metros cúbicos por hectare ao ano. Isso ajudou a indústria de polpação a ter um grande impulso no país que, num intervalo de vinte anos, se tornou o oitavo produtor mundial de celulose. Sendo assim, o interesse no estudo das ligninas do *Eucalyptus* cultivado em solos do Brasil torna-se muito grande. As principais espécies que estão sendo utilizadas por essas indústrias são: *E. grandis*, *E. saligna* e os híbridos *grandis-saligna* e *grandis-uophila*¹³.

CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E BIOGÊNESE DE LIGNINAS

Em 1868 Erdman isolou catecol e ácido protocatequínico da reação de fusão alcalina da madeira, a qual deveria, portanto, apresentar constituintes aromáticos¹⁴. Em 1874, Tiemann e Harrmann isolaram a coniferina do cambium de *Picea abies*,

sugerindo que poderia estar vinculada à estrutura da lignina¹⁵. Em 1897, Klason propôs que a biogênese da lignina poderia estar vinculada ao álcool coniferílico¹⁶. Baseado em trabalhos posteriores deduziu, mais tarde, que a lignina era uma substância macromolecular cujas unidades básicas compreendiam dímeros desse álcool e do aldeído coniferílico¹⁷⁻²¹ (Figura 1).

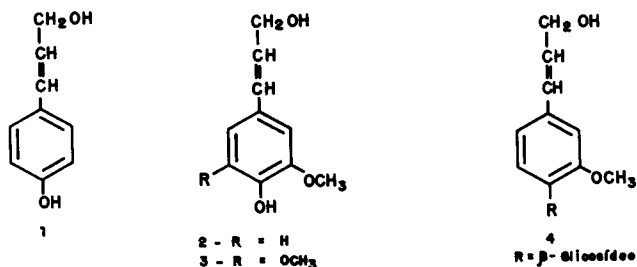


Figura 1. Estrutura dos álcoois precursores de ligninas: 1- álcool p-cumarílico, 2- álcool coniferílico, 3- álcool sinapílico, 4- coniferina.

Em 1939, Freudenberg identificou a vanilina como produto da oxidação da lignina de *Picea excelsa* (madeira mole - *Gymnospermae*) com nitrobenzeno²². Greighton, em 1945, identificou vanilina e siringaldeído nos produtos dessa oxidação de madeiras duras (*Angiospermae*)²³. Greighton e Hibbert ainda identificaram em gramíneas (*Graminae*) a presença de p-hidroxibenzaldeído, o qual também pode ser encontrado em madeiras moles ou duras, porém em proporções pequenas²⁴. A partir dos estudos desenvolvidos por seu grupo nas décadas de 1950 e 1960, Freudenberg propôs que a lignina se forma nas plantas a partir da coniferina, via álcool coniferílico, através de uma polimerização desidrogenativa⁷. Sendo assim, define-se a lignina como um polímero vegetal constituído de unidades de arilpropanóides, denominadas unidades C₆ C₃ ou, mais simplesmente, unidades C₉.

Baseando-se na quantidade relativa em fração molar de aldeídos produzidos pela reação de oxidação com nitrobenzeno tem-se a indicação da abundância relativa das unidades C₉: p-hidroxifenilpropano, guaiacilpropano e siringilpropano, nas ligninas² (Figura 2). Assim, numa classificação inicial de ligninas segundo a presença dessas unidades tem-se que: ligni-

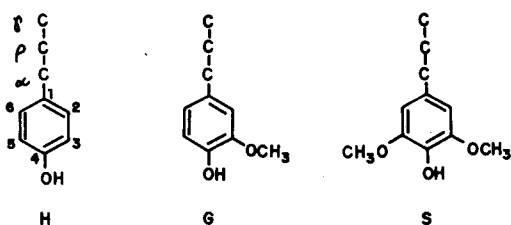


Figura 2. Unidades básicas C_6 em ligninas: H: *p*-hidroxifenilpropano, G: guaiacilpropano, S: siringilpropano.

nas de madeiras duras ou angiospermas são formadas principalmente de unidades guaiacil- e siringilpropanóides; ligninas de madeiras moles ou gimnospermas são formadas fundamentalmente de unidades guaiacilpropanóides; ligninas de gramíneas compreendem guaiacil-, siringil- e *p*-hidroxifenilpropanóides. Entretanto, nem sempre isso representa a realidade. Existem ligninas de certas espécies de gimnospermas e de gramíneas que apresentam abundância de unidades guaiacil- e siringilpropanóides, além de outras variações entre diferentes espécies¹². Portanto, numa conceituação mais precisa as ligninas são classificadas nos seguintes grupos: tipo G (ligninas guaiacilicas); tipo G-S (ligninas guaiacil-siringilicas); tipo H-G-S (ligninas 4-hidroxifenil-guaiacil-siringilicas) e tipo H-G (ligninas 4-hidroxifenil-guaiacilicas)^{12,25}.

ESTRUTURA DE LIGNINAS

O estudo químico de ligninas evoluiu a partir da análise dos produtos de suas reações de hidrólise¹⁷⁻²¹, oxidação com nitrobenzeno²² e etanolise²⁶, que permitiram identificar substâncias do tipo arilpropanóides como suas unidades estruturais básicas. A partir desta constatação, o grande desafio foi determinar como estas unidades encontram-se quimicamente ligadas na macromolécula das ligninas. Essa questão envolveu uma série de estudos de reações de degradação oxidativa e de diferentes tipos de hidrólise de ligninas, assim como de substâncias-modelo^{2,3,10,12,27,28}. A análise dos produtos dessas reações possibilitou elucidar os principais tipos de subestruturas das ligninas, os quais são apresentados na Figura 3^{6,12,28,29}. Para essa análise muito contribuiu o desenvolvimento da ressonância magnética nuclear (RMN) e sua aplicação ao estudo de ligninas, principalmente a RMN do carbono-13^{2,8,30-35}. Por outro lado, a proposta da biogênese de ligninas feita por Freudenberg permitiu uma racionalização do mecanismo de formação dessas subestruturas^{2,7}.

Alguns esquemas estruturais foram propostos para ligninas de diferentes tipos de madeira, gimnosperma e angiosperma^{1-3,6,8,10,12,28,36}. As Figuras 4 a 6 apresentam alguns exemplos desses esquemas^{1,8,36}. Verificou-se a partir desses estudos que, diferentemente da celulose e de outros polímeros naturais, as ligninas apresentam uma estrutura macromolecular cujas unidades monoméricas não se repetem de modo regular. Além do mais, estas últimas encontram-se entrelaçadas por diferentes tipos de ligações químicas, conforme ilustrado na Figura 3. Assim, tem-se a ocorrência de ligações carbono-carbono entre cadeias alifáticas C_3 de duas unidades (β - β' , α - α' , α - β'), entre estas e anéis aromáticos (β -5', β -1', α -1', β -6'), entre carbonos de núcleos aromáticos (5-5'), além de ligações etéricas, envolvendo cadeias alifáticas e anéis aromáticos (α -O-4', em estruturas fenilcumarânicas; β -O-4') ou, apenas, cadeias alifáticas (α - γ' , em estruturas pino- ou siringorresinolicas).

A Tabela 1 apresenta os principais tipos de ligações que são encontradas mais freqüentemente entre os monômeros das subestruturas de ligninas.

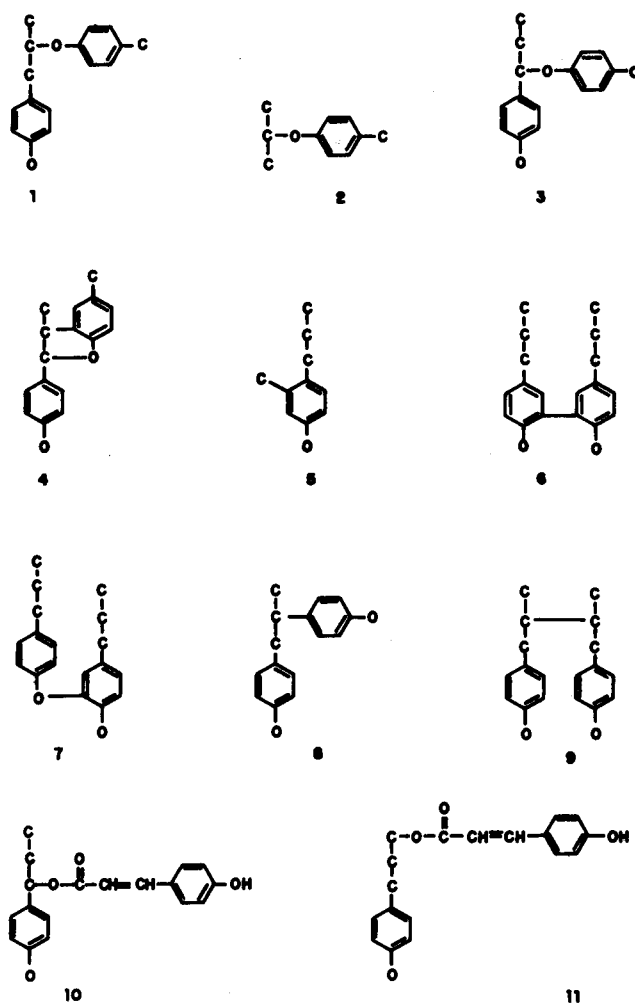


Figura 3. Principais subestruturas presentes em ligninas.

Tabela 1. Principais tipos de ligações encontradas na estrutura de ligninas^{1-3,8,10,12,28,36}.

Tipo de ligação entre monômeros	exemplo de subestruturas (Figura 3)
β -O-4'	1
β -O-4'	2
α -O-4'	3
β -5'	4
α -O-4'	4
α -6' β -6'	5
5-5'	6
4-O-5'	7
β -1'	8
β - β'	9
α - β	10
γ - γ'	11

Uma observação importante sobre a estrutura de ligninas é que ela pode ser diferente, dependendo de sua localização no vegetal, havendo a contribuição de fatores topoquímicos, que influenciam em sua formação^{2,11,12,37-42}. Esses fatores podem

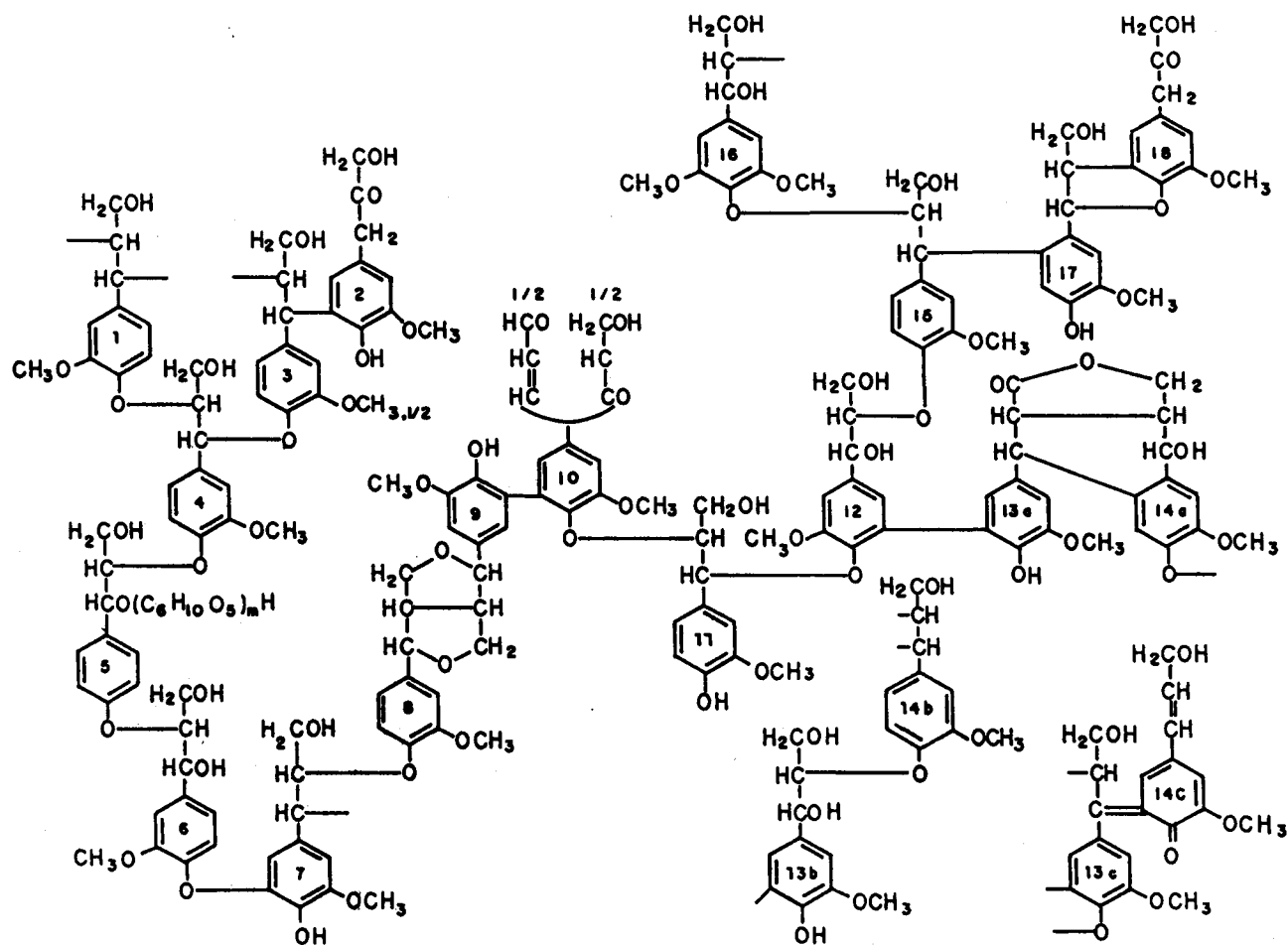


Figura 4. Esquema estrutural proposto para a lignina de *Picea abies* (madeira mole).

afetar a quantidade relativa da ocorrência e a estrutura das ligninas. Em madeiras moles, as ligninas situadas na madeira de compressão ocorrem em maiores proporções do que aquelas situada na madeira normal. Elas apresentam menor conteúdo de grupos metoxilicos e produzem quantidades diferentes de produtos oriundos de unidades arilpropanóides, ao reagirem com nitrobenzeno, quando comparadas com os produtos provenientes das ligninas de madeira normal^{2,12}. Em madeiras duras as ligninas são menos abundantes nos tecidos desenvolvidos na madeira de tensão e suas estruturas também apresentam diferenças em relação às das ligninas dos tecidos da madeira normal^{12,37,38}. Além do mais, observam-se variações na abundância relativa e nas características químicas de ligninas isoladas da lamela média ou das paredes secundárias das fibras de um mesmo vegetal^{2,6,42}.

ISOLAMENTO DE LIGNINAS

Existem diferentes tipos de preparação de ligninas. Nenhum deles permite obtê-las como se encontram no vegetal, pois há sempre uma interferência entre o procedimento de isolamento químico e a estrutura das ligninas *in situ* (protoligninas)^{2,3,12}. Um bom método de isolamento deve eliminar os extrativos presentes na madeira e ser o mais brando possível, para evitar alterações drásticas na natureza química da lignina. Essas são condições importantes quando se quer desenvolver seu estudo estrutural. Há três procedimentos básicos para preparação de ligninas: por extração, isolamento como resíduo e como derivados.

As ligninas são pouco solúveis em solventes orgânicos. Os

principais métodos para obtê-las por extração são: extração sucessiva da madeira com éter etílico e água e, então, com etanol, que as extraem com rendimentos da ordem de 2 a 4% (lignina de Brauns ou nativa)^{2,43,44}; extração com éter e água, seguida de digestão por cultura de fungos, que as liberam dos polissacarídeos e apresenta um rendimento da ordem de 10 a 20% do teor total de ligninas da madeira^{2,3,42}; moagem da madeira em moinho de bolas, sob atmosfera inerte, na presença ou ausência de solventes como tolueno, seguida de extração com mistura de dioxano ou acetona aquosos, que fornece a lignina de madeira moída (MWL- milled wood lignin) ou lignina de Björkman^{2,6,43-46}, cujo rendimento alcança até 50% do total das ligninas. Esta lignina é considerada a mais adequada para estudos estruturais, a mais próxima da protolignina.

As ligninas podem ser obtidas como resíduo a partir da madeira livre de extrativos, a qual, após hidrólise ácida para remoção dos polissacarídeos, fornece as ligninas de Klason (H₂SO₄)⁴⁷ ou de Willstätter (HCl)⁴⁸ em rendimentos quantitativos. Entretanto, o meio ácido catalisa condensações, introduzindo modificações químicas na macromolécula, o que não permite obter ligninas adequadas para estudos estruturais.

Os derivados de ligninas são obtidos por tratamento químico da madeira com certos reagentes, de modo que são liberados como produtos que podem ser isolados facilmente. Produzem-se assim, principalmente, ligninas por reação com ácido tioglicólico, por hidrogenação e por polpação organossolve (empregando solventes orgânicos e catalisadores) ou processos clássicos (lignossulfonatos, álcali-lignina ou soda-lignina, lignina kraft, tioligninas)^{2,3,6,43}.

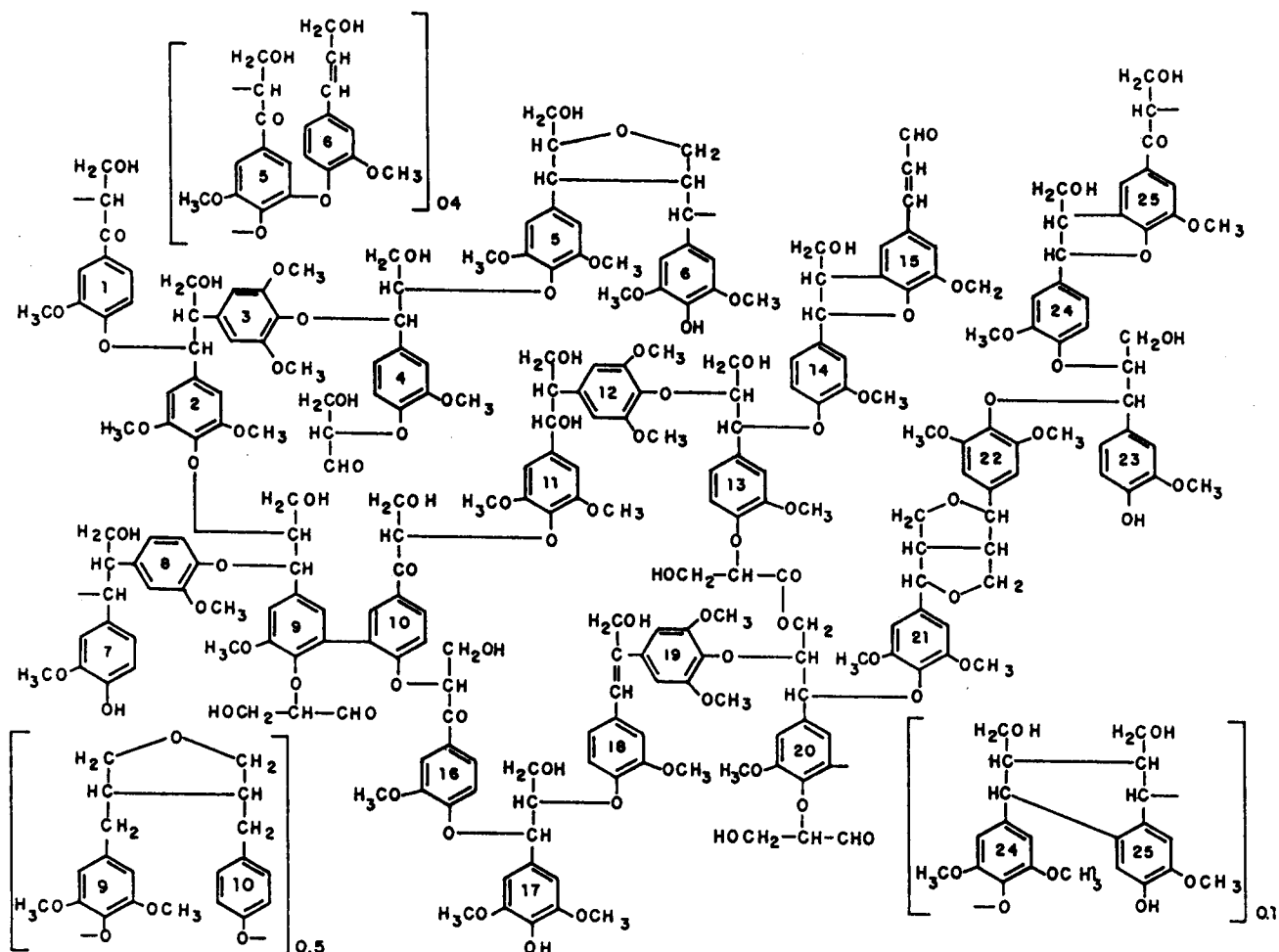


Figura 5. Esquema estrutural proposto para a lignina de *Fagus sylvatica* (madeira dura)^ª.

A Tabela 2 resume os principais tipos de preparação de ligninas descritos na literatura^{2,3,6,12,43-48}.

Conforme anteriormente comentado, para o estudo estrutural das ligninas deve-se utilizar a preparação que permita isolá-las sem transformações químicas drásticas, para que sejam as mais representativas possíveis das protoligninas. A lignina de madeira moída é considerada a mais adequada para esse fim.

Os parâmetros mais usuais empregados para verificar a representatividade de uma lignina são o teor de grupos metoxílicos e a percentagem de carbono, que devem se situar numa faixa normalmente encontrada para alguns dos tipos já conhecidos de ligninas^{3,12}. Em seguida, tem-se a determinação da fórmula elementar por unidade C_9 ^{2,6-12}. Devido à possibilidade de haver carboidratos como contaminantes ou ainda como constituintes do complexo lignina-carboidrato^{11,45}, devem-se corrigir os dados obtidos da análise elementar em relação ao teor de carboidratos analisados na amostra, caso este seja maior que 5%¹².

As razões molares entre os três constituintes básicos das ligninas (guaiacil-, siringil- e 4-hidroxifenilpropanóides) dependem da espécie vegetal que lhes deu origem^{2,7}. Por outro lado, como pode ser verificado na Figura 2, há uma variação no número de grupos metoxílicos presentes nesses constituintes. Sendo assim, desenvolveu-se a metodologia de tomar o conteúdo desses grupos como um parâmetro de referência na caracterização de uma lignina e de apresentá-lo explicitamen-

te na sua fórmula elementar por unidade C_9 ⁷. Isso torna a determinação do teor de metoxila uma etapa de primária importância na análise estrutural de ligninas, o que é feito quimicamente pelo método de Zeisel modificado⁴⁹⁻⁵¹. Métodos físicos de análise são também empregados para análise de metoxilas, utilizando-se rotineiramente a espectroscopia no infravermelho (IV)⁵²⁻⁵⁴.

Ligninas contendo menos que um mol de metoxilas por unidade C_9 são do tipo guaiacila; quando essa relação é maior que um, são do tipo guaiacila-siringila. Normalmente, a percentagem de metoxilas em madeiras moles varia de 12 a 16% e, em madeiras duras, de 18 a 22%^{2,3,7}. A Tabela 3 apresenta os conteúdos de metoxilas de lignina de madeira moída de diferentes espécies vegetais^{3,36,55,56}.

A madeira de *Eucalyptus* apresenta um conteúdo de polifenóis relativamente elevado⁵⁸⁻⁶⁰, os quais podem contaminar a lignina de madeira moída isolada pelo procedimento de Björkman. Bland e Menshum introduziram modificações nesse procedimento para adequá-lo ao estudo da lignina de *E. regnans* e outras espécies^{61,62}. Além do mais, verificaram que desse modo obtinham lignina de madeira moída menos contaminada por carboidratos. No isolamento da lignina de madeira moída de *Eucalyptus grandis*, entretanto, Morais^{36,57} e Nascimento^{57,63} demonstraram que essas modificações não são suficientes para obtê-la em relativo estado de pureza, pois verificou-se pelos espectros de RMN de ¹H e de ¹³C que ela apresenta um teor relativamente grande de um contaminante ali-

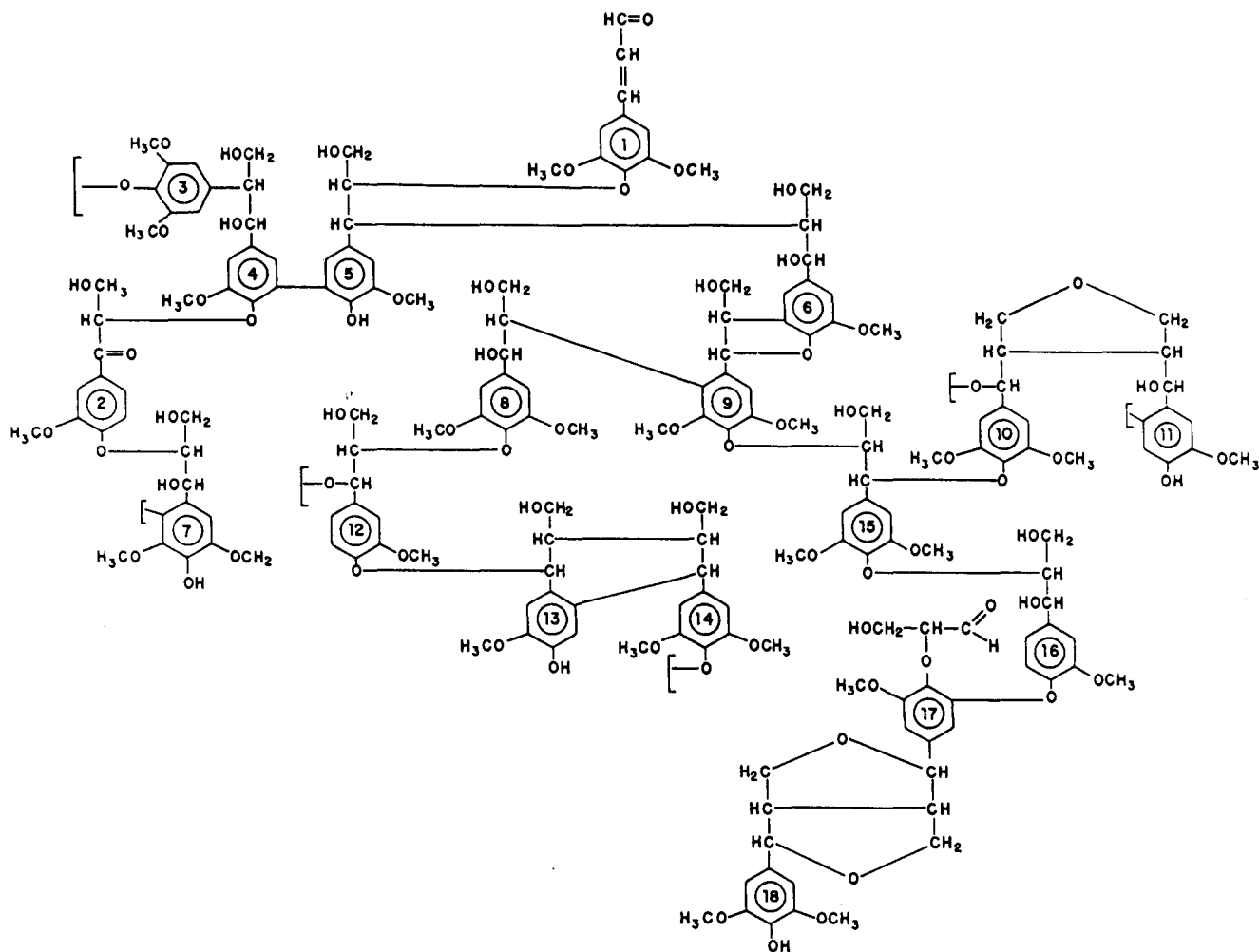


Figura 6. Esquema estrutural proposto para a lignina de *Eucalyptus grandis* (madeira dura)³⁶.

fático, em adição aos contaminantes polifenólicos⁶⁴. Assim, introduziram modificações no procedimento de Bland e Menshum (neutralização com ácido acético 0,1N, após dissolução com NaOH 0,1N e extração exaustiva com clorofórmio), de modo a reduzir ao máximo possível a presença do contaminante alifático, detectado através dos sinais observados entre 0,95 e 1,40 δ nos espectros de RMN de ^1H , conforme pode ser verificado nas Figuras 7a e 7b⁵⁷. Esse contaminante alifático aparece também nos respectivos espectros de RMN de ^1H da lignina de *E. grandis* obtida por hidrólise em ácido sulfúrico (LHA) (Figura 7c)⁶⁵. A análise desse contaminante mostrou que se trata de um éster de fórmula $\text{C}_{32}\text{H}_{64}\text{O}_2$ ^{36,66}.

A Tabela 4 apresenta os dados da análise elementar e as percentagens de metoxilas para a lignina de Brauns (LB)⁴⁴; para as ligninas de madeira moída do *E. grandis*, isoladas pelo procedimento de Bland e Menshum⁶¹ (MWLa), assim como por este procedimento modificado^{57,66} (MWL); e para a lignina obtida pela hidrólise ácida da madeira (LHA)⁶⁷. O teor de metoxilas em cada caso foi obtido por método químico⁵⁰⁻⁵² e pela análise do espectro no infravermelho^{53,54}, obtendo-se concordância entre os valores calculados^{36,57,63}.

Como citado anteriormente, no estudo de subestruturas da constituição química de ligninas o teor de grupos metoxílicos serve de sonda para a análise da presença relativa de unidades guaiacilas e siringilas⁷. Pelos dados da Tabela 4 verificam-se também as diferenças que podem ocorrer na fórmula elemen-

tar e no teor de metoxila de uma lignina, caso ela esteja contaminada por extrativos. A lignina de Brauns do *E. grandis* apresenta um teor de metoxila incompatível com as características do tipo guaiacila-siringila. Isso reflete a sua maior contaminação por extrativos, os quais não são suficientemente eliminados pela metodologia utilizada para obtê-la⁶⁷. As demais preparações, MWLa, MWL e LHA, pelo teor de metoxilas, representam ligninas do tipo guaiacila-siringila. As diferenças nas fórmulas elementares por unidade C_9 devem-se ao fato de MWLa e LHA conterem contaminante alifático (Figura 7)^{66,67}. Não é surpreendente que contaminantes polifenólicos e alifáticos contribuam diferentemente para as características de ligninas. Assim, MWL e LHA que são contaminadas apenas por substâncias alifáticas apresentam um teor de metoxilas maiores que LB, a qual contém polifenóis em adição aos extrativos alifáticos.

A Tabela 5 apresenta exemplos de dados analíticos obtidos para ligninas de madeira moída de diferentes espécies vegetais^{12,57}.

Verifica-se pelos dados dessa Tabela que a lignina de *P. glauca* (madeira mole), do tipo guaiacila, apresenta teor de metoxila menor que 1 mol/ C_9 , enquanto este teor para as ligninas das demais espécies, as quais são do tipo guaiacila-siringila, é maior que 1 mol/ C_9 .

Uma relação simples permite calcular a percentagem de unidades guaiacila, a partir do teor de metoxilas: $\%G=100.(2-n^\circ$

Tabela 2. Ligninas e principais métodos de preparação^{2,36,43-48}.

Tratamento da madeira	Tipo de lignina	Observações
Extração sem reação (por dissolução)	Lignina nativa (LN) ou de Brauns (LB)	EtOH
	Lignina de madeira moída (MWL)	Moagem e Dioxano: Água (9:1)
Digestão enzimática (dissolução)	Lignina obtida enzimaticamente	Fungos Glicosidase
Extração com reação (como derivado)	Lignina alcoólica	Álcool/catalisador
	Lignina acetossolúvel	AcOH/catalisador
	Lignina dioxano	Dioxano/HCl
	Lignina de ácido tioglicólico	HSCH ₂ CO ₂ H
	Lignina fenólica	Fenol/HCl
	Lignina por solventes supercríticos	Condições supercríticas
Hidrogenação (como derivado)	Lignina de Hidrogenólise	H ₂
Reação com reagentes inorgânicos (derivado)	Lignina Sulfítica	SO ₃ , HSO ₃
	Álcali-lignina	NaOH
	Tiolignina	Na ₂ S/NaHS
	Lignina Kraft	NaOH/Na ₂ S
Hidrólise de polissacarídeos (como resíduo)	Lignina Klason	H ₂ SO ₄
	Lignina Runkel	H ₂ SO ₄ /HBr
	Lignina Willstätter	HCl
	Lignina fluorídrica	HF
	Lignina trifluoroacética	CF ₃ CO ₂ H
	Lignina cuoxan	NaOH/H ₂ SO ₄ /Cu(NH ₃) ₄ (OH) ₂
Oxidação de polissacarídeos (como resíduo)	Lignina Purves	Na ₃ H ₂ IO ₆

Tabela 3. Percentagens de metoxilas para MWL de diferentes espécies vegetais^{3,36,55,56}.

Espécie MWL	Tipo	% OCH ₃
<i>P. abies</i>	madeira mole	15,8
<i>E. grandis</i>	madeira dura	22,0
<i>F. silvatica</i>	madeira dura	21,4
<i>E. tetradonta</i>	madeira dura	20,4
<i>E. diversicolor</i>	madeira dura	21,0
<i>E. regnans</i>	madeira dura	22,9

OCH₃/C₉)^{7,36}. Assim, a lignina de madeira moída do *E. grandis*, por exemplo, com 1,50 mol de OCH₃/C₉ apresenta um conteúdo de cerca de 50% de grupos guaiacilas, dentre as unidades fenilpropanóides que a constituem⁵⁷. Estudos por infravermelho indicam que, para essa lignina, as proporções relativas das unidades básicas monoméricas siringila, guaiacila

e 4-hidroxifenilpropano são respectivamente iguais a 49, 49 e 2%^{36,57}. Este resultado apresenta boa coerência com o cálculo feito a partir do número de moles de metoxila da fórmula elementar por unidade C₉, acima apresentado (Tabela 5).

QUANTIFICAÇÃO DE GRUPOS FUNCIONAIS EM LIGNINAS

As diferentes unidades monoméricas das ligninas encontram-se entrelaçadas por diversas ligações químicas carbono-carbono e etéreas, conforme indicado na Tabela 1 e Figura 3. É possível quantificar essas ligações por estudos químicos e físicos, os quais englobam diferentes métodos analíticos: reações de degradação oxidativa com nitrobenzeno ou com permanganato de potássio-periodato de sódio e estudo dos produtos por cromatografia gasosa, acoplada à espectrometria de massas^{2,22,23,68-70}; determinação de grupos funcionais: hidroxilas totais^{43,71-73}, hidroxilas alifáticas⁷¹, hidroxilas fenólicas^{71,74-76}; éteres α-O-4' e β-O-4'^{12,71,77}; carbonilas⁷⁸⁻⁷⁹; identificação de subestruturas por ressonância magnética nuclear do hidrogênio e do carbono-13^{1,12,30-35,80-89}.

A literatura apresenta estudos das proporções relativas dos diferentes grupos funcionais de ligninas de gimnosperma e

Tabela 4. Dados analíticos de ligninas de *E. grandis* e respectivas fórmulas elementares por unidade C₉⁶²⁻⁶⁷.

	%C	%H	%O	%OMe	Fórmula elementar/C ₉
LB	56,50	6,40	37,76	5,86	C ₉ H _{11,51} O _{4,23} (OMe) _{0,38}
MWLa	60,64	6,86	32,50	21,70	C ₉ H _{9,72} O _{2,75} (OMe) _{1,45}
MWL	60,60	6,00	32,00	22,00	C ₉ H _{7,90} O _{2,73} (OMe) _{1,50}
LHA	61,87	4,70	33,46	19,50	C ₉ H _{5,52} O _{2,90} (OMe) _{1,25}

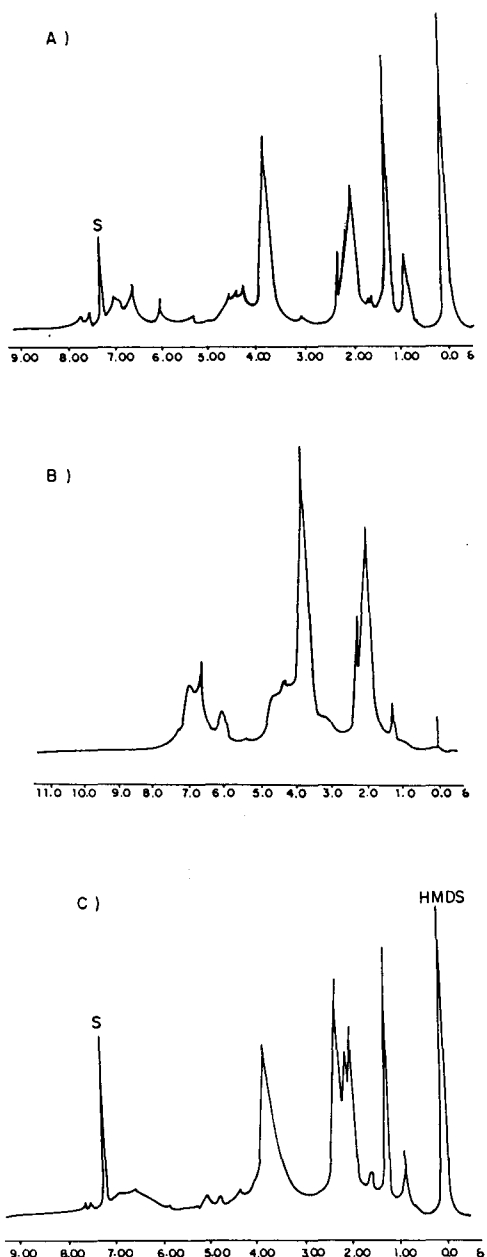


Figura 7. Espectros de RMN de ^1H de ligninas de *Eucalyptus grandis*: MWLa (A), MWL (B) e LHA (C).

angiosperma. As Tabelas 6 e 7 exemplificam alguns desses estudos^{2,3,6,9,10,12}.

A análise comparativa das Tabelas 6 e 7 mostra que a ligação etérea é mais abundante do que a carbono-carbono entre as unidades C_9 de ligninas, independentemente do tipo de madeira que lhes dá origem, havendo predominância da ligação $\beta\text{-O-4}'$ (subestrutura 1, Fig.3). As ligações tipo fenilcumarana (4, Fig.3) e bifênica (6, Fig.3) são mais abundantes nas ligninas de madeira mole, enquanto ligações diaril-éter (7, Fig.3) são relativamente mais freqüentes nas ligninas de madeira dura.

Se se considerarem os três álcoois precursores da macromolécula das ligninas (coniferílico, sinapílico e *p*-cumarfílico, Figura 1), verifica-se que cada qual apresenta uma hidroxila alifática ligada ao carbono γ e uma hidroxila fenólica. Entre-

tanto, os estudos dos grupos funcionais de ligninas indicam que se tem de 20 a 40%, no máximo, de hidroxilas fenólicas por 100 C_9 em ligninas de madeira moída^{2,6,90,91}. Isso indica que a maioria foi etericada durante a polimerização biossintética. Alguns autores afirmam que, na realidade, essa porcentagem não passaria de 10% na protolignina e que os valores maiores encontrados seriam devidos ao processo de moagem que romperia ligações etéreas^{90,91}. A Figura 8 ilustra o processo biossintético de formação de ligações etéreas na lignina¹³, justificando a predominância das ligações $\beta\text{-O-4}'$ e $\alpha\text{-O-4}'$.

A quantificação de grupos funcionais proporciona um conhecimento mais detalhado da macromolécula de uma lignina, fornecendo bases lógicas para a proposição de fragmentos de estrutura, como os apresentados nas figuras 4 a 6^{1,8,36}. A proposta tentativa apresentada para a lignina de *E. grandis* (Figura 6)³⁶ resultou de estudos desenvolvidos para aprofundar o conhecimento da madeira de *Eucalyptus* cultivados no Brasil^{36,57,63-67}. A quantificação de alguns grupos funcionais, base para a proposição desse esquema, será apresentada nos exemplos a seguir, servindo de modelo para mostrar como, de modo geral na literatura, diferentes tipos de estudos são combinados para permitir a proposição de esquemas de fragmentos estruturais de ligninas. Por outro lado, essa quantificação também constitui uma sonda que ilustra uma parte da metodologia geral, descrita na literatura, desenvolvida para interpretar os processos que intervêm na formação da lignina.

A determinação do teor de hidroxilas fenólicas da macromolécula de ligninas pode ser feita por titulação condutivimétrica^{36,71}, enquanto que as hidroxilas totais são calculadas por determinação indireta, através de reações de metilação ou acetilação, seguida de saponificação e titulação^{2,7,44,72}. Por diferença, calcula-se o teor de hidroxilas alifáticas totais. As hidroxilas alifáticas e fenólicas podem ainda ser quantificadas aplicando-se a espectroscopia de RMN ao estudo de ligninas acetiladas^{12,32,35}.

Ao contrário das hidroxilas fenólicas, apenas cerca de 20 a 25% de moles das hidroxilas alifáticas dos álcoois precursores de ligninas são envolvidos no processo de lignificação, segundo os resultados das análises de grupos funcionais e estudos da polimerização desidrogenativa^{1,2,9}. Isso significa que as ligninas contêm um mínimo de hidroxilas totais igual a 75 por 100 unidades C_9 ⁹², ou 0,75 moles por C_9 . Com exceção das ligninas técnicas, as ligninas que contêm mais de um mol de hidroxilas alifáticas por C_9 sofreram quebras homolíticas durante o processo de moagem ou a partir da hidrólise catalisada por ácido, originando novos grupos deste tipo. Portanto, estes se somaram aos previamente existentes, formados pela adição nucleofílica de água ao carbono α , a qual ocorre durante o processo natural de lignificação⁹⁰⁻⁹².

A Tabela 8 apresenta os resultados da análise de grupos hidroxilas da lignina de madeira moída do *E. grandis*³⁶.

Verifica-se pelos dados dessa Tabela que o teor de hidroxilas fenólicas está dentro dos limites característicos descritos para outras ligninas de madeira moída^{2,6}, enquanto o conteúdo total de hidroxilas alifáticas é ligeiramente superior ao limite máximo teórico. Isso sugere ter havido rompimento de ligações etéreas durante o processo de moagem. Tomando como base o teor de hidroxilas totais pode-se calcular a fórmula elementar por unidade C_9 dessa lignina acetilada: $\text{C}_9\text{H}_{6,55}\text{O}_{1,38}(\text{OCH}_3)_{1,5}(\text{OCOCH}_3)_{1,55}$ ³⁶.

Combinando o resultado do total de hidroxilas fenólicas com os obtidos pelas hidrólises alcalina e ácida⁷¹ da MWL do *E. grandis*³⁶, de um lado, foi calculado o teor de ligações $\alpha\text{-O-4}'$ com OH livre em C_4 (0,08 mol/ C_9) e de $\alpha\text{-O-4}'$ etericada em C_4 (0,10 mol/ C_9), somando 18 moles por 100 unidades C_9 ; de outro lado, foram quantificadas as ligações $\beta\text{-O-4}'$ totais, obtendo-se 47 moles por 100 unidades C_9 . O resultado das primeiras está dentro dos limites verificados para outras madeiras (Tabelas 6 e 7) e o resultado das últimas está

Tabela 5. Dados analíticos e fórmula elementar por unidade C₉ para ligninas de madeira moída (MWL) de diferentes espécies de vegetais^{12,57,62}

Tipo de Lignina (MWL)	C	Composição Elementar ^a		OCH ₃	/ Fórmula por unidade C ₉
		H	O		
<i>Picea glauca</i>	64,30	6,21	29,48	15,72	/ C ₉ H _{7,66} O ₂ (H ₂ O) _{0,48} (OCH ₃) _{0,94}
<i>Betula papurifera</i>	61,88	6,32	33,44	22,43	
<i>Liquidambar stryaciflua</i>	58,74	5,67	35,59	22,16	/ C ₉ H _{6,87} O ₂ (H ₂ O) _{0,86} (OCH ₃) _{1,52}
<i>Bischofia polycarpa</i>	61,66	5,53	32,81	19,42	/ C ₉ H _{5,00} O ₂ (H ₂ O) _{1,28} (OCH ₃) _{1,55}
<i>Eucalyptus grandis</i>	60,60	6,00	32,40	22,00	/ C ₉ H _{6,49} O ₂ (H ₂ O) _{0,92} (OCH ₃) _{1,25}
<i>Eucalyptus regnans</i>				22,90	/ C ₉ H _{6,44} O ₂ (H ₂ O) _{0,73} (OCH ₃) _{1,50}
					/ C ₉ H _{6,22} O ₂ (H ₂ O) _{0,75} (OCH ₃) _{1,54}

a- corrigido pelo conteúdo de carboidrato; média de duas análises elementares (% de O, por diferença).

Tabela 6. Percentagens dos diferentes tipos de ligações na MWL de *Picea abies* (madeira mole)^{6,12}.

Tipo de ligação /exemplo de subestrutura ^a	Percentagens /100 unidades C ₉
β-O-4'/1	48
β-O-4'/2	2
α-O-4' não cíclicas/3	6-8
β-5'/4	9-12
α-O-4' cíclicas/4	9-12
α-6' e β-6'/5	2,5-3
5-5'/6	9,5-11
4-O-5'/7	3,5-4
β-1'/8	7
β-β'/9	2

a-conforme apresentado na Figura 3.

bem abaixo dos 60% verificados para outras madeiras duras. O total de ligações etéreas aril-alkila é, portanto, 65%. Bland relata que para a MWL do *E. regnans* foi encontrado 63% de ligações etéreas, sem especificar a parcela devida a α-O-4' e a β-O-4'⁶². Estes dois valores sugerem uma especificidade de ligninas de *Eucalyptus*, em relação a outras madeiras duras.

A Tabela 9 apresenta os resultados da interpretação do espectro de RMN de ¹H para a lignina de madeira moída acetilada do *E. grandis* (Figura 7b)^{57,65}. Algumas observações importantes afloram desses dados. Verifica-se que os sinais de ressonância dos hidrogênios dos grupos acetatos alifáticos e aromáticos somam 30,65%. Esse número corresponde a 1,50 moles de acetilas derivadas das hidroxilas totais por unidade C₉, sendo cerca de 10% maior que os 1,35 apresentados na

Tabela 7. Percentagens dos diferentes tipos de ligações na MLW de *Betula verrucosa* (madeira dura)^{6,12}.

Tipo de ligação /exemplo de subestrutura	Percentagem/100 unidades C ₉		
	guaiacila	siringila	total
β-O-4'/1	22-28	34-39	58-65
β-O-4'/2			2
α-O-4' não cíclica/3			6-8
β-5'/4			
α-O-4' cíclica/4			6
α-6' e β-6'/5	1-1,5	0,5-1	1,5-2,5
5-5'/6	4,5		4,5
4-O-5'/7	1	5,5	6,5
β-1'/8			7
β-β'/9			3

a-conforme apresentado na Figura 3.

Tabela 8. Teor de grupos hidroxilas da MWL do *E. grandis*^{7,36}.

Tipo de grupo	%	mol/C ₉	mol/OCH ₃
OH alif. primária	5,94	0,72	0,49
OH alif. secundária	2,86	0,35	0,24
OH alif. total	8,80	1,07	0,73
OH fenol. conjugada	1,26	0,15	0,10
OH fenol. não conjugada	1,04	0,13	0,09
OH fenol. total	2,30	0,28	0,19
OH Total	11,10	1,35	0,92

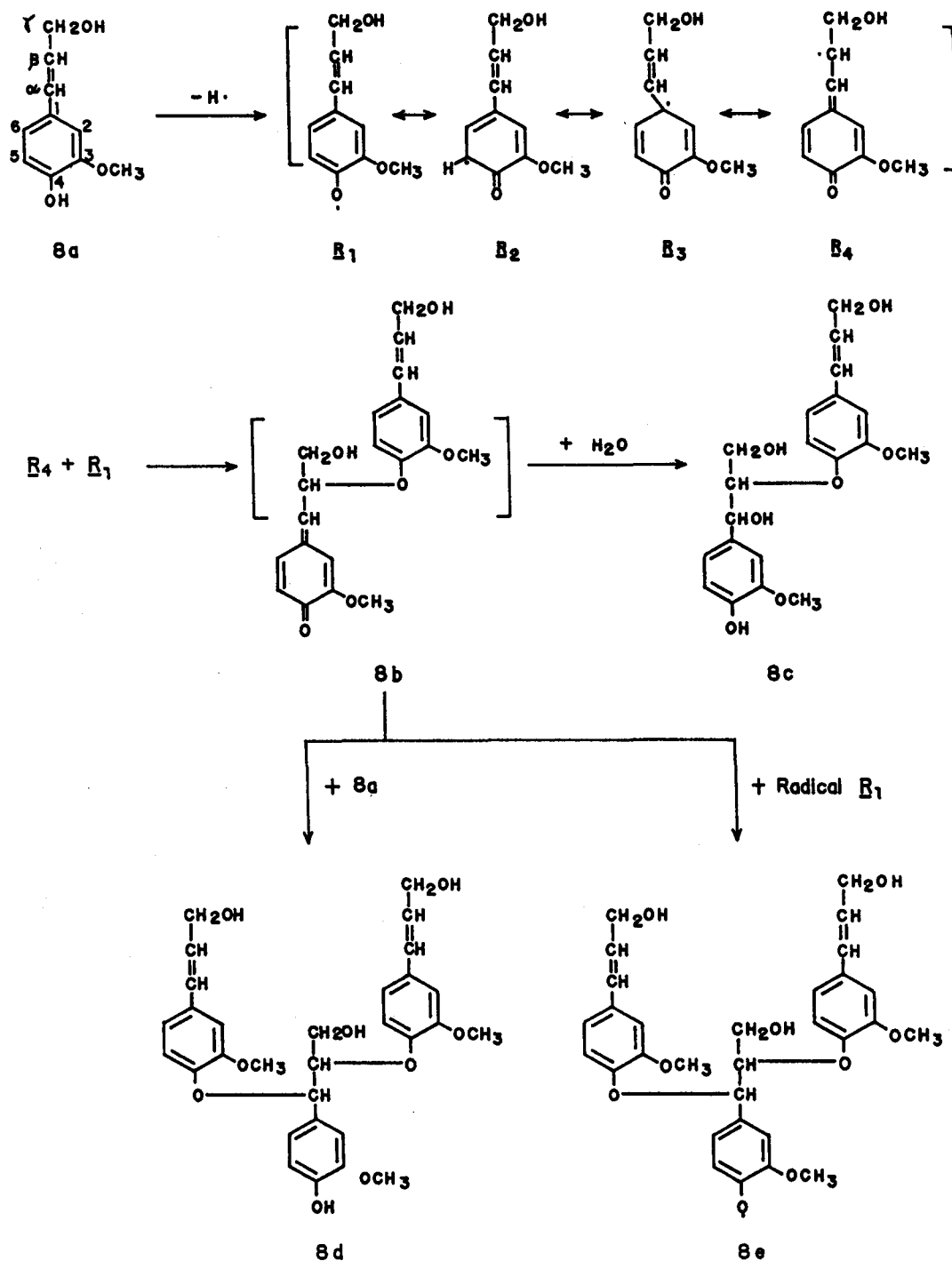


Figura 8. Reações de acoplamento levando à formação de ligações α -O-4' e β -O-4'.

Tabela 8 e que foram incorporados à fórmula elementar da lignina acetilada. Essa discrepância pode ser devida em parte à superposição de sinais de outros tipos de hidrogênios que poderiam ser observados no intervalo de 1,7 a 2,6 δ (Figura 7b) e, em parte, ao erro relativo do cálculo da integração dos sinais do espectro de RMN de 1H .

Os 28,7% de hidrogênios de metoxilas calculados pelos dados do espectro de RMN de 1H estão bem próximos dos 29,8% de hidrogênios calculados a partir dos 1,50 moles de metoxilas, que foram obtidos por métodos químicos ou por infravermelho⁵⁷.

Os sinais de ressonância devidos a hidrogênios aromáticos de unidades guaiacila e siringila apresentam-se nas mesmas intensidades relativas, correspondendo praticamente às mesmas percentagens de núcleos, respectivamente, 7,0 e 6,9%. Como essas unidades ocorrem em mesmas proporções nesta lignina, fica evidenciada a ocorrência de condensações das unidades guaiacilas. Considerando que a percentagem teórica de hidrogênios, calculada a partir do número de moles de metoxilas da fórmula elementar C₉ (Tabela 5), é 2,50 moles/C₉⁵⁷ e que, pela análise do espectro de RMN de 1H , o conteúdo de hidrogênios aromáticos é igual a dois moles por unida-

Tabela 9. Atribuições e percentagens de diferentes tipos de prótons da MWL acetilada do *E. grandis* (Figura 7b).

δ	Atribuição	%
10,0-9,6	Prótons formílicos em unidades cinamaldeídicas e benzaldeídicas	0,61
7,70-7,53	Prótons aromáticos localizados <i>orto</i> a um grupo carbonílico em unidades benzaldeídicas	0,97
7,20-6,75	Prótons aromáticos em unidades guaiacíflicas	7,00
6,75-6,40	Prótons aromáticos em unidades siringíflicas	6,90
6,20-5,90	H α em unidades β -O-4 certos prótons viníflicos	3,35
5,90-5,30	H α em estruturas β -5 de fenilcumaranas; H α de subestruturas α -O-4	1,85
5,25-4,43	H β em β -O-4 (forma eritro); H α em pino- e siringorresinol; xilanas; H β em β -O-4 (forma tréo); prótons metilénicos em álcoois cinamíflicos	7,66
4,43-4,15	H γ em várias estruturas	6,70
3,77	Prótons metoxíflicos	28,69
3,09	H β em estruturas pino- e siringorresinóllica	1,02
2,60-2,28	Acetatos aromáticos	7,53
2,28-1,70	Acetatos alifáticos	23,12
1,70-0,80	Contaminantes alifáticos	3,47

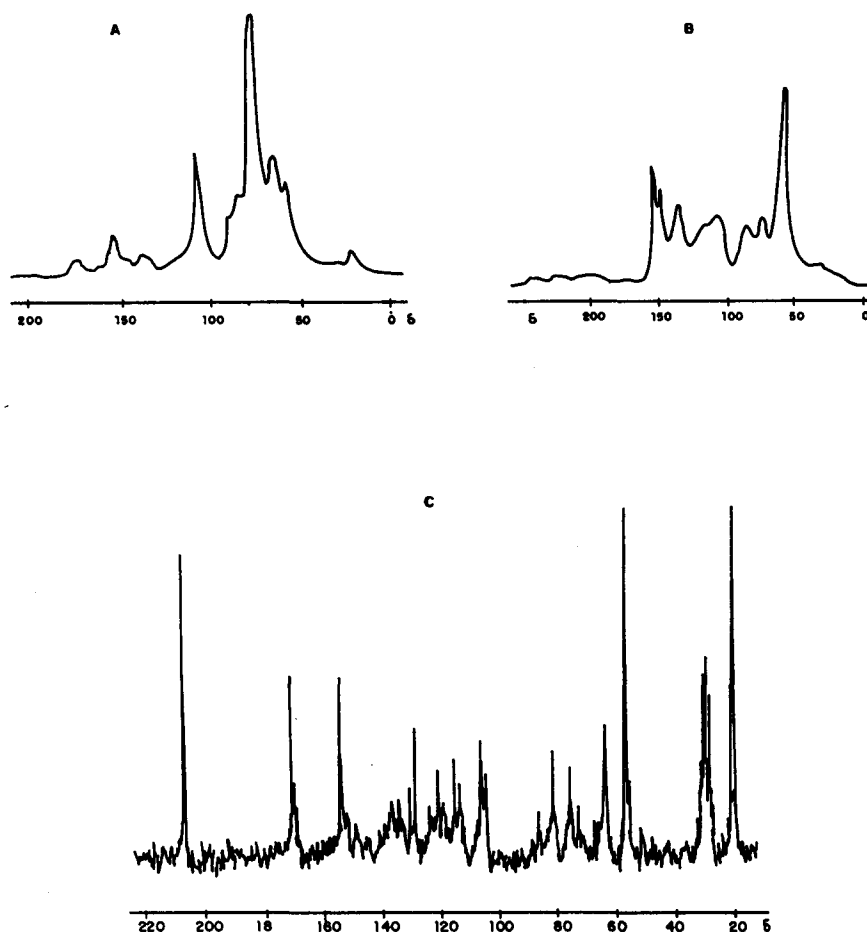


Figura 9. Espectros de RMN de ^{13}C no estado sólido (CP/MAS) da madeira (A), da MWL (B) e da MWL do *E. grandis*, em solução no $\text{DMSO}-d_6$ (C).

Tabela 10. Atribuições dos sinais de RMN de ^{13}C de *MWL* de madeiras duras em geral e da *MWL* do *E. grandis* em DMSO - d_6 ^{35,36,91}(Figura 9C).

Madeiras duras em geral, δ ^{13}C	<i>E. grandis</i> , δ ^{13}C	Atribuições ^a
193,6		α -CO e γ -CHO
191,0		α -CHO
172,0		-C=O de ácidos carboxílicos alifáticos
169,6		-C=O de grupos acetílicos de xilanas
152,9		C- α de Ar-CH=CH-CHO
152,9-152,2	152,1	C-3/C-5 de Se, C-3/C-5' de 5-5' e
149,5-149,2	149,5	C-3 de Ge
147,7-146,5	147,7-146,5	C-4 de Ge, C-3/C-5 de Sne, C-3 de Gne
145,5	145,5	C-4 de Gne
143,2		C-4' de subestr. fenilcumarânicas (β -5), C-4/C-4' de 5-5' e
138,0	138,0	C-1 de Se
136,1		C-4 de Se
135,6-135,0	134,4	C-1 de Ge, C-4 de Sne
132,2	132,5	C-1 de Gne, C-1 de Sne
130,0-128,0		C- α /C- β em Ar-CH=CHCH ₂ OH, C- β em Ar-CH=CH-CHO, C-2/C-6 de Hne, -CH=CH de olefinas
119,3-119,0	119,3	C-6 de Ge e Gne
115,8-114,6	115,0-114,7	C-5 de Ge e Gne
112,2	113,3	C-2 de Ge e Gne
106,8-103,5	104,5-103,5	C-2/C-6 de Se e Sne com ou sem α -C=O
101,9-101,6		C-1 de xilanas
87,0-86,2	86,0	C- β de β -O-4 de S (forma eritro)
84,6-84,0	85,0	C- β de β -O-4 de G (forma eritro)
76,0-73,0		C-2/C-3/C-4 de xilanas
73,3-72,4	72,2	C- α de β -O-4 de S (forma eritro), C- α de β -O-4 de G (forma eritro)
71,6	71,6	C- α de β -O-4 de S ou G (forma tréo)
62,9-62,6	62,8	C- γ de β - β de G e S
60,3	60,1	C- γ de β -O-4 de G com α -C=O, C- γ de β -5 e β -1 de G e S
56,0	55,9	C- γ de β -O-4 de G ou S (formas tréo e eritro)
54,2-53,8	53,7	-OCH ₃ de G e S
53,5	53,7	C- β de β - β de G e S
20,9		C- β de β -5 de G e S
		-CH ₃ de grupos acetílicos de xilanas

a- Se, Ge: unidades siringílicas e guaiacílicas eterificadas; Sne, Gne: unidades siringílicas e guaiacílicas não eterificadas; S, G: unidades siringílicas e guaiacílicas eterificadas ou não eterificadas; Hne: unidades *p*-hidroxifenilpropílicas não eterificadas; 5-5' e: unidades bifenílicas eterificadas.

de C₉, a combinação desses dados permite calcular que o grau de condensação dessa lignina é 0,50 /C₉^{35,57,62}.

A Tabela 10 apresenta atribuições dos sinais de RMN de ^{13}C para *MWL* de madeiras duras em geral e para o *E. grandis*^{11,13,32-36,65}. Esses dados complementam os obtidos por RMN de ^1H e, conjugados com as informações provenientes de análises químicas, permitem um conhecimento mais preciso das ligações existentes entre as unidades básicas da macromolécula de ligninas.

É possível, por técnicas especiais, obter espectros de RMN de ^{13}C mais detalhados e também espectros quantitativos de ligninas^{35,80-83,93-96}. Esses recursos vem contribuindo para que esta metodologia esteja adquirindo uma importância cada vez maior no estudo estrutural das ligninas.

A utilização da RMN de ^{13}C em estado sólido, envolvendo técnicas de polarização cruzada e rotação no ângulo mágico (*CP/MAS*, cross-polarization/magic angle spinning), tem também propiciado estudos importantes sobre a estrutura de ligninas⁹⁷⁻¹⁰⁴. Apresenta a grande vantagem de não modificar a composição da lignina quanto a fragmentos macromoleculares, mas não possibilita resolução espectral comparável àquela obtida na RMN em fase líquida. Aplica-se principalmente ao estudo dos produtos da pirólise de ligninas^{102,103}, à análise de protoligninas¹⁰⁴ e de ligninas insolúveis, estas últimas de particular interesse para o conhecimento aprofundado do processo de deslignificação.

A Figura 9 apresenta os espectros em fase sólida (*CP/MAS*) da madeira moída (A) e da *MWL* (B) do *Eucalyptus grandis*,

assim como o espectro desta MWL em solução no dimetilssulfóxido deuterado (C)³⁶. A Figura 9-A mostra a maior intensidade relativa dos sinais de carbonos alifáticos, entre 50 e 90 δ , por causa da maior abundância da celulose na madeira. Nesse espectro os sinais característicos da lignina são relativamente mais fracos, podendo ser observados entre 110 e 160 δ , região da ressonância dos carbonos aromáticos e em 55,3 δ , devido aos carbonos de metoxilas (Tabela 10).

Há uma correspondência geral entre os espectros de RMN do ¹³C da amostra no estado sólido (9B) e em solução (9C). Entretanto, verificam-se diferenças na feição dos sinais em cada intervalo de δ que engloba determinados sinais. O espectro 9-B da MWL apresenta sinais mais largos e mal resolvidos, se comparados aos sinais mais distintos e numerosos do respectivo intervalo do espectro 9-C dessa mesma lignina, porém obtido em solução. Além do efeito residual da interação dipolar magnética entre os núcleos de carbono e hidrogênio, a largura dos sinais de ressonância de ligninas registrados no estado sólido reflete a dispersão dos deslocamentos químicos muito próximos, causada pela variação de arranjos espaciais diferentes das unidades básicas arilpropanóides, que estão "congeladas". Essa imobilização relativa das diferentes confi-

gurações faz com que haja ambientes químicos e magnéticos ligeiramente diferentes para um mesmo tipo de carbono^{97,100}, o qual ocorre repetidas vezes na macromolécula, porém sem uma regularidade estrutural. No líquido, o movimento das moléculas faz os sinais serem relativamente mais estreitos, representando a média desses arranjos espaciais e refletindo, portanto, uma configuração média da macromolécula.

A Figura 10 apresenta o Diagrama de Rydholm^{2,36} para a lignina do *E. grandis*, o qual resume os dados obtidos para os diferentes grupos funcionais e ligações que a constituem, ilustrando a distribuição dos mesmos, em relação às unidades C₉. Esses dados são resultantes da combinação dos diferentes métodos químicos e espectroscópicos de análise orgânica empregados e propiciaram a proposição do modelo estrutural apresentado na Figura 6. A composição global desse modelo estrutural é equivalente à fórmula molecular C₁₆₂H₁₃₁O₄₅(OCH₃)₂₇. Esta, ao ser dividida pelo número de unidades que constituem o modelo apresentado na Figura 6, resulta na fórmula elemental C₉H_{7,3}O_{2,5}(OCH₃)_{1,5}^{57,63-67} a qual está em concordância com aquela calculada a partir dos dados experimentais e mostrada na Tabela 4, para a lignina de madeira moída do *E. grandis*.

A ênfase particular no detalhamento desses estudos sobre a constituição química da lignina do *E. grandis*^{36,57,63-67,103} objetivou, particularmente, ilustrar em detalhe o conjunto da metodologia geral desenvolvida por diferentes pesquisadores^{1,6-12,27,35-38,58-62,85} para o estudo da constituição íntima das ligninas.

Essa metodologia esta bem consolidada e, juntamente com as propriedades de não-cristalinidade²; insolubilidade das ligninas virtualmente em todos os solventes comuns²⁷; variedade de conformações de suas macromoléculas e análise do peso molecular das frações de ligninas solubilizadas^{11,105-107}, propiciou a formulação do paradigma clássico, segundo o qual ligninas são polímeros de estrutura tridimensional aleatória, constituídas de unidades de arilpropanóides interligadas de modos diferentes⁴¹. Entretanto, a verificação de que há um fator topoquímico influenciando na estrutura de ligninas^{2,37-42}; o fato de vários autores postularem que algumas ligninas em solução não são polímeros covalentes, mas associação de moléculas menores¹⁰⁸⁻¹¹¹; resultados verificados de distribuição binodal de pesos moleculares de ligninas solúveis, assim como considerações sobre a ultraestrutura dos polissacarídeos nas paredes celulares⁴¹, colocam em questão o paradigma acima citado, sendo proposto um paradigma modificado para ligninas:

-Lignina das lamelas médias da madeira é um polímero de estrutura tridimensional aleatória, composto de monômeros de arilpropanóides, interligados de modos diferentes. Lignina da parede secundária é um polímero de estrutura bidimensional "não aleatória". A constituição química dos monômeros e as ligações que constituem estas estruturas espaciais variam em regiões morfológicas diferentes (lamela média versus parede secundária), em diferentes tipos de células (vasos versus fibras) e em diferentes tipos de madeiras (madeiras moles versus madeiras duras). Quando a madeira é deslignificada as propriedades das macromoléculas que são solubilizadas refletem as propriedades da estrutura das quais elas são derivadas⁴¹.

A partir dessas ambiguidades ressaltadas do estudo das propriedades das ligninas, pode-se verificar que, apesar do grande desenvolvimento científico e tecnológico dos nossos tempos, o qual vem propiciando metodologias cada vez mais aperfeiçoadas para o isolamento e análise estrutural das mesmas (cromatografias de permeação em gel; técnicas modernas de espectroscopias no infravermelho e de ressonância magnética nuclear), este assunto continua sendo um campo aberto para o avanço do conhecimento da área, constituindo-se em um desafio para os pesquisadores.

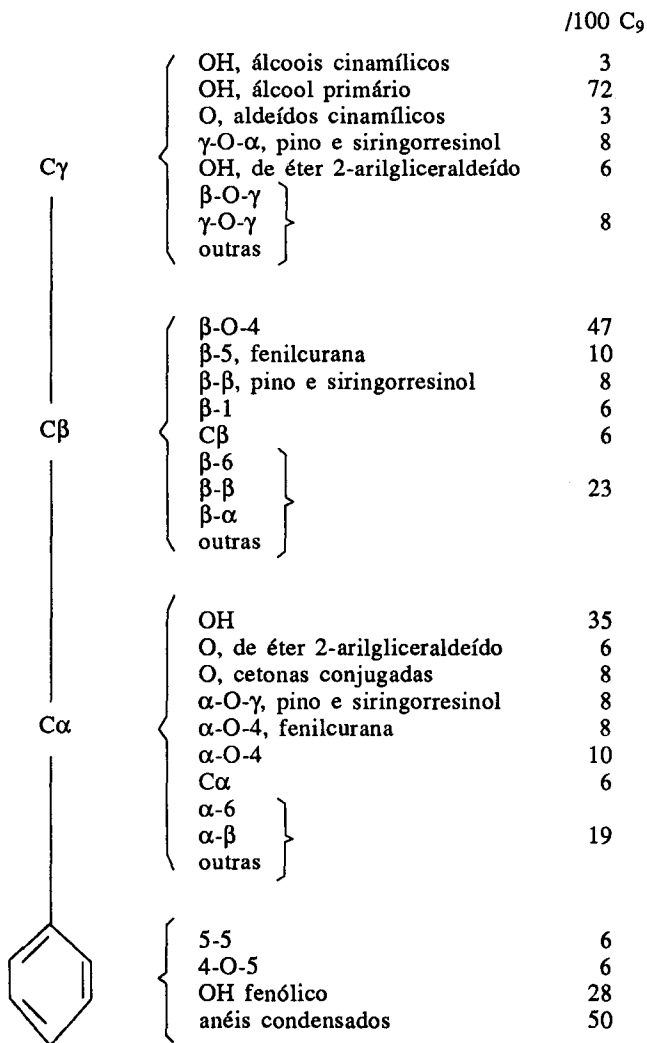


Figura 10. Diagrama de Rydholm ilustrando a distribuição dos principais grupos funcionais e as ligações em relação às unidades C₉ da MWL do *E. grandis*.

REFERÊNCIAS

- Freudenberg, K.; *Sci.*, (1965), **148**, 595.
- Sarkanen, K. V.; Ludwig, C. H.; ed., *Lignins - Occurrence, Formation, Structure, and Reactions*, Wiley-Interscience, New York, 1971.
- Fengel, D.; Wegener, G.; *Wood: Chemistry, Ultrastructure, Reactions*, Walter de Gruyter & Co., Berlin, 1984.
- Payen, A.; *Compt. Rend. Acad. Sci. Paris*, (1838), **7**, 1052.
- Tilghman, B.; *British Patent* 2924, 1866.
- Sjöström, E.; *Wood Chemistry - Fundamentals and Applications*, Academic Press, New York, 1981.
- Freudenberg, K.; Neish, A. C.; *The Constitution and Biosynthesis of Lignin*, Springer-Verlag, Berlin, 1968.
- Nimz, H.; *Angew. Chem. Int. Ed. Eng.*, (1974), **13**, 313.
- Adler, E.; *Wood Sci. Technol.*, (1977), **11**, 169.
- Sakakibara, A.; in: *The Structure, Biosynthesis and Degradation of Wood*, Loewus, F. A.; Runeckles V. C.; ed.; Plenum Press, New York, (1977); *Wood Sci. Technol.*, (1980), **14**, 89.
- Glasser, G. W.; Sarkanen, S.; ed.; *Lignin - Properties and Materials*, ACS Symposium Series 397, Washington, 1989.
- Chen, C. -L.; *Lignins: Occurrence in Wood Tissues, Isolation, Reactions, and Structure*, in: *Wood Structure and Composition*, Lewis, M. e Goldstein, I. S., ed.; Marcel Dekker Inc., New York, 1991.
- Stonis, A.; *O Papel*, (1976), **39**, 55.; *Associação Nacional dos Fabricantes de Papel e Celulose, Relatório Estatístico*. (1992), **6**, 19.
- Erdman, E.; *Ann. Chem. Pharm.*, (1868), Suppl. V, 223.
- Tiemann, F.; *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, (1874), **7**, 608.
- Klason, P.; *Svensk. Kem. Tidskr.*, (1897), 135.
- Klason, P.; *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, (1920), **53**, 706.
- Klason, P.; *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, (1920), **53**, 1864.
- Klason, P.; *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, (1923), **56**, 300.
- Klason, P.; *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, (1929), **62**, 635.
- Klason, P.; *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, (1929), **62**, 2523.
- Freudenberg, K.; Lautsch, W.; *Naturwiss.*, (1939), **27**, 227.
- Creighton, H. J.; Gibbs, R. D.; Hibbert, H.; *J. Am. Chem. Soc.*, (1944), **66**, 32.
- Creighton, H. J.; Hibbert, H.; *J. Am. Chem. Soc.*, (1944), **66**, 37.
- Gibbs, R. D.; in: *The Physiology of Forest Trees*, Thimann, K. V., ed.; Ronald Press, New York, 1958.
- Cramer, A. B.; Hunter, M. J.; Hibbert, H.; *J. Am. Chem. Soc.*, (1939), **61**, 509.
- Brauns, F. E.; *The Chemistry of Lignin*, Academic Press, New York, 1952.
- Adler, E.; *Wood Sci. Technol.*, (1973), **11**, 169.
- Larsson, S.; Miksche, G. E.; *Acta Chem. Scand.*, (1971), **25**, 647.
- Bland, D. E.; Sternhell, S.; *Austr. J. Chem.*, (1965), **18**, 401.
- Ludwig, C. H.; Nist, B. J.; McCarth, J. C.; *J. Am. Chem. Soc.*, (1964), **86**, 1186.
- Ltdemann, H. D.; Nimz, H.; *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, (1973), **52**, 1162; *Makromol. Chem.*, (1974), **175**, 2393, *Holzforchung*, (1976), **30**, 33.
- Obst, J. R.; Landucci, L. L.; *Holzforchung*, (1976), Suppl. **40**, 87; *J. Wood Chem. Technol.*, (1986), **6**, 311.
- Kringstad, P.; Morck, R.; *Holzforchung*, (1983), **37**, 237 e (1985), **39**, 109.
- Chen, C. -L.; Robert, D.; *Characterization of Lignin by ¹H and ¹³C NMR Spectroscopy*, in: *Methods in Enzymology 161B*, Wood, W. A. e Kellog, S., ed.; Academic Press, Orlando, 1988.
- Morais, S. A. L.; *Contribuição ao Estudo Químico e Espectroscópico da Lignina de Madeira Moida do Eucalyptus grandis: Isolamento, Quantificação e Análise Estrutural*, Tese de Doutorado, Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1992.
- Wardrop, A. B.; Dadwell, H. E.; *Austr. J. Sci. Res.*, (1948), **B.1**, 3.
- Bland, D. E.; *Holzforchung*, (1958), **12**, 36; (1961), **15**, 102; (1966), **20**, 12.
- Fergus, B. J.; Goring, D. A. I.; *Holzforchung*, (1970), **24**, 113.
- Hardell, H. L.; Learu, G. J.; Stoll, M.; Westermark, U.; *Svensk Papperstidn.*, (1980), **83**, 44.
- Goring, D. A. I.; *The Lignin Paradigm*, in: *Lignin-Properties and Materials*, Glasser, W. G.; Sarkanen, S.; ed.; ACS Symposium Series 397, Washington, 1989.
- Fergus, B. J.; Procter, A. R.; Scott, J. A. N.; Goring, D. A. I.; *Wood Sci. Technol.*, (1969), **3**, 117.
- Browning, b. l.; *Methods of Wood Chemistry*, Interscience Pub., New York, 1967.
- Brauns, F. E.; *J. Am. Chem. Soc.*, (1939), **61**, 2120.
- Pew, J. C.; *Tappi*, (1957), **40**, 553.
- Bjorkman, A.; *Svensk Papperstidn.*, (1956), **59**, 477.
- Klason, P.; *Cellulosechemie*, (1923), **4**, 81.
- Willstatter, R.; Kreicberga, Z.; *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, (1913), **46**, 2401.
- Li, L.; Kiran, E.; *Supercritical Fluid Extraction of Lignin from Wood*, in: *Lignin - Properties and Materials*, Glasser, W. G.; Sarkanen, S.; ed.; ACS Symposium Series 397, Washington, 1989.
- Zeisel, S.; *Monatsh. Chem.*, (1885), **6**, 989.
- Viebock, F.; Brecher, C.; *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, (1930), **63**, 3207.
- Klimova, V. A.; *Basic Methods of Organic Microanalysis*, Mir Publishers, Moscou, 1977.
- Sarkanen, K. V.; Chang, H. M.; Allan, G. G.; *Tappi*, (1967), **50**, 572.
- Faix, O.; Schwes, W.; *Holzforchung*, (1974), **28**, 50.
- Schultz P.; Glasser, W. G.; *Holzforchung*, (1986), **40**, 37.
- Garland, C. P.; James, F. C.; Nelson, P. J.; Wallis, A. F. A.; *Appita*, (1986), **39**, 361.
- Veloso, D. P.; Nascimento, E. A.; Morais, S. A. L.; *Proceedings of the Second Brazilian Symposium on the Chemistry of Lignin and Other Wood Components*, Campinas, 1991, Ed. UNICAMP, Duran, N. e Esposito, E., ed.; Campinas, (1992), **Vol. 3**, 12.
- Cohen, W. E.; Dadswell, H. E.; *Council for Scientific and Industrial Research Pamphlet*, (1931), 22.
- Bland, D. E.; Og, H.; Cohen, W. E.; *Austr. J. Sci. Res.*, (1950), **3**, 642.
- Bland, D. E.; Billek, G.; Gruber, K.; Kratzl, K.; *Holzforchung*, (1954), **8**, 68.
- Bland, D. E.; Menschun, M.; *Appita*, (1967), **20**, 17; (1970), **23**, 427.
- Bland, D. E.; *Appita*, (1985), **38**, 53.
- Nascimento, E. A.; *Obtenção e Caracterização de Coque da Lignina Hidrolítica do Eucalyptus grandis*, Tese de Doutorado, Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1989.
- Veloso, D. P.; Morais, S. A. L.; *Ciência e Cultura*, (1988), supl. **40**, 603.
- Veloso, D. P.; *Proceedings of the First Brazilian Symposium on the Chemistry of Lignin and Other Wood Components*, De Groote, R. A. M. G.; Curvelo, A. A. S.; ed.; São Carlos, (1989), **Vol. 1**, 95.
- Veloso, D. P.; Morais, S. A. L.; Nascimento, E. A.; *Proceedings of First European Workshop on Lignocellulosics*

- and Pulp (EWLP), Faix, O.; Meier, D., ed.; Hamburg, (1991), 363.
67. Morais, S. A. L.; *Contribuição ao Estudo Químico de Ligninas de Eucalyptus grandis*, Tese de Mestrado, Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1987.
 68. Miksche, G. E.; Larsson, S.; *Acta Chem. Scand.*, (1967), **21**, 1970; (1969), **23**, 917; (1972), **26**, 2031; (1973), **27**, 127.
 69. Glasser, W. G.; Morohashi, N.; *Tappi*, (1979), **62**, 101.
 70. Chen, C. -L.; *Characterization of Lignin by Oxidative Degradation: Use of Gas Chromatography - Mass Spectrometry Technique*, in: *Methods in Enzymology* 161B, Wood, W. A. e Kellog, S., ed.; Academic Press, Orlando, 1988.
 71. Sarkanen, K. W.; Schuerch, C.; *Anal. Chem.*, (1955), **27**, 1245.
 72. Freudenberg, F.; Schultze, H.; *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, (1955), **88**, 617.
 73. Brauns, F. E.; *J. Am. Chem. Soc.*, (1939), **61**, 2120.
 74. Goldschmid, O.; *Anal. Chem.*, (1954), **26**, 1421.
 75. Adler, E.; Lündquist, K.; *Acta Chem. Scand.*, (1961), **18**, 223.
 76. Yang, J. M.; Goring, D. A. I.; *Can. J. Chem.*, (1980), **58**, 2411.
 77. Miksche, G. E.; *Acta Chem. Scand.*, (1972), **26**, 4137.
 78. Marton, J.; Adler, E.; *Acta Chem. Scand.*, (1959), **13**, 75 e (1961), **15**, 357.
 79. Krager, K.; Darson, G.; Fuhr, K.; *Erdol und Kohle - Erdgas - Petrochimie*, (1965), **18**, 701.
 80. Obst, J. R.; Ralph, J.; *Holzforchung*, (1983), **37**, 297.
 81. Hemmingson, J. A.; *J. Wood Chem. Technol.*, (1985), **5**, 513.
 82. Robert, D.; Chen, C. -L.; *Holzforchung*, (1989), **43**, 323.
 83. Edw, R. M.; Brunow, G.; *J. Org. Chem.*, (1992), **57**, 1477.
 84. Drumond, M. G.; Veloso, D. P.; Cota, S. D. S.; Morais, S. A. L.; Nascimento, E. A.; Chen, C. -L.; *Holzforchung*, (1992), **46**, 127.
 85. Ltndquist, K.; *Acta Chem. Scand.*, (1979), **33**, 27; (1980), **34**, 21 e (1981), **35**, 3.
 86. Ltndquist, K.; Olsson, T.; *Acta Chem. Scand.*, (1977), **31**, 788.
 87. Ltndquist, K.; Paterson, A.; Ransey, L.; *Acta Chem. Scand.*, (1983), **37**, 734.
 88. Ltndquist, K.; Unge, S. V.; *Acta Chem. Scand.*, (1986), **40**, 791.
 89. Hauteville, M.; Ltndquist, K.; Unge, S. V.; *Acta Chem. Scand.*, (1986), **40**, 31.
 90. Winston, M. H.; Chen, C. -L.; Gratzl, J. S.; Goldstein, J. S.; *Holzforchung*, (1986), **40**, suppl., 45.
 91. Tai, D. S.; Chen, C. -L.; Gratzl, J. S.; *J. Wood Chem. Technol.*, (1990); **10**, 111.
 92. Chen, C. -L.; *Determination of Total and Aliphatic Hydroxyl Groups*, in: *Methods in Enzymology* 161B, Wood, W. A.; Kellog, S.; ed.; Academic Press, Orlando, 1988.
 93. Robert, D.; Gagnaire, D.; *Proceedings of International Symposium on Wood and Pulping Chemistry*, Stockholm, (1981), 86.
 94. Bardet, M.; Foray, M. -F.; Robert, D.; *Makromol. Chem.*, (1985), **186**, 1495.
 95. Landucci, L. L.; *Holzforchung*, (1985), **39**, 3355.
 96. Lapiere, C.; Monties, B.; Guittet, E.; Lallemand, J. Y.; *Holzforchung*, (1987), **41**, 51.
 97. Bartuska, V. J.; Maciel, G. E.; Bolker, H. I.; Fleming, B. I.; *Holzforchung*, (1980), **34**, 214.
 98. Maciel, G. E.; O Donnell, D. J.; Ackerman, J. J. H.; Hawkins, B. H.; Bartuska, V. J.; *Makromol. Chem.* (1981), **182**, 2297.
 99. Maciel, G. E.; Frye, J. S.; Kolodzieyski, W.; *Anal. Chem.*, (1982), **54**, 1419.
 100. Himmesbasch, D. S.; Barton E. E.; Wimdham, W. R.; *J. Agric. Food Chem.*, (1983), **31**, 401.
 101. Haw, J. F.; Schultz, T. P.; *Holzforchung*, (1985), **39**, 289.
 102. Lindberg, J. J.; Hortling, B.; *Adv. Polym. Sci.*, (1985), **66**, 1.
 103. Veloso, D. V.; Morais, S. A. L.; Nascimento, E. A.; *Tappi Proceedings-1989 Wood and Pulping Chemistry*, Rawley, (1989), 233.
 104. Hatfield, G. R.; Maciel, G. E.; Erbatur, O.; Erbatur, G.; *Anal. Chem.*, (1987), **59**, 172.
 105. Yean, W. K.; Goring, D. A. I.; *Pulp Paper Mag, Can.*, (1964), **65**, T-127.
 106. Mcnaughton, J. G.; Yean, W. Q.; Goring, D. A. I.; *Tappi*, (1967), **50**, 548
 107. Szabo, A.; Goring, D. A. I.; *Svensk Papperstidn.*, (1968), **66**, 141.
 108. Gross, S. K.; Sarkanen, K. V.; Achuerch, C.; *Anal. Chem.*, (1958), **30**, 518.
 109. Wegener, G.; Fengel, D.; *Wood Sci. Technol.*, (1977), **11**, 133.
 110. Sarkanen, S.; Teller, D. C.; Hall, J.; MacCarthy, J. L.; *Macromolecules*, (1981), **14**, 426.
 111. Chum, H. C.; Johnson, D. K.; Tucker, M. P.; Himmel, M. E.; *Holzforchung*, (1987), **41**, 97.