

Manuscrito avaliado e aceito pelo comitê científico do II CBCTEM

## Caracterização da lignina obtida da madeira de diferentes espécies por meio do processo organosolv

Patrícia S. Bilhalva dos Santos<sup>1</sup>; Aline Krolow Soares<sup>2</sup>; Sílvia Fuentes<sup>1</sup>; Jalel Labidi<sup>1</sup>; Darci Alberto Gatto<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Ingeniería Química y del Medio Ambiente, Universidad del País Vasco, San Sebastián, España.

<sup>2</sup> Centro de Engenharias, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil

**RESUMO** A lignina, por ser um biopolímero extremamente abundante e com características fenólicas, apresenta grandes potencialidades para ser utilizada em diversas aplicações. No entanto, sua estrutura tridimensional e de formação complexa variam em função de diversos aspectos, entre eles a espécie e a forma de obtenção. Neste contexto, o presente estudo objetivou caracterizar a lignina obtida da madeira de quatro espécies (*Eucalyptus paniculata* Sm, *Eucalyptus botryoides* Sm, *Eucalyptus tereticornis* Smith e *Corymbia citriodora* Hook) por meio de processo Organosolv (extração com etanol/água). As ligninas foram determinadas quanto a sua composição, estrutura e grupos funcionais. A reatividade das ligninas foi analisada através do teor de fenóis totais e do poder oxidante das mesmas. As propriedades físico-químicas das ligninas foram determinadas por técnicas alternativas como GPC (cromatografia de permeação em gel), e ATR-IR (infravermelho com atenuada refletância total). Os resultados mostraram que as ligninas obtidas das diferentes espécies pelo processo Organosolv têm alto grau de pureza, por apresentarem baixos teores de açúcares e contaminantes inorgânicos. Além disso, todas ligninas apresentaram elevada polidispersidade sendo que a maior média de peso molecular foi verificada na lignina do *E. paniculata*.

**Palavras-chave:** *Eucalyptus*, *Corymbia citriodora*, teor fenóis, capacidade antioxidante.

## Characterization of organosolv lignin of wood from different species

**ABSTRACT** Lignin is a biopolymer extremely abundant with phenolic characteristics that have great potential for use in various applications. However, their three-dimensional structure of complex formation varies depending on various aspects including the specie and the way of obtaining. In this context, this study aimed to characterize the lignin obtained from four species (*Eucalyptus paniculata* Sm, *Eucalyptus botryoides* Sm, *Eucalyptus tereticornis* Smith, *Corymbia citriodora* Hook) through Organosolv process (ethanol/water). Lignins were determined as its composition, structure and functional groups. The reactivity of lignins was analyzed by total phenol content and the oxidant power. The physic-chemical properties of the lignins were determined by alternative techniques such as GPC (gel permeation chromatography) and ATR-IR (infrared attenuated total reflectance). The results showed that the lignin obtained from different species by the Organosolv process has high purity, because they have low levels of sugars and inorganic contaminants. In addition, all lignins presented high polydispersity and a higher average molecular weight was verified in *E. paniculata* lignin.

**Keywords:** *Eucalyptus*, *Corymbia citriodora*, content phenols, antioxidant capacity.

### Introdução

A composição lignocelulósica, a variabilidade de espécies e a disponibilidade fazem da madeira um material extremamente versátil, o qual é utilizado em diversas aplicações. Den-

tre as espécies de rápido crescimento, o eucalipto é amplamente utilizado nas indústrias em função da facilidade de adaptação e alta produtividade. No Brasil, as plantações de eucalipto em 2012 representaram aproximadamente

6.664.812 ha, sendo desse total (76,6% e 23,4%) correspondente respectivamente pelas espécies de *Eucalyptus* e *Pinus*, a maior parte destes plantios foram destinados às indústrias de celulose e papel (ABRAF, 2013)

Dentre os principais componentes da madeira, a lignina é um biopolímero de estrutura amorfa e característica fenólica formada a partir da desidrogenação dos alcoóis precursores: p-cumarílico, coniferílico e o sinapílico (FENGEL e WEGENER, 1983), e se encontra na lamela média e nas paredes celulares das plantas (ROWELL, 2005). Por ser de origem renovável e a maior fonte natural de polímero aromático fenólico (CARROTT et al., 2007), a lignina é uma boa alternativa com grandes potenciais para ser utilizada na síntese de novos materiais poliméricos (TEJADO et al., 2007; CAVDAR et al., 2008).

Sarkar e Adhikari (2000) e Jin et al. (1990) estudaram a utilização de ligninana síntese de resinas fenólicas, Kubo e Kadla (2004) em óxido de polietileno/Organosolv, Boeriu et al. (2004) como emulsionante e Li e Ragauskas (2012) em espuma rígida de poliuretano.

Dentre os processos de polpação, o método por Organosolv é ambientalmente mais adequado para o fracionamento dos componentes lignocelulósicos por usar solventes orgânicos (RODRÍGUEZ et al., 1998). A lignina Organosolv é industrialmente interessante por ser livre de enxofre e geralmente seu peso molecular é mais baixo (LI e RAGAUSKAS, 2012). A conversão de ligninas, em biorrefinarias, como coprodutos de maior valor agregado pode ajudar a reduzir o custo da produção de biocombustíveis, para isso é necessário investigar mais a respeito da lignina e suas potencialidades (ARAQUE et al. 2008).

Neste contexto, o presente estudo teve como objetivo caracterizar a composição e a estruturas das ligninas obtidas de quatro espécies (*E. paniculata*, *E. botryoides*, *E. tereticornis* e *C. Citriodora*) através do processo Organosolv.

## Material e Métodos

### Matéria Prima

Para realização deste estudo, foram utilizadas árvores das espécies de *Eucalyptus paniculata* Sm, *Eucalyptus botryoides* Sm, *Eucalyptus tereticornis* Smith e *Corymbia citriodora* Hook que foram abatidas de plantios localizados no Rio Grande do Sul. As toras obtidas a altura do DAP (diâmetro a altura do peito, 1.30 m), foram cortadas pranchas e colocadas em câmara climatizada a 20°C e 65% de umidade relativa até atingirem o teor de umidade de equilíbrio (12% UR). Depois as madeiras foram moídas em moinho de facas e o material retido na peneira de 40 mesh foi utilizado nas análises subsequentes.

### Processo Organosolv

A deslignificação de cada espécie foi realizada pelo processo Organosolv conforme descrito por Garcia et al. (2012). Para tal, utilizou-se uma solução de etanol/água (60/40% volume) como solvente juntamente com a madeira moída na proporção de 1:10 (madeira:solvente) à 180°C por 90 min em um reator com agitação. A reação foi filtrada e a polpa celulósica (parte sólida) foi lavada com solução de etanol/água (60/40% volume) e depois com água. Da fração líquida (licor negro) do processo de deslignificação foi precipitada a lignina.

### Precipitação e caracterização da lignina

As ligninas foram precipitadas do licor negro por acidificação conforme método descrito por Alrios et al. (2009). O teor de cinzas e lignina insolúvel em ácido (lignina Klason) foram determinados de acordo com os métodos descritos por Toledano et al. (2012).

Uma parte do filtrado líquido resultante da lignina Klason foi utilizado para determinar a porcentagem de lignina solúvel em ácido através de espectroscopia UV-VIS utilizando equipamento JascoV-630. O filtrado líquido foi diluído em uma solução aquosa com 1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (ácido sulfúrico) até que a absorção estivesse entre 0.1 e 0.8 nm. A absorvância das amostras foi medida a 205 nm. Da outra parte do filtrado líquido foi verificado o conteúdo dos açúcares (glucose, xilose e arabinose) através da técnica de cromatografia líquida de alta performance (HPLC).

Os grupos funcionais presentes nas ligninas Organosolv foram verificados utilizando espectroscopia de infravermelho com atenuada refletância total (ATR-IR) utilizando instrumento MKII Golden Gate Specac. Os espectros foram registrados em modo de transmitância em função do número de ondas (4000 – 650 cm<sup>-1</sup>) durante 30 varreduras com resolução de 4 cm<sup>-1</sup>.

Para avaliar o peso molecular (MW) e a distribuição do peso molecular (polidispersidade) as ligninas foram submetidas à técnica de Cromatografia de Permeação em Gel (GPC), utilizando equipamento JASCO com interface LC-NetII/ADC, um detector de índice de reflexão RI-2031 Plus e duas colunas Polar Gel-M. Como eluente utilizou-se dimetilformamida mais 0.1 % de brometo de lítio. A taxa de fluxo foi 0.7 mL.min<sup>-1</sup> à 40°C. A calibração foi feita com padrões de poliestireno (Sigma-Aldrich) variando de 266 a 70.000 g.mol<sup>-1</sup>.

O conteúdo total de fenóis das amostras de lignina foi determinado conforme método descrito por Garcia et al. (2012) e Amendola et al. (2010). O teste consiste em misturar 2,5 mL de reativo de Folin-Ciocalteu, 5mL de solução de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> a 20% e 0,5 mL de solução de lignina em uma concentração de (2g/L) de lignina em DMSO, por 30 min a 40°C, antes de medir a absorvância a 750 nm. A intensidade da cor azul foi medida a 750 nm num espectrofotômetro de UV-VIS, e o teor

de fenóis foi determinado utilizando uma curva padrão com as soluções de ácido gálico.

O poder antioxidante, bem como a capacidade da lignina para reduzir radical ABTS foram medidos através do método espectrofotométrico (UV-VIS) descrito por Amendola et al. (2010) e Garcia et al. (2010).

### **Análise estatística**

Os dados foram analisados por estatística descritiva e análise de variância ( $p < 0,05$ ). Quando a hipótese nula foi rejeitada, os valores médios foram submetidos a comparação com o teste de Tukey em nível de significância de 5%.

## **Resultados e Discussão**

### **Composição e estrutura das ligninas**

A Tabela 1 mostra os valores médios da composição das ligninas quanto aos percentuais de cinzas, açúcares e lignina (insolúvel e solúvel em ácido e total). O *E. paniculata* apresentou o maior percentual de cinzas, tanto a 525°C como a 800°C, comparado com as outras espécies.

Em relação aos açúcares, a glucose e a xilose foram estatisticamente diferentes entre as espécies, sendo que a arabinose não foi detectada em nenhuma das espécies analisadas. Observa-se que a lignina obtida da *C. citriodora* apresentou o maior teor de açúcares (glucose e xilose) e que a lignina obtida do *E. paniculata* foi a lignina com mais impurezas em relação as outras espécies, apresentando o menor teor de lignina total.

### **Análises de ATR-IR**

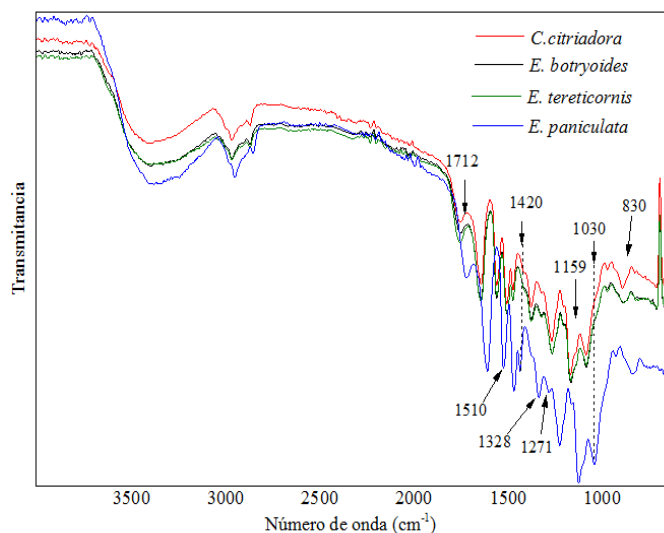
Os espectros entre 4000 - 650 cm<sup>-1</sup> das diferentes ligninas mostraram os mesmos picos, com algumas diferenças em relação a suas intensidades.

Observou-se na Figura 1, um pico a 1712 cm<sup>-1</sup>, que é relacionado a vibração de carbonilo conjugados. O pico 1510

**Tabela 1.** Composição das ligninas organosolv de diferentes espécies.**Table 1.** Composition of organosolv lignins from different species.

Espécie	Cinzas %		Açúcares %			Lignina %		
	525 °C	800 °C	Glicose	Xilose	Arabinose	Insolúvel	Solúvel	Total
<i>E. paniculata</i>	1,09b	1,04b	0,093a	1,093b	ND	73,4 ± 1,9 a	1,06 ± 0,2b	75,0 ± 2,1a
<i>E. botryoides</i>	0,65ab	0,41ab	0,211b	0,887a	ND	82,5 ± 0,9b	0,9 ± 0,1a	83,4 ± 1,5b
<i>E. tereticornis</i>	0,15a	0,12a	0,098a	0,867a	ND	89,2 ± 0,6b	0,9 ± 0,04a	90,1 ± 0,5b
<i>C. citriodora</i>	0,41ab	0,22a	0,617c	1,691c	ND	87,1 ± 0,25b	1,2 ± 0,3ab	88,3 ± 0,1b

$\text{cm}^{-1}$  está relacionado com as vibrações do esqueleto aromático e em  $1456 \text{ cm}^{-1}$  com os grupos metilo e metileno. Os picos encontrados em  $1328$  e  $1271 \text{ cm}^{-1}$  correspondem as vibrações condensadas de siringil (S) e guaiacil (G). Picos comuns a lignina e a celulose foram encontrados a  $1420$ ,  $1111$  e  $1030 \text{ cm}^{-1}$ . Um pico a  $830 \text{ cm}^{-1}$  e a  $1159 \text{ cm}^{-1}$  relacionados as unidades G e S (KLINE et al., 2010).



**Figura 1.** Espectroscopia de infravermelho (ATR-FT-IR) para as três espécies estudadas, na região de intervalo  $4000\text{-}650 \text{ cm}^{-1}$ .

**Figure 1.** Infrared spectroscopy (ATR-FT-IR) of three species in the range  $4000\text{-}650 \text{ cm}^{-1}$ .

De acordo com Hage et al. (2009), organosolv deslignificação não produz alterações significativas na estrutura do núcleo da lignina quando comparado com outros métodos de extração de lignina.

### Análises de GPC

As ligninas de diferentes espécies apresentaram peso molecular médio (Mw), média em número (Mn) e polidispersividade (Mw/Mn) significativamente diferentes (Tabela 2). A lignina obtida do *E. paniculata* apresentou o maior peso molecular com  $10193 \text{ (g/mol)}$  e a lignina do *E. tereticornis* o menor Mw com  $8444 \text{ (g/mol)}$ , sendo este último resultado semelhante ao encontrado por Guerra et al. (2008) referente a lignina de *E. globulus* ( $Mw = 8100 \text{ g/mol}$ ).

**Tabela 2.** Resultados médios de peso molecular (Mw), número molecular (Mn) e polidispersidade das ligninas de diferentes espécies.

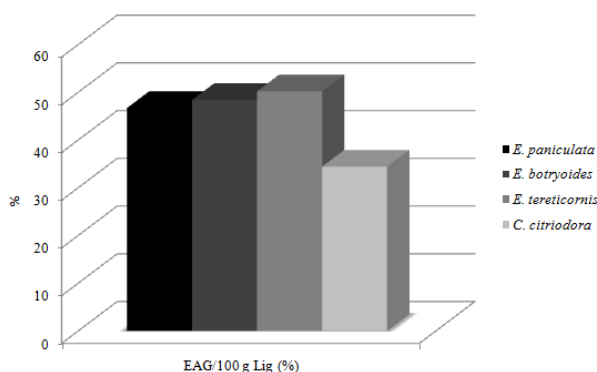
**Table 2.** Average values of molecular weight (Mw), molecular number (mn) and polidispersity of lignin from different species.

Espécie	Mw (g mol <sup>-1</sup> )	Mn (g mol <sup>-1</sup> )	Mw/Mn
<i>E. paniculata</i>	10193d	1916c	5,32c
<i>E. botryoides</i>	8848c	2052d	4,31a
<i>E. tereticornis</i>	8444a	1745b	4,84b
<i>C. citriodora</i>	8604b	1534a	5,61d

Os valores médios na mesma coluna, seguida pela mesma letra não são estatisticamente diferentes ao nível de 5% pelo teste de Tukey.

### Teores de fenóis totais

Os resultados dos teores de fenóis totais determinados por Folin-Ciocalteu e expressos como porcentagem de equivalentes de ácido gálico (EAG) por 100 g de lignina são mostrados na Figura 2.



**Figura 2.** Percentual de grupos fenólicos expresso em equivalente de ácido láctico (EAG) por lignina.

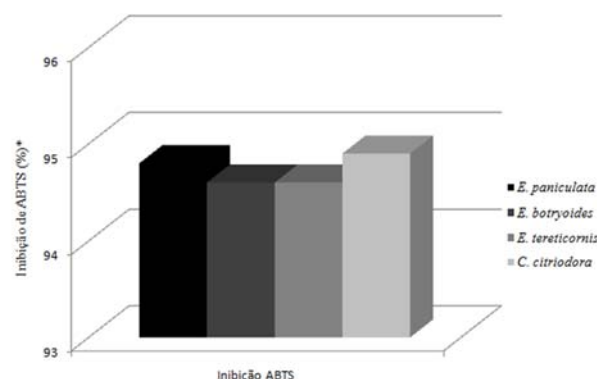
**Figure 2.** Percentage of phenolic groups expressed in equivalence of lactic acid (EAG) per lignin.

Todas ligninas apresentaram altos níveis de compostos fenólicos em comparação com outras espécies relatadas na literatura (VÁSQUEZ et al., 2012). Verificou-se na lignina obtida do *E. tereticornis* os maiores teores de fenólicos, enquanto, que na lignina do *C. citriodora* encontrou-se os menores índices de compostos fenólicos.

### Capacidade antioxidante

A Figura 3 mostra a capacidade antioxidante das ligninas organosolv determinado pelo percentual de redução do radical ABTS. Todas ligninas apresentaram bons potenciais antioxidante (94%), com resultados semelhantes aos descritos por Garcia et al. (2012). A presença de grupos hidroxilos na lignina tem papel importante na captação de radicais livres. Desse modo, fatores como o peso molecular (quanto maior a molécula menos OH disponíveis), a polidispersão dessas moléculas, a funcionalidade e a heterogeneidade dos fragmentos

de ligninas isoladas podem afetar na capacidade antioxidante da lignina.



**Figura 3.** Capacidade antioxidante das ligninas. \* Capacidade antioxidante expressa em porcentagem da redução do radical ABTS relativa a solução de lignina 2 g/L em DMSO.

**Figure 3.** Antioxidant capacity of lignins. \*Antioxidant capacity expressed in percentage of reduction of ABTS radical related to 2 g/L of lignin in DMSO.

De acordo com Pan et al. (2006), o alto peso molecular e polidispersidade elevada reduz a atividade de captação dos radicais livres. Ainda segundo esses autores, o baixo peso molecular proporciona maior despolimerização da lignina, o que favorece a formação de novos sítios ativos com grupos hidroxilos aromáticos. Para Ugartondo et al. (2008), os grupos hidroxilos fenólicos são fundamentais para a atividade antioxidante, visto que os hidroxilos alifáticos têm uma relação negativa ao potencial antioxidante da lignina.

### Conclusões

- O processo de deslignificação Organosolv não influenciou a capacidade antioxidante das ligninas estudadas.
- Todas ligninas Organosolv apresentaram contaminação, sendo que o *E. paniculata* apresentou os maiores níveis de contaminação, provavelmente devido ao seu elevado peso molecular e o baixo teor de lignina total.
- A *Corymbia citriodora* apresentou o menor teor de fenóis totais e o maior teor de açúcares.

## Agradecimentos

Os autores gostariam de agradecer ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelas bolsas de doutorado pleno no exterior nos processos (246018/2012-7 e 207252/2014-9) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pelo projeto (CNPQ/CAPES 014/2012) por apoiar financeiramente este trabalho, as Universidades envolvidas e a todos os autores pela sua cooperação.

## Referências

- ABRAF (Associação Brasileira de Produtores de Florestas Plantadas). Anuário estática ABRAF. Brasília, 2013.
- ALRIOLS, M. G.; TEJADO, A.; BLANCO, M.; MONDRAGON, I.; LABIDI, J. Agricultural palm oil tree residues as raw material for cellulose, lignin and hemicelluloses production by ethylene glycol pulping process. *CHEM ENG J*, v.148, p.106-14, 2009.
- AMENDOLA, D.; De FAVERI, D.M.; SPIGNO, G. Grape marc phenolics: Extraction kinetics, quality and stability of extracts. *J FOOD ENG*, v.97, p.384-392, 2010.
- ARAQUE, E.; PARRA, C.; FREER, J.; CONTRERAS, D.; RODRÍGUEZ, J.; MENDONÇA, R.; BAEZA, J. Evaluation of organosolv pretreatment for the conversion of *Pinus radiata* D. don to ethanol. *ENZYME MICROB. TECH.*, v.43, p.214-219, 2008.
- BOERIU, C. G.; BRAVO, D.; GOSSELINK, R. J. A.; VAN DAM, J. E. G. Characterisation of structure-dependent functional properties of lignin with infrared spectroscopy. *IND CROP PROD*, v.20, p.205-218, 2004.
- CARROTT, P.; CARROTT, M. R. et al. Lignin-from natural adsorbent to activated carbon: A review. *BIORESOURCE TECHNOLOGY*, v. 98, p.2301-2312, 2007.
- CAVDAR, A. D.; KALAYCIOGLU, H.; HIZIROGLU, S. Some of the properties of oriented strandboard manufactured using kraft lignin phenolic resin. *J MATER PROCESS TECH.*, v.202, p.59-63, 2008.
- FENGEL, D.; WEGENER, G. Wood-chemistry, ultrastructure, reactions: Walter de Gruyter, 1983.
- GARCÍA, A.; ALRIOLS, M.G.; LABIDI, J. Evaluation of the effect of ultrasound on organosolv black liquor from olive tree pruning residues. *BIORESOURCE TECHNOLOGY*, v.108, p.155-161, 2012.
- GARCÍA, A.; TOLEDANO, A.; ANDRÉS, M. A.; LABIDI, J. Study of the antioxidant capacity of *Miscanthus sinensis* lignins. *PROCESS BIOCHEM.*, v.45, p.935-940, 2010.
- GUERRA, A.; LUCIA, L. A.; ARGYROPOULOS, D. S. Isolation and characterization of lignins from *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden and *Eucalyptus globulus* Labill: By enzymatic mild acidolysis (EMAL). *HOLZFORSCHUNG*, v.62, p.24-30, 2008.
- HAGE, R.; BROSE, N.; CHRUSCIEL, L.; SANCHEZ, C.; SANNIGRAHI, P.; RAGAUSKAS, A. Characterization of milled wood lignin and ethanol organosolv lignin from miscanthus. *POLYM DEGRAD STABIL.* v.94, p.1632-1638, 2009.
- JIN, L.; SELLERS Jr, T.; SCHULTZ, T. P.; NICHOLAS, D. D. Utilization of lignin modified by brown-rot fungi: Properties of flakeboard produced with a brown-rotted lignin modified phenolic adhesive. *HOLZFORSCHUNG*, v.44, p.207-210, 1990.
- KLINE, L. M.; HAYES, D.G.; WOMAC, A.R.; LABBÉN. Simplified determination of lignin content in hard and softwood via uv-espectrophotometric analysis of biomass dissolved in ionic liquids. *BIORESOURCES*, v.5, p.1366-1383, 2010.
- KUBO, S.e KADLA, J. F. Poly (Ethylene Oxide)/Organosolv Lignin Blends: Relationship between Thermal Properties, Chemical Structure, and Blend Behavior. *MACROMOL.*, v.37, p.6904-6911, 2004.
- LI, Y. e RAGAUSKAS, A. J. Kraft lignin-based rigid polyurethane foam. *J WOOD CHEMTECHNOL*, v.32, p.210-224, 2012.
- PAN, X.; KADLA, J. F.; EHARA, K.; GILKES, N.; SADDLER, J. N. Organosolv ethanol lignin from hybrid poplar as a radical scavenger: relationship between lignin structure, extraction conditions, and antioxidant activity. *J. AGRIC. FOOD CHEM.*, v.54, p.5806-5813, 2006.
- RODRÍGUEZ, F.; GILARRANZ, M.A.; OLIET, M.; TIJERO, A. Pulping of lingocelulosics by organosolv processes. *CHEMICAL ENGINEERING*, v.2, p.9-47, 1998.

ROWELL, R. M. Handbook of wood chemistry and wood composites. CRC: Press, Florida, 2005.

SARKAR, S. e ADHIKARI, B. Lignin-modified phenolic resin: Synthesis optimization, adhesive strength, and thermal stability. J.ADHES. SCITECHNOL, v.14, p.1179-1193, 2000.

TEJADO, A.; PEÑA, C.; LABIDI, J.; ECHEVERRIA, J. M.; MONDRAGON, I. Physico-chemical characterization of lignins from different sources for use in phenol-formaldehyde resin synthesis. BIORESOUR TECHNOL, v.98, p.1655-1663, 2007.

TOLEDANO, A.; ERDOCIA, X.; SERRANO, L.; LABIDI, J. Influence of extraction treatment on olive tree (*Olea europaea*) pruning lignin structure. SUSTAINABLE ENERGY, 2012.

UGARTONDO, V.; MONTSERRAT, M.; VINARDELL, M.P. Comparative antioxidant and cytotoxic effects of lignins from different sources. BIORESOUR. TECHNOL., v.99, p.6683-6687, 2008.

VÁZQUEZ G.; SANTOS J.; FREIRE, M. S.; ANTORRENA G.; GONZÁLEZ-ALVAREZ J. Extraction of antioxidants from eucalyptus (*Eucalyptus globulus*) bark. WOOD SCITECHNOL, v.46, p.443-457, 2012.