



Rendiconti  
Accademia Nazionale delle Scienze detta dei XL  
*Memorie di Scienze Fisiche e Naturali*  
125° (2007), Vol. XXXI, P. II, t. I, pp. 213-227

CLAUDIA CRESTINI\*

## La lignina, cent'anni di studi strutturali

**Riassunto** – Sebbene la prima caratterizzazione strutturale della lignina risalga al 1908 molto è ancora ignoto circa la sua struttura. Gli avanzamenti nel settore si sono focalizzati principalmente sulla caratterizzazione e quantificazione mediante tecniche avanzate di risonanza magnetica nucleare e sull'identificazione e caratterizzazione di interazioni supramolecolari.

**Abstract** – Despite the study of lignin structures dates back to 1908, its structure is to date not clearly understood. The advances in lignin characterisation are focused mainly on the characterisation and quantitative analysis by advanced NMR techniques and on the identification and characterisation of supramolecular interactions.

### INTRODUZIONE

La progressiva riduzione delle disponibilità di risorse petrolifere, l'aumento inarrestabile dei loro costi e la crescente necessità di una efficiente tutela ambientale, rendono oggi necessario lo sviluppo di nuove tecnologie per lo sfruttamento di energie rinnovabili ed a basso impatto ambientale.

Da questo punto di vista, i materiali lignocellulosici rappresentano il più grande serbatoio di energia solare immagazzinata nei legami chimici dei più abbondanti biopolimeri presenti sulla terra: cellulosa e lignina. Queste risorse sono continuamente rinnovate e presentano una larga potenzialità per l'ottenimento di sostanze combustibili e per la preparazione di commodities, specialties e fine chemicals per applicazioni industriali. La progettazione e lo sviluppo di nuovi materiali e processi dalle biomasse vegetali richiede l'identificazione e lo sviluppo di nuove tecniche analitiche per la caratterizzazione strutturale dei biopolimeri ed il monitoraggio dell'entità di degradazione dei materiali lignocellulosici.

\* Dipartimento di Scienze e Tecnologie Chimiche Università di Tor Vergata, Via della Ricerca Scientifica, 00133, Roma. E-mail: crestini@stc.uniroma2.it

Nel 1838 Anselme Payen scoprì che trattando del legno con acido nitrico e successivamente con una soluzione alcalina si poteva ottenere un residuo insolubile, che chiamò cellulosa, ed un polimero solubile a cui venne attribuito da Schulze il nome di lignina. Circa trent'anni dopo venne brevettato il primo metodo per separare la lignina dalla cellulosa e quindi si aprì la strada per la produzione della carta a partire dalle fibre lignocellulosiche. Da allora sono state prodotte oltre 12.000 pubblicazioni scientifiche su questo argomento ed il numero dei brevetti è in continuo aumento.

Quando nel 1908 Klason propose un modello elementare di struttura della lignina certo non poteva immaginare di stare avviando una delle ricerche più complesse ed ancora oggi solo in parte risolte sulla struttura dei polimeri naturali. Infatti mentre la struttura della cellulosa può oramai considerarsi chiarita, molti problemi devono ancora trovare una risposta nel caso della lignina.

#### DISCUSSIONE

##### *Biosintesi e struttura della lignina*

La lignina è un caratteristico componente chimico e morfologico delle piante superiori come le pteridofite e le spermatofite (gimnosperme e angiosperme) ove è presente nei tessuti vascolari specializzati nel trasporto di liquidi (trachee e tracheidi) e nel sostegno meccanico della pianta (fibre). In particolare la lignina è uno dei costituenti principali delle pareti cellulari.

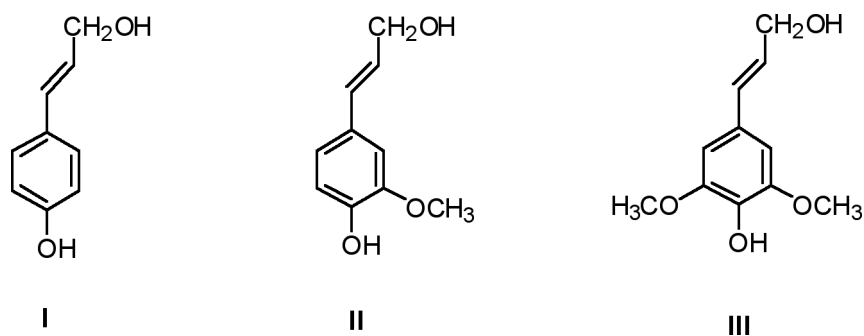


Fig. 1. Struttura dei precursori della lignina.

Chimicamente, la lignina è un polimero amorfo di natura fenil propionica generato mediante polimerizzazione radicalica enzimaticamente iniziata di alcol *p*-coumarilico, alcol coniferilico ed alcol sinapilico (fig. 1). I tre monomeri sono incorporati diversamente nelle lignine delle varie specie vegetali. Le gimnosperme hanno una lignina (softwood lignin) costituita prevalentemente da unità guaiaciliche (G, struttura II), le angiosperme dicotiledoni mostrano una lignina (hardwood lignin) contenente quantità significative di unità guaiaciliche e siringiliche (GS,

strutture II e III), mentre le angiosperme monocotiledoni hanno lignine (grass lignin) che presentano anche unità *p*-idrossifeniliche (GSH strutture I, II, III). La lignina si differenzia dagli altri polimeri biologici nella mancanza di una regolarità di sequenza e di legame intermonomerico. Infatti, a causa della natura radicalica del processo di biosintesi, esistono almeno 10 tipi diversi di legame intermonomerico.

Il primo stadio della biosintesi della lignina è la deidrogenazione enzimatica degli alcoli *p*-idrossi cinnamici che porta a sistemi aromatici mancanti di un protone. In figura 2 è mostrata la formazione per trasferimento monoelettronico dei fenossiradicali, stabilizzati per risonanza, dell'alcol coniferilico.

Le principali modalità di accoppiamento dei radicali sono mostrate in figura 2. Le relative densità elettroniche determinano la frequenza dei differenti siti implicati nelle reazioni di formazione di legame. Da calcoli quantomeccanici si è dedotto che nei radicali fenossido si ha la più alta densità elettronica sull'atomo di ossigeno fenolico, favorendo così la formazione di legami arileterei come il legame  $\beta$ -O-4, il più frequente tipo di legame incontrato nelle lignine (tab. 1).

Tab. 1. Frequenza dei principali tipi di legame in lignine di legni teneri e duri.

| % di Unità Fenilpropanoiche           |                 |                 |
|---------------------------------------|-----------------|-----------------|
| Tipo di Legame                        | Softwood        | Hardwood        |
| $\beta$ -Aril etere ( $\beta$ -O-4)   | 45-48           | 60              |
| Bifenile (5-5')                       | 9.5-17          | 4.5             |
| Fenilcoumarano ( $\beta$ -5)          | 9-12            | 6               |
| $\beta$ -1                            | 7-10            | 8               |
| $\alpha$ -Aril etere ( $\alpha$ -O-4) | tracce          | tracce          |
| Difenil etere (4-O-5)                 | 3.5-8           | 6.5             |
| $\beta$ - $\beta$                     | 3               | -               |
| dibenzodioxocin                       | Non determinato | Non determinato |

Il primo stadio della polimerizzazione è la formazione di strutture dimere. Alcuni dimeri indicati con il nome di «dilignoli» sono mostrati in figura 2. La successiva reazione a catena di tipo «end wise polymerization» procede tramite «steps way coupling» di monolignoli con i gruppi fenolici di di- o oligo-lignoli, portando ad un polimero altamente ramificato con catene di tri-, tetra-, penta- e oligo-lignoli.

Riassumendo, è evidente che le macromolecole di lignina non si formano con un meccanismo regolare, descritto geneticamente, ma per un accoppiamento casuale di lignoli a dare un polimero non lineare. la costituzione finale della lignina è quindi determinata preminentemente dalla reattività e dalla frequenza delle unità costituenti coinvolte nella polimerizzazione.

La fig. 3 mostra il più recente modello della lignina proposto da Brunow nel 1998 [1].

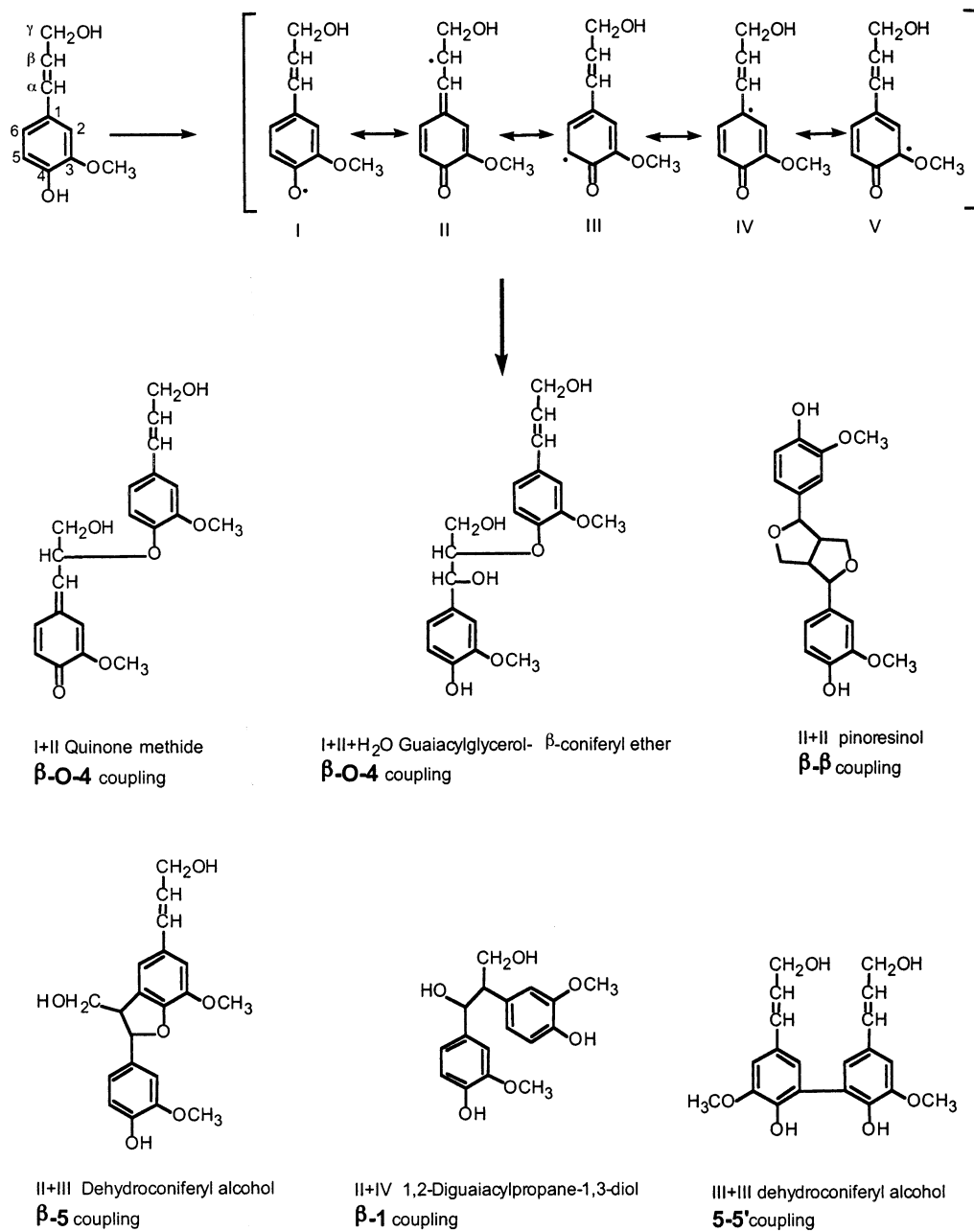


Fig. 2. Rappresentazione schematica dei processi di lignificazione.

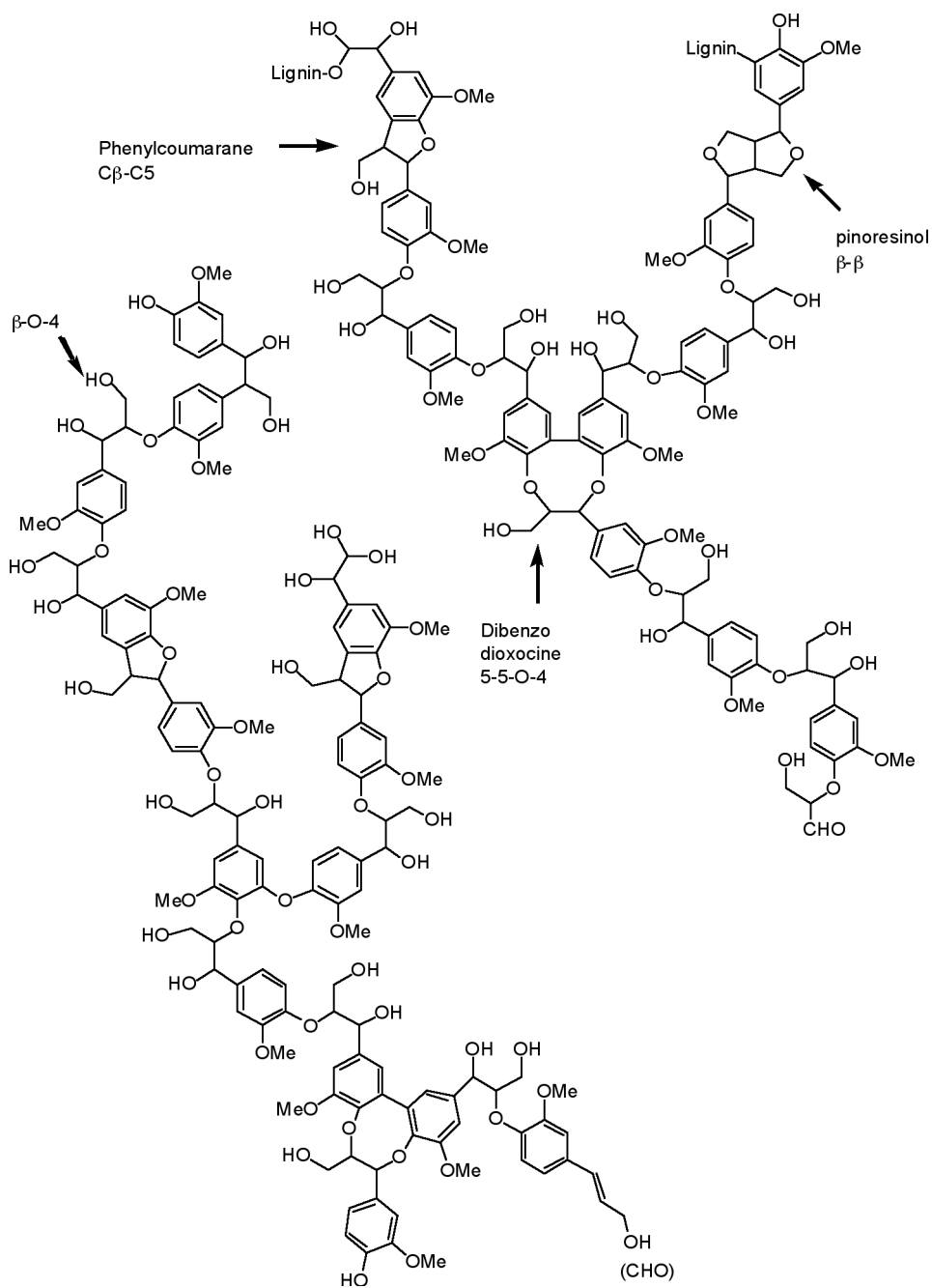


Fig. 3. Modello della struttura della lignina proposto da Brunow [1].

### *Caratterizzazione strutturale della lignina*

La caratterizzazione strutturale della lignina può essere divisa in tre settori principali fortemente interconnessi fra di loro: la determinazione dei gruppi funzionali, la determinazione dei legami intermonomerici e la determinazione del peso molecolare. Questi parametri sono di importanza fondamentale per stabilire lo stato di purezza, la natura e le modificazioni strutturali indotte nel polimero. Inoltre sono necessari per poter pianificare opportune modificazioni strutturali per la ricerca e sviluppo di nuovi materiali. La determinazione dei gruppi funzionali e dei legami intermonomerici è stata storicamente effettuata attraverso metodi chimici indiretti di funzionalizzazione o degradazione della lignina e successiva titolazione di opportuni gruppi funzionali rilasciati nell'ambiente di reazione [2]. Queste metodologie per quanto ingegnose, portano a risultati non del tutto attendibili sul piano dell'errore sperimentale introdotto assumendo come quantitative e selettive delle reazioni chimiche che tali non sono. Inoltre, le determinazioni indirette richiedono delle modificazioni della lignina che possono falsare i risultati. Più recentemente sono state sviluppate numerose tecniche analitiche di risonanza magnetica nucleare che permettono la diretta caratterizzazione della lignina senza operare modificazioni chimiche sul polimero. Queste tecniche non sono soltanto più attendibili in quanto permettono di analizzare direttamente il polimero senza sottoporlo a modifiche strutturali, ma riescono a ridurre l'errore sperimentale e a diminuire sensibilmente i tempi di analisi [2].

#### DETERMINAZIONE DEI GRUPPI FUNZIONALI E DEI LEGAMI INTERMONOMERICI NELLE LIGNINE

La rivelazione e quantificazione dei gruppi funzionali delle lignine costituisce uno tra gli obiettivi primari nell'analisi delle lignine. Insieme all'analisi elementare, questa tecnica permette la definizione di formule minime di unità fenil propioniche.

I gruppi funzionali comunemente analizzati nelle lignine sono i

- Gruppi metossilici
- Gruppi ossidrilici (fenolici ed alifatici)
- Gruppi carbonilici (chetoni, chinoni, aldeidi)
- Gruppi carbossilici.

La determinazione e la quantificazione dei gruppi funzionali metossilici presenti sulle lignine rappresenta il punto di partenza per la determinazione di una formula minima basata sull'unità C<sub>9</sub> fenilpropionica del tipo  $C_{900}H_xO_y(OCH_3)_z$ . Tale formula è necessaria per stabilire la natura della lignina (softwood o hardwood) e per determinare lo stato di alterazione del polimero rispetto alla struttura originaria.

Parallelamente l'analisi qualitativa e quantitativa dei gruppi ossidrilici alifatici permette di determinare lo stato di ossidazione della catena laterale della lignina.

Infatti in un tipico legame di tipo  $\beta$ -O-4 sono attesi due ossidrili alifatici per unità C9. Una loro diminuzione indica la presenza di subunità parzialmente ossidate a chetoni, aldeidi o acidi, che sono specie responsabili per i fenomeni di colorazione delle lignine e dei materiali da esse derivati.

La determinazione quali-quantitativa dei gruppi carbonilici a carbossilici risulta quindi di importanza rilevante per la determinazione di eventuali processi di ingiallimento e per valutare lo stato di degradazione della lignina.

Gli ossidrili fenolici individuano invece le unità terminali della lignina. La loro quantità può quindi dare un'idea dello stato di depolimerizzazione del sistema. Inoltre processi di ossidazione del nucleo aromatico fenilpropionico possono introdurre ulteriori gruppi fenolici. La conoscenza del tipo di gruppi fenolici presenti, di tipo guaiacilico, siringilico o condensato, fornisce inoltre informazioni sul grado di modificazione strutturale indotto sulle lignine.

Una conoscenza approfondita della struttura della lignina può essere conseguita mediante caratterizzazione dei legami intermonomerici. Questo tipo di determinazione è estremamente critico in quanto metodi tradizionali basati su tecniche di degradazione chimica quali la tioacidolisi o l'ossidazione col permanganato forniscono solo stime poco accurate e poco riproducibili.

#### TECNICHE NMR APPLICATE ALLA CARATTERIZZAZIONE DELLA LIGNINA

Negli ultimi anni si è assistito ad un consistente sviluppo di tecniche avanzate di risonanza magnetica nucleare applicate alla caratterizzazione della lignina. L'NMR è una tecnica estremamente riproducibile e rapida che non richiede degradazione del campione e pertanto non genera artefatti [2-5].

L'elevata abbondanza naturale del nucleo del protone abbia (100%) e la sua alta selettività hanno reso l'NMR del protone piuttosto popolare nelle fasi iniziali dell'applicazione di questa tecnica alla determinazione strutturale della lignina. Tuttavia l'estensione limitata di chemical shift, (12 ppm) la sovrapposizione dei segnali di assorbimento e fenomeni di accoppiamento ne limitano l'uso.

#### <sup>13</sup>C-NMR

L'NMR del carbonio è invece divenuta una tecnica indispensabile per l'elucidazione strutturale dello scheletro di carbonio della lignina. Comparata all'NMR del protone lo spettro <sup>13</sup>C-NMR della lignina offre una risoluzione considerevolmente migliore, priva di effetti di coupling, disposta su un largo spettro di chemical shift (200 ppm). Convenienza, velocità e la possibilità di ottenere informazioni quantitative hanno contribuito alla vasta diffusione dell'uso del <sup>13</sup>C-NMR alla caratterizzazione delle lignine. Più specificamente è possibile valutare quantitativamente la presenza di gruppi metossilici e di gruppi ossidrilici alifatici e aromatici mediante integrazione dei corrispondenti picchi di lignine acetilate in presenza di un adatto standard interno. È inoltre possibile valutare qualitativamente la presenza

di unità siringiliche e guaiaciliche, ed i legami intermonomerici di tipo ariletereo, pinoresinolico e fenilcumaranico [3-5]. Tuttavia l'analisi quantitativa mediante  $^{13}\text{C}$ -NMR richiede un'accurata integrazione dello spettro come pure una correzione dell'offset dovuta alla distribuzione dei segnali su un vasto campo di frequenze che non vengono coperte uniformemente dall'impulso NMR.

### $^{31}\text{P}$ -NMR

Recentemente è stata sviluppata una nuova tecnica di risonanza magnetica nucleare del fosforo  $^{31}\text{P}$  particolarmente utile nella elucidazione strutturale delle lignine [6-7]. Questa tecnica consiste nella derivatizzazione di tutti i protoni labili presenti nelle lignine (protoni alcolici, fenolici, e carbossilici) con un clorodiossafosfolano a dare i corrispondenti derivati fosforilati (fig. 4). Il chemical shift degli atomi del fosforo così introdotti sulla lignina, risulta dipendente dall'intorno chimico e differenzia marcatamente le diverse classi di gruppi funzionali. Inoltre la sensibilità del metodo è elevata poichè l'abbondanza naturale del  $^{31}\text{P}$  è del 100%. Sostituzioni in posizione meta o para sull'anello aromatico hanno un piccolo effetto sul chemical shift. Ciò permette una chiara distinzione tra i gruppi fenolici non sostituiti, guaiacilici e siringilici. Inoltre, gli ossidrili negli alcoli alifatici e benzilici sono chiaramente distinguibili dagli ossidrili fenolici negli spettri dei composti modello derivatizzati con l'1,3,2-diossafosfolanil cloruro.

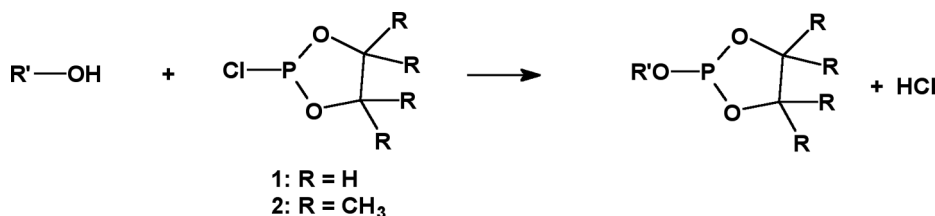


Fig. 4. Fosfitazione di lignine per l'analisi  $^{31}\text{P}$ -NMR.

Nelle lignine fosfitate con 1,3,2-diossafosfolanil cloruro è possibile distinguere gli ossidrili in posizione eritro da quelli treo in legami  $\beta$ -O-4 ariletere, come pure sono distinte le zone di assorbimento degli ossidrili primari e dei gruppi fenolici guaiacilici e siringilici e dei gruppi carbossilici. [6-15] L'uso di questo reattivo permette in particolare l'analisi quantitativa dei gruppi carbossilici, guaiacilici, degli ossidrili primari e secondari e dei legami  $\beta$ -ariletere (fig. 5).

Un nuovo reagente per la fosfitazione dei protoni labili della lignina il 2-cloro-4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-diossafosfolano si è dimostrato particolarmente utile nella risoluzione della regione dei gruppi fenolici. In questo caso è possibile effettuare un'analisi quantitativa delle strutture aromatiche condensate che presentino un gruppo fenolico, in quanto queste hanno un proprio intervallo di chemical shift.



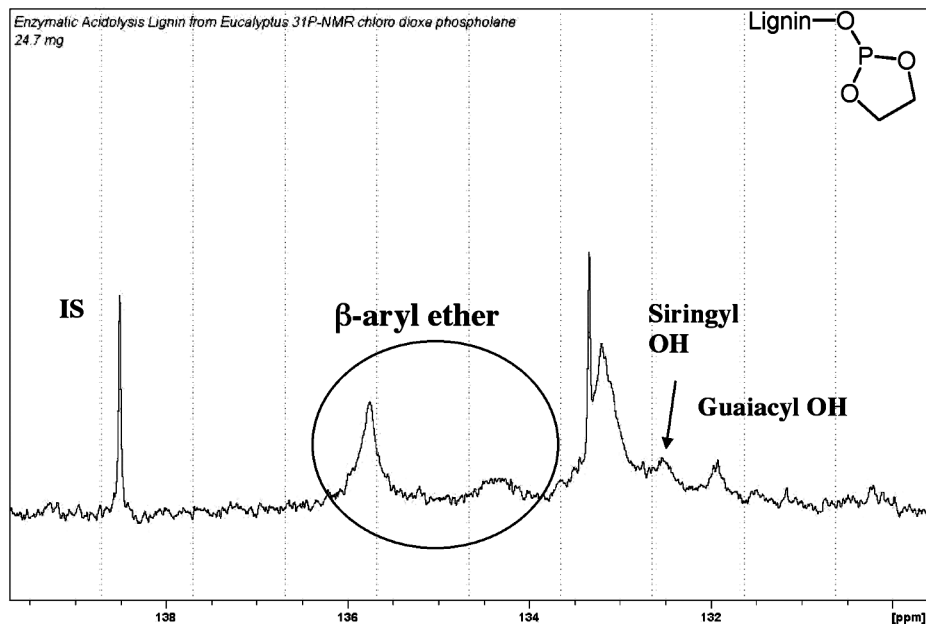


Fig. 5. <sup>31</sup>P-NMR di una lignina fosfitata con 1,3,2-diossafosfolanil cloruro.

L'utilizzo di questo reattivo, in presenza di uno standard interno e di un opportuno «reattivo di rilassamento» come il cromoacetilacetato (che serve ad abbassare i tempi di rilassamento spin-reticolo e sostanzialmente a ridurre i tempi dell'analisi) permette, utilizzando pulse delays di 5s, di acquisire spettri di <sup>31</sup>P-NMR che possono essere utilizzati per l'analisi quantitativa degli ossidrili alifatici, fenolici e carbossilici delle lignine. (Fig. 6).

#### <sup>19</sup>F-NMR

Analogamente, è stata sviluppata una tecnica che permette l'analisi NMR di gruppi carbonilici presenti sulla lignina [16]. Il metodo consiste nella trifluorometilazione dei gruppi aldeidici, chetonici e chinonici seguita dall'analisi <sup>19</sup>F-NMR del campione. (Fig. 7). L'elevata abbondanza naturale del fluoro e l'elevata frequenza di assorbimento di questo nucleo rendono possibile la determinazione di piccole quantità di gruppi carbonilici quali sono quelle responsabili di processi di ingiallimento. (Fig. 8).

#### 2D-NMR

L'applicazione di tecniche 2D NMR eterocorrelate come ad esempio la sequenza HMQC (heteronuclear multiple quantum coherence) permette di valutare le connettività <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C. Una volta che le frequenze dei protoni sono state asse-

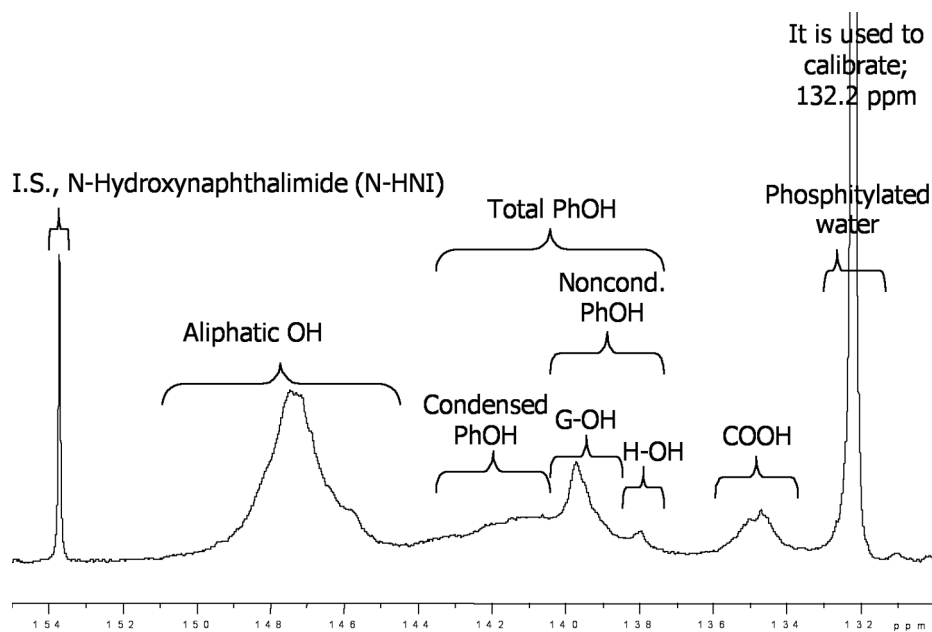


Fig. 6.  $^{31}\text{P}$ -NMR di una lignina fosfitata con tetrametil-1,3,2-diossafosfolanil cloruro.

gnate, l'uso di sequenze HSQC o HMQC permette l'assegnazione dei carboni direttamente legati ai singoli protoni [8, 17, 18]. Le tecniche classiche di NMR eterocorrelato non permettono l'integrazione diretta dei segnali. Recentemente è stata sviluppata una tecnica di HSQC quantitativa, che permette direttamente l'integrazione dei segnali in uno spettro HSQC [19]. In questo modo è possibile determinare l'abbondanza dei singoli legami intermonomerici in una lignina senza ricorrere a procedure di funzionalizzazione o di degradazione. Questo metodo è quindi privo di interferenze dovute a side-reactions e reazioni incomplete. Inoltre permette di analizzare la lignina senza indurvi modifiche strutturali. Gli errori sperimentali sulla determinazione sono evidentemente molto più ridotti e la tecnica è molto più attendibile dei procedimenti precedentemente riportati in letteratura.

Figura 9 mostra uno spettro HSQC di una lignina softwood e la tabella 2 la determinazione quantitativa delle singole unità.

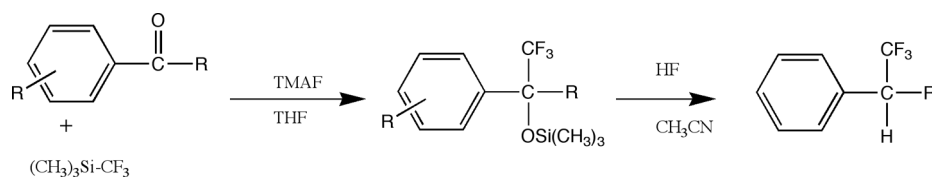


Fig. 7. Trifluorometilazione di modelli della lignina contenenti gruppi carbonilici.

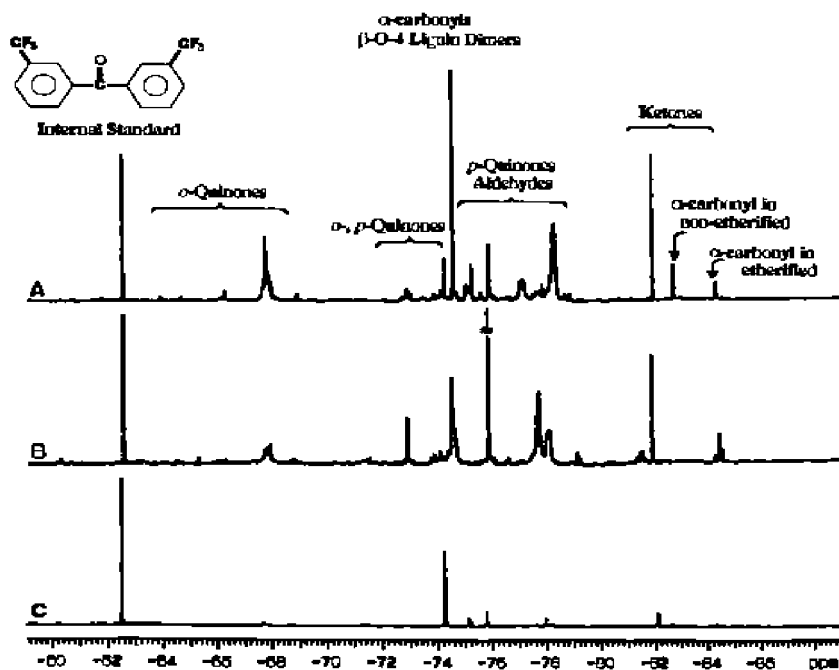


Fig. 8. Tipico spettro  $^{19}\text{F}$ -NMR di lignina trifluorometilata. A. Lignina dopo ossidazione di Dakin. B. Lignina nativa. C Lignina sottoposta a riduzione.

Questa tecnica costituisce il più significativo avanzamento nella caratterizzazione quali-quantitativa della lignina degli ultimi anni. Gli studi attualmente focalizzati sulla messa a punto di sistemi solventi adatti a materiali lignocellulosici permetteranno auspicabilmente in breve futuro di caratterizzare direttamente la lignina nella matrice legnosa. Ciò permetterà di avere finalmente una chiara concezione della struttura della lignina nativa, senza alcuna delle modifiche strutturali indotte dai processi, per quanto blandi, di isolamento.

#### *Aggregazione supramolecolare nelle lignine*

La determinazione del peso molecolare delle lignine continua a presentare difficoltà sperimentali nonostante recenti avanzamenti nei settori del light scattering della cromatografia per esclusione. Sono stati riportati valori di pesi molecolari medi per le lignine varianti tra qualche centinaio a qualche milione di Dalton. Ciò è dovuto, oltre che alla variabilità dei campioni di lignina, anche alla mancanza di opportuni standard di peso molecolare. Inoltre nuove idee ed acquisizioni sulla struttura delle lignine hanno mostrato la presenza e l'importanza di associazioni non covalenti tra singole catene polimeriche nella determinazione delle proprietà

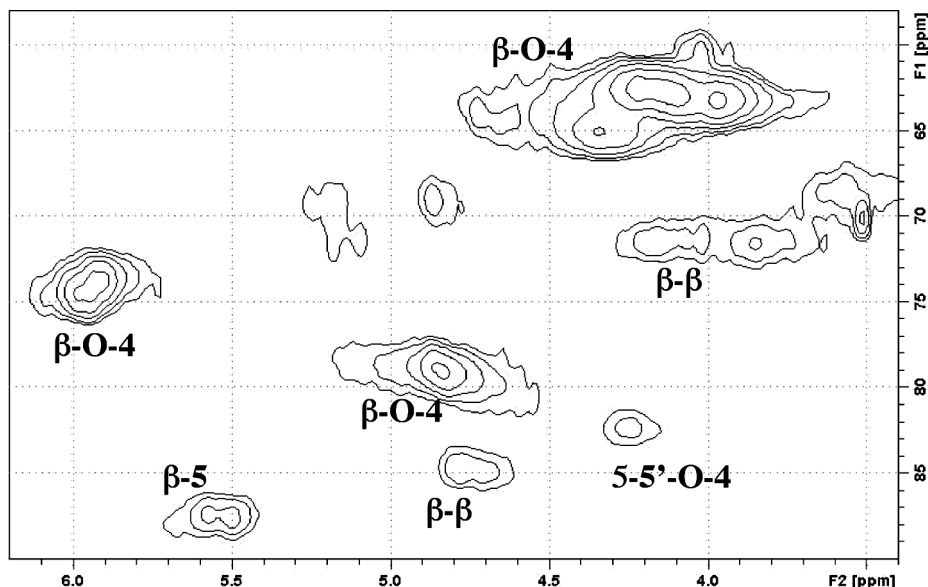


Fig. 9. HSQC di una lignina softwood. Sono evidenti i picchi di correlazione dei legami intermonomerici presenti.

chimico-fisiche della lignina. Infatti, nonostante ci sia un generale consenso circa la possibilità di strutture supramolecolari non covalenti per la lignina, che possono formarsi sia in acqua che in solventi organici, la natura e l'intensità delle forze operanti in tali processi è ancora materia di discussione [20]. La conoscenza e quindi il controllo di tali interazioni potrebbe permettere la modulazione delle proprietà generali della lignina aprendo nuove e sin qui impensate opportunità applicative. In particolare, è stata analizzata l'aggregazione in tetraidrofurano di lignine isolate da

|                           | Black spruce milled wood lignin      | Enzymatic mild acidolysis spruce lignin | Letteratura                         |
|---------------------------|--------------------------------------|---|-------------------------------------|
| formula                   | $C_{900}H_{746}O_{306}(OCH_3)_{101}$ | $C_{900}H_{887}O_{298}(OCH_3)_{113}$    | $C_{900}H_{908}O_{200}(OCH_3)_{92}$ |
|                           |                                      | Valori per unità C9                     |                                     |
| Gruppi metossilici        | 1.01                                 | 1.13                                    | 0.94                                |
| Legami $\beta$ -O-4       | 0,32                                 | 0,36                                    | 0,44                                |
| Legami $\beta$ -5'        | 0.097                                | 0,106                                   | 0,09-0,12                           |
| Legami $\beta$ - $\beta'$ | 0.035                                | 0,016                                   | 0,02                                |
| Legami 5-5'-O-4           | 0.019                                | 0,038                                   | Non determinato                     |

Tab. 2. Frequenza dei diversi legami intermonomerici in due diverse lignine softwood determinati mediante HSQC quantitativo.

diverse qualità di legni di tipo softwood ed hardwood e da piante annuali come la paglia di grano. I campioni di lignina sottoposti a derivatizzazione tramite acetobromurazione e successivamente analizzati tramite cromatografia per esclusione e light scattering hanno evidenziato il differente comportamento di aggregazione della lignina a seconda della sua provenienza. Le lignine da softwood presentano una propensione ad associare e dissociare maggiore rispetto a lignine di hardwood e di piante erbacee. Inoltre i processi di associazione/dissociazione sembrano dipendenti dal tempo d'invecchiamento dei campioni, indicando la tendenza dei sistemi a formare strutture supramolecolari più stabili in funzione del tempo di interazione. Favorendo condizioni di dissociazione in presenza di iodio, per interrompere le interazioni di  $\pi$  stacking (fig. 10) gli autori [21] hanno anche evidenziato un valore del peso molecolare medio per le singole catene di lignina molto basso rispetto a quanto riportato in precedenza, suggerendo un nuovo scenario per questo polimero, in cui una popolazione di oligomeri relativamente piccoli aggrega fortemente per costituire una struttura supramolecolare particolarmente stabile.

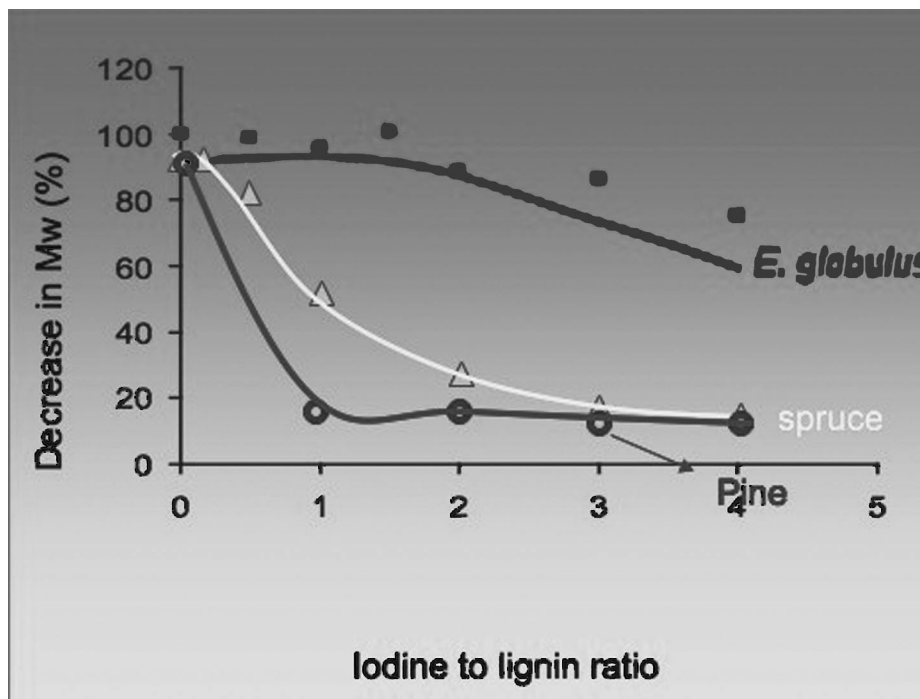


Fig. 11. Andamento del peso molecolare di differenti lignine al diminuire delle interazioni intermolecolari.

BIBLIOGRAFIA

- [1] Brunow, G. 1998. Oxidative coupling of phenols and the biosynthesis of lignin. In *Lignin and Lignan Biosynthesis*, ed. Lewis, N.G. & Sarkanen, S. American Chemical Society, Washington, DC, pp. 131-147.
- [2] Lin S., Dence C.W. (eds.) 1992. *Methods in lignin chemistry* (Springer series in wood science) Evtuguin D., Orlandi M., Crestini C., Baumberger S., Kilpelainem I. Argyropoulos D.S. 2007. An overview of the analytical tools in the quali/quantitative analysis of functional groups and interunit bondings in lignin. I. Functional groups determination. In: Abstract of COST workshop: Functional groups and surface analysis of wood and fibers. Rome, May 7-8, 2007.
- [3] Crestini C., Baumberger S., Kilpelainem I., Orlandi M., Evtuguin D., Argyropoulos D.S. 2007. An overview of the analytical tools in the quali/quantitative analysis of functional groups and interunit bondings in lignin. II. Interunit bondings characterisation In: Abstract of COST workshop: Functional groups and surface analysis of wood and fibers. Rome, May 7-8, 2007.
- [4] Crestini C., Orlandi M., Tolppa E.L., Zoia L., Saladino R. 2006. Characterisation of lignin by different spectroscopic and chromatographic techniques. In Abstract of the workshop: Progress of the COST E41 Joint analysis effort on wood and fiber characterisation Wien August 30- 31, 2006.
- [5] Crestini C., Orlandi M., Tolppa E.L., Zoia L., Saladino R. 2006. Combined HSQC, quantitative <sup>13</sup>C- and <sup>31</sup>P-NMR techniques in the characterisation of lignins. In: Abstracts of Progress of the COST E41 Joint analysis effort on wood and fiber characterisation April 12-13, 2006 Grenoble .
- [6] Granata A., Argyropoulos D.S. 1995. 2-Chloro-4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaphospholane, a reagent for the accurate determination of the uncondensed and condensed phenolic moieties in lignins. *J. Agric. Food Chem.*, 43, 1538-1544.
- [7] Argyropoulos D.S. 1994. Quantitative phosphorus-31 NMR analysis of lignins, a new tool for the lignin chemist. *J. Wood Chem. Technol.*, 14, 45-63.
- [8] Crestini C. and Argyropoulos D.S. 1997. Structural analysis of wheat straw lignin by quantitative <sup>31</sup>P and 2D NMR spectroscopy; The occurrence of ester bonds and a-O-4 substructures. *Journal Agricultural Food Chemistry*, 49(4), 1212-1219.
- [9] Crestini C., Giovannozzi Sermanni G., Argyropoulos D.S. 1998. Structural modifications induced during biodegradation of wheat lignin by *Lentinula edodes*. *Bioorganic. & Medicinal Chemistry* 6, 967-973.
- [10] Crestini C., Jurasek L., Argyropoulos D.S. 2003. On the Mechanism of the Laccase-Mediator System in the Oxidation of Lignin. *Chemistry A European Journal*. 9, 5371-5378.
- [11] Crestini C., Caponi M.C., Argyropoulos D.S., Saladino R. 2006. Heterogeneous methyltrioxo rhenium/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> systems for the oxidation of lignin and lignin model compounds, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 14(15), 5292-5302.
- [12] Crestini C., Pro P., Neri V., Saladino R. 2005. Methyltrioxorhenium: a new catalyst for the activation of hydrogen peroxide to the oxidation of lignin and lignin model compounds. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 13, 2569-2578.
- [13] Crestini C., Pastorini A., Tagliatesta P. 2004. The immobilized porphyrin-mediator system Mn(TmePyP)/Clay/HBT (clay-PMS): a lignin peroxidase biomimetic catalyst in the oxidation of lignin and lignin model compounds. *Eur. J. Inorg. Chem.* 22, 4477.
- [14] Crestini C., Pastorini A., Tagliatesta P. 2004. Metallo porphyrins immobilized on montmorillonite as biomimetic catalysts in the oxidation of lignin model compounds. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical* 208, 195-202.

- [15] Crestini C., Saladino R., Tagliatesta P., Boschi T. 1999. Biomimetic Degradation of Lignin and Lignin Model Compounds by synthetic Anionic and Cationic Water Soluble Manganese and Iron Porphyrins. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 7, 1897-1905.
- [16] Ahvazi B.C., Crestini C., Argyropoulos D.S. <sup>19</sup>F nuclear magnetic resonance spectroscopy for the quantitative detection and classification of carbonyl groups in lignins, 1999. *Journal Agricultural Food Chemistry* 47(1), 190-201.
- [17] Ede R.M., Brunow G. 1992. Application of two dimensional homo and heteronuclear correlation NMR spectroscopy to wood lignin structure determination. *J. Org. Chem.* 57,1477-1480.
- [18] Ede R.M., Kilpelainen I. 1995. Homo- and hetero-nuclear 2D NMR techniques: unambiguous structural probes for non-cyclic benzyl aryl ethers in soluble lignin samples. *Res. Chem. Intermed.* 21, 313-328.
- [19] Heikkinen S., Toikka M.M., Karhunen P.T., Kilpelainen I.A. 2003. Quantitative 2D HSQC (Q-HSQC) via Suppression of J-Dependence of Polarization Transfer in NMR Spectroscopy: Application to Wood Lignin. *Journal of the American Chemical Society*, 125, 4362-4367.
- [20] Crestini C. 2007. Il legno, cent'anni di studi strutturali. *La Chimica e L'Industria*, Italic 4. In stampa.
- [21] Guerra A., Gaspar A.R., Contreras S., Lucia L.A., Crestini C., Argyropoulos D.S. 2007. On the propensity of lignin to associate: A size exclusion chromatography study with lignin derivatives isolated from different plant species. *Phytochemistry*, in stampa.