

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FÍSICA

Análise quantitativa dos teores de lignina e celulose em
materiais de biomassa por RMN de ^{13}C no estado sólido

Daniel Fernandes Cipriano

Vitória, 2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FÍSICA

Análise quantitativa dos teores de lignina e celulose em
materiais de biomassa por RMN de ^{13}C no estado sólido

Daniel Fernandes Cipriano

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física do Centro de Ciências Exatas da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Física, na área de concentração em Física da Matéria Condensada.

Orientador: Prof. Dr. Jair Carlos Checon de Freitas

Vitória, 2015

Dedico aos meus pais José Elias Cipriano e Rosilda Fernandes Cipriano.

Agradecimentos

À Santíssima Trindade, fonte inesgotável de amor e razão de minha existência,

À minha família, por toda ajuda, compreensão, apoio, mas principalmente por todo aprendizado que pude obter até hoje ao viver em família.

Ao Prof. Dr. Jair Carlos Checon de Freitas, por toda orientação recebida, mas principalmente pela grandeza de alma que possui.

Ao Prof. Dr. Alfredo Gonçalves Cunha que me acolheu no LMC ainda na graduação como aluno de iniciação científica e que permanece contribuindo para minha formação.

À Dra. Sonia M. C. de Menezes e ao Dr. Luis S. Chinelatto Jr. por toda ajuda fornecida e pelo acompanhamento do trabalho.

A todos os professores do grupo de RMN da UFES.

Aos amigos de laboratório, Miguel, Thierry, Gustavo, Wanderson, Enrique, Mariana, Débora, Cristiane e Emanuelle por todo o apoio e pela presença amiga.

A toda equipe LMC/LPT pela ajuda e amizade ao longo destes últimos 2 anos.

Ao CENPES/PETROBRAS pelo apoio dado a este trabalho.

Ao CNPq, pela bolsa concedida, e à CAPES e à FAPES pelo apoio financeiro aos laboratórios envolvidos nesta pesquisa.

Ao NCQP pelo apoio com espaço físico e equipamentos para análise.

À UFES, pela oportunidade concedida.

“Se, portanto, ressuscitastes com Cristo, buscai as coisas lá do alto, onde Cristo está sentado à direita de Deus”

Colossenses 3,1

Sumário

Lista de Tabelas	viii
Lista de Figuras	ix
Lista de Abreviaturas	xiv
Resumo	xv
Abstract	xvi
1 Introdução	1
2 Os materiais lignocelulósicos	4
2.1 Aspectos estruturais dos materiais lignocelulósicos	4
2.1.1 Celulose	5
2.1.2 Hemicelulose	8
2.1.3 Lignina	9
2.2 Determinação dos componentes lignocelulósicos: importância e aplicação. .	10
2.2.1 Produção de carvão vegetal e madeira prensada	13
2.2.2 Produção agropecuária	14
2.2.3 Produção de bioetanol	15

3	Fundamentos de RMN	18
3.1	Aspectos gerais	18
3.2	O efeito Zeeman nuclear	20
3.3	Perturbação e relaxação do sistema de spins	25
3.4	Interações de spin nuclear	33
3.5	Técnicas de alta resolução em RMN de sólidos	38
3.5.1	Rotação em torno do ângulo mágico (MAS)	38
3.5.2	Desacoplamento heteronuclear de alta potência	40
3.5.3	Polarização cruzada (CP)	41
3.6	A RMN aplicada ao estudo de materiais lignocelulósicos	49
4	Objetivos	55
5	Materiais e métodos	56
5.1	Materiais utilizados	56
5.1.1	Padrões de celulose e lignina	56
5.1.2	Materiais de biomassa	57
5.2	Metodologia Klason	58
5.3	Metodologia de quantificação por RMN	59
5.4	Tratamentos ácidos	62
5.5	Análise por termogravimetria	63
6	Resultados e Discussão	64
6.1	Aspectos gerais das análises quantitativas em espectros de RMN de ^{13}C CP/MAS	64
6.1.1	Experimentos de variação de tempo de contato (VCT)	64

6.1.2	Aplicação do defasamento dipolar na determinação de lignina . . .	65
6.1.3	Variação na quantidade de amostra do rotor e sua influência na intensidade espectral	70
6.2	Construção e validação do modelo de quantificação	72
6.2.1	Identificação e deconvolução dos picos presentes no espectro de RMN	72
6.2.1.1	Amostras Padrões	72
6.2.1.2	Materiais de Biomassa	73
6.2.2	Curvas de calibração	75
6.2.3	Avaliação da incerteza nas intensidades obtidas por deconvolução espectral	78
6.2.4	Validação do modelo	81
6.3	Aplicação no estudo de amostras quimicamente tratadas	85
6.4	Análise de diferentes padrões de lignina	91
6.5	Critérios de aplicabilidade do método em diferentes materiais de biomassa	95
	Referências Bibliográficas	100

Lista de Tabelas

5.1.1 Amostras padrões de lignina analisadas	57
5.2.1 Teores de lignina, holocelulose e extrativos, em base seca, dos materiais de biomassa utilizados.	58
5.3.1 Frações em massa de celulose e lignina nas misturas preparadas	61
6.1.1 Parâmetros obtidos por regressão linear dos pontos experimentais associa- dos à intensidade do sinal em três situações diferentes de empacotamento.	72
6.2.1 Intensidades absolutas dos sinais deconvoluídos do espectro de RMN de ^{13}C CP/MAS obtidos em triplicata para a mistura Cel_Lig_1_1	81
6.2.2 Teores de lignina obtidos por RMN de ^{13}C CP/MAS para diferentes mate- riais lignocelulósicos.	82
6.2.3 Teores de celulose ordenada (C4_o) e holocelulose (C4 ou C2,3,5) obtidos por RMN de ^{13}C CP/MAS para diferentes materiais lignocelulósicos.	82
6.3.1 Teores previstos pelo método de quantificação desenvolvido, aplicado para as amostras de bagaço de cana submetidas a tratamentos ácidos.	91

Lista de Figuras

2.1.1 Esquema ilustrativo da estrutura dos materiais lignocelulósicos.	5
2.1.2 Representação de uma cadeia formada por várias unidades de glicose ligadas por ligações β -1,4-glicosídicas.	6
2.1.3 Representação da secção transversal e longitudinal de uma microfibrila de celulose	7
2.1.4 Estrutura cristalina da celulose I.	8
2.1.5 Estrutura química de alguns dos açúcares constituintes da hemicelulose	9
2.1.6 Estrutura molecular presente na hemicelulose, com maior predominância de unidades de xilose.	10
2.1.7 Unidades básicas de fenil-propano precursoras da lignina.	11
2.1.8 Estrutura macromolecular da lignina de coníferas.	11
3.1.1 Ilustração artística do fenômeno de ressonância.	19
3.2.1 Precessão do momento de um núcleo como o ^{13}C na presença de um campo externo.	23
3.2.2 Diagrama dos níveis de energia dos spins nucleares sob a ação do campo magnético, para o caso $I = 1/2$ e $\gamma > 0$	24
3.3.1 Representação esquemática do movimento da magnetização decorrente da aplicação do campo \vec{B}_1	27
3.3.2 Sinal elétrico detectado em um experimento de RMN	28

3.3.3	Evolução da magnetização após a aplicação de um pulso de 90°	29
3.3.4	Transformada de Fourier do FID	30
3.3.5	Representação da blindagem magnética decorrente da circulação eletrônica induzida por \vec{B}_0	32
3.4.1	Ângulos polar e azimutal que localizam o campo externo no SEP do tensor de deslocamento químico.	36
3.4.2	Diference orientações do SEP do tensor de deslocamento químico da molé- cula de CO_2 em relação ao sistema de eixos do laboratório.	36
3.4.3	Interação dipolar entre dois núcleos vizinhos.	37
3.5.1	Efeito da técnica de MAS para a interação dipolar entre os núcleos de ^{13}C e ^1H	39
3.5.2	Desacoplamento dipolar heteronuclear para o caso do par de spins ^1H - ^{13}C	41
3.5.3	Representação artística do processo de polarização cruzada.	45
3.5.4	Curvas teóricas de variação do tempo de contato para $T_{1\rho\text{H}} = 5\text{ ms}$	47
3.5.5	Sequência de pulso de um experimento de CP-rampa	48
3.5.6	Sequência de pulso do experimento de CPDD	48
3.6.1	Espectro de RMN de ^{13}C CP/MAS da celulose proveniente de fibras de algodão, deconvoluído por Larsson e colaboradores	53
3.6.2	Espectro de RMN de ^{13}C CP/MAS da polpa de bétula branquiada obtido por Wickholm	54
5.1.1	Fórmula molecular relativa aos padrões de celulose (a) e lignina (b) utili- zados na calibração dos sinais	56
5.1.2	Fórmula molecular relativa a amostra de Lignina B	57
5.3.1	Espectrômetro utilizado nos experimentos de RMN.	60

5.3.2 Arranjos experimentais do rotor avaliados em busca de melhores condições de quantificação. As letras (a), (b) e (c) indicam os espaços disponíveis para o empacotamento de amostra nos respectivos rotores	62
6.1.1 Espectro de RMN de ^{13}C CP/MAS para a amostra BC1	66
6.1.2 Variação do tempo de contato para os carboidratos	67
6.1.3 Resultados obtidos com os experimentos com variação de tempo de contato para o pico de 56 ppm associado à lignina presente no espectro de RMN de ^{13}C CP/MAS do bagaço de cana. As linhas sólidas são ajustes dos pontos experimentais pela equação 3.5.7.	67
6.1.4 Espectros de RMN de ^{13}C registrados com CP/MAS e CPDD/MAS para lignina, celulose e misturas de ambas.	69
6.1.5 Calibração da intensidade do sinal de RMN em função da massa de lignina para diferentes quantidades de amostra no rotor	71
6.2.1 Espectro de RMN de ^{13}C CP/MAS obtido para uma amostra de celulose padrão.	73
6.2.2 Espectro de RMN de ^{13}C CP/MAS obtido para uma amostra de lignina padrão.	74
6.2.3 Comparação dos espectros de RMN de ^{13}C CP/MAS para os padrões de celulose e lignina utilizados.	74
6.2.4 Espectro de RMN de ^{13}C CP/MAS obtido para a amostra BC1.	75
6.2.5 Espectro de RMN de ^{13}C CP/MAS obtido para a amostra BC2.	76
6.2.6 Espectro de RMN de ^{13}C CP/MAS obtido para a amostra LC1.	76
6.2.7 Espectro de RMN de ^{13}C CP/MAS obtido para a amostra LC2.	77
6.2.8 Espectro de RMN de ^{13}C CP/MAS obtido para a amostra de CPA.	77
6.2.9 Espectro de RMN de ^{13}C CP/MAS obtido para a amostra MPW.	78
6.2.10 Curva de calibração do teor de celulose a partir da área total da região C4.	79

6.2.11	Curva de calibração do teor de celulose considerando apenas a área da região C _{4_o}	79
6.2.12	Curva de calibração do teor de lignina a partir da área C _{56ppm} do pico associado à metoxila.	80
6.2.13	Curva de calibração do teor de celulose a partir da área associada aos carbonos C _{2,3,5} da celulose.	80
6.2.14	Comparação entre os resultados obtidos para o teor de lignina pelo método de análise quantitativa aqui apresentado (RMN) e pelo método Klason, para os materiais de biomassa analisados, em comparação com a Função Identidade (FI).	83
6.2.15	Comparação entre os resultados obtidos para o teor de celulose ordenada pelo método de análise quantitativa aqui apresentado (RMN C _{4_o}) e pelo método Klason, para os materiais de biomassa analisados, em comparação com a Função Identidade (FI).	83
6.2.16	Comparação entre os resultados obtidos para o teor de holocelulose pelo método de análise quantitativa aqui apresentado (RMN C ₄) e pelo método Klason, para os materiais de biomassa analisados, em comparação com a Função Identidade (FI).	84
6.2.17	Comparação entre os resultados obtidos para o teor de holocelulose pelo método de análise quantitativa aqui apresentado (RMN C _{2,3,5}) e pelo método Klason, para os materiais de biomassa analisados, em comparação com a Função Identidade (FI).	84
6.3.1	Espectros de RMN de ¹³ C CP/MAS obtidos para amostras de bagaço de cana submetidas a diferentes tempos de tratamento ácido. Ampliação do espectro na região dos carbonos C _{2,3,5} da celulose	86
6.3.2	Espectros de RMN de ¹³ C obtidos para amostras de bagaço de cana submetidas a diferentes tempos de tratamento ácido. Ampliação do espectro na região do carbono C ₄ da celulose.	87

6.3.3 Espectros de RMN de ^{13}C obtidos para amostras de bagaço de cana submetidas a diferentes tempos de tratamento ácido. Ampliação do espectro na região do carbono C6 da celulose e do pico de 56 ppm da lignina.	87
6.3.4 Espectros de RMN de ^{13}C obtidos para amostras de bagaço de cana submetidas a diferentes tempos de tratamento ácido. Ampliação do espectro na região dos grupos metila associados a hemicelulose e de grupos do tipo metileno.	88
6.3.5 (a) Evolução com o tempo de tratamento ácido das intensidades devidas a toda região associada ao carbono 4 (C4_{total}) e às formas ordenadas (C4_o) e desordenadas (C4_d) de celulose nas amostras de bagaço de cana submetidas a diferentes tempos de tratamento ácido. (b) Evolução com o tempo de tratamento ácido da intensidade do pico em 56 ppm, característico da lignina nas mesmas amostras. As linhas que ligam os pontos são apenas guias para os olhos.	90
6.4.1 Curva de TG obtida em atmosfera oxidante das amostras de Lignina A, Lignina B, Lignina C, BC1 e CPA.	94
6.4.2 Espectro de RMN de ^{13}C CP/MAS obtido para os três padrões de lignina analisados.	94
6.5.1 Espectro de RMN de ^{13}C CP/MAS e CPDD/MAS para uma amostra de farelo de mamona em (a) e madeira de pinho em (b). O tempo de defasamento foi de 0,25 ms.	96

Lista de Abreviaturas

RMN - Ressonância magnética nuclear

SEP - Sistema de eixos principais

RF - Radiofrequência

MAS - Rotação em torno do ângulo mágico (do inglês "*Magic Angle Spinning*")

CP - Polarização cruzada (do inglês "*Cross Polarization*")

LMC - Laboratório de Materiais Carbonosos e Cerâmicos

NCQP - Núcleo de Competência em Química do Petróleo

TG - Termogravimetria

SPE - Excitação com pulso simples (do inglês "*Single Pulse Excitation*")

FID - Decaimento livre de indução

DD - Defasamento Dipolar

IC - Índice de cristalinidade

CPDD - Polarização cruzada com defasamento dipolar

Resumo

Este trabalho é dedicado ao estudo e desenvolvimento de um método experimental que permita a utilização de ressonância magnética nuclear (RMN) de ^{13}C no estado sólido com polarização cruzada (CP) e rotação em torno do ângulo mágico (MAS) para a obtenção de teores de lignina e celulose presentes em materiais lignocelulósicos. A validade do método foi testada em diferentes materiais de biomassa por comparação com os resultados obtidos pelo método de quantificação Klason. O método desenvolvido também foi utilizado em um estudo comparativo de amostras de bagaço de cana submetidas a diferentes tempos de tratamento ácido. Para desenvolvimento do método, foram realizados experimentos com amostras padrões de celulose e lignina e misturas desses materiais em proporções previamente conhecidas. Após a obtenção dos espectros de RMN de ^{13}C com CP/MAS, foram construídos gráficos relacionando a intensidade de regiões selecionadas do espectro com a massa da componente responsável por tal intensidade. Foi observado que os teores de lignina obtidos para a maioria dos materiais de biomassa analisados concordaram com o teor determinado diretamente por análise química; já o teor de celulose não foi corretamente previsto, possivelmente devido a sobreposições com sinais de hemicelulose nos espectros. Com respeito às amostras de bagaço de cana submetidas a tratamentos ácidos, foi observado um crescimento no teor de lignina nas amostras com maior tempo de tratamento, o que ocorreu também para a fração de celulose estruturalmente mais ordenada.

Palavras-chave: RMN no estado sólido; Materiais lignocelulósicos; Análises Quantitativas

Abstract

This work is dedicated to the study and development of an experimental method that allows the use of solid state ^{13}C nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy, with cross polarization (CP) and magic angle spinning (MAS), to determine the lignin and cellulose contents in lignocellulosic materials. The validity of the method was tested on different biomass materials by comparison to the corresponding contents obtained by the Klason method. The method was also used in a comparative study of sugarcane bagasse samples subjected to acid treatments for different times. For the development of the method, standard samples of cellulose and lignin as well as mixtures of both materials in known proportions were analyzed by ^{13}C CP/MAS NMR. After acquiring the NMR spectra, graphs were constructed relating the intensity of selected spectral regions to the mass of the component responsible for that intensity. It was observed that the lignin contents of most of the analyzed lignocellulosic materials agreed well with the contents determined directly by chemical analysis. On the other hand, the cellulose contents were not correctly predicted, possibly due to the overlap of hemicellulose and cellulose signals in the NMR spectra. Regarding the acid-treated sugarcane bagasse samples, an increase in the lignin contents of the samples subjected to longer acid treatments was observed, concomitantly with the increase in the fraction of structurally ordered cellulose.

Keywords: *Solid-state NMR; Lignocellulosic materials; Quantitative analysis*

Capítulo 1

Introdução

A biomassa lignocelulósica é a matéria prima orgânica mais abundante em nosso planeta. Disponível em distintas formas, ela é uma fonte renovável de recursos a serem utilizados de maneira sustentável em benefício da sociedade moderna. Há tempos o homem utiliza-se desses materiais a fim de manter a sua sobrevivência, mas é de se notar que nos últimos séculos a sua utilização tem se intensificado, principalmente com o desenvolvimento tecnológico e industrial [1].

Dos vários materiais que constituem a biomassa lignocelulósica disponível no planeta, podemos citar exemplos de gramíneas, como as pastagens e o capim-elefante utilizados na alimentação de animais e também as culturas agrícolas de milho e cana de açúcar utilizadas na alimentação humana e animal, e mais recentemente, também, na produção de etanol [2,3]. Também podem ser citados as diferentes espécies de árvores que compõem o que pode ser chamado de biomassa florestal e pelas suas características próprias tem grande utilidade na produção de carvão vegetal e madeiras de corte [4].

Nos últimos anos, uma nova aplicação para os materiais lignocelulósicos vem sendo estudada por cientistas do mundo inteiro, que consiste na utilização da biomassa lignocelulósica disponível no planeta para a produção de etanol celulósico. Sabe-se que o Brasil e os EUA são os maiores produtores de etanol, provenientes respectivamente da sacarose presente no caldo da cana-de-açúcar e do amido presente nos grãos de milho [5]. No entanto o aumento da produção de etanol a partir dessas duas matérias primas encontra

barreiras em limites éticos e sócio-econômicos impostos para que o seu cultivo não comprometa a produção de alimentos. Nesse contexto e com a possível escassez de recursos energéticos provenientes de fontes não renováveis, a produção de etanol a partir da celulose presente na estrutura das plantas tem atraído a atenção da comunidade científica internacional [6, 7].

Resíduos agrícolas como o bagaço e a palha de cana, a palha de milho, de arroz, de trigo, são exemplos de materiais de biomassa em potencial para produção do combustível celulósico, capazes de ampliar consideravelmente a produção de etanol sem a ampliação das lavouras já existentes [7, 8]. No Brasil, por exemplo, o reconhecimento do etanol proveniente do caldo da cana-de-açúcar como fonte potencial de energia sustentável tem gerado também uma maior quantidade de bagaço de cana que por sua vez pode ser utilizado na produção do bioetanol [9, 10]. Além de resíduos agrícolas, materiais de biomassa florestais, como a madeira do tronco de árvores, são também fonte do biocombustível celulósico, sendo conveniente até mesmo a utilização da madeira proveniente do desbaste das árvores [5, 6, 11].

Dentre todas as aplicações possíveis para a biomassa lignocelulósica, observa-se a necessidade unânime da determinação dos teores dos três principais constituintes desses materiais: a celulose, a hemicelulose e a lignina. Essa determinação é feita frequentemente através de metodologias que usam reagentes químicos com o objetivo de se separar e quantificar o teor de cada um dos componentes [12–14]. Também há relatos na literatura de análises espectroscópicas utilizadas na caracterização e determinação desses teores, dentre as quais destacam-se a espectrofotometria de absorção na região do ultravioleta-visível e a espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) [15, 16].

A espectroscopia de RMN tem sido muito utilizada no estudo desses materiais, e por ser uma técnica espectroscópica de caráter quantitativo, existem alguns estudos que reportam a quantificação dos teores lignocelulósicos por meio desta técnica [17, 18]. Seguindo essa mesma linha de pesquisa, pretende-se nesse trabalho, avaliar a aplicabilidade de técnicas de alta resolução de RMN de ^{13}C no estado sólido para quantificação dos componentes lignocelulósicos. A partir de amostras padrões comerciais de celulose e lig-

nina, pretende-se elaborar curvas de calibração que relacionem a massa e a intensidade de sinais nos espectros de RMN característicos de cada um dos dois padrões utilizados. Paralelamente, pretende-se monitorar a contribuição da hemicelulose nos espectros de RMN obtidos para amostras de bagaço de cana submetidas a diferentes tempos de tratamento ácido.

O capítulo 2 deste trabalho tem por objetivo apresentar uma breve revisão sobre a composição, utilização e caracterização dos materiais lignocelulósicos. Nesse capítulo, é feita uma revisão sobre os três principais componentes lignocelulósicos, celulose, hemicelulose e lignina, visto que o conhecimento estrutural desses componentes é de fundamental importância para discussão e interpretação dos resultados. Ainda nesse capítulo busca-se justificar a necessidade do desenvolvimento de uma técnica de quantificação dos componentes lignocelulósicos de maneira mais rápida e fácil do que as atualmente utilizadas.

No capítulo 3 são apresentados fundamentos de RMN e discutidos os parâmetros de validade do método de quantificação desenvolvido a partir de técnicas de alta resolução, dentre as quais a polarização cruzada exige peculiar atenção, visto que esta técnica não pode ser considerada quantitativa em primeira análise. O capítulo 4 é dedicado à apresentação dos objetivos deste trabalho e o 5 à apresentação da metodologia proposta e dos materiais e equipamentos utilizados. No capítulo 6 são apresentados e discutidos os resultados obtidos e no capítulo 7 são apresentadas as conclusões finais e perspectivas futuras do trabalho.

Capítulo 2

Os materiais lignocelulósicos

2.1 Aspectos estruturais dos materiais lignocelulósicos

Os materiais lignocelulósicos são a matéria orgânica renovável mais abundante na superfície de nosso planeta, tendo como principais componentes a celulose, a hemicelulose e a lignina, juntamente com uma pequena parcela de cinzas (substâncias inorgânicas) e extrativos (substâncias orgânicas de baixo peso molecular). Esses componentes estão presentes nas paredes celulares das plantas, como apresentado na Figura 2.1.1, com frações distintas e que podem variar dependendo da idade, fase de desenvolvimento, tipo de espécie vegetal, além de outros possíveis fatores. No caule das árvores, por exemplo, há percentualmente em massa cerca de 40-55 % de celulose, 24-40 % de hemicelulose e 18-25 % de lignina, podendo este último componente chegar a 30 % para madeiras mais resistentes [19,20]. Para o bagaço de cana são apresentados na literatura valores típicos de 40-50% de celulose, 15-25% de lignina e 30-35 % de hemicelulose [21]. Esses materiais, entretanto, possuem estruturas altamente complexas devido às características químicas e morfológicas dos seus componentes e à forma como esses componentes se ligam para formar o material lignocelulósico. Isso, por exemplo, torna difícil a sua decomposição a fim de se aproveitar as propriedades individuais de cada um dos seus constituintes. Nas subseções seguintes, é apresentada uma breve revisão sobre algumas das principais características dos três principais componentes lignocelulósicos.

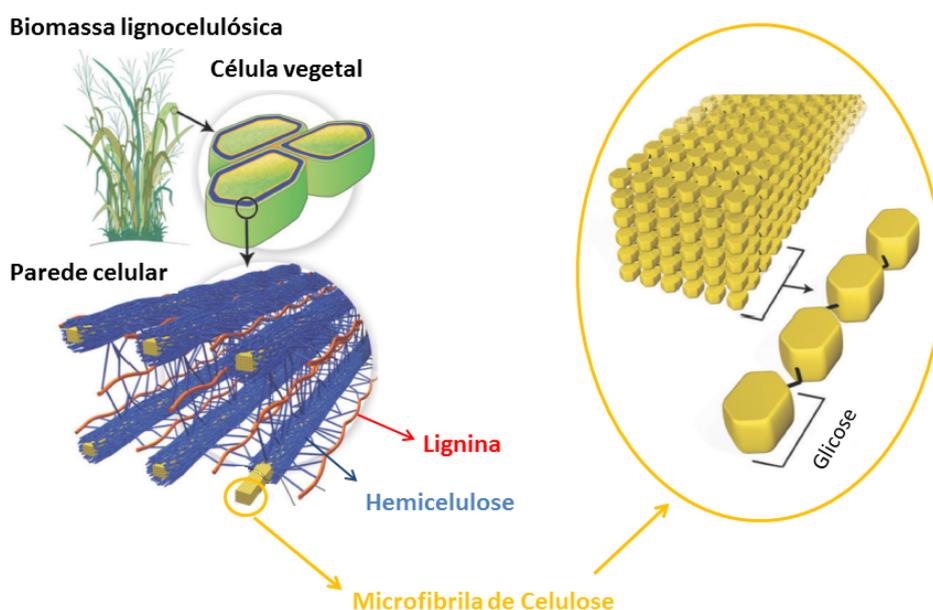


Figura 2.1.1: Esquema ilustrativo da estrutura dos materiais lignocelulósicos. Adaptado de [10].

2.1.1 Celulose

A celulose é um carboidrato de função estrutural responsável pela sustentação das estruturas das plantas, fornecendo resistência e rigidez as mesmas. Produzida a partir da fotossíntese, ela é formada por imensas cadeias lineares de glicose, que chegam a conter de dez a quinze mil unidades do monômero. Esta estrutura retilínea, diferente da estrutura do amido que possui uma arquitetura helicoidal, é decorrente do tipo de ligação existente entre as moléculas de glicose, denominada ligação β -1,4-glicosídica. Na celulose, esta interação entre o carbono 1 e o carbono 4 de duas moléculas distintas de glicose leva o sistema a uma condição de mínima energia quando cada subunidade de glicose está girada em 180° com relação as unidades vizinhas, o que permite a formação das extensas cadeias lineares que compõem a celulose, como pode ser observado esquematicamente na Figura 2.1.2 [22, 23].

Estas longas estruturas de glicose em uma arquitetura retilínea, como sugerido na Figura 2.1.2, favorecem a junção de várias cadeias distintas paralelamente, através de pontes de hidrogênio, o que dá origem às microfibrilas de celulose. Este caráter linear estrutural maximiza a ocorrência das pontes de hidrogênio entre cadeias, o que confere

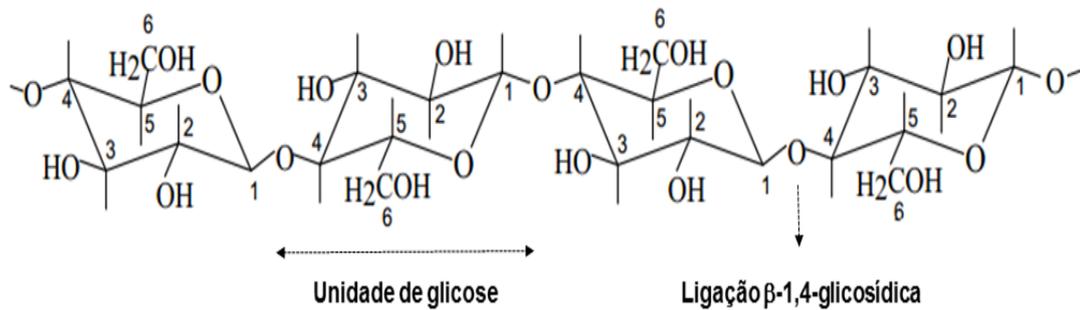


Figura 2.1.2: Representação de uma cadeia formada por várias unidades de glicose ligadas por ligações β -1,4-glicosídicas. Adaptado de [13]

às microfibrilas de celulose uma estrutura organizada de caráter cristalino, insolúvel em água, com grande resistência a tratamentos químicos e biológicos, além de conferir grande resistência mecânica às fibras de celulose, responsáveis pela sustentação das plantas [14, 23, 24].

Na Figura 2.1.3 pode-se observar esquematicamente que o grau de cristalinidade diminui à medida que as cadeias de glicose se afastam da região central da microfibrila, de forma que das 36 cadeias lineares que se unem para formar a microfibrila, apenas uma parte encontra-se em alto grau de cristalinidade e é denominada celulose cristalina, enquanto o restante encontra-se em um menor grau de cristalinidade, muitas vezes denominada celulose desordenada ou amorfa [25]. Também pode ser observado na Figura 2.1.3 que as regiões de alta cristalinidade não se estendem de forma contínua ao longo de toda extensão da microfibrila, mas que possivelmente há regiões que se intercalam entre amorfa e cristalina, dando origem a nanocristais de celulose [26].

As microfibrilas de celulose podem ser observadas em diferentes arranjos cristalinos, o que dá origem a vários polimorfos de celulose (I, II, III, IV). Dentre as diferentes estruturas cristalinas observadas para a celulose, a estrutura associada à celulose I (celulose nativa) é encontrada nos diversos materiais de biomassa existentes na natureza, enquanto as estruturas associadas à celulose II, III e IV são obtidas sinteticamente, por modificações químicas na celulose nativa [25, 26]. Na celulose I, também é possível observar

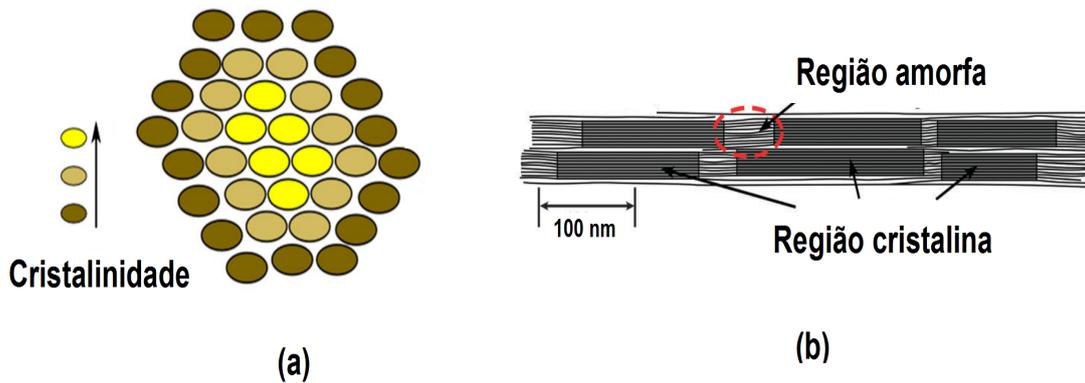


Figura 2.1.3: (a) Representação da secção transversal de uma microfibrila de celulose indicando a variação no grau de cristalinidade na mesma. Adaptado de [32]. (b) Representação longitudinal de uma microfibrila indicando a ocorrência de regiões cristalinas e amorfas. Adaptado de [26].

dois sistemas cristalinos distintos, uma estrutura triclinica (celulose I_α) e uma estrutura monoclinica (celulose I_β), que estão relacionados às interações entre cadeias de glicose vizinhas [27, 28]. Ambas estruturas podem ser assemelhadas a um paralelepípedo com os três lados distintos, mas com um ângulo diferente de 90° na estrutura monoclinica e com os três ângulos diferentes de 90° na estrutura triclinica [29]. Dentre esses dois polimorfos, a celulose I_β é mais estável, podendo a celulose I_α ser convertida em I_β por tratamentos térmicos em solução alcalina [26, 30].

Como pode ser observado na Figura 2.1.4 esta diferença entre os ângulos na célula unitária dos dois sistemas (I_α e I_β) acarreta uma diferença na organização das cadeias lineares de glicose, ocasionando um deslocamento de $+c/4$ entre cadeias na estrutura triclinica e um deslocamento alternado entre $+c/4$ e $-c/4$ na estrutura monoclinica, onde c é o parâmetro da célula unitária tomado ao longo da direção longitudinal das microfibrilas. Os parâmetros da célula unitária do sistema triclinico são $a = 0,672$ nm, $b = 0,596$ nm, $c = 1,040$ nm, $\alpha = 118,08^\circ$, $\beta = 114,801^\circ$, $\gamma = 80,3751^\circ$; e os parâmetros da célula unitária do sistema monoclinico são $a = 0,778$ nm, $b = 0,820$ nm, $c = 1,038$ nm, $\gamma = 96,51^\circ$ [26, 31].

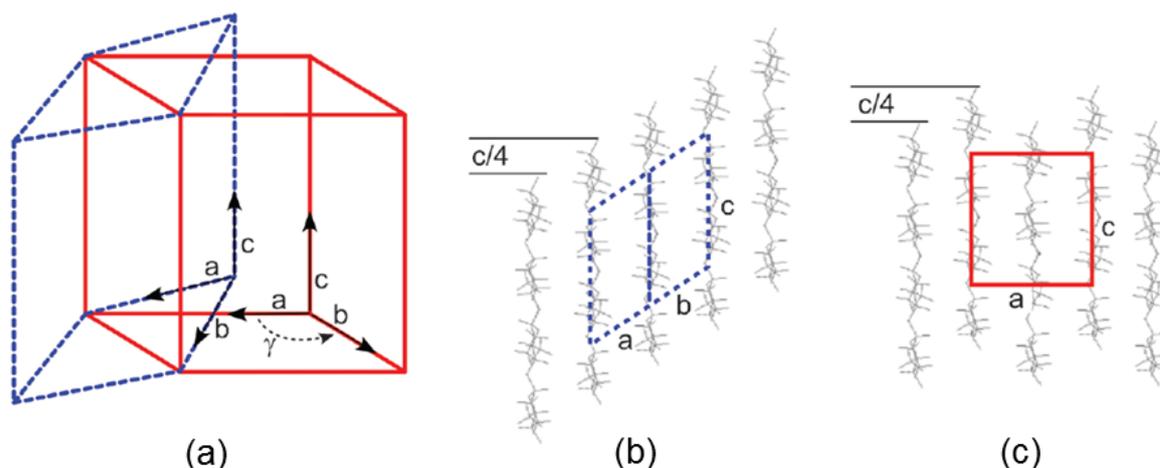


Figura 2.1.4: Estrutura cristalina da celulose I. (a) Comparação entre os sistemas cristalinos monoclínico (linha cheia) e triclínico (linha tracejada). (b) Enquanto na estrutura triclínica há um deslocamento entre cadeias por um fator $+c/4$, (c) na estrutura monoclínica este deslocamento se alterna entre $+c/4$ e $-c/4$, onde c é um parâmetro da célula unitária associada a estas estruturas [26].

2.1.2 Hemicelulose

Enquanto a celulose é um polissacarídeo formado unicamente por repetidas unidades de glicoses, a hemicelulose, também conhecida como poliose, é um polissacarídeo formado por diferentes unidades básicas de açúcares, em proporções variadas, compondo uma estrutura ramificada e com elevado grau de desordem estrutural, o que leva ela em muitos casos a ser classificada como amorfa. Presente na parede celular das plantas, a hemicelulose é encontrada envolvendo as microfibrilas de celulose, como apresentado na Figura 2.1.1, sendo em muitos casos o segundo maior constituinte da parede celular vegetal [13,33].

Como já mencionado, as quantidades e os tipos de açúcares de hemicelulose podem variar para diferentes materiais de biomassa. No bagaço de cana, por exemplo o principal açúcar constituinte da hemicelulose é a xilose. Em algumas madeiras de coníferas também conhecidas como *softwood*, como o pinheiro, por exemplo, há na hemicelulose uma proporção maior de açúcares de manose e galactose, já em madeiras folhosas conhecidas como *hardwood*, como o cedro, há maior ocorrência de xilose e grupos acetila. Na Figura 2.1.5 são apresentadas as estruturas moleculares de alguns dos diferentes açúcares que

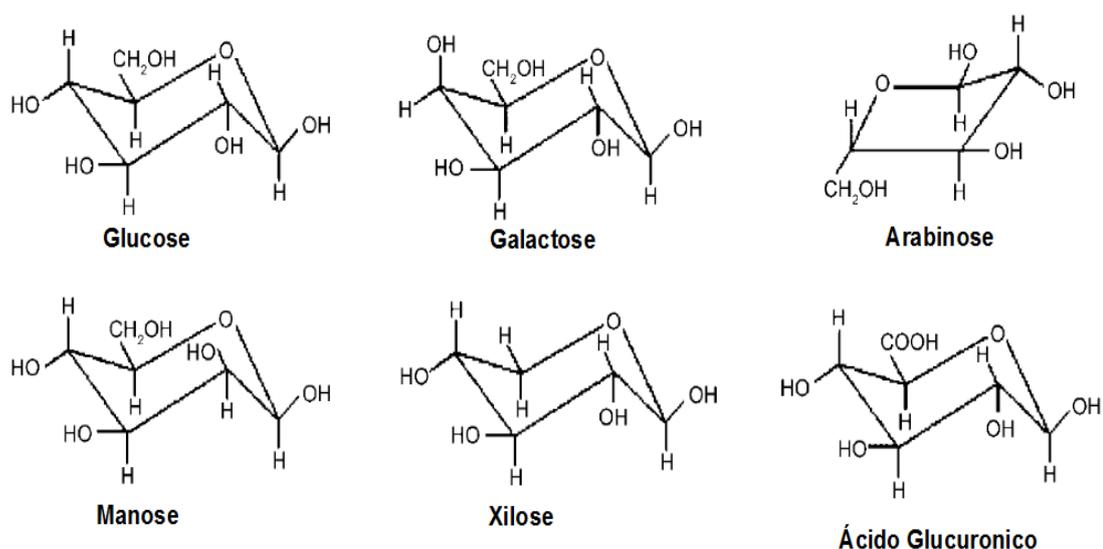


Figura 2.1.5: Estrutura química de alguns dos açúcares constituintes da hemicelulose. Adaptado de [33].

podem compor a hemicelulose e na Figura 2.1.6 é apresentada uma possível ligação entre estas estruturas, considerando uma maior ocorrência de unidades de xilose [5, 14, 34, 35].

2.1.3 Lignina

A lignina é um complexo molecular constituído predominantemente por anéis aromáticos, de estrutura tridimensional, ramificada e amorfa. Presente em quase todas as espécies vegetais, a lignina encontra-se na parede celular associada aos açúcares de hemicelulose, como visto na Figura 2.1.1, através de ligações covalentes, atuando como um componente ligante entre as células. Em analogia à construção civil, podemos citar a lignina como um “cimento” que une as estruturas celulares, fornecendo também resistência mecânica, e auxiliando no transporte de nutrientes e água [36]. No processo de formação da célula, a lignina é o último componente adicionado à parede celular e, juntamente com a hemicelulose, envolve as microfibrilas de celulose dando rigidez à parede celular. Esta estrutura amorfa é altamente resistente à ação química e biológica, atuando até mesmo como barreira de proteção à ação de microrganismos nas plantas [13, 20, 37].

A lignina é constituída basicamente por três possíveis unidades de fenil-propano,

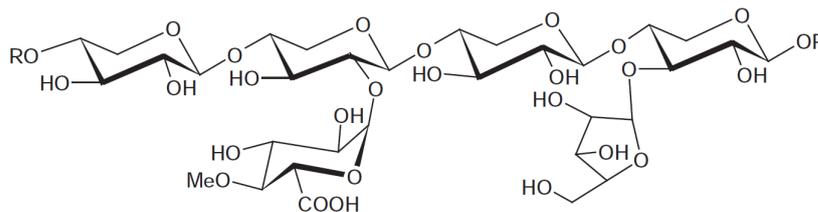


Figura 2.1.6: Estrutura molecular presente na hemicelulose com predominância de unidades de xilose [20].

apresentadas na Figura 2.1.7. Estas unidades, são compostas basicamente por seis carbonos sp^2 em um anel aromático e três carbonos sp^3 em uma cadeia linear ligada ao primeiro carbono do anel. O que torna diferente as três unidades é a presença de um grupo metoxil ligado a um carbono de hibridização sp^2 , possivelmente nas posições 3 e 5 do anel. Como pode ser visto na Figura 2.1.7, essas unidades precursoras da lignina podem ser classificadas como: unidade siringila se há a ocorrência de dois grupos metoxil, unidade guaiacila se há ocorrência de apenas um grupo metoxil, unidade p-hidroxifenila se não houver grupo metoxil ligado ao anel [12, 14, 34].

A composição final da lignina formada a partir destas três unidades básicas pode variar dependendo do tipo de material lignocelulósico analisado, isto porque o percentual individual de cada uma das três unidades é variável de um material para outro. De forma geral, madeiras mais macias possuem uma maior quantidade de unidades guaiacila, enquanto em madeiras mais duras há um balanço entre unidades guaiacila e siringila. Em muitas gramíneas é possível encontrar também unidades p-hidroxifenila, além das outras duas [3, 13, 38]. A Figura 2.1.8 apresenta uma possível estrutura para a macromolécula de lignina de coníferas, onde há predominância de unidades guaiacila [39, 40].

2.2 Determinação dos componentes lignocelulósicos: importância e aplicação.

Como previamente discutido, no material lignocelulósico uma matriz constituída de microfibrilas de celulose com maior grau de ordenação estrutural é envolvida por uma

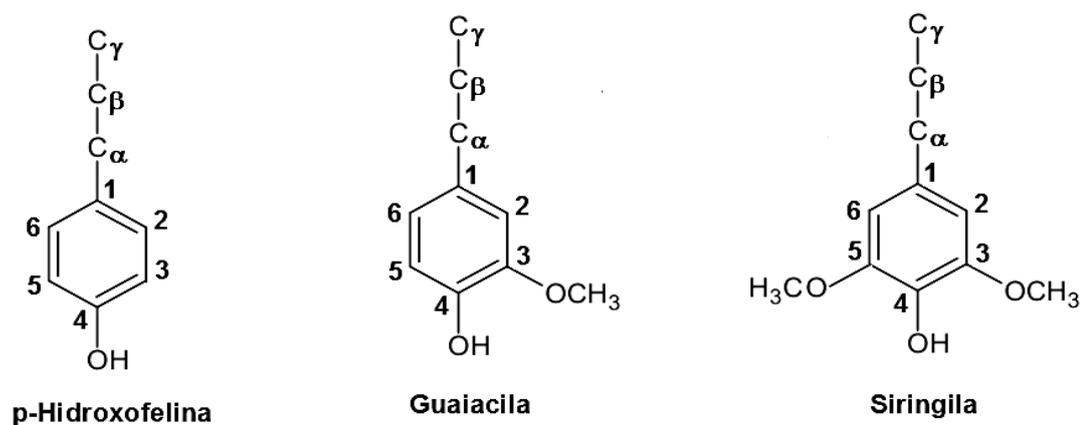


Figura 2.1.7: Unidades básicas de fenil-propano precursoras da lignina.

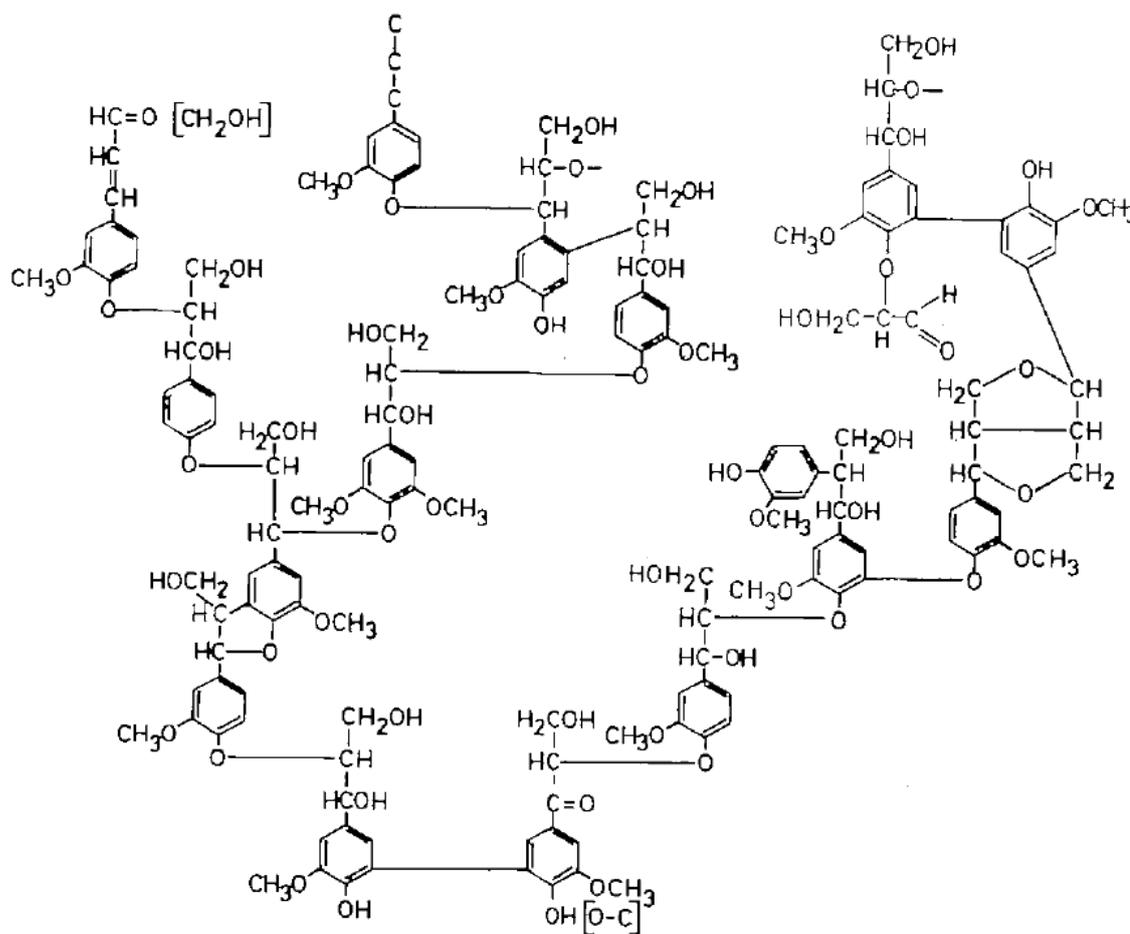


Figura 2.1.8: Estrutura macromolecular da lignina de coníferas, onde há predominância de unidades guaiacila [39].

matriz mais desordenada de hemicelulose e lignina. Nessa estrutura, a celulose cristalina, bem como a lignina, possui maior resistência a tratamentos tanto químicos como biológicos, enquanto os açúcares de hemicelulose podem ser mais facilmente removidos. Essa característica, também conhecida como recalcitrância da biomassa lignocelulósica, dificulta não só os processos de separação desses componentes, mas até mesmo as análises que visam quantificá-los, exigindo muitas vezes o uso de métodos nos quais a amostra é submetida a minuciosos processos de tratamento químico capazes de estimar os teores dos componentes lignocelulósicos [8, 41, 42].

Para determinação do teor de lignina, por exemplo, um procedimento químico frequentemente utilizado é o método Klason, e o teor obtido, denominado lignina Klason, consiste na razão entre a massa residual obtida no fim do processo e a massa de amostra utilizada [15]. Nesse método, a amostra é submetida a um tratamento em solução com alta concentração de ácido sulfúrico, de forma que após a conclusão de todo o processo, obtenha-se por filtragem uma massa composta somente pela lignina e cinzas presente na amostra estudada [12, 43]. Outros métodos também podem ser adotados para quantificação dos teores lignocelulósicos, os quais fazem uso de outros reagentes ou até mesmo de espectroscopia ótica ou ressonância magnética nuclear de alta resolução em sólidos [3, 41, 44].

Os parágrafos seguintes desta seção apresentam algumas áreas de aplicação, ressaltando a importância da determinação dos componentes lignocelulósicos em diferentes materiais de biomassa. Eles foram organizados sequencialmente, em três subseções que destacam a necessidade da quantificação dos componentes lignocelulósicos na produção de carvão vegetal e de madeira prensada, na produção agropecuária e nas pesquisas que visam aprimorar e intensificar a produção de bioetanol. Desta maneira pretende-se justificar a busca por uma metodologia de determinação dos teores lignocelulósicos que seja mais rápida e de fácil realização.

2.2.1 Produção de carvão vegetal e madeira prensada

Em pesquisas que visam otimizar a produção de carvão vegetal, dentre os diversos fatores relevantes, o conhecimento dos teores lignocelulósicos tem se mostrado de grande importância, visto que estes teores influenciam diretamente o rendimento da produção do carvão [45]. Na avaliação de diferentes qualidades de madeira em potencial para a produção de carvão vegetal, a determinação do teor de lignina é fundamental, visto que a presença de lignina aumenta o rendimento da produção de carvão, além de aumentar seu poder calorífico, isso porque a lignina tem maior resistência à degradação térmica, consequência das ligações entre carbonos constituintes das unidades de fenil-propano presentes em sua estrutura [11, 46]. Por outro lado, a holocelulose (celulose e hemicelulose juntas) não possui grande resistência à degradação decorrente do aumento da temperatura, principalmente a hemicelulose, que em uma estrutura amorfa e ramificada acaba sendo facilmente degradada com o aumento da temperatura [47].

O Brasil é um dos maiores produtores de carvão vegetal do mundo, principalmente no estado de Minas Gerais, onde encontram-se os maiores consumidores deste recurso dentro do ramo das indústrias siderúrgicas [4]. Nesse contexto, a preocupação com um melhor rendimento na produção do carvão para abastecer estes setores tem intensificado as pesquisas na busca por espécies com características que propiciem este rendimento. Alguns estudos, por exemplo, buscam avaliar a diferença na composição química entre as diferentes partes morfológicas que compõem os troncos das árvores e também buscam avaliar como estas propriedades são afetadas durante as fases de crescimento da espécie [48, 49].

Também na produção de painéis de madeira é de grande relevância o conhecimento dos teores lignocelulósicos, visto que a lignina atua de forma positiva na produção desses painéis. A lignina com sua estrutura condensada envolve as microfibrilas de celulose e atua como amortecedora aumentando a resistência mecânica a ação de forças externas. Nessas estruturas atua até mesmo como uma espécie de “ligante” que mantém unida a madeira prensada [11, 48].

Alguns estudos buscam avanços na produção de painéis de madeira, utilizando os resíduos gerados durante o processamento mecânico da madeira para produção de tábuas ou gerados em atividades de silvicultura como no processo de desbaste das árvores [11]. Em todos os estudos realizados, análises dos teores lignocelulósicos são realizadas através de procedimentos químicos, muitas vezes utilizando-se a metodologia Klason para determinação dos teores de lignina e determinando-se os teores de holocelulose de maneira indireta, por diferença em relação à soma dos teores de lignina, extrativos e cinzas [47].

2.2.2 Produção agropecuária

Também na agropecuária, têm sido importantes os estudos sobre os teores lignocelulósicos [3]. Pesquisas que visam melhorar a eficiência na alimentação de animais, e conseqüentemente melhorar a produção de carne e leite, têm levado em conta os teores lignocelulósicos de gramíneas utilizadas na alimentação desses animais [50]. Um dos fatores relevantes na alimentação desses animais é a digestibilidade desses alimentos. Alguns estudos visam avaliar diferentes tipos de gramíneas que podem ser utilizadas na alimentação animal, tendo como um dos fatores primários na análise de digestibilidade o teor de lignina dos alimentos utilizados, visto que a lignina atua como barreira à ação digestiva de alguns microrganismos presentes no organismo de animais ruminantes, o que torna a digestão lenta e pouco efetiva [3, 44].

Algumas pesquisas têm mostrado grande insuficiência de métodos analíticos na análise do teor de lignina de gramíneas, não havendo até mesmo correlação entre resultados obtidos por diferentes métodos analíticos de determinação de lignina [3, 16]. Numa análise comparativa, o método de determinação de lignina através de detergente ácido foi considerado subestimado, visto que esse método solubiliza parcialmente a lignina. Já o método Klason, desenvolvido para ser aplicado em madeiras, não foi confiável, pois, diferentemente das madeiras, as gramíneas têm grande teor de proteínas que não se solubilizam, permanecendo como contaminante no conteúdo final de lignina. O terceiro método estudado para determinação de lignina, utilizando permanganato de potássio, também foi considerado insuficiente, pois solubiliza além da lignina, também a hemicelu-

lose [3]. Alguns trabalhos também analisaram o uso, na alimentação animal, de gramíneas mais resistentes que as pastagens aos períodos de estiagem, como por exemplo a cana-de-açúcar. Tais pesquisas visam estudar o potencial nutritivo desse tipo de gramínea para os animais ruminantes, tendo como um dos fatores relevantes o conteúdo lignocelulósico presente no material. [2, 51].

Dada a importância da determinação do teor de lignina no setor de alimentação de animais ruminantes, e tendo em vista que os métodos analíticos baseados em utilização de reagentes químicos poderiam apresentar resultados não satisfatórios, também foram realizados alguns estudos a fim de obter equações de regressão capazes de determinar o teor de lignina a partir de espectrofotometria de absorção na região do ultravioleta-visível [44]. A fim de se analisar a validade deste método, estudos comparativos foram realizados entre padrões de lignina produzidos a partir de diversos materiais de biomassa, o que permitiu observar que alguns padrões apresentaram espectros similares independentemente da fonte que foram extraídos e as maiores variações estavam relacionadas aos padrões que sofreram as maiores mudanças durante os processos químicos de extração [16, 44]. Os estudos mostraram a possibilidade de relacionar os teores de lignina, previstos pelo método espectrofotométrico, com os graus de digestibilidade dos respectivos materiais; entretanto os valores estimados sempre foram superiores aos obtidos com os três métodos químicos utilizados [44]. Ainda nesse contexto, também foram feitas análises por RMN de ^{13}C e ^1H a fim de avaliar padrões de lignina obtidos através de diferentes métodos químicos [52], em busca da obtenção de um padrão de lignina capaz de representar o maior número possível de materiais lignocelulósicos, mesmo havendo grande variabilidade entre a composição fenólica de diferentes padrões [38, 44].

2.2.3 Produção de bioetanol

Como apresentado na introdução deste trabalho, os materiais lignocelulósicos são considerados grandes aliados no desenvolvimento e busca por novas formas de energia de caráter renovável e sustentável. Sabe-se da literatura que o Brasil e os EUA são os dois maiores produtores de etanol proveniente do caldo da cana-de-açúcar e do amido, mas

que o aumento da produção está restrito aos limites permitidos de ocupação de áreas de plantio para este fim. Diante desse cenário, muitas pesquisas estão sendo realizadas a fim de otimizar a produção do etanol a partir da fermentação dos carboidratos estruturais das plantas, que após alguns tratamentos químicos e biológicos são convertidos em açúcares fermentáveis. O etanol proveniente desta fonte é em muitos casos conhecido como etanol celulósico, bioetanol ou até mesmo etanol de segunda geração [5,6].

A grande vantagem da utilização dos materiais lignocelulósicos é que, diante da possibilidade de utilização de diferentes materiais, capazes de adaptar-se até mesmo em regiões e condições climáticas desfavoráveis, é possível conseguir grande aumento na produção mundial de etanol, diminuindo assim a dependência com os combustíveis fósseis e ao mesmo tempo respondendo às necessidades contemporâneas do meio ambiente. Dentre os diferentes materiais lignocelulósicos em potencial utilização, pode-se destacar dois grandes grupos: os materiais de biomassa florestal e os resíduos agrícolas [6].

A maior dificuldade a ser resolvida para a efetiva utilização de diferentes materiais lignocelulósicos na produção de etanol de segunda geração é o problema da recalcitrância da biomassa lignocelulósica. Para vencer a barreira da estrutura lignocelulósica, permitindo que enzimas específicas possam atuar na desconstrução das microfibrilas de celulose, são necessários diferentes processos de pré-tratamento, dependendo do tipo de material lignocelulósico utilizado, capazes de remover consideravelmente a lignina e diminuir a cristalinidade da celulose. Visando esta etapa de pré-tratamento, são de grande relevância informações sobre a composição do material, visto que a escolha do tipo de pré-tratamento e suas condições dependem dos teores de celulose, hemicelulose e lignina [5].

Diferentes tipos de pré-tratamento são encontrados na literatura, e informações sobre o teor de lignina e sobre o grau de cristalinidade da celulose têm grande relevância sobre os mesmos. Também o teor de hemicelulose é importante na caracterização dos materiais a serem submetidos a bioconversão celulósica, visto que os açúcares de hemicelulose e a glicose não são fermentados necessariamente pelos mesmos microorganismos [8].

Dessa maneira fica evidente a importância do conhecimento dos teores lignocelulósicos nos diferentes materiais de biomassa com potencial utilização tanto na área de

produção de energia como nas diversas áreas citadas acima. Esse contexto motiva estudos de caracterização e quantificação desses diferentes materiais através de técnicas que sejam mais fáceis e confiáveis, como a RMN, que já é uma poderosa técnica de caracterização e pode vir também a se tornar uma rotineira técnica de quantificação dos materiais lignocelulósicos.

Capítulo 3

Fundamentos de RMN

3.1 Aspectos gerais

O fenômeno denominado ressonância pode ser observado em diferentes sistemas físicos, e é caracterizado pela transferência de energia entre dois sistemas particulares que estão oscilando com mesma frequência [53]. Na infância, muitos já devem ter experimentado de maneira divertida este fenômeno, quando brincando em um balanço ficou sujeito a um movimento oscilatório amortecido, que pode ser mantido pela ação de um segundo sujeito que fornecia no instante correto o impulso necessário capaz de manter a amplitude da oscilação e a energia do movimento.

De maneira similar, a RMN é um fenômeno físico associado à transferência de energia entre dois sistemas que oscilam à mesma frequência, mas neste caso a interação é eletromagnética, pois na RMN a componente magnética de ondas de radiofrequência interagem com momentos de dipolo magnético associados aos spins nucleares, fornecendo energia para estes últimos. Na Figura 3.1.1 é apresentada uma ilustração sugestiva do fenômeno de ressonância em dois sistemas muito distintos, um de ordem macroscópica e de natureza mecânica e o outro de ordem microscópica e de natureza eletromagnética.

Na presença de um campo magnético estático, os momentos magnéticos orientam-se sob a influência do campo e os níveis de energia do sistema, inicialmente degenerados,

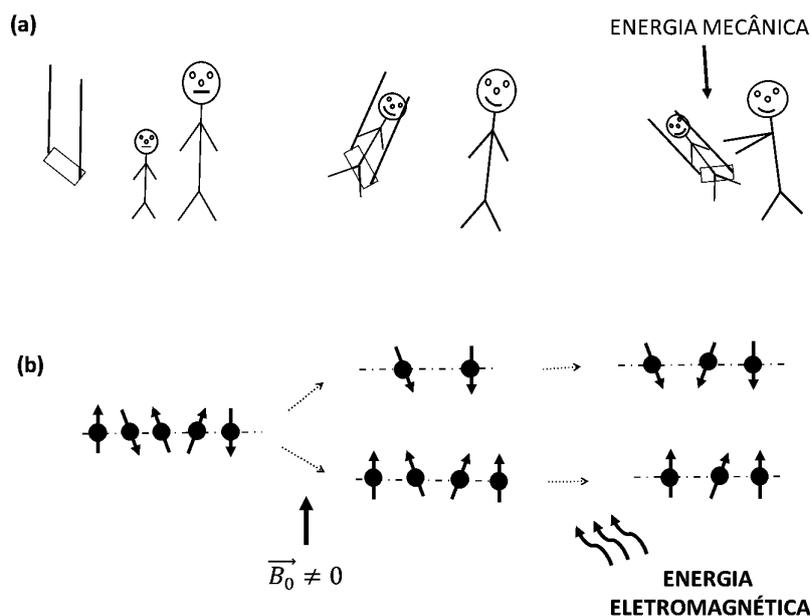


Figura 3.1.1: Ilustração artística do fenômeno de ressonância. (a) Sistema macroscópico onde a interação é de natureza mecânica. (b) Sistema microscópico onde a interação é de natureza eletromagnética.

separam-se de acordo com sua intensidade e com os possíveis valores que podem ser assumidos pela componente z do spin nuclear, considerando como z a direção do campo estático aplicado. A absorção da energia proveniente da componente magnética da radiação faz com que alguns núcleos passem para um nível de energia mais alto, colocando o sistema em uma situação de desequilíbrio. O sistema perturbado pela componente magnética da radiação tende a retornar ao equilíbrio térmico inicial, emitindo a energia absorvida e fornecendo muitas informações sobre a estrutura e dinâmica em que os núcleos se encontram. Essas informações são obtidas pela chamada espectroscopia de ressonância magnética nuclear e fazem desta uma importante técnica de caracterização de diferentes materiais naturais ou sintetizados em laboratório, além de permitir o acompanhamento de modificações estruturais durante processos de síntese, tratamentos físicos ou químicos, o que torna a RMN uma ferramenta poderosa na investigação científica, de maneira particular na área de física da matéria condensada [54–56].

A espectroscopia de ressonância magnética é uma técnica que pode ser utilizada para estudar diferentes materiais e em diferentes estados de agregação. Contudo, devido à

existência de diversas interações envolvendo os spins nucleares dependentes da anisotropia do sistema, os espectros de RMN de sólidos (altamente anisotrópicos) são extremamente largos, quando comparados com os picos finos obtidos em RMN de líquidos isotrópicos, resultando em uma menor aplicabilidade da técnica no estado sólido durante os anos iniciais de surgimento da RMN.

Atualmente este quadro não é mais o mesmo, visto que muitas técnicas desenvolvidas permitem hoje a obtenção de espectros de RMN de sólidos comparáveis em resolução a espectros obtidos em solução. O casamento dessas diversas técnicas ficou conhecido como ressonância magnética nuclear de alta resolução em sólidos e a sua utilização levou a um crescimento na produção científica por RMN no estado sólido [54].

Nos parágrafos a seguir uma breve revisão é feita sobre alguns princípios físicos de RMN, inicialmente discutindo os efeitos do campo estático aplicado (efeito Zeeman) o que em alguns textos é conhecido como etapa de preparação do sistema de spins. Na sequência será discutida a interação do campo de radiofrequência com os spins (excitação) e o processo de retorno ao estado de equilíbrio (relaxação), que correspondem respectivamente às etapas de perturbação do sistema e detecção do sinal de RMN a ser processado e analisado. Após essa discussão, será feita uma breve revisão sobre as diferentes interações do spin nuclear com o ambiente no qual se encontra e as técnicas de alta resolução que podem ser utilizadas para minimizar o alargamento causado por estas interações nos espectros de RMN de sólidos.

3.2 O efeito Zeeman nuclear

A ressonância magnética nuclear é um fenômeno que pode ocorrer sempre que um conjunto de núcleos com spin nuclear diferente de zero é colocado na presença de um campo magnético externo (estático). A utilização do termo spin nuclear é simplesmente uma forma compacta de se referir ao momento angular total do núcleo que é o somatório das contribuições dos momentos angulares orbital e de spin de cada próton e nêutron constituinte do núcleo [57]. Dessa maneira, um núcleo com spin \vec{I} não nulo possui um

momento de dipolo magnético $\vec{\mu}$ associado a ele pela equação 3.2.1, onde γ é uma constante associada as características de cada núcleo e denominada fator giromagnético [58].

$$\vec{\mu} = \gamma \vec{I} \quad (3.2.1)$$

A existência desse momento magnético é de fato responsável pelo fenômeno da RMN, isto porque a interação entre o momento de dipolo magnético com o campo magnético externo, conhecida como interação Zeeman, separa o conjunto de núcleos em questão em diferentes estados de energia, de acordo com os possíveis valores assumidos pela componente z do spin. Esta discussão mostra, por exemplo, que núclídeos como o ^{12}C e o ^{16}O não são sensíveis a RMN, visto que seus núcleos possuem spin nulo, enquanto os núclídeos ^{13}C e ^{17}O o são, por possuírem spin nuclear diferente de zero [59].

Quando um conjunto de núcleos sensíveis à RMN são colocados na presença de um campo magnético externo \vec{B}_0 os seus momentos de dipolo magnético $\vec{\mu}$ sofrem um torque $\vec{\tau}$ precessionando em torno do campo, como apresentado na equação 3.2.2. Em um tratamento clássico, este movimento de precessão, que pode ser visualizado na Figura 3.2.1, provém da variação temporal do momento angular \vec{I} causada pelo torque, equação 3.2.3, e é comparável ao movimento de um pião que sofre um torque exercido pela força gravitacional em relação ao ponto de contato com o solo [60].

$$\vec{\tau} = \vec{\mu} \times \vec{B}_0 = \gamma \vec{I} \times \vec{B}_0 \quad (3.2.2)$$

$$\vec{\tau} = \frac{d\vec{I}}{dt} \quad (3.2.3)$$

Combinando as equações 3.2.2 e 3.2.3 temos:

$$\frac{d\vec{I}}{dt} = \gamma \vec{I} \times \vec{B}_0 \quad (3.2.4)$$

Considerando que $\vec{B} = B_0 \hat{z}$ é possível escrever:

$$\frac{d\vec{I}}{dt} = (\gamma I_y B_0) \hat{x} - (\gamma I_x B_0) \hat{y} \quad (3.2.5)$$

$$\frac{dI_x}{dt} = \gamma I_y B_0 \quad (3.2.6)$$

$$\frac{dI_y}{dt} = -\gamma I_x B_0 \quad (3.2.7)$$

$$\frac{dI_z}{dt} = 0 \quad \rightarrow \quad I_z(t) = \text{constante} \quad (3.2.8)$$

Tomando a segunda derivada da equação 3.2.6 e substituindo no resultado a equação 3.2.7 podemos escrever as seguintes equações características de um oscilador harmônico, onde $\omega = \gamma B_0$:

$$\frac{d^2 I_x}{dt^2} = \gamma B_0 \frac{dI_y}{dt} = -\gamma^2 B_0^2 I_x \quad (3.2.9)$$

$$I_x(t) = I_0 \cos(\omega t) \quad (3.2.10)$$

Substituindo a equação 3.2.10 em 3.2.7:

$$I_y(t) = -I_0 \sin(\omega t) \quad (3.2.11)$$

A soma do módulo quadrado de 3.2.10 e 3.2.11 nos mostra que a componente transversal do momento angular oscila com módulo constante no plano transversal, garantindo que o momento angular mantém uma inclinação θ fixa em relação ao campo aplicado. Observando que no instante $t = 0$, temos $I_x(0) = I_0$ e $I_y(0) = 0$ e no instante $t = \frac{\pi}{2\omega}$, $I_x(\frac{\pi}{2\omega}) = 0$ e $I_y(\frac{\pi}{2\omega}) = -I_0$, temos que a componente transversal descreve seu movimento no sentido horário, o que pela regra da mão direita mostra que a frequência angular do

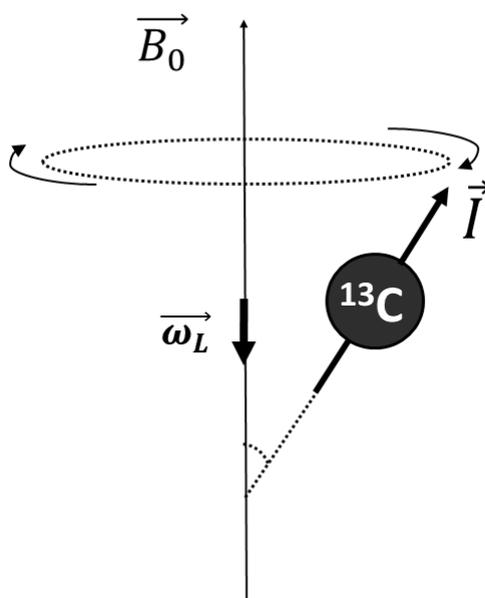


Figura 3.2.1: Precessão do momento de um núcleo como o ^{13}C na presença de um campo externo.

movimento de precessão $\vec{\omega}_L$, também conhecida como frequência de Larmor [61], tem sentido contrário ao campo externo para $\gamma > 0$ [62].

Como já mencionado acima, vemos que as equações 3.2.8, 3.2.10 e 3.2.11 são características de um movimento de precessão onde a componente z se mantém constante enquanto as componentes x e y oscilam com a frequência de Larmor dada por:

$$\vec{\omega}_L = -\gamma\vec{B}_0 \quad (3.2.12)$$

Em um tratamento quântico, o hamiltoniano da interação entre o momento magnético e o campo pode ser escrito como $H_B = -\vec{\mu} \cdot \vec{B}_0$ e utilizando a equação 3.2.1 temos $H_B = -\gamma I_Z B_0$ de forma que a energia da interação é dada por $E_m = -m\gamma\hbar B_0$, onde consideramos no formalismo quântico $I_Z |I, m\rangle = m\hbar |I, m\rangle$, sendo o número quântico $m = -I, -I+1, \dots, I-1, I$ [61, 63]. Como vemos na Figura 3.2.2 quando o campo magnético externo aplicado é nulo os diversos estados de spin nuclear possuem a mesma energia. Esta degenerescência, por sua vez, é quebrada quando o campo aplicado é diferente de zero e ocorre devido à interação do campo com os momentos magnéticos nucleares, separando os núcleos em diferentes estados energéticos de acordo com a orientação de seus

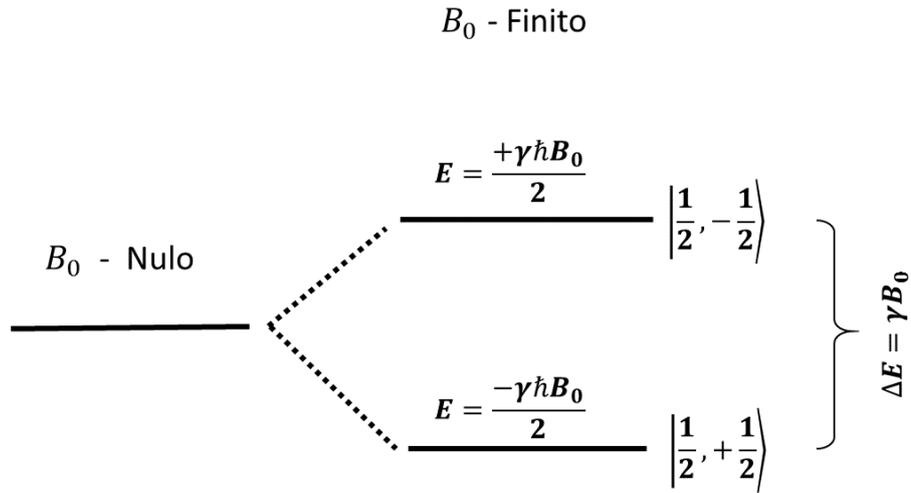


Figura 3.2.2: Diagrama dos níveis de energia dos spins nucleares sob a ação do campo magnético, para o caso $I = 1/2$ e $\gamma > 0$.

spins; este fenômeno é o já mencionado efeito Zeeman [59, 64].

Para um núcleo de spin $I = \frac{1}{2}$, por exemplo, teremos $m = \pm \frac{1}{2}$ de forma que a interação Zeeman nos dá dois possíveis estados denominados α e β que representam respectivamente o spin nuclear com orientação paralela e antiparalela ao campo magnético. Assim as energias destes estados são descritas pelas equações 3.2.13 e 3.2.14.

$$E_\alpha = \frac{-\gamma\hbar B_0}{2} \quad (3.2.13)$$

$$E_\beta = \frac{\gamma\hbar B_0}{2} \quad (3.2.14)$$

Ao se comparar a diferença de energia entre estes dois estados $\Delta E = E_\beta - E_\alpha = \gamma\hbar B_0$ com a condição de Bohr $\Delta E = \hbar\omega_0$ para a energia emitida ou absorvida em transições entre dois estados pode-se observar que a frequência angular da radiação envolvida no processo de transição de spins nucleares é $\omega_0 = \gamma B_0$. Este resultado comparado com a equação 3.2.12 mostra que a frequência da radiação é igual em módulo à frequência de precessão dos spins nucleares em torno do campo magnético [62].

Ao se analisar a faixa de valores de γ para os diversos núcleos magnéticos e os possíveis valores de B_0 nos diversos espectrômetros de RMN que variam tipicamente de 1.5 T a 21 T conclui-se que os campos magnéticos irradiados possuem frequências tipicamente da ordem de dezenas a centenas de megahertz, o que corresponde à faixa das ondas de rádio e por isso as radiações envolvidas são conhecidas como radiofrequências (RF). Assim temos que ao incidir um campo de RF em um conjunto de núcleos sob a interação Zeeman haverá transição entre estados de spin nuclear sempre que a frequência da radiação incidente for igual à frequência de precessão dos spins nucleares, em outras palavras, quando o campo magnético oscilante entrar em ressonância com o sistema de spins [64].

Após esta breve abordagem do fenômeno da RMN, uma descrição mais detalhada de como pode ser obtido o sinal de RMN em um experimento de ressonância magnética nuclear é feita na seção seguinte.

3.3 Perturbação e relaxação do sistema de spins

Como discutido acima para o caso de um núcleo com spin 1/2, o campo magnético separa os núcleos em dois estados de energia α e β com os spins orientados para cima e para baixo, respectivamente. Para um conjunto de núcleos presentes em uma amostra a ser analisada haverá uma pequena diferença entre as populações em cada estado de spin descritas pela distribuição de Boltzmann [63,65] segundo a equação 3.3.1 onde N_α e N_β são as populações de spin nos níveis de menor e maior energia respectivamente, κ_B é a constante de Boltzmann, T a temperatura absoluta e ΔE a diferença de energia entre os estados α e β .

$$\frac{N_\alpha}{N_\beta} = \exp\left(\frac{\Delta E}{\kappa_B T}\right) \quad (3.3.1)$$

Esta diferença entre as populações de spin gera uma magnetização nuclear resultante \vec{M}_0 na direção de \vec{B}_0 associada ao ligeiro excesso de núcleos no estado de menor

energia. Essa magnetização é o resultado da precessão dos spins nucleares em torno do campo, anulando-se as componentes transversais e restando apenas a componente longitudinal a \vec{B}_0 . Em um experimento de RMN a amostra a ser analisada é colocada na presença do campo \vec{B}_0 como já discutido acima, mas também no interior de uma bobina de radiofrequência. Esta bobina gera pulsos de RF com um campo magnético \vec{B}_1 oscilante perpendicular à magnetização \vec{M}_0 . Estes pulsos de RF, em ressonância, incididos na amostra levam a magnetização a girar em torno de \vec{B}_1 com frequência $\omega_1 = \gamma B_1$. A consequência é um movimento de nutação de \vec{M}_0 em torno do eixo z aproximando-se do plano transversal a \vec{B}_0 como mostrado na Figura 3.3.1. Este movimento ao ser observado de um referencial que gira em torno do eixo z com frequência ω_0 simplifica-se a uma rotação de um ângulo θ de \vec{M}_0 em relação a \vec{B}_0 , onde θ depende do tempo t_p de duração do pulso de RF e é dado pela expressão $\theta = \omega_1 t_p = \gamma B_1 t_p$ [64, 65].

Um pulso de RF que leva a magnetização a uma rotação de um ângulo $\theta = \frac{\pi}{2}$ é chamado de pulso $\frac{\pi}{2}$ ou pulso de 90° , da mesma forma se o pulso inverte o sentido da magnetização dizemos que foi aplicado um pulso π ou pulso de 180° . Após a aplicação do pulso de 90° a magnetização estará girando em torno do eixo z no plano transversal e na bobina será detectada uma corrente alternada induzida pela variação temporal do campo gerado pela magnetização com frequência igual à frequência de precessão dos spins em torno do campo externo. Este sinal elétrico detectado na bobina é conhecido como decaimento livre de indução (FID, do inglês “*Free Induction Decay*”) que reporta ao fato de que o sinal é induzido na bobina na ausência do campo \vec{B}_1 gerado por ela e decai de forma exponencial devido a processos de relaxação que fazem a magnetização voltar ao seu estado inicial.

A relaxação do sistema de spins perturbado ocorre em dois processos simultâneos, mas distintos, conhecidos como relaxação transversal e relaxação longitudinal. No primeiro o que ocorre é a defasagem da magnetização no plano transversal, ou seja, os momentos magnéticos nucleares que, devido à aplicação do campo \vec{B}_1 descreviam um movimento de precessão em fase, gerando as componentes da magnetização M_x e M_y , passam a precessionar fora de fase, anulando tais componentes e levando a zero o sinal

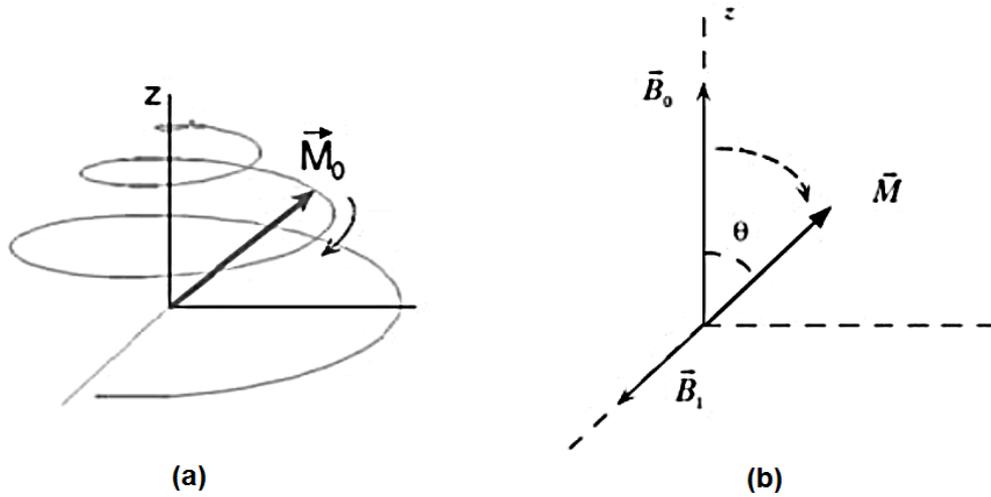


Figura 3.3.1: Representação esquemática do movimento da magnetização decorrente da aplicação do campo \vec{B}_1 , (a) visto a partir do referencial do laboratório [66] e (b) de um referencial que gira com frequência ω_0 . [64]

detectado na bobina, como vemos na Figura 3.3.2. Este processo de relaxação transversal leva o sinal elétrico a um decaimento típico do tipo $M(t) = M_0 \exp\left(-\frac{t}{T_2}\right) \cos(\omega_0 t)$ onde M_0 é o valor inicial da magnetização e T_2 uma constante denominada tempo de relaxação transversal [56]. Contudo, devido à não homogeneidade do campo magnético \vec{B}_0 , em geral os campos magnéticos gerados pelos magnetos não são perfeitamente homogêneos, ocorre que a queda do sinal é governada por um tempo característico T_2^* relacionado a T_2 pela expressão 3.3.2, de forma que o decaimento observado é ainda mais acentuado que o regido por T_2 [62]. Observe que quanto maior for a inhomogeneidade ΔB_0 do campo magnético estático, mais rápida será a atenuação do sinal elétrico.

$$\frac{1}{T_2^*} = \frac{1}{T_2} + \frac{\gamma \Delta B_0}{2} \quad (3.3.2)$$

O tempo de relaxação transversal T_2 também é conhecido como tempo de relaxação spin-spin, pois este processo ocorre em muitos casos devido a interações dipolares entre os momentos magnéticos nucleares; contudo todas as interações presentes no hamiltoniano de interação do spin nuclear contribuem para uma distribuição de frequências em torno da frequência de ressonância e ocasionando a relaxação transversal [57,64].

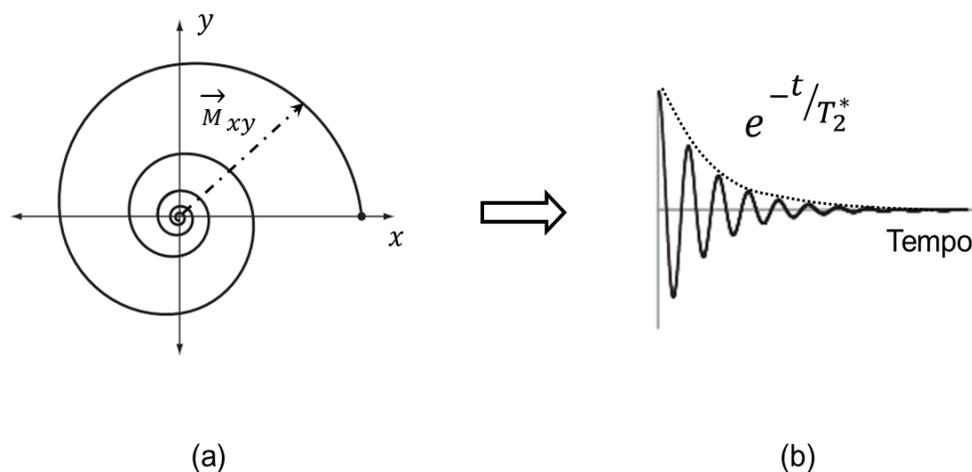


Figura 3.3.2: Sinal elétrico detectado em um experimento de RMN. A presença da magnetização oscilante no plano xy (a) governada pelo tempo característico T_2^* (considerando \vec{B}_0 não homogêneo) leva a detecção do FID na bobina de RF (b). Adaptado de [67].

No segundo processo de relaxação citado, relaxação longitudinal, temos o retorno da magnetização para a direção z devido à interação dos spins com campos magnéticos flutuantes com frequências próprias para transições entre os estados de spin nuclear e originados nos movimentos moleculares presentes na amostra estudada [62]. Este processo de retorno da magnetização para a direção z após a incidência de um pulso de 90° pode ser tipicamente descrito pela expressão $M_z(t) = M_0 + \left(1 - \exp\left(-\frac{t}{T_1}\right)\right)$ onde T_1 é uma constante denominada tempo de relaxação longitudinal ou tempo de relaxação spin-rede pelo fato deste processo ocorrer devido a interações dos spins com a rede de átomos e moléculas [56,64]. Na Figura 3.3.3 temos uma ilustração dos dois processos de relaxação que ocorrem após a aplicação do pulso de RF.

Este processo de aplicação de um pulso de RF e aquisição do sinal elétrico na bobina pode ser repetido várias vezes a fim de se melhorar a qualidade do sinal obtido. Contudo entre a aplicação de dois pulsos de 90° é necessário esperar que a magnetização retorne totalmente para a direção z de forma a ter sempre a máxima intensidade de sinal em cada processo de aquisição do FID.

Normalmente, após um tempo T_1 da aplicação do pulso de RF a magnetização

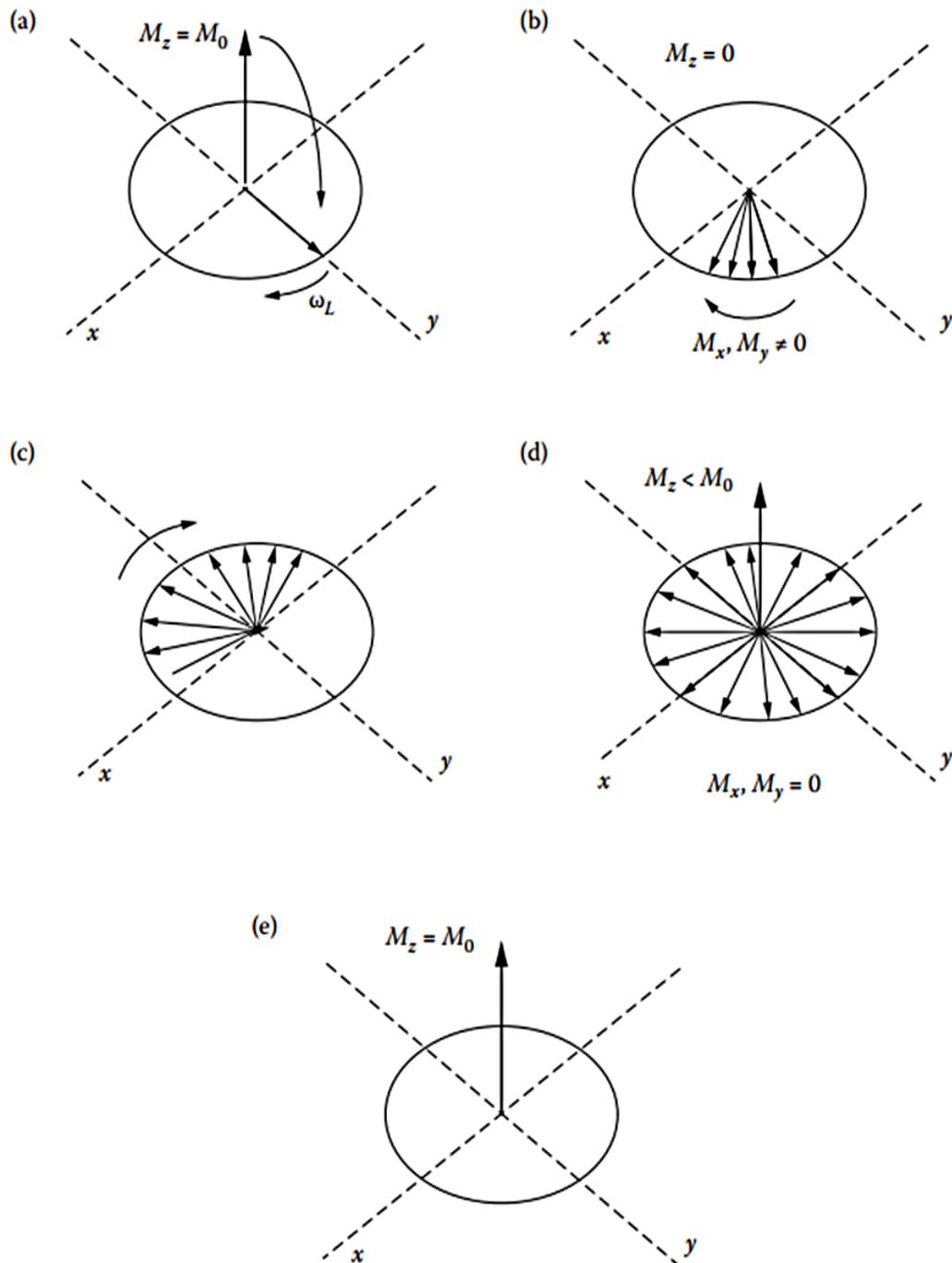


Figura 3.3.3: Evolução da magnetização após a aplicação de um pulso de 90° . (a) Efeito do pulso de RF (b) Movimento coerente da magnetização líquida no plano transversal (c-d) Redução a zero da magnetização transversal concomitante ao processo de retorno à direção longitudinal a \vec{B}_0 . (e) Retorno completo da magnetização à direção longitudinal após um tempo da ordem de $5T_1$ [56,64].

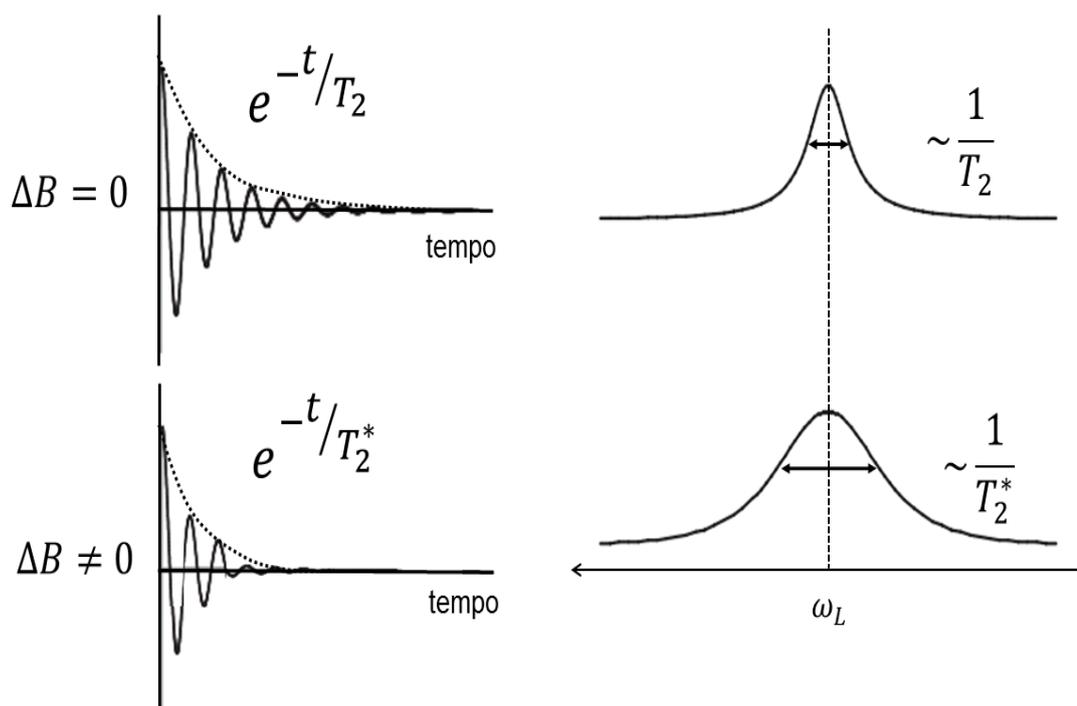


Figura 3.3.4: Transformada de Fourier do FID. A inhomogeneidade do campo influencia diretamente na largura de linha [67].

recupera cerca de 63% de seu valor inicial. Efetivamente, em uma análise quantitativa, deve-se esperar um tempo da ordem de $5T_1$ entre duas aquisições, denominado tempo de repetição, garantindo-se o retorno completo da magnetização à direção z [56,64].

Após a aquisição do FID é computada a sua transformada de Fourier (TF), o que fornece um gráfico da intensidade do sinal em função da frequência de precessão da magnetização, este por sua vez é denominado espectro de RMN. Como já discutido, a intensidade do sinal decai com o tempo de forma que a TF gera uma curva tipicamente lorentziana, para decaimentos exponenciais, com largura inversamente proporcional ao tempo de relaxação transversal. E como já discutido, a inhomogeneidade do campo aplicado ($\Delta B \neq 0$) leva a uma atenuação mais rápida do sinal elétrico e uma maior largura de linha, como vemos na Figura 3.3.4 [62]. Em amostras líquidas os valores de T_2 são em geral maiores que em amostras sólidas, resultando em espectros bem mais alargados para estas últimas, problema este que leva à necessidade de técnicas de alta resolução em RMN de sólidos que serão discutidas nas seções seguintes [64].

É importante ressaltar que na TF podem aparecer vários sinais em diferentes frequên-

cias, o que indica que há núcleos na amostra estudada com diferentes frequências de precessão de seus spins em torno do campo \vec{B}_0 . Isso ocorre, pois cada núcleo na amostra experimenta um campo $\vec{B} \neq \vec{B}_0$ dependendo do meio em que se encontra. Devido a este fato no espectro de RMN é possível identificar diferentes frequências dependendo do ambiente químico em que o núcleo se encontra, e também relacionar a intensidade (área) de cada pico no espectro ao número de núcleos presentes na amostra com ambiente químico correspondente àquela frequência de ressonância, possibilitando assim tanto análises qualitativas como quantitativas por RMN.

Essa diferença no campo local experimentado por cada núcleo vem da interação das nuvens eletrônicas em que os núcleos se encontram com o campo externo aplicado. Este, como ilustrado na Figura 3.3.5, induz, no momento em que a amostra é inserida na presença do campo, uma circulação dos elétrons nas nuvens eletrônicas que produz um campo adicional proporcional a \vec{B}_0 , dado pela expressão $\vec{B}'_i = -\tilde{\sigma}\vec{B}_0$ de forma que o campo local efetivamente experimentado por cada núcleo é $\vec{B}_{Efetivo} = \vec{B}_0 - \tilde{\sigma}\vec{B}_0 = (1 - \tilde{\sigma})\vec{B}_0$ onde $\tilde{\sigma}$ é conhecido como tensor de proteção ou blindagem magnética. Este tensor é associado à densidade eletrônica do meio e reporta o fato de que o campo efetivo (ou local) não é sempre paralelo ao campo aplicado, podendo assumir diferentes orientações locais. Uma descrição mais completa sobre o processo de blindagem será feita na próxima seção, destinada à apresentação do hamiltoniano de spin nuclear. A mudança no campo local experimentado por cada núcleo provoca assim uma alteração na frequência de precessão de forma que o valor observado é $\omega_{obs} = \gamma(1 - \tilde{\sigma})B_0$.

Esse desvio da frequência de precessão do spin de cada núcleo é conhecido como deslocamento químico, sendo obtido diretamente dos espectros de RMN. Estes não são construídos exatamente em função da frequência ω_{obs} , pois ela tem dependência com o campo magnético que por sua vez pode variar para diferentes espectrômetros de RMN. Os espectros de RMN são construídos pela diferença entre a frequência observada ω_{obs} de cada núcleo analisado e a frequência de referência ω_{ref} de um pico no espectro de RMN, registrado para uma substância padrão. Assim o deslocamento químico representado por δ que compõe o eixo horizontal dos espectros de RMN é dado por [64]:

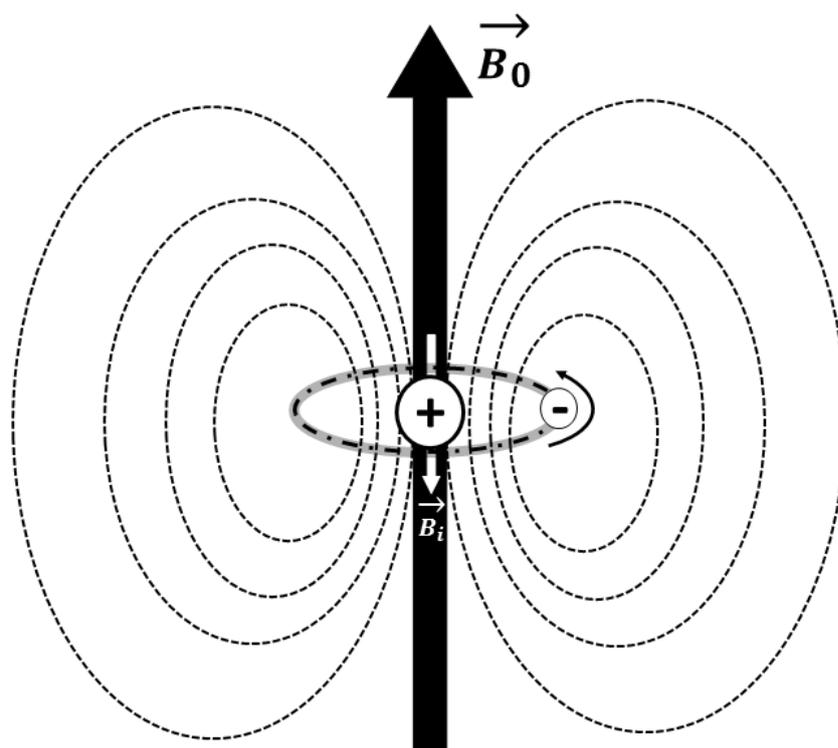


Figura 3.3.5: Representação da blindagem magnética decorrente da circulação eletrônica induzida por \vec{B}_0 .

$$\delta = \frac{\omega_{obs} - \omega_{ref}}{\omega_{ref}} \quad (3.3.3)$$

Valores típicos de δ são da ordem de 10^{-6} , de forma que esses valores são normalmente expressos em partes por milhão (ppm). Ainda sobre os espectros de RMN é importante citar que seu eixo horizontal é convencionalmente construído em ordem crescente dos valores de δ da direita para a esquerda. Com relação à proteção magnética, temos que menores frequências estão associadas a um maior valor de blindagem, de forma que as constantes de blindagem aumentam para a direita dos espectros, ou seja, um pico observado mais à direita em um espectro de RMN indica núcleos em um ambiente químico mais “protegido” magneticamente [62].

3.4 Interações de spin nuclear

Todo o conteúdo até agora revisado tem por objetivo apresentar os conceitos físicos básicos que fundamentam a espectroscopia de ressonância magnética nuclear e permitem o desenvolvimento de metodologias para análise de diferentes materiais, utilizando como sonda algum núcleo ativo (spin não nulo) presente na estrutura a ser estudada. Como discutido no final da seção anterior, o que torna a RMN muito atraente é o efeito conhecido como deslocamento químico, que corresponde à ligeira mudança na frequência de precessão de Larmor ($\omega_L = \gamma B_0$) devido a variações no ambiente químico em que o núcleo se encontra. Dessa forma, as diferentes interações químicas e físicas em que um núcleo pode estar envolvido são refletidas no espectro de RMN, fazendo do espectro um instrumento poderoso na identificação de diferentes estruturas. No entanto, o deslocamento químico não é a única interação de spin nuclear que pode ser observada no espectro de RMN, sendo em muitos casos, até mesmo obscurecido pela sobreposição de sinais decorrentes de outras interações nucleares.

A própria descrição dada até o momento para o fenômeno de deslocamento químico, de certo modo, foi feita de maneira muito simples, desconsiderando as diferentes orientações moleculares que podem ser assumidas em relação a direção do campo \vec{B}_0 , e que influenciam diretamente os efeitos da blindagem magnética, de maneira que o efeito de deslocamento químico pode ser separado em duas contribuições: isotrópica, dependente somente do tipo de ambiente químico em que o núcleo se encontra; anisotrópica, dependente da orientação da molécula em relação ao campo externo. Além do mais, não foram citadas outras interações que afetam consideravelmente os espectros de RMN, provocando um alargamento adicional. Para obter uma descrição mais completa vamos analisar o hamiltoniano das interações do spin nuclear com os campos eletromagnéticos externos e internos presentes na rede em que o núcleo se encontra. Tal hamiltoniano pode ser escrito como [68, 69]:

$$H = H_Z + H_{RF} + H_{DQ} + H_D + H_J + H_Q \quad (3.4.1)$$

Nesta expressão H_Z , representa a interação com o campo magnético estático externo que leva ao desdobramento Zeeman e H_{RF} representa a interação dos spins com o campo magnético oscilante existente durante o tempo de aplicação dos pulsos de RF . Ambos são termos externos do hamiltoniano. O termo H_{DQ} representa a interação do núcleo com o campo induzido pelas nuvens eletrônicas responsável pelo deslocamento químico; H_D representa a interação dipolar magnética entre núcleos de uma mesma espécie nuclear e de espécies diferentes; H_J representa o acoplamento escalar J dos momentos magnéticos nucleares, o qual é intermediado pela presença das nuvens eletrônicas em ligações químicas; por fim, H_Q representa a interação do momento de quadrupolo elétrico presente em núcleos com spin maior que 1/2 com gradientes de campo elétrico presentes no material. Essas interações são responsáveis pelo espectro final de RMN, provocando o deslocamento químico já citado e também o alargamento e, em alguns casos, o desdobramento das linhas de ressonância observadas [58, 59].

O hamiltoniano de deslocamento químico H_{DQ} , por exemplo, pode ser escrito como:

$$H_{DQ} = \sum_i \gamma^i \vec{I}^i \tilde{\sigma}^i \vec{B}_0 \quad (3.4.2)$$

Na equação 3.4.2, $\tilde{\sigma}$ é o tensor de blindagem magnética e o índice na soma se estende para todos os núcleos em questão da amostra analisada. A partir de $\tilde{\sigma}$ é possível definir o parâmetro σ , denominado constante de blindagem magnética, pelas componentes do sistema de eixos principais do tensor segundo a relação 3.4.3, considerando que, por convenção $|\sigma_{ZZ} - \sigma| \geq |\sigma_{YY} - \sigma| \geq |\sigma_{XX} - \sigma|$. Esse parâmetro é independente da orientação da nuvem eletrônica, e por isso é conhecido como constante de blindagem magnética isotrópica [58, 69].

$$\sigma = \frac{\sigma_{XX} + \sigma_{YY} + \sigma_{ZZ}}{3} \quad (3.4.3)$$

Essa descrição da anisotropia do deslocamento químico utilizando o tensor de blindagem leva em conta a orientação espacial da nuvem eletrônica que circunda o núcleo onde as componentes do tensor estão relacionadas ao efeito da blindagem magnética exer-

cida sobre o núcleo. Essa interação de desvio químico é responsável por uma modificação na frequência de ressonância, de forma que a frequência observada é dada pela seguinte expressão [58,64]:

$$\omega_{obs} = \omega_L - \omega_L \left[\sigma + \delta^{DQ} \left(\frac{3\cos^2\theta - 1}{2} + \frac{1}{2}\eta^{DQ}\sin^2\theta\cos 2\phi \right) \right] \quad (3.4.4)$$

Nesta expressão temos que θ e ϕ são as coordenadas angulares polar e azimutal que localizam o sistema de eixos principais (SEP) de $\tilde{\sigma}$ em relação a \vec{B}_0 , como apresentado esquematicamente na Figura 3.4.1. Os termos $\delta^{DQ} = \sigma_{ZZ} - \sigma$ e $\eta^{DQ} = (\sigma_{XX} - \sigma_{YY})/\delta^{DQ}$ são parâmetros ligados às componentes principais de $\tilde{\sigma}$, associados respectivamente à anisotropia do deslocamento químico e à assimetria do tensor em relação a uma simetria cilíndrica. Em amostras líquidas, os rápidos movimentos moleculares anulam os termos geométricos descritos acima, de forma que retomamos a equação $\omega_{obs} = (1 - \sigma)\omega_0 = (1 - \sigma)\gamma B_0$. Assim, em RMN de líquidos os espectros são bem resolvidos, com os deslocamentos químicos isotrópicos definidos. Em sólidos monocristalinos, temos o deslocamento na frequência dependendo da orientação da amostra em relação a \vec{B}_0 . Já em amostras policristalinas, pulverizadas ou amorfas, temos diversas orientações que contribuem para o alargamento do espectro em torno de $(1 - \sigma)\omega_0$. Este espectro é conhecido como espectro de pó, do qual podem ser extraídas as componentes principais do tensor $\tilde{\sigma}$ [69]. A Figura 3.4.2 busca ilustrar algumas das possíveis orientações moleculares que podem ser assumidas em relação ao campo externo.

O hamiltoniano que descreve o acoplamento dipolar direto entre os spins nucleares pode ser expresso pela equação 3.4.5, onde \tilde{D}^{ij} representa o tensor de interação dipolar entre cada par de núcleos da amostra analisada e os índices na soma se estendem para todos os núcleos presentes no material [58,64]. Essa interação provém do fato de que cada momento magnético associado ao spin nuclear gera um campo magnético em torno de sua vizinhança que afetará os spins próximos (a magnitude desta interação decai rapidamente com a distância $\sim 1/r^3$), conforme pode ser observado na Figura 3.4.3 [59]. Considerando a simetria cilíndrica desta interação ao longo do vetor internuclear que liga dois núcleos

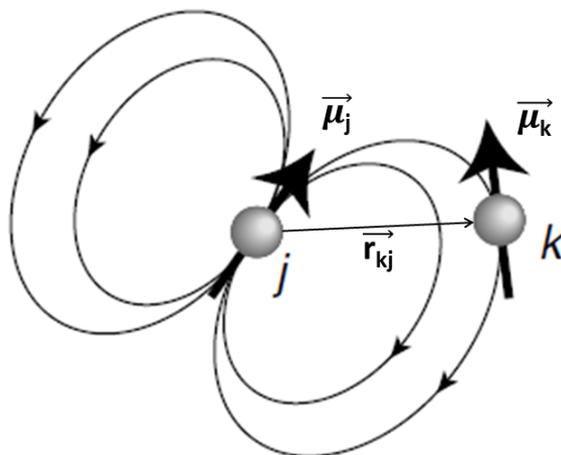


Figura 3.4.3: Interação dipolar entre dois núcleos vizinhos [59].

vizinhos, é possível afirmar que o parâmetro de assimetria η^D , análogo ao descrito para interação de deslocamento químico é invariavelmente nulo, de forma que somente o fator de anisotropia δ^D contribuirá para essa interação [69].

$$H_D = \sum_{i < j} \gamma^i \gamma^j \vec{I}^i \tilde{D}^{ij} \vec{I}^j \quad (3.4.5)$$

Além do alargamento devido às interações de deslocamento químico e acoplamento dipolar direto, os espectros de RMN são também alargados pelas outras interações que compõem o hamiltoniano de spin nuclear, levando a alargamentos ainda mais pronunciados. No caso de núcleos com spin igual a $1/2$ a interação dipolar se sobressai, enquanto que para núcleos com spin maior que $1/2$ a interação quadrupolar é a principal responsável pelo alargamento. Dessa forma, para a obtenção de espectros de RMN de sólidos com resolução que permita a observação da estrutura fina causada pelo deslocamento químico, faz-se necessário o uso de técnicas especiais que removam ou minimizem esses alargamentos, conhecidas como técnicas de alta resolução em RMN de sólidos [56, 62].

3.5 Técnicas de alta resolução em RMN de sólidos

Nesta seção serão discutidas três técnicas utilizadas para se obter espectros de RMN de sólidos comparáveis a espectros obtidos em solução. As duas primeiras visam minimizar ou eliminar o alargamento devido às diversas interações nucleares citadas na seção anterior: o desacoplamento heteronuclear (DEC, do inglês “*decoupling*”) e a rotação em torno do ângulo mágico (MAS, do inglês “*magic angle spinning*”). A última técnica a ser discutida visa intensificar o sinal de núcleos raros e de baixo fator giromagnético e é conhecida como polarização cruzada (CP, do inglês “*cross polarization*”).

3.5.1 Rotação em torno do ângulo mágico (MAS)

A obtenção de espectros de RMN com MAS é hoje parte da rotina dos mais variados laboratórios de RMN de sólidos no mundo, visto que essa técnica permite reduzir consideravelmente, dentro dos limites experimentais de cada equipamento, os efeitos anisotrópicos das interações de spin nuclear, desde que a frequência de rotação da amostra seja maior que a largura de linha dos espectros estáticos [54,64].

Esta técnica sugerida independentemente por Lowe [70] e Andrew et al. [71] no fim da década de 50, fundamenta-se na dependência angular das interações de spin, em sua parte secular, com o termo $3\cos^2\theta - 1$, onde θ é o ângulo entre \vec{B}_0 e o eixo z do sistema de eixos principais do tensor que define cada interação em particular. É possível demonstrar analiticamente que quando a amostra em estudo é colocada em rotação rápida esta dependência angular pode ser reescrita como uma função geométrica média (equação 3.5.1) que depende do ângulo entre \vec{B}_0 e o eixo de rotação da amostra. Para a interação dipolar, por exemplo, pode-se afirmar que a rápida rotação da amostra ao longo de um eixo faz com que os vetores internucleares se orientem em média na direção do eixo de rotação. Na equação 3.5.1 o ângulo θ_m representa a inclinação entre o eixo de rotação da amostra e o campo estático e β representa as várias inclinações possíveis que podem ser assumidas em um sólido entre os vetores internucleares e o eixo de rotação [58,62,69].

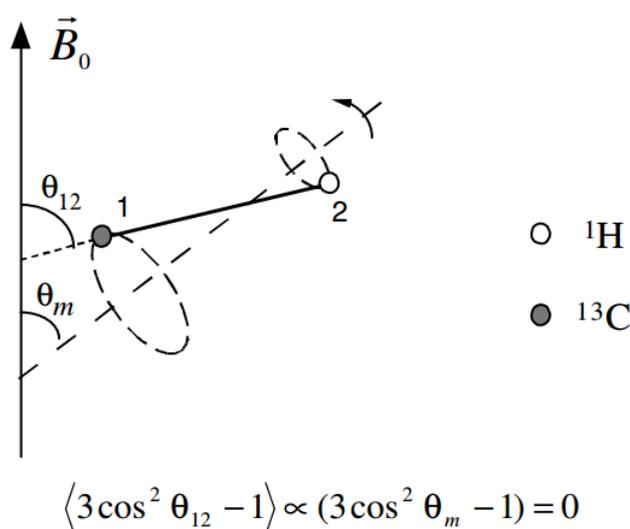


Figura 3.5.1: Efeito da técnica de MAS para a interação dipolar entre os núcleos de ^{13}C e ^1H . Adaptado de [64].

$$\langle 3 \cos^2 \theta_{12} - 1 \rangle = \frac{1}{2} (3 \cos^2 \theta_m - 1) (3 \cos^2 \beta - 1) \quad (3.5.1)$$

Desta forma a técnica de MAS consiste basicamente em girar a amostra sólida prensada em um rotor com frequência superior à largura do espectro estático, estando o rotor colocado ao longo de um eixo inclinado de um ângulo $\theta_m = 54,74^\circ$ em relação a \vec{B}_0 , conhecido como ângulo mágico, pois esse ângulo anula as contribuições anisotrópicas que dependem do termo discutido acima. Como pode ser observado na Figura 3.5.1 para o caso da interação dipolar entre dois núcleos diferentes a técnica de MAS promedia o ângulo de interação entre estes dois núcleos em relação a \vec{B}_0 ao ângulo mágico, o que consequentemente atenua, quando não elimina, o alargamento de linha causado por esta interação [64]. Contudo, como consequência dessa rotação, surgem as chamadas bandas laterais, que são réplicas de um pico de RMN separadas pela frequência de rotação e que em geral decaem em intensidade à medida que se afastam da linha de ressonância isotrópica, sendo contudo moduladas pelo espectro obtido para a amostra estática (espectro de pó), de modo que tornam-se intensas as bandas onde o espectro de pó é intenso [62].

3.5.2 Desacoplamento heteronuclear de alta potência

Depois da interação quadrupolar, a interação dipolar entre núcleos, em geral, é a principal responsável pelo alargamento nas linhas obtidas em RMN de sólidos. No caso de espectros obtidos para núcleos abundantes como o hidrogênio esta interação é predominantemente homonuclear, mas em espectros obtidos para núcleos pouco abundantes como o ^{13}C o alargamento é causado predominantemente por interações dipolares de caráter heteronuclear. É este tipo de alargamento que visa ser minimizado com a técnica de desacoplamento heteronuclear de alta potência. O desacoplamento homonuclear não será utilizado nem discutido neste trabalho, mas informações sobre ele podem ser obtidas diretamente da literatura [58].

O desacoplamento heteronuclear de alta potência consiste basicamente em um processo de ressonância dupla, em que se irradia um campo de RF nos núcleos abundantes, com frequência de Larmor correspondente a estes núcleos, ao mesmo tempo em que se irradia um campo de RF nos núcleos raros a serem analisados, como ilustrado na Figura 3.5.2. Ainda utilizando como exemplo amostras contendo núcleos como o ^{13}C e o ^1H , enquanto se obtém o espectro de RMN para os núcleos de ^{13}C , os núcleos de hidrogênio também estão em ressonância, ou seja, estão precessionando em torno do campo aplicado a eles, de maneira que o campo local (de origem dipolar) produzido por eles sobre os núcleos raros irá em média se anular, eliminando na média a interação dipolar e conseqüentemente o alargamento causado por ela no espectro de RMN de ^{13}C . É importante salientar que o desacoplamento funciona nas duas vias, ou seja, pode-se obter o espectro de RMN de ^1H enquanto se desacopla núcleos de ^{13}C ou outros núcleos. O campo de RF utilizado no desacoplamento pode ser produzida de forma contínua ou por meio de trens de pulsos, com durações e fases convenientemente escolhidas. Isto diferencia o desacoplamento de onda contínua (CW) das outras seqüências que são comumente usadas, tais como SPINAL (*small phase incremental alteration*) [72, 73] e TPPM (*two pulse phase-modulation*) [74].

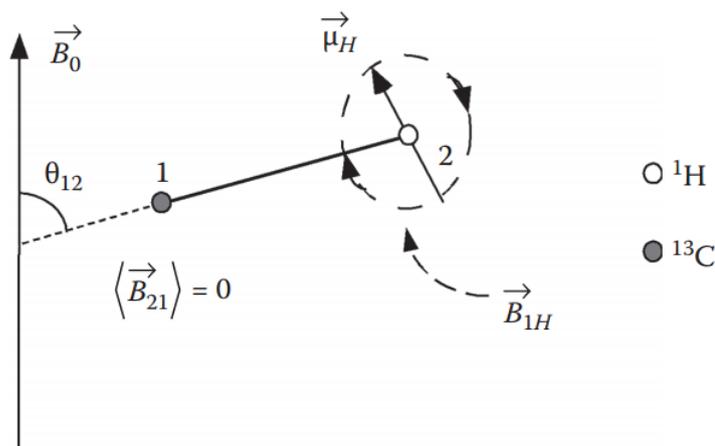


Figura 3.5.2: Desacoplamento dipolar heteronuclear para o caso do par de spins ^1H - ^{13}C . Adaptado de [56].

3.5.3 Polarização cruzada (CP)

Para obtenção de um espectro de RMN as características do núcleo em estudo, como abundância natural e fator giromagnético, têm grande relevância no sinal obtido, de forma que em RMN de ^1H , ^{27}Al , ^{19}F , por exemplo, os sinais podem ser facilmente observados com excelente relação sinal/ruído; todavia, em análises de núcleos como ^{13}C , ^{29}Si , ^{17}O , cuja sensibilidade é muito pequena, a dificuldade para se obter um espectro com razoável relação sinal/ruído é muito maior, sendo necessária em muitos casos a realização de experimentos com duração de alguns dias ou o até mesmo o enriquecimento isotópico do material estudado. Neste contexto, a técnica de CP tem como objetivo intensificar o sinal de núcleos pouco abundantes e com baixo fator giromagnético, a fim de se facilitar a obtenção de espectros de RMN para núcleos com estas características. Em um segundo momento será possível observar que CP também tem um caráter seletivo, de forma que ela pode ser utilizada também para núcleos com alta sensibilidade, mas com o objetivo específico de se fazer análises seletivas [56, 58].

O termo polarização cruzada traz em si o princípio físico fundamental presente nesta técnica, que consiste na transferência de polarização entre dois conjuntos de núcleos a fim de se intensificar o sinal de núcleos com baixa sensibilidade ou selecionar determinados grupos químicos em experimentos de seletividade. Um exemplo clássico, onde o experimento de CP é utilizado para se melhorar a intensidade dos sinais, é o caso da trans-

ferência de polarização de núcleos abundantes e com alto fator giromagnético, como os núcleos de ^1H , para núcleos pouco abundantes como os núcleos de ^{13}C . Um outro exemplo, onde se tem um objetivo específico de seletividade, ocorre quando CP é realizada entre núcleos abundantes e com boa sensibilidade como ^1H e ^{27}Al , para detectar seletivamente grupos contendo núcleos de ^{27}Al próximos a núcleos de ^1H [75].

Neste trabalho, a técnica de CP é utilizada para se obter o espectro de RMN de ^{13}C de diferentes materiais de biomassa em um intervalo de tempo muito menor que experimentos de polarização direta, por este motivo, ela será apresentada nos próximos parágrafos com um olhar voltado para este fim, o que de forma alguma impede que os mesmos princípios físicos sejam aplicados para outros experimentos que desejem polarizar outros núcleos tendo também outros objetivos.

Considera-se inicialmente que o sistema de ^1H e de ^{13}C são “dois reservatórios isolados da rede”, devido ao fato que os tempos de relaxação longitudinal de ambos sistemas têm valores suficientemente longos em sólidos para essa consideração. Em outras palavras, é possível provocar uma perturbação na magnetização inicial de equilíbrio destes dois sistemas e esta perturbação existirá durante um tempo suficientemente longo para ocorrência do processo de CP [64]. Na presença de \vec{B}_0 , ambos os sistemas estarão em equilíbrio térmico com a rede e terão uma magnetização inicial $M_0(H, C)$ dada pela equação 3.5.2. Nesta equação $C_{H,C}$ é a constante de Curie e θ_R a temperatura da rede.

$$M_0(H, C) = \frac{C_{H,C} B_0}{\theta_R} \quad (3.5.2)$$

Sabe-se que esta magnetização é consequência da pequena diferença de populações de spin ocupando diferentes níveis de energia provenientes da interação Zeeman. Como apresentado na equação 3.3.1 esta diferença de populações é inversamente proporcional a temperatura do sistema, ou seja, quanto menor a temperatura, maior será a diferença de ocupação dos níveis de energia e maior será a magnetização resultante para um mesmo campo magnético. Dessa forma percebe-se que a magnetização responsável pelo sinal de RMN pode ser intensificada pelo aumento do campo magnético externo ou pela redução

na temperatura do conjunto de spins do núcleo em estudo. E justamente essa segunda alternativa que é utilizada em um experimento de polarização cruzada. O termo temperatura de spin reporta nesse contexto que a perturbação que altera a magnetização inicial de equilíbrio em um experimento de RMN é específica para um dado conjunto de spins nucleares em questão e não para toda a rede. Basicamente, com o objetivo de se aumentar a magnetização dos núcleos de ^{13}C , abaixa-se a temperatura de spin θ_C desse núcleos através de um contato térmico com os núcleos de ^1H previamente colocados em uma condição de baixa temperatura de spin. O contato térmico, melhor descrito nos próximos parágrafos, irá permitir que os ^{13}C transfiram energia para os ^1H até que a temperatura dos dois sistemas entre em equilíbrio (é possível considerar que a temperatura θ_H do sistema de ^1H praticamente não sofrerá alteração) [63,68].

Para se colocar o sistema de prótons em baixa temperatura de spin, a magnetização inicial deles alinhada ao campo externo é transferida para o plano transversal a \vec{B}_0 , através da aplicação de um pulso de 90° . Logo após a aplicação do pulso, efetua-se uma modificação de 90° na fase desse campo de RF denominado \vec{B}_{1H} de forma que, no referencial girante de coordenadas do sistema de núcleos de ^1H , a magnetização fica alinhada a este campo aplicado. Teremos assim uma situação de não equilíbrio, onde a alta magnetização dos prótons, inicialmente alinhada a \vec{B}_0 , está agora associada a um baixo campo magnético \vec{B}_{1H} ($B_{1H}/B_0 \sim 10^{-3}$), o que corresponde a temperatura de spin θ_H da ordem de 0,3 K que pode ser obtida da equação 3.5.3, para $\theta_R \sim 300$ K [56,62].

$$\theta_H = \frac{B_{1H}}{B_0} \theta_R \quad (3.5.3)$$

Como visto, o sistema de ^1H encontra-se agora fora do equilíbrio inicial e está apto para interagir com mecanismos presentes na rede que permitam troca de energia a fim de que sua temperatura aumente novamente, ou seja, sua magnetização “travada” pelo campo \vec{B}_{1H} no plano transversal diminua de intensidade. É nesse momento que aproveita-se dessa condição de desequilíbrio para se abaixar a temperatura de spin do sistema de núcleos de ^{13}C de forma a intensificar sua magnetização. O que se faz é preparar o sistema

de núcleos raros para que percam energia, diminuindo sua temperatura e aumentando sua magnetização. Para isso irradia-se um pulso de RF sobre os núcleos raros, de forma que seja satisfeita a relação 3.5.4. Este processo é o que podemos chamar de contato térmico como sugerido na Figura 3.5.3 [56, 58].

$$\gamma_C B_{1C} = \gamma_H B_{1H} \quad (3.5.4)$$

Na equação 3.5.4, B_{1C} é o campo da RF aplicada sobre os núcleos de ^{13}C e a ocorrência de tal relação, conhecida como condição de Hartmann-Hahn [76], implica que as magnetizações dos prótons e dos núcleos de ^{13}C precessionam à mesma frequência $\omega_H = \gamma_H B_{1H}$ e $\omega_C = \gamma_C B_{1C}$, nos respectivos sistemas girantes de coordenadas, em torno de \vec{B}_{1H} e \vec{B}_{1C} . Assim, nesses referenciais girantes, a diferença de energia entre os estados provenientes da interação Zeeman é idêntica para ambos os sistemas, permitindo a troca de energia entre eles. Sendo o sistema de prótons um reservatório de alta capacidade térmica, pelo fato de que os prótons são muito mais abundantes que os núcleos de ^{13}C , o sistema de núcleos de ^{13}C tenderá a entrar em equilíbrio com o sistema de prótons igualando sua temperatura de spin a θ_H [62, 68]. Assim, teremos:

$$M(C) = \frac{C_C B_{1C}}{\theta_H} \quad (3.5.5)$$

Substituindo 3.5.3 e 3.5.4 em 3.5.5, temos:

$$M(C) = C_C \frac{\gamma_H B_0}{\gamma_C \theta_H} \quad (3.5.6)$$

Comparando 3.5.6 com 3.5.2, temos:

$$M(C) = \frac{\gamma_H}{\gamma_C} M_0(C) \approx 4M_0(C)$$

Vemos que por meio da técnica de CP temos um aumento de até 4 vezes na magnetização em cada contato térmico. A detecção do sinal ocorre ao desligar-se o campo

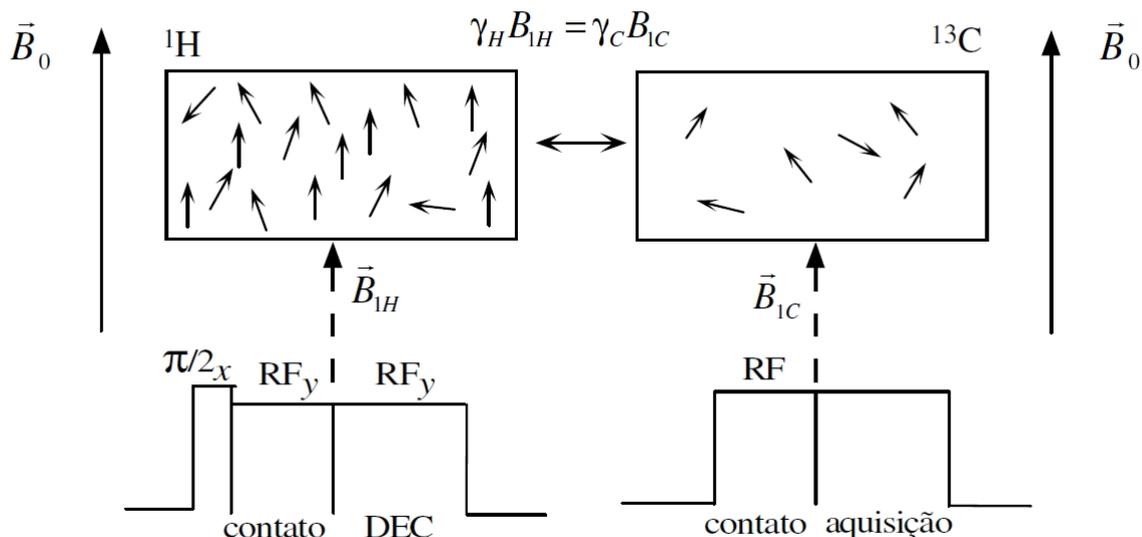


Figura 3.5.3: Representação do processo de polarização cruzada [64].

B_{1C} de modo que a magnetização dos núcleos de ^{13}C decai a zero com seu respectivo tempo de relaxação transversal. Em contrapartida, o campo B_{1H} é mantido para que novas aquisições sejam realizadas. Quando a magnetização do sistema de prótons tiver uma atenuação apreciável, um novo pulso de 90° sobre os mesmos deve ser aplicado, recomeçando o processo. É importante notar que a técnica de CP, além de provocar um aumento na magnetização, também reduz o tempo de espera para repetição do experimento, pois esse tempo passa a ser ditado pelo tempo de relaxação longitudinal dos prótons, que normalmente é menor que o tempo de relaxação longitudinal dos núcleos mais raros, permitindo um maior número de aquisições do FID por unidade de tempo e melhorando a relação sinal/ruído no espectro de RMN [56,62].

Um parâmetro importante a ser otimizado em um experimento de RMN utilizando CP é o tempo de contato, intervalo durante o qual são mantidos os campos B_{1C} e B_{1H} satisfazendo a condição de Hartmann-Hahn. Ao se traçar uma curva da intensidade de um dado pico do espectro em função do tempo de contato descrita na equação 3.5.7 e apresentada na Figura 3.5.4, é possível observar que esse parâmetro possui um valor ótimo. Após um crescimento inicial da curva, governado por um parâmetro denominado T_{CH} (*tempo de transferência de polarização*), observa-se uma queda associada à relaxação dos

prótons e governada pelo *tempo de relaxação spin-rede no sistema girante de coordenadas* denominado $T_{1\rho H}$ [55]. É importante observar que há um valor ideal de tempo de contato que maximiza a intensidade do sinal de cada pico obtido em um espectro de RMN e este valor pode ser diferente de um pico para o outro, de forma que experimentos de CP não podem ser tomados de forma geral para análises quantitativas relativas de diferentes sinais do espectro [77]. Também deve ser considerado que mesmo para o valor ótimo de tempo de contato, a intensidade do espectro obtido em um experimento de CP não é necessariamente igual ao número de núcleos. Entretanto, construindo curvas de variação do tempo de contato é possível obter a intensidade corrigida I_0 que pode ser utilizada em análises quantitativas [17]. Já uma outra possibilidade de análise quantitativa utilizando CP pode ser feita a partir da calibração do sinal utilizando um padrão externo [18, 78], procedimento este que será utilizado neste trabalho.

$$I(t) = I_0 \alpha^{-1} \left[1 - \exp\left(-\frac{\alpha t}{T_{CH}}\right) \right] \exp\left(\frac{-t}{T_{1\rho H}}\right) \quad (3.5.7)$$

Onde

$$\alpha = 1 - (T_{CH}/T_{1\rho H})$$

Outro fator que pode restringir o caráter quantitativo de CP é o fato de que em uma amostra macroscópica a condição de Hartmann-Hahn pode não ser idealmente satisfeita para todos os núcleos, visto que a interação dipolar, responsável pela transferência de polarização, pode não ter a mesma eficiência para todos os spins a serem polarizados. Esse problema pode ser contornado pela utilização de sequências em que a amplitude do campo \vec{B}_{1H} ou do campo \vec{B}_{1C} seja variada linearmente, por meio de uma rampa de crescimento, método este conhecido como *CP-rampa* [77, 80]. A Figura 3.5.5 apresenta a sequência de um experimento de polarização cruzada com uma rampa de crescimento da amplitude do campo \vec{B}_{1H} . Uma outra sequência recente, conhecida como *Multi-CP*, também tem aprimorado a utilização de CP em medidas quantitativas, principalmente para materiais em que $T_{1\rho H} < 10 \text{ ms}$. Por meio da aplicação de múltiplos pulsos separados por um

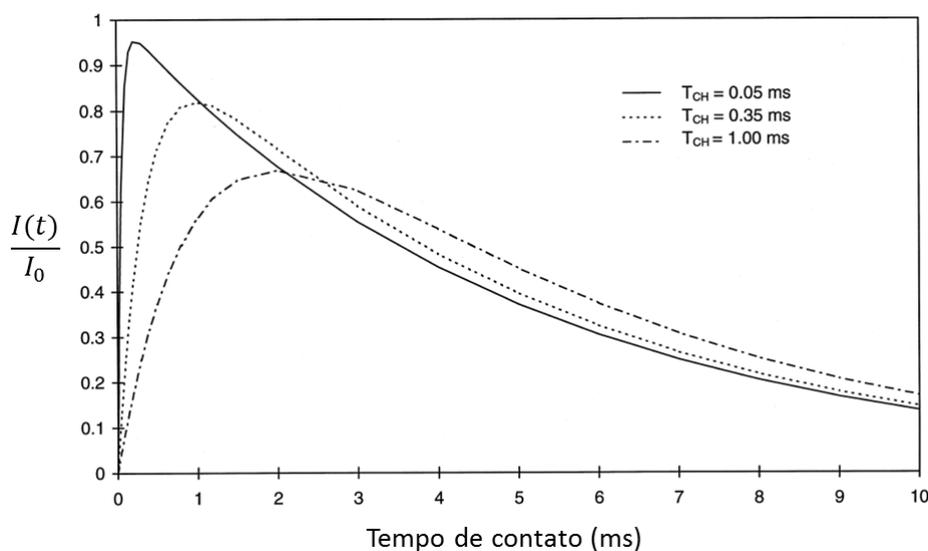


Figura 3.5.4: Curvas teóricas de variação do tempo de contato para $T_{1\rho H} = 5$ ms [79].

intervalo de tempo suficiente para os núcleos de ^1H retornarem próximo da magnetização de equilíbrio inicial, é possível a obtenção de informações quantitativas de diferentes materiais no estado sólido [81].

Uma variável do experimento CP que pode ser utilizada a fim de se selecionar determinados picos em um espectro é o experimento de polarização cruzada com defasamento dipolar (CPDD). Como discutido, o experimento de CP já é em si seletivo, visto que núcleos mais próximos aos ^1H são melhor polarizados que núcleos mais distantes, de forma que o sinal dos núcleos mais próximos acaba sobressaindo em relação aos outros. Entretanto, há também a possibilidade de se explorar os diferentes tempos de relaxação transversal presentes em uma mesma amostra, a fim de se conduzir experimentos seletivos fundamentados no tempo de espera para início da aquisição do sinal. Este tempo de espera é conhecido como tempo de defasagem ou tempo de defasamento e, dependendo da sua escolha, é possível selecionar a ocorrência ou não de certos sinais no espectro, visto que após este tempo de espera a magnetização de alguns grupos já terá perdido coerência. Como pode ser observado na Figura 3.5.6, esse caráter seletivo do experimento CPDD ocorre por meio da interação dipolar presente durante o tempo de defasamento (desacoplamento desligado) e responsável pelo processo de edição do espectro [82].

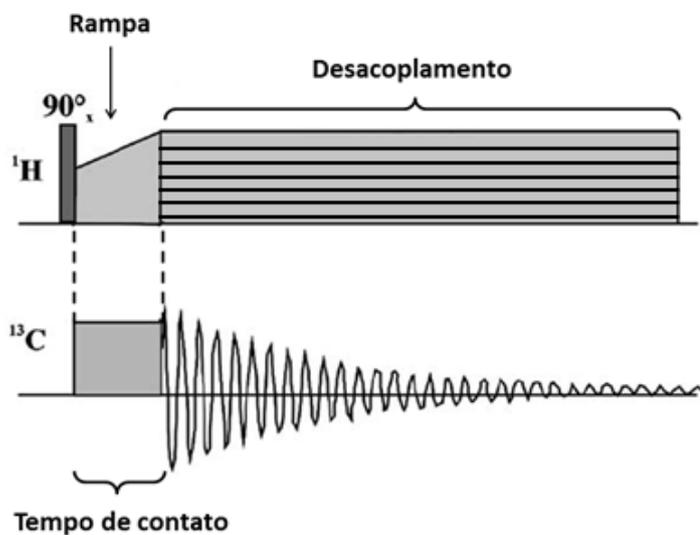


Figura 3.5.5: Sequência de pulsos de um experimento de CP-rampa [83].

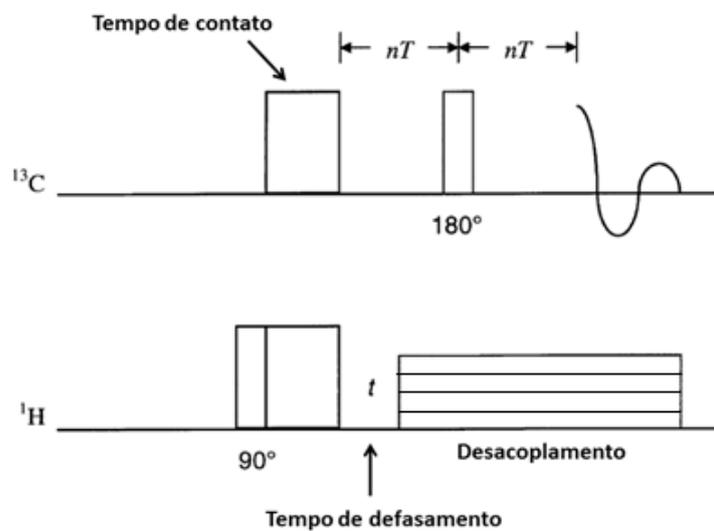


Figura 3.5.6: Sequência de pulsos do experimento de CPDD [82].

3.6 A RMN aplicada ao estudo de materiais lignocelulósicos

A aplicação da técnica de RMN de ^{13}C de alta resolução no estado sólido tem se mostrado uma ferramenta muito útil no estudo de materiais lignocelulósicos, podendo ser observadas no espectro de RMN contribuições características de cada uma das componentes lignocelulósicas [84]. Entretanto, espectros de RMN obtidos via CP em geral não podem ser diretamente utilizados em análises quantitativas, visto que tais experimentos dependem da transferência de polarização entre núcleos ^1H e ^{13}C presentes na amostra [85]. Mesmo não sendo quantitativos em primeira análise, os experimentos de CP são muitas vezes preferidos aos experimentos com polarização direta dos núcleos ^{13}C - denominados SPE, do inglês “single pulse excitation” - por permitirem a obtenção de um espectro com boa relação sinal ruído em um tempo relativamente menor [64, 86].

Medidas de RMN de ^{13}C via SPE são relativamente demoradas pelo fato do núcleo de ^{13}C ter abundância natural muito baixa, cerca de 1,1 %, e um fator giromagnético pequeno, de forma que para obtenção de um espectro com boa relação sinal ruído é necessária a aquisição do mesmo sinal muitas vezes, o que pode demorar algumas horas ou até mesmo dias. Por ser um núcleo pouco abundante e não quadrupolar, com spin igual a $1/2$, os espectros de RMN de ^{13}C no estado sólido são principalmente afetados pela interação dipolar heteronuclear (principalmente com prótons) e a anisotropia de deslocamento químico. A interação dipolar é, nos casos favoráveis, removida por desacoplamento de prótons combinado com rotação em torno do ângulo mágico; a anisotropia de deslocamento químico pode ser bastante grande no caso de materiais contendo anéis aromáticos (como é o caso da lignina), situação em que é comum a presença de bandas laterais, em particular quando são usados altos campos magnéticos [63, 84].

Também devido ao fato de ser um núcleo raro e não quadrupolar, os valores de T_1 para os núcleos ^{13}C tendem a ser grandes em materiais sólidos, principalmente para os núcleos em átomos sem ligação direta com átomos de hidrogênio, como aqueles pertencentes a átomos de carbono quaternários. Essa relaxação spin-rede ineficiente para

alguns grupos, aliada à baixa sensibilidade dos núcleos ^{13}C , fazem da técnica de CP via núcleos ^1H (utilizada em conjunção com desacoplamento de prótons e MAS) a abordagem experimental mais utilizada para a análise de materiais orgânicos sólidos [83].

Ao se fazer análises de RMN de ^{13}C com CP, três problemas principais estão envolvido com a quantificação de grupos químicos em materiais lignocelulósicos: a variação na eficiência da transferência de magnetização dos prótons para os núcleos ^{13}C para diferentes grupos químicos no material; a existência de átomos de carbono com núcleos insensíveis ao processo de CP devido à proximidade de centros paramagnéticos, que leva ao encurtamento excessivo no tempo de relaxação longitudinal no sistema girante de coordenadas dos prótons; e a perda de intensidade e distorção das linhas de ressonâncias (em especial as aromáticas) devidas às bandas laterais. Os dois primeiros problemas são específicos da técnica CP, enquanto que o terceiro é comum aos processos de CP ou de polarização direta dos núcleos ^{13}C [83, 86, 87].

Não há soluções gerais para esses problemas, mas há procedimentos para tentar contorná-los, ainda que parcialmente, tais como a utilização de campos magnéticos com magnitude moderada (para minimizar a ocorrência das bandas laterais), a otimização dos tempos de contato para cada ressonância e o cuidado em empregar amostras sem a contaminação de impurezas com características magnéticas [84]. Há também várias propostas de métodos que visam aprimorar o caráter quantitativo dos experimentos de CP, tais como a utilização de uma rampa de amplitude variável (CP-rampa) [77, 80], bem como a realização de experimentos com variações de tempos de contato. Todavia, a obtenção de curvas de variação de tempo de contato que permitam a realização de análises quantitativas com CP também exigem a realização longos tempos de medida [17, 56].

Há algumas décadas a RMN vem sendo aplicada ao estudo de diferentes materiais lignocelulósicos, tanto visando caracterizar a sua morfologia e composição química, bem como monitorar variações estruturais em processos de pré-tratamento físicos, químicos e biológicos que visam desconstruir a estrutura recalcitrante desses materiais.

Com o objetivo de observar variações de porosidade em amostras de bagaço de cana submetida a tratamentos alcalinos após prévio tratamento com ácido sulfúrico, Tsuchida

e colaboradores correlacionaram informações morfológicas obtidas por microscopia eletrônica de varredura com informações de porosidade obtidas por estudos de relaxometria por RMN de ^1H de baixo campo. A partir destes estudos, foi possível desenvolver um método semi-quantitativo para monitorar a eficiência da hidrólise enzimática no bagaço de cana, deixando em aberto a possibilidade deste ser estendido para outros materiais [32].

Também a influência do tratamento térmico em materiais de biomassa foi monitorada por RMN. A partir da observação de espectros de RMN de ^{13}C CP/MAS, Freitas e colaboradores observaram alterações nas estruturas da casca de arroz e do endocarpo de babaçu. Ambos materiais apresentaram degradação da celulose e hemicelulose a partir de $300\text{ }^\circ\text{C}$, com decorrente formação de estruturas aromáticas. Freitas também observou nestes materiais, utilizando RMN de ^{29}Si , a ocorrência de silício em moléculas orgânicas, e que os tratamentos térmicos levaram à conversão dessas associações em grupos de silício oxigenados [64,88].

Por volta de 1980, Earl, VanderHart, Atalla, juntamente com outros pesquisadores [89,90] reportaram avanços na compreensão das estruturas lignocelulósicas por meio de técnicas de alta resolução de RMN de ^{13}C em sólidos. Earl e VanderHart, observaram que o espectro de RMN de ^{13}C obtido com CP/MAS para a celulose nativa é formado por três sinais distintos associados aos carbonos 1, 4 e 6, e um pico associado a sobreposição de sinais provenientes dos carbonos 2, 3 e 5 da molécula de glicose identificados na Figura 2.1.2. No mesmo trabalho, também observaram de maneira similar para o carbono 4 e carbono 6 a ocorrência de dois sinais distintos correspondentes a unidades de glicose em dois sítios estruturalmente distintos, provavelmente amorfo e cristalino. Atalla e colaboradores reforçaram esta discussão comparando espectros obtidos com a mesma técnica para diferentes polimorfos de celulose, ressaltando até mesmo, por interpretações puramente espectrais, a existência de duas diferentes fases cristalinas presentes na estrutura da celulose nativa, também chamada de celulose I, encontrada naturalmente nos diferentes materiais de biomassa [91].

Nesse mesmo período as estruturas da lignina e dos açúcares de hemicelulose foram amplamente estudadas por RMN de ^{13}C CP/MAS. Kolodziejcki e colaboradores estuda-

ram amostras de lignina obtidas por diferentes métodos de isolamento e observaram, pela variação espectral, que a estrutura da lignina, além de variar para diferentes fontes, também pode sofrer modificações durante os processos de isolamento. No mesmo trabalho eles também observaram que a contribuição da hemicelulose para o espectro de RMN também pode variar dependendo dos açúcares constituintes, sendo possível observar picos em 21,5 e 174 ppm associados a grupos acetatos [84], mas que de forma geral a principal contribuição da hemicelulose no espectro de RMN está centrada na mesma região em que há contribuição dos carbonos 2, 3 e 5 da celulose, sobrepondo-se com estes nos espectros dos diferentes materiais de biomassa [92]. Utilizando essa mesma técnica, Haw e Maciel [78] realizaram uma refinada análise qualitativa e quantitativa de polpas de madeiras, identificando os diferentes picos do espectro associados a lignina e aos carboidratos. Sabendo que a lignina da amostra de polpa que analisou era rica em unidades guaiacila ele adotou uma fórmula molecular aproximada para a mesma e conseguiu determinar, a partir da integração do espectro de RMN, um teor de 26,5 % de lignina, comparável ao teor de lignina Klason de 25,5 % para a amostra em estudo.

Muitos outros trabalhos foram realizados desde então utilizando técnicas de alta resolução de RMN de sólidos. Com o objetivo de estudar as variações na ultraestrutura da celulose em diferentes materiais de biomassa, Larsson e colaboradores utilizaram um modelo construído a partir de curvas Lorentzianas e Gaussianas para deconvoluir regiões do espectro de RMN de ^{13}C CP/MAS, a fim de identificar essas variações de ultraestrutura da celulose em diferentes tipos de materiais lignocelulósicos [93–96]. A Figura 3.6.1 apresenta o modelo utilizado por Larsson e colaboradores para deconvoluir a região do espectro de RMN de ^{13}C CP/MAS de 80 a 90 ppm, correspondente ao carbono 4 (C4) das unidades de glicose presentes na celulose. Nesta figura é possível observar a presença de diferentes sinais provenientes da ultraestrutura da celulose I. Os sinais centrados entre 83 e 84 ppm são relacionados a carbonos em regiões desordenadas com maior ou menor acessibilidade. Os sinais centrados entre 88 e 90 ppm são associados às regiões cristalinas e paracristalinas, em organizações triclinicas (Celulose I α) e monoclinicas (Celulose I β). Larsson e colaboradores indentificaram contribuições espectrais na região do C4 decorren-

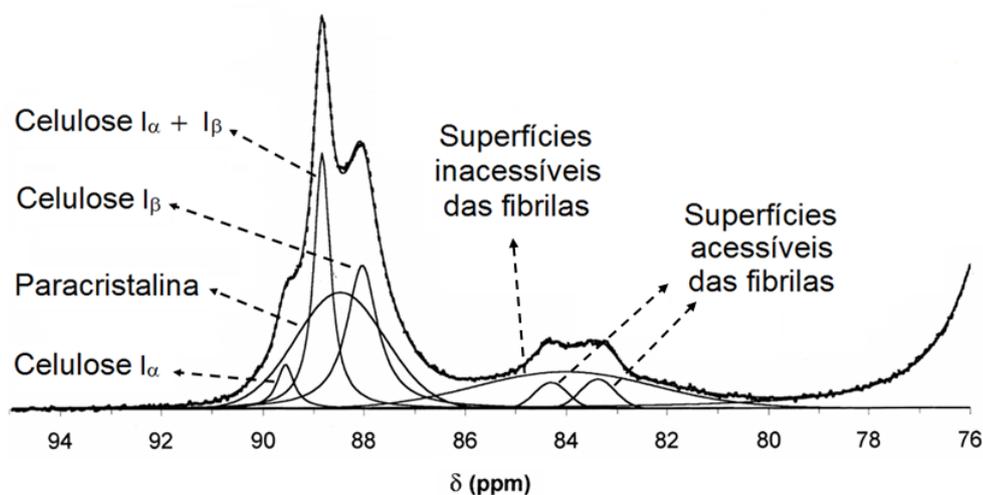


Figura 3.6.1: Espectro de RMN de ^{13}C CP/MAS da celulose proveniente de fibras de algodão, deconvolvido por Larsson e colaboradores. Adaptado de [97].

tes da interação de açúcares de hemicelulose, como a xilana, com a celulose, acarretando o surgimento de um sinal em torno de 82 ppm decorrente desta interação, como apresentado na Figura 3.6.2 [97–99].

Nesse contexto, Foston e colaboradores observaram melhorias nas análises de ultra-estrutura da celulose em materiais de biomassa a partir de prévios tratamentos ácidos. Monitorando as condições do tratamento, como concentração ácida, temperatura e tempo da reação, foi possível realizar a remoção da hemicelulose, ainda que com parcial remoção de celulose amorfa, eliminando a presença de sinais desses polissacarídeos não celulósicos no espectro de RMN de ^{13}C CP/MAS [41].

Com o objetivo de melhor compreender a influência da hemicelulose na polpa celulósica obtida no processo *kraft*, Duchesne et al. [100] correlacionou informações de microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo com informações obtidas por espectroscopia de RMN de ^{13}C CP/MAS. Utilizando a mesma montagem espectral da Figura 3.6.1, Duchesne e colaboradores observou uma correlação entre o teor de hemicelulose, a ocorrência de superfícies mais acessíveis e o tamanho dos agregados de fibrila. Liitia e colaboradores [101] observaram que em muitos casos a utilização de sequências de edição espectral, fundamentadas nos diferentes tempos de relaxação das estruturas cris-

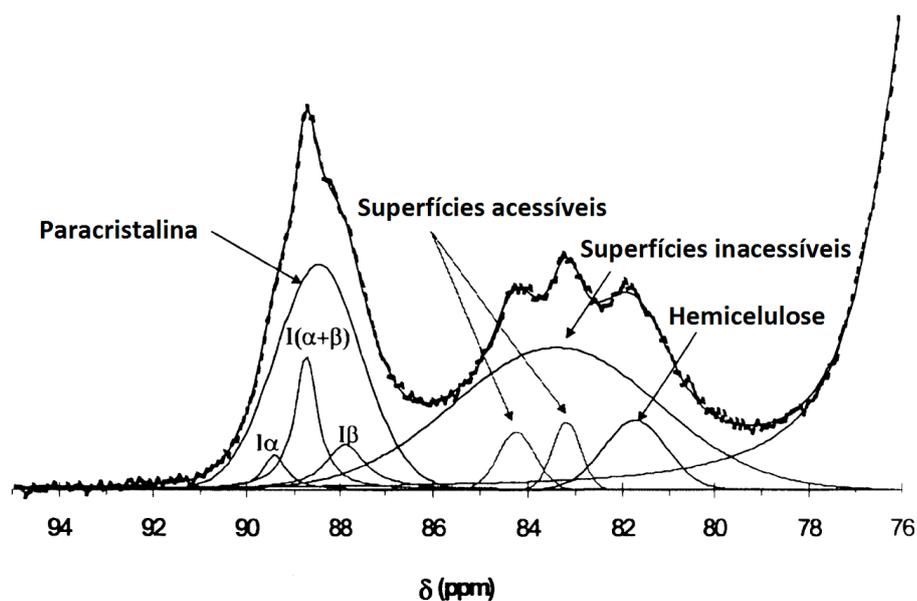


Figura 3.6.2: Espectro de RMN de ^{13}C CP/MAS da polpa de bétula branquiada obtido por Wickholm. Adaptado de [98].

talinas e amorfas, pode contribuir para a separação de sinais de celulose e hemicelulose no espectro.

Grandes avanços vêm sendo gradativamente alcançados na compreensão, estudo e caracterização desses diferentes materiais. Estudos recentes vêm hoje confirmar trabalhos iniciados a tempos, como a determinação do teor de lignina por RMN. Nesse contexto, Fu e colaboradores [18], seguindo uma ideia muito parecida com a adotada neste trabalho, utilizaram uma amostra de lignina padrão para construir uma curva de calibração da intensidade do espectro na região aromática em função da massa de amostra utilizada. Para evitar interferências decorrentes das alterações químicas ocasionadas nos processos de isolamento da lignina, eles utilizaram uma amostra de lignina obtida, da própria biomassa a ser quantificada, pela ação de fungos capazes de degradar apenas os carboidratos da biomassa lignocelulósica.

Capítulo 4

Objetivos

Em busca de métodos quantitativos e menos demorados que os experimentos de polarização direta, neste trabalho esforços foram dedicados ao estudo, elaboração e validação de um procedimento experimental que utilizando RMN de ^{13}C com CP/MAS permita, de maneira confiável, a determinação dos teores de lignina e celulose em materiais de biomassa, a partir da construção de curvas de calibração da intensidade do sinal obtido no espectro de RMN registrado com tempo de contato fixo em função da massa previamente conhecida de cada componente presente em misturas padrões preparadas com lignina e celulose puras.

Como objetivos específicos deste trabalho podem ser destacados:

- Aplicação do método aqui apresentado em diferentes materiais lignocelulósicos a fim de avaliar a extensão de validade do mesmo.
- Aplicação do método de quantificação aqui apresentado em amostras de bagaço de cana quimicamente modificadas a fim de se monitorar a eficiência do tratamento empregado.
- Investigação da influência no método de quantificação apresentado de diferentes arranjos de empacotamento de amostra no rotor.
- Estudo das possíveis contribuições provenientes da utilização da polarização cruzada com defasamento dipolar na quantificação de materiais lignocelulósicos.

Capítulo 5

Materiais e métodos

5.1 Materiais utilizados

5.1.1 Padrões de celulose e lignina

As amostras utilizadas como padrão de celulose e lignina para realização de misturas e calibração do sinal de RMN são duas amostras comerciais da empresa Sigma-Aldrich[®], denominadas respectivamente “*Cellulose powder*” (22183) e “*Lignosulfonic acid sodium salt*” (370975), cujas fórmulas moleculares são apresentadas na Figura 5.1.1 [102].

Outras duas amostras padrões de lignina também foram analisadas a fim de se comparar diferenças no perfil do espectro de diferentes ligninas e como isto pode influenciar a previsão dos teores lignocelulósicos. Durante as análises comparativas entre diferen-

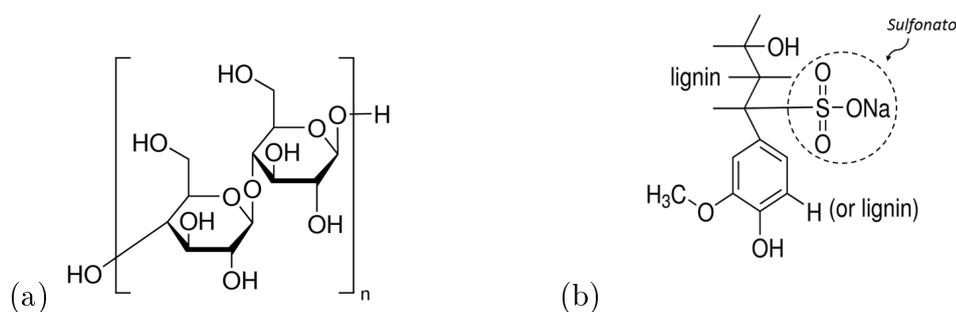


Figura 5.1.1: Fórmula molecular relativa aos padrões de celulose (a) e lignina (b) utilizados na calibração dos sinais [102].

Tabela 5.1.1: Amostras padrões de lignina analisadas

Amostra	Fornecedor	Observações
Lignina A*	Sigma-Aldrich	Alto teor de sulfonatos
Lignina B	Sigma-Aldrich	Baixo teor de sulfonatos
Lignina C	Fibria	Lignina <i>kraft</i> - Eucalipto

*Amostra utilizada nas misturas preparadas para calibração do sinal.

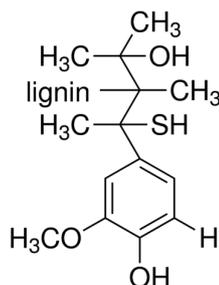


Figura 5.1.2: Fórmula molecular relativa a amostra de Lignina B [102].

tes padrões de lignina, será adotada a nomenclatura apresentada na Tabela 5.1.1 para distinguir entre as três amostras estudadas.

As análises quantitativas foram realizadas somente com a Lignina A, pois somente esta amostra esteve disponível desde o início da pesquisa. As amostras B e C foram obtidas e analisadas durante o desenvolvimento do trabalho e análises quantitativas com essas amostras poderão ser reportadas em trabalhos futuros. Como pode ser visto na Tabela 5.1.1, a amostra B também é proveniente da empresa Sigma-Aldrich[®], denominada “*Lignin, alkali*” (471003), sua fórmula molecular é apresentada na Figura 5.1.2. A amostra C, proveniente da empresa *Fibria*, foi obtida pelo processo *kraft* para produção de poupa celulósica da madeira de Eucalipto.

5.1.2 Materiais de biomassa

Os materiais de biomassa utilizados para validação do método de quantificação foram duas alíquotas de bagaço de cana de safra brasileira, uma amostra de madeira de pinho (*Monterey Pine Whole*), duas amostras de fibras de madeira (*Lignocel*) comercializadas pela empresa J. RETTENMAIER & SÖHNE[®] [103], e uma amostra de casca de

Tabela 5.2.1: Teores de lignina, holocelulose e extrativos, em base seca, dos materiais de biomassa utilizados.

Biomassa	Símbolo	Lignina (%)	Holocelulose (%)	Extrativos (%)
Bagaço de cana 1	BC1	22	73	3
Bagaço de cana 2	BC2	23	67	6
Monterey Pine Whole	MPW	27	66	2
Casca de Palmiste	CPA	59	26	3
Lignocel 1	LC1	32	66	2
Lignocel 2	LC2	29	65	3

palmiste (fruto da palmeira *Elaeis guineensis*) [104]. Uma amostra de farelo de mamona foi utilizada para exemplificar algumas características espectrais que inviabilizam a utilização do procedimento descrito neste trabalho. Estes materiais utilizados neste trabalho, bem como as amostras padrões de lignina e celulose, foram fornecidos pelo Laboratório de RMN do Centro de Pesquisas e Desenvolvimento Leopoldo Américo Miguez de Mello (CENPES/Petrobras), por meio dos pesquisadores: Dra. Sonia M. C. de Menezes e Dr. Luis S. Chinelatto Jr.

Os teores de lignina, holocelulose e extrativos para as diferentes amostras de materiais de biomassa estudadas neste trabalho são apresentados na Tabela 5.2.1 e a sua determinação é descrita na seção 5.2.

5.2 Metodologia Klason

Os teores de lignina e holocelulose foram obtidos pelo método de determinação de lignina Klason desenvolvido para madeiras [43]. Todo o procedimento foi conduzido por membros do laboratório de análises químicas do CENPES/Petrobras.

Para determinação do teor de lignina, a amostra após triturada e seca, é submetida a uma determinação inicial do teor de extrativos com acetona, seguida de um tratamento com ácido sulfúrico a 72 % e a 30 °C por uma hora; na sequência o caldo obtido é diluído em água e levado a um reator onde permanece a 120 °C por mais uma hora. O teor de lignina consiste no material retido após a filtração, que por sua vez é submetido a análise

térmica para correção de valores de cinzas e umidade. O percentual de holocelulose é obtido por diferença, subtraindo do total o percentual de lignina, extrativos e cinzas.

É importante considerar que o teor de lignina Klason comparativamente utilizado neste trabalho pode ser superestimado devido à presença de substâncias, como proteínas, que não se solubilizam e permaneçam como contaminantes da massa de lignina obtida no final do processo.

5.3 Metodologia de quantificação por RMN

As análises por RMN de ^{13}C foram efetuadas em temperatura ambiente utilizando um espectrômetro Varian-Agilent 400 MHz, apresentado na Figura 5.3.1, operando em frequências de 399,73 MHz para prótons e 100,52 MHz para ^{13}C , o que corresponde a um campo magnético de 9,4 T. Utilizou-se uma sonda de radiofrequência (RF) de tripla ressonância com rotores de zircônia com 4 mm de diâmetro, apropriada para experimentos com CP e MAS em frequências de rotação de até 18 kHz. Como sinal de referência para os espectros de RMN de ^{13}C foi utilizado o pico associado aos grupos metila no espectro do hexametilbenzeno (HMB), o qual possui deslocamento químico igual a 17,3 ppm em relação à referência primária para ^{13}C , que é o pico único observado no espectro de RMN de ^{13}C do tetrametilsilano (TMS) [105].

Após a otimização de todos os parâmetros experimentais, foram realizados experimentos de CP/MAS com aplicação de pulso de 3,6 μs nos núcleos de ^1H , intervalo de 5 s entre pulsos, tempo de aquisição de 20,48 ms, janela espectral de 50 kHz, com registro de 1024 pontos e aquisição de 1500 transientes (~ 2 h). Os experimentos realizados com a sequência de defasamento dipolar (DD), foram conduzidos com um tempo de defasamento de 0,25 ms, escolhido após a realização de alguns experimentos de variação do tempo de defasagem.

Inicialmente foram realizados experimentos com variação de tempo de contato (as curvas serão apresentadas na próxima seção), com 22 passos em um intervalo de 0,05 a 25 ms, a fim de determinar um tempo de contato ideal para análise dos componentes lignoce-



Figura 5.3.1: Espectrômetro utilizado nos experimentos de RMN.

lulósicos nos espectros de RMN com boa relação sinal/ruído. Ao fim destes experimentos escolheu-se trabalhar com um tempo de contato fixo igual a 1 ms para todas as medidas realizadas.

Fixado o tempo de contato, realizou-se uma otimização das condições de Hartmann-Hahn (condições experimentais necessárias para ocorrência do processo de CP) para análises com MAS à frequência de 10 kHz (este valor foi escolhido para evitar a ocorrência de arcos elétricos no interior da sonda, observados em experimentos para frequência de MAS de 14 kHz). Os experimentos foram realizados utilizando desacoplamento de alta potência do tipo SPINAL.

Os experimentos foram realizados para amostras padrões de celulose e lignina e misturas desses padrões com as proporções previamente conhecidas, como mostrado na Tabela 5.3.1. Os mesmos experimentos foram também realizados para diferentes materiais lignocelulósicos descritos anteriormente.

Para avaliação da incerteza na intensidade do sinal foram realizadas medidas em triplicata da mistura Cel_Lig_1_1 com as mesmas condições experimentais descritas, mas com uma aquisição de 320 transientes. Da mesma forma, foram conduzidos os experimentos realizados no estudo de amostras de bagaço de cana submetidas a tratamentos

Tabela 5.3.1: Frações em massa de celulose e lignina nas misturas preparadas

Mistura	Teor de Celulose (%)	Teor de Lignina (%)
Cel_Lig_9_1	90	10
Cel_Lig_3_1	75	25
Cel_Lig_6_4	60	40
Cel_Lig_1_1	50	50
Cel_Lig_4_6	40	60
Cel_Lig_1_3	25	75
Cel_Lig_1_9	10	90

ácidos, mas com 720 transientes. Para os experimentos com defasamento dipolar foram adquiridos 3000 transientes ($\sim 4h$).

Após a obtenção dos espectros de RMN, foram construídos gráficos relacionando a intensidade absoluta de regiões selecionadas do espectro com a massa da componente na mistura responsável por tal intensidade. As intensidades foram obtidas por deconvolução do espectro de RMN, com utilização de curvas gaussianas e lorentzianas [97], como será detalhado mais adiante na seção destinada aos resultados. Por regressão linear aplicada ao conjunto de pontos experimentais foram obtidas curvas de calibração para cada região espectral selecionada. Os parâmetros obtidos da curva foram utilizados na determinação dos teores dos componentes lignocelulósicos presentes em amostras de diferentes materiais de biomassa e em amostras de bagaço de cana tratadas quimicamente.

Também foram realizados testes da metodologia de quantificação alterando as condições de empacotamento da amostra no rotor como apresentado na Figura 5.3.2. Isto foi feito variando o tamanho dos espaçadores colocados no rotor, alterando conseqüentemente a quantidade e centralização da amostra em seu interior. As curvas de calibração foram obtidas nestas três condições, a fim de se avaliar as melhores condições experimentais para as análises quantitativas [106].

No processamento do FID, foi realizado um preenchimento com zeros, aumentando o número de pontos para 4096, seguido de uma apodização exponencial com $lb = 20$. Então obteve-se o espectro pela transformada de Fourier do FID, o qual passou por correções de fase de primeira ordem e correções na linha de base. Por fim os picos presentes no

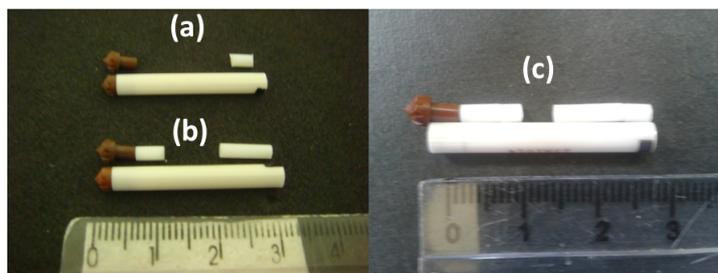


Figura 5.3.2: Arranjos experimentais do rotor avaliados em busca de melhores condições de quantificação. As letras (a), (b) e (c) indicam os espaços disponíveis para o empacotamento de amostra nos respectivos rotores

espectro foram selecionados e o espectro deconvoluído. Todos os espectros de RMN foram processados no programa ACD/NMR Processor Academic Edition [107].

Para o cálculo percentual de cada componente lignocelulósico em questão utilizou-se as expressões 5.3.1 e 5.3.2, onde A e B são, respectivamente, os coeficientes angular e linear obtidos da curva de calibração da intensidade I_{Comp} de um pico previamente escolhido, m_{Comp} é a massa do componente em questão e m_a a massa da amostra analisada contida no rotor. Um dos problemas a serem superados para a realização deste cálculo é que o pico a ser escolhido deve representar quantitativamente o componente que se deseja quantificar, por este motivo neste trabalho foram eleitos (por razões a serem discutidas na apresentação dos resultados) alguns picos presentes no espectro de RMN a fim de se verificar qual a escolha mais apropriada para a correta quantificação dos componentes.

$$I_{Comp} = A \times m_{Comp} + B ; (Comp = Componente) \quad (5.3.1)$$

$$\%Comp = \frac{m_{Comp}}{m_a} \quad (5.3.2)$$

5.4 Tratamentos ácidos

Como mencionado anteriormente, também como forma de avaliação do método de quantificação desenvolvido, foram preparadas cinco amostras de bagaço de cana submeti-

das a diferentes tempos de tratamento ácido a fim de se avaliar a retirada da hemicelulose, visando a obtenção de espectros sem sobreposição de picos devidos a celulose e hemicelulose [41].

Para esses tratamentos, foram utilizados 930 mg de uma amostra de bagaço de cana em pó misturados em 40 ml de HCl 2,5 M a 100 °C em um sistema de refluxo. Foram preparadas cinco amostras de bagaço de cana submetidas a diferentes tempos de tratamento ácido: 5, 10, 30, 120, 240 minutos. Para realização do tratamento ácido foi utilizada a amostra BC2, devido à maior quantidade disponível.

5.5 Análise por termogravimetria

As análises por termogravimetria (TG) foram conduzidas em um analisador Shimadzu TGA-50H, localizado no Laboratório de Materiais Carbonosos e Cerâmicos (LMC) da UFES. Essa técnica foi utilizada para se avaliar o conteúdo de cinzas das três amostras de lignina comparadas na fase final deste trabalho. Os ensaios de TG foram conduzidos utilizando-se uma rampa de aquecimento de 10 °C/min, da temperatura ambiente até 1000 °C sob um fluxo de 50 ml/min de O₂.

Capítulo 6

Resultados e Discussão

6.1 Aspectos gerais das análises quantitativas em espectros de RMN de ^{13}C CP/MAS

6.1.1 Experimentos de variação de tempo de contato (VCT)

Na Figura 6.1.1 é apresentado um espectro típico de RMN de ^{13}C no estado sólido obtido com CP/MAS para uma amostra de bagaço de cana, onde pode ser observada a contribuição de cada componente lignocelulósico no espectro. Os deslocamentos químicos correspondentes a cada pico permitem a sua associação às componentes principais presentes em materiais lignocelulósicos: celulose, hemicelulose e lignina. Os picos designados pela letra C com numeração de 1 a 6 representam os sinais associados aos seis diferentes carbonos presentes na celulose, contribuindo para uma região do espectro de 60 a 105 ppm. A hemicelulose, representada pela letra H no espectro, formada por diferentes unidades monoméricas, contribui tanto para região associada aos sinais da celulose, como também possui picos característicos de grupos acetatos em 21,5 ppm (metil) e 174 ppm (carboxila) [84, 88, 90]. A lignina, além de contribuir para os sinais da região aromática, possui também carbonos que contribuem para região alifática tendo como sinal mais pronunciado o pico em 56 ppm, característico do grupo metoxil. A partir das intensidades (áreas) desses picos é possível estimar as contribuições de cada componente para o

espectro em questão [17, 52, 84]. Entretanto, como discutido anteriormente, essas áreas relativas espectrais não correspondem às respectivas frações em massa de cada componente do material, devido à dependência da transferência de polarização com relação aos detalhes da interação dipolar entre núcleos ^{13}C e ^1H em cada grupo químico e também porque o número de átomos de hidrogênio por unidade de massa de cada componente é diferente (e em geral desconhecido).

Assim, é necessário realizar procedimentos que corrijam as intensidades no experimento de CP em busca das corretas relações quantitativas. Um procedimento para atingir esse caráter quantitativo consiste em repetir os experimentos de CP com diferentes tempos de transferência de polarização (denominados tempos de contato) e analisar como varia a intensidade de cada pico em função do tempo de contato. Na Figura 6.1.2 é mostrado um gráfico da intensidade de alguns picos do espectro associados a carboidratos em função do tempo de contato; pode-se observar que todos apresentam intensidade máxima em torno de 1 ms. O mesmo pode ser visto para o pico associado à lignina na Figura 6.1.3. O ajuste da função apresentada na Equação 3.5.7 a esses conjuntos de pontos permite, em princípio, a determinação da intensidade corrigida de cada pico [86]. Esforços foram empregados nesse sentido, mas não foram obtidas soluções viáveis para o problema de quantificação dos teores de lignina e celulose utilizando experimentos com variação de tempo de contato, visto que esses experimentos são muito demorados (embora sejam mais rápidos que os experimentos de polarização direta) e necessitam de conhecimento (ou suposição) de fórmulas moleculares médias para transformar as intensidades espectrais relativas (ainda que corrigidas) em frações em massa.

6.1.2 Aplicação do defasamento dipolar na determinação de lignina

Da Figura 6.1.1 é possível observar vários sinais cuja intensidade pode ser correlacionada com a massa do componente lignocelulósico associado ao pico escolhido. Por motivos a serem explicados na seção 6.2 o pico de 56 ppm foi escolhido neste trabalho para

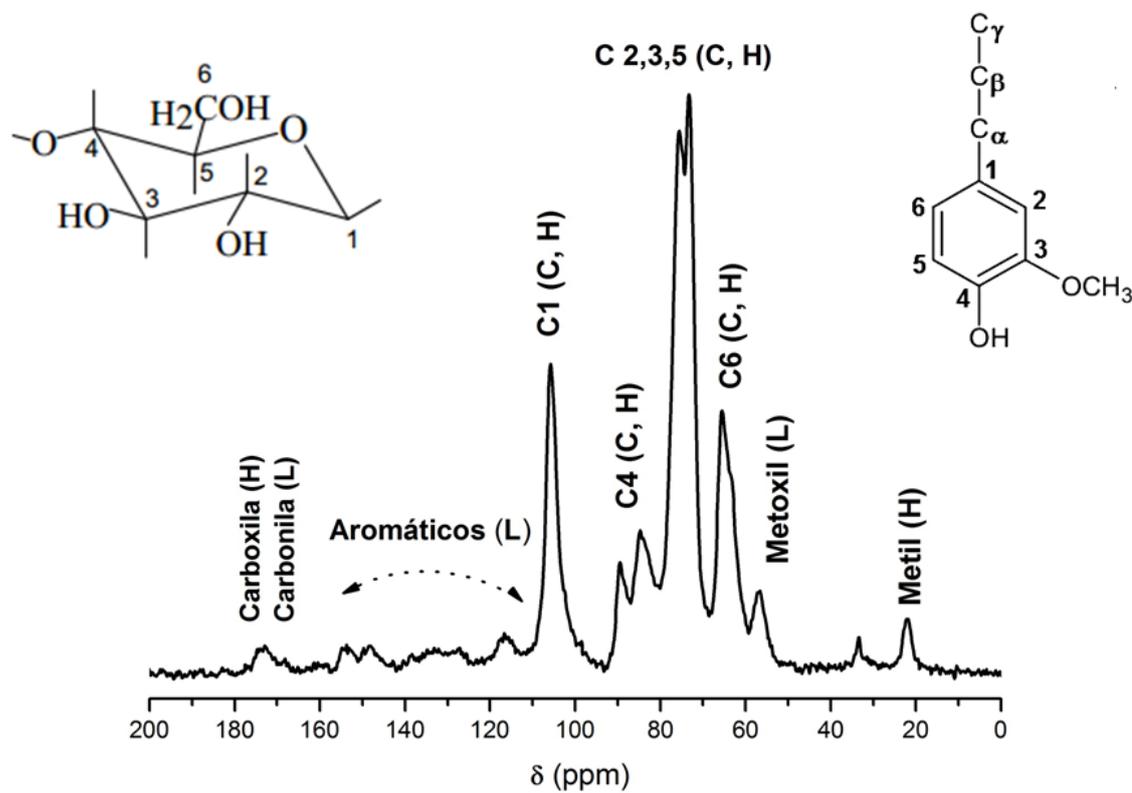


Figura 6.1.1: Espectro de RMN de ^{13}C CP/MAS para a amostra BC1. As letras C, H e L indicam contribuições correspondentes respectivamente a celulose, hemicelulose e lignina. A letra C seguida dos números de 1 a 6 indica o tipo de carbono presente nas unidades básicas de celulose e hemicelulose, indicados na Figura 2.1.2, que correspondem ao sinal assinalado no espectro.

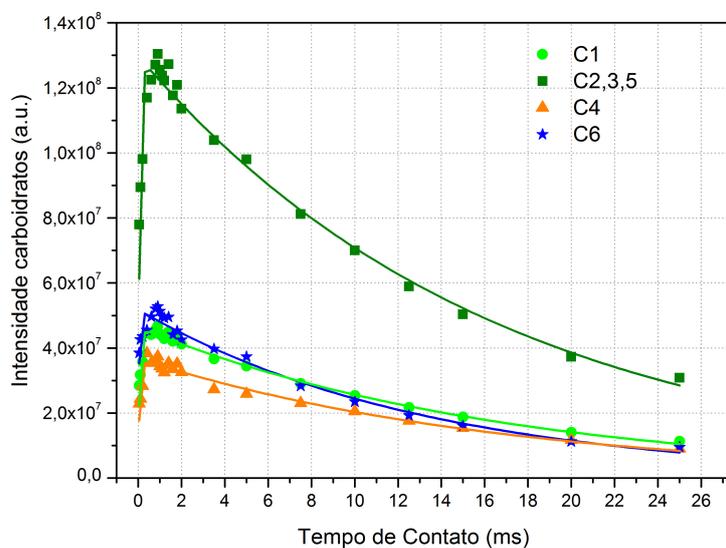


Figura 6.1.2: Resultados obtidos com os experimentos de variação de tempo de contato para diferentes picos associados a carboidratos presentes no espectro de RMN de ^{13}C CP/MAS do bagaço de cana. As linhas sólidas são ajustes dos pontos experimentais pela equação 3.5.7.

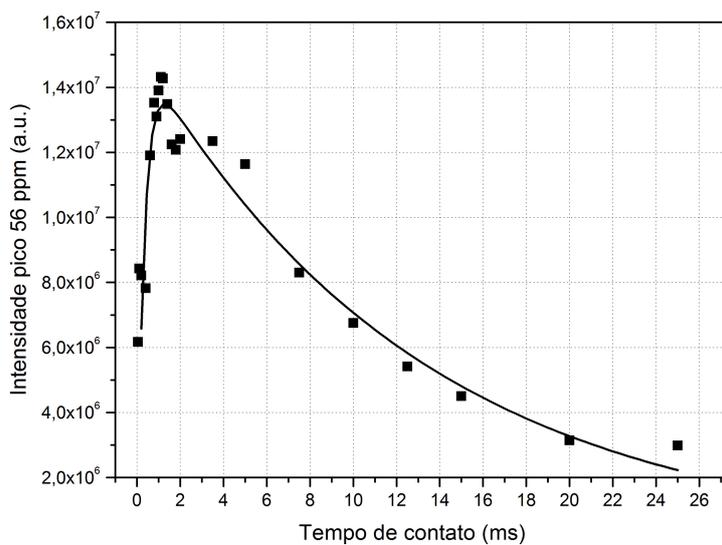


Figura 6.1.3: Resultados obtidos com os experimentos com variação de tempo de contato para o pico de 56 ppm associado à lignina presente no espectro de RMN de ^{13}C CP/MAS do bagaço de cana. As linhas sólidas são ajustes dos pontos experimentais pela equação 3.5.7.

se analisar a correlação da sua intensidade com a massa de lignina presente na amostra. Como o metoxil possui uma dinâmica bem distinta comparado aos carboidratos, análises preliminares com e sem defasamento dipolar foram realizadas a fim de se observar possíveis melhorias nos resultados de quantificação.

Como análise preliminar, foram elaboradas curvas de calibração do teor de lignina a partir dos espectros obtidos por polarização cruzada com e sem defasamento dipolar, a fim de se avaliar por meio do resultado previsto para a amostra de bagaço de cana, a possível utilização do defasamento dipolar no procedimento de calibração. Na Figura 6.1.4 são mostrados os espectros obtidos para as seguintes amostras: lignina, misturas de celulose e lignina preparadas com diferentes proporções em massa (celulose:lignina = 1:3, 1:1 e 3:1) e celulose. Os espectros registrados com o método CP/MAS são exibidos na Figura 6.1.4a e aqueles registrados com defasamento dipolar (CPDD/MAS) são exibidos na Figura 6.1.4b.

Observa-se claramente que o método DD levou a uma melhor definição do pico devido aos grupos OCH_3 da lignina (localizado em 56 ppm), por meio da supressão quase total dos picos devidos aos carboidratos. Utilizando a área desse pico (obtida por deconvolução) foram construídas curvas de calibração em função da quantidade de lignina em cada mistura. Com essas curvas preliminares, foi determinado o teor de lignina na amostra de bagaço de cana, sendo obtidos os valores de 25 (2) % (método CP/MAS) e 24 (2) % (método CPDD/MAS) para o teor em massa de lignina no bagaço de cana (BC1). Esses valores são favoravelmente comparáveis ao valor de 22 % obtido pelo método Klason, como indicado na Tabela 5.2.1. Considerando a similaridade dos resultados obtidos utilizando os métodos CP/MAS e CPDD/MAS, pode-se observar que a deconvolução do espectro obtido com CP/MAS mostra-se suficiente para separação do sinal associado a metoxila, sem a necessidade da utilização do defasamento dipolar. Levando em conta o menor tempo de medida nos experimentos CP/MAS, apenas este último método foi utilizado para análise quantitativa das demais amostras de materiais lignocelulósicos.

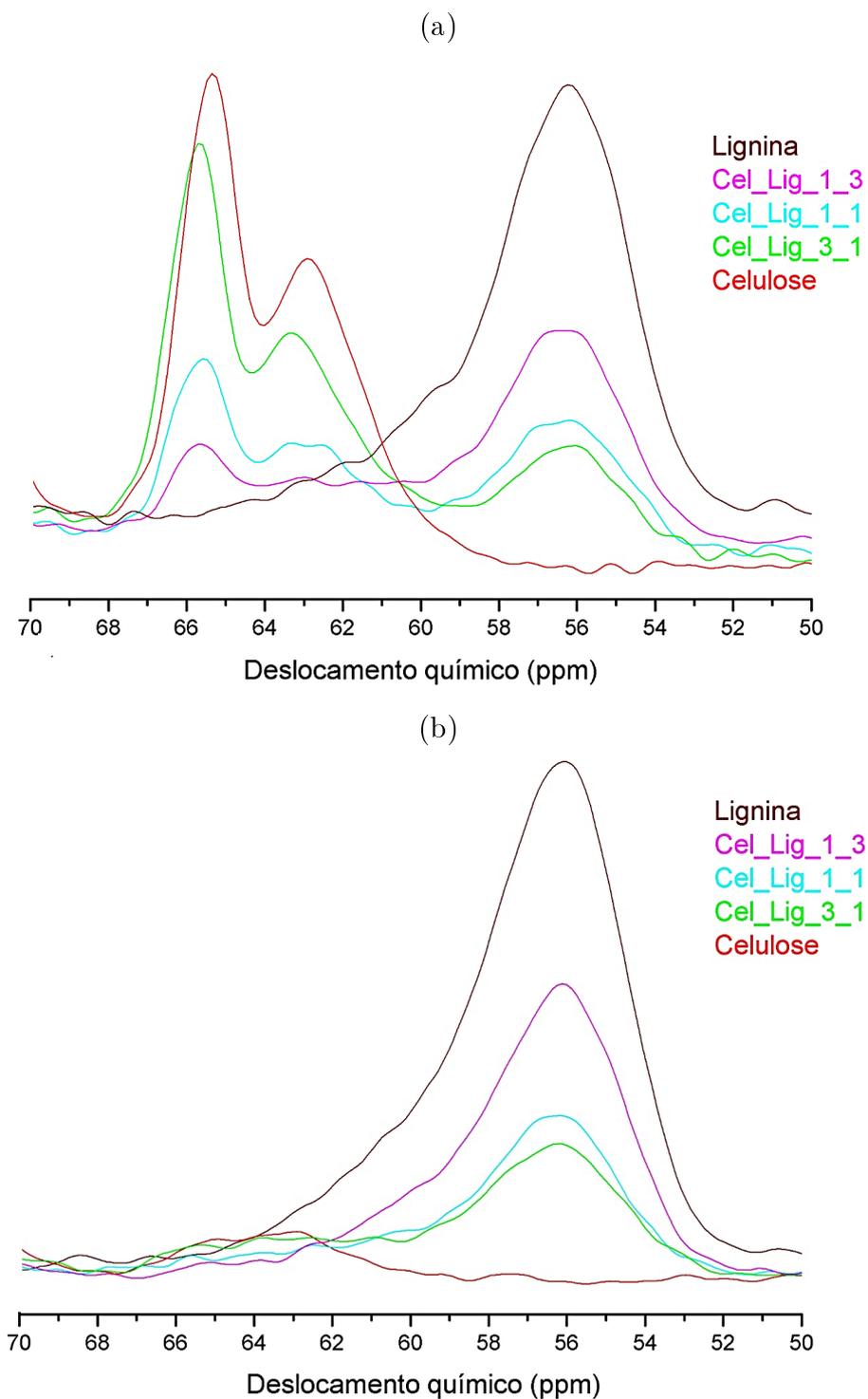


Figura 6.1.4: Espectros de RMN de ^{13}C registrados com CP/MAS (a) e CP/DD/MAS (b) para lignina, misturas de celulose e lignina preparadas com diferentes proporções em massa (celulose:lignina = 1:3, 1:1 e 3:1) e celulose. É mostrada apenas a região de deslocamentos químicos em torno do pico devido aos grupos OCH_3 da lignina (localizado em 56 ppm). O tempo de defasamento utilizado foi de 0,25 ms.

6.1.3 Variação na quantidade de amostra do rotor e sua influência na intensidade espectral

Um dos parâmetros que devem ser levados em conta ao se conduzir análises quantitativas em RMN é a homogeneidade do campo \vec{B}_1 aplicado [106]. Nesse sentido foram comparados três arranjos experimentais diferentes em que as amostras foram empacotadas em rotores com espaçadores de diferentes tamanhos como já apresentado na Figura 5.3.2. Como pode ser observado, à medida que se aumenta o tamanho dos espaçadores, a quantidade de amostra diminui e fica mais centralizada. Dessa forma, durante o experimento a amostra fica concentrada em uma região com \vec{B}_1 mais homogêneo. Entretanto, quanto maior for o ganho na homogeneidade, menor será a quantidade de amostra empacotada e menos núcleos estarão contribuindo para o sinal, piorando a relação sinal/ruído e exigindo um tempo maior de medida. O raciocínio inverso também é válido, quanto mais amostra for colocada no rotor, dentro do limite útil da bobina de RF, mais núcleos poderão contribuir para o sinal, mas parte desta contribuição pode ser comprometida pela inhomogeneidade de \vec{B}_1 , o que inviabiliza as análises quantitativas, visto que o pulso aplicado não conduzirá ao mesmo ângulo de nutação, no caso $\theta = \frac{\pi}{2}$, para todos os núcleos em estudo [106]. Além disso, no caso de CP, também a condição de Hartmann-Hahn fica comprometida para núcleos fora da região de maior homogeneidade.

Na Figura 6.1.5 pode ser observado o resultado das análises quantitativas para os três diferentes arranjos experimentais testados. Como pode ser visto, há uma considerável variação na inclinação da curva de calibração dos sinais, obtendo-se a maior inclinação da curva para o arranjo (c), onde a amostra foi empacotada em um rotor com espaçadores maiores, de forma que a amostra ficou mais centralizada em uma região de melhor homogeneidade do campo de RF aplicado. Como pode ser observado, o arranjo (a), que teve a maior quantidade de amostra empacotada, teve a inclinação da curva de quantificação comprometida, visto que a maior parte da amostra ficou fora da região de melhor homogeneidade; olhando sob outro ângulo, o aumento na quantidade de amostra não provocou um crescimento proporcional na intensidade do sinal, o que impossibilita análises

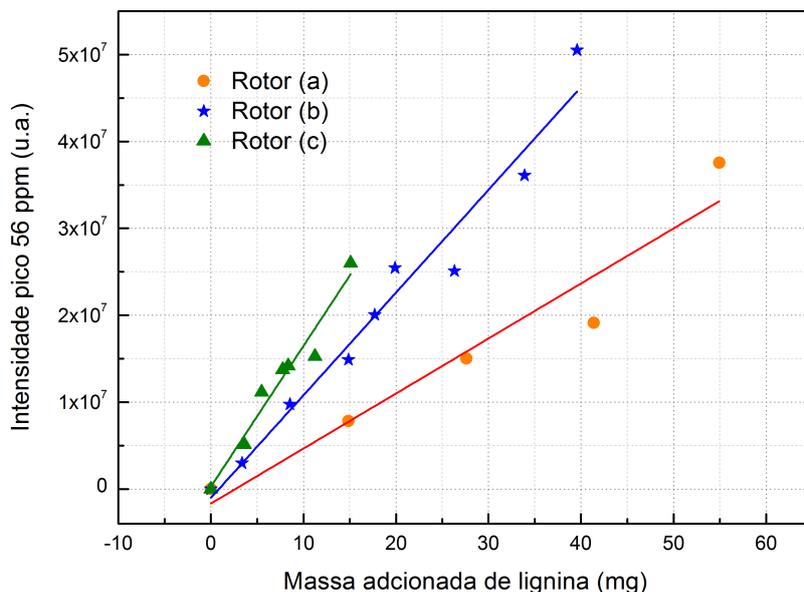


Figura 6.1.5: Calibração da intensidade do sinal de RMN em função da massa de lignina para diferentes quantidades de amostra no rotor .

quantitativas utilizando o arranjo (a) descrito.

Na Tabela 6.1.1 são apresentados os parâmetros obtidos por regressão linear dos pontos apresentadas na Figura 6.1.5. Como pode ser observado, os coeficientes angulares das curvas (b) e (c) são comparáveis, o que indica que de (c) para (b) não há grandes perdas na homogeneidade do campo aplicado. Todavia, como no arranjo (b) a quantidade de amostra empacotada é quase o dobro de (c), há um expressivo ganho na intensidade dos sinais, como observado na Figura 6.1.5, permitindo um menor tempo de medida. Dessa forma, levando em consideração a homogeneidade do campo de RF aplicado, a quantidade de amostra empacotada e o tempo de realização do experimento, o melhor arranjo de empacotamento das amostras no rotor é o caso (b) apresentado na Figura 5.3.2.

Tabela 6.1.1: Parâmetros obtidos por regressão linear dos pontos experimentais associados à intensidade do sinal em três situações diferentes de empacotamento.

Arranjo	R ²	Coef. Linear (10 ⁶ u.a.)	Coef. Angular (10 ⁶ u.a./mg)
(a)	0,91	-1 ± 3	0,6 ± 0,1
(b)	0,96	-1 ± 2	1,2 ± 0,8
(c)	0,95	0 ± 1	1,6 ± 0,2

6.2 Construção e validação do modelo de quantificação

6.2.1 Identificação e deconvolução dos picos presentes no espectro de RMN

6.2.1.1 Amostras Padrões

Nas Figuras 6.2.1 e 6.2.2 são apresentados os espectros deconvoluídos dos padrões de celulose e lignina, respectivamente, com identificação das regiões cujas áreas são utilizadas para construção das curvas de calibração, no caso, a região associada ao pico C4 da celulose e a região associada ao pico do grupo metoxila da lignina com deslocamento químico em 56 ppm (indicado como C_{56ppm}). Observando ainda a Figura 6.2.1, a região assinalada como C4 foi subdividida em duas classes: C4_o e C4_d, respectivamente associadas a carbonos C4 da celulose em fibras mais ordenadas e regiões contendo celulose em formas mais desordenadas superpostas a contribuições de hemicelulose [84,92,97]. Na elaboração da curva de calibração do teor de celulose é importante também considerar os picos indicados por C_{84ppm} e C_{74ppm} no espectro da lignina, visto que esses picos, presente nas misturas, contribuíram respectivamente para as áreas correspondentes às regiões C4_d e C2,3,5 nos espectros registrados para as misturas.

Observando-se a Figura 6.2.3 pode ser feita uma análise comparativa entre os espectros de celulose e lignina padrão. Nessa figura é possível observar que o pico C_{56ppm} característico da lignina é o sinal mais intenso desta componente. Nesse sentido, relacionar a área deste sinal com a massa de lignina mostrou-se a melhor escolha, para construção das curvas de calibração. Para a celulose, a região do pico C4 é a menos influenciada por

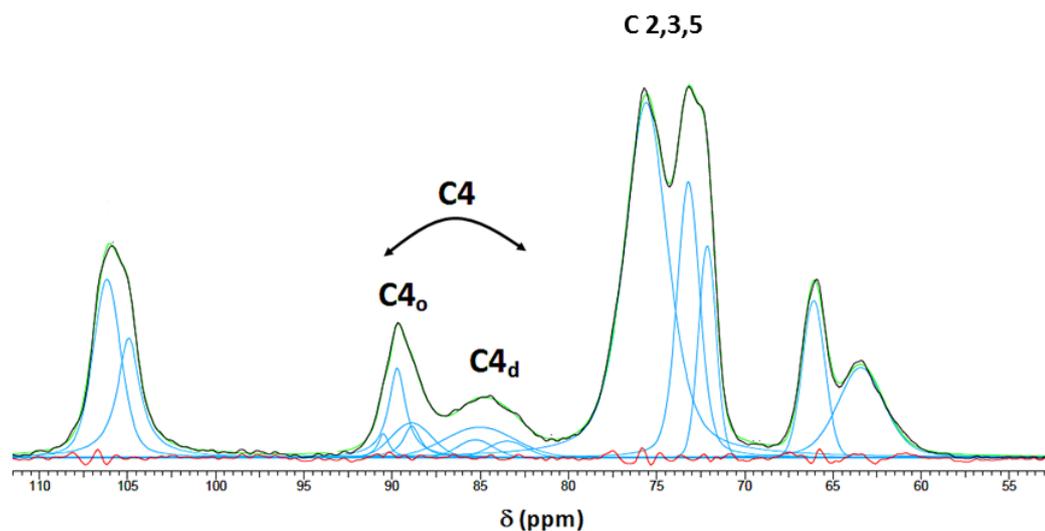


Figura 6.2.1: Espectro de RMN de ^{13}C CP/MAS obtido para uma amostra de celulose padrão. Os símbolos C4 e C2,3,5 representam as regiões de deslocamento químico que serão utilizadas para construção das curvas de calibração, onde C4_o e C4_d estão associados a regiões espectrais associadas a carboidratos com maior e menor ordenamento estrutural ou cristalinidade, respectivamente. Em vermelho temos a diferença entre o espectro real (preto) e o ajustado (verde) a partir da superposição dos picos deconvoluídos mostrados em azul.

sinais provenientes da amostra padrão de lignina. Numa tentativa de analisar a influência da lignina e também da hemicelulose (a ser discutida posteriormente) foram elaboradas curvas de calibração tanto para região total do pico C4 como para a região espectral C4_o . A análise da região C4_o pode em princípio ser utilizada para a determinação do teor de fibras de celulose estruturalmente ordenadas [41, 97]. Também foram feitas comparações do teor de celulose obtido a partir da integração da região associada aos carbonos C2,3,5 da celulose.

6.2.1.2 Materiais de Biomassa

Na Figura 6.2.4 é apresentado o espectro deconvoluído de uma amostra de bagaço de cana (BC1), sendo as regiões mencionadas acima também indicadas. Os espectros correspondentes às outras cinco amostras (BC2, LC1, LC2, CPA, MPW) são apresentados respectivamente nas Figuras 6.2.5 a 6.2.9; essas amostras foram escolhidas, em uma primeira análise, para validação das curvas de calibração dos teores lignocelulósicos. Alguns

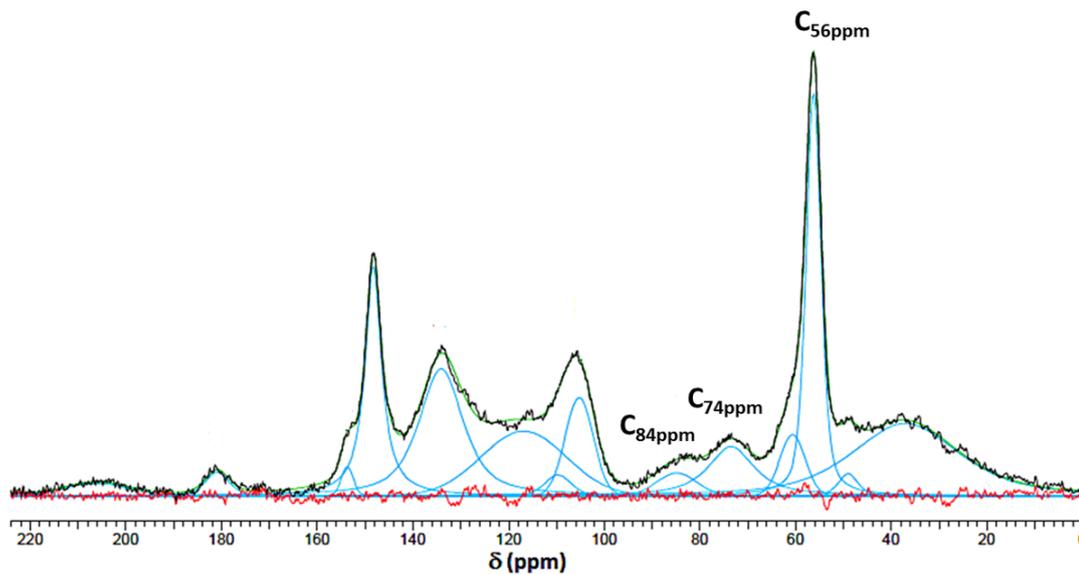


Figura 6.2.2: Espectro de RMN de ^{13}C CP/MAS obtido para uma amostra de lignina padrão. Os símbolos $\text{C}_{56\text{ppm}}$, $\text{C}_{84\text{ppm}}$ e $\text{C}_{74\text{ppm}}$ representam os picos presentes na amostra de lignina que serão utilizados na construção das curvas de calibração. Em vermelho temos a diferença entre o espectro real (preto) e o ajustado (verde) a partir da superposição dos picos deconvoluídos mostrados em azul.

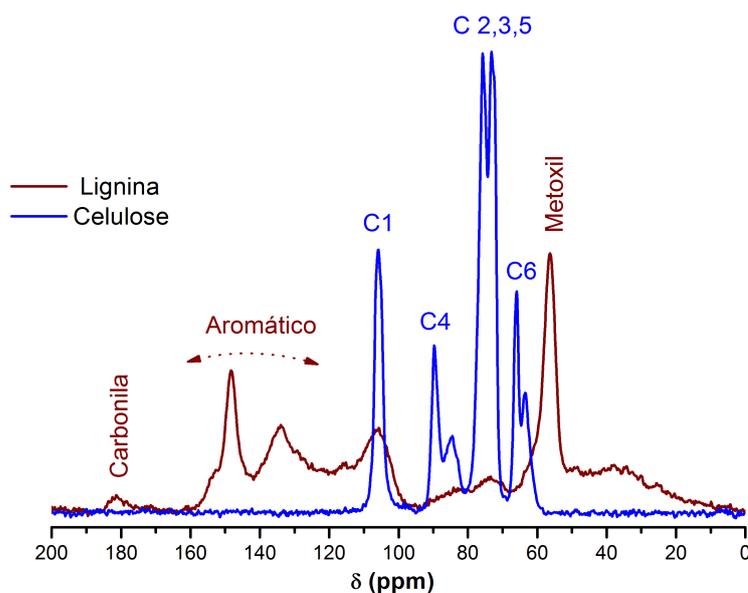


Figura 6.2.3: Comparação dos espectros de RMN de ^{13}C CP/MAS para os padrões de celulose e lignina utilizados.

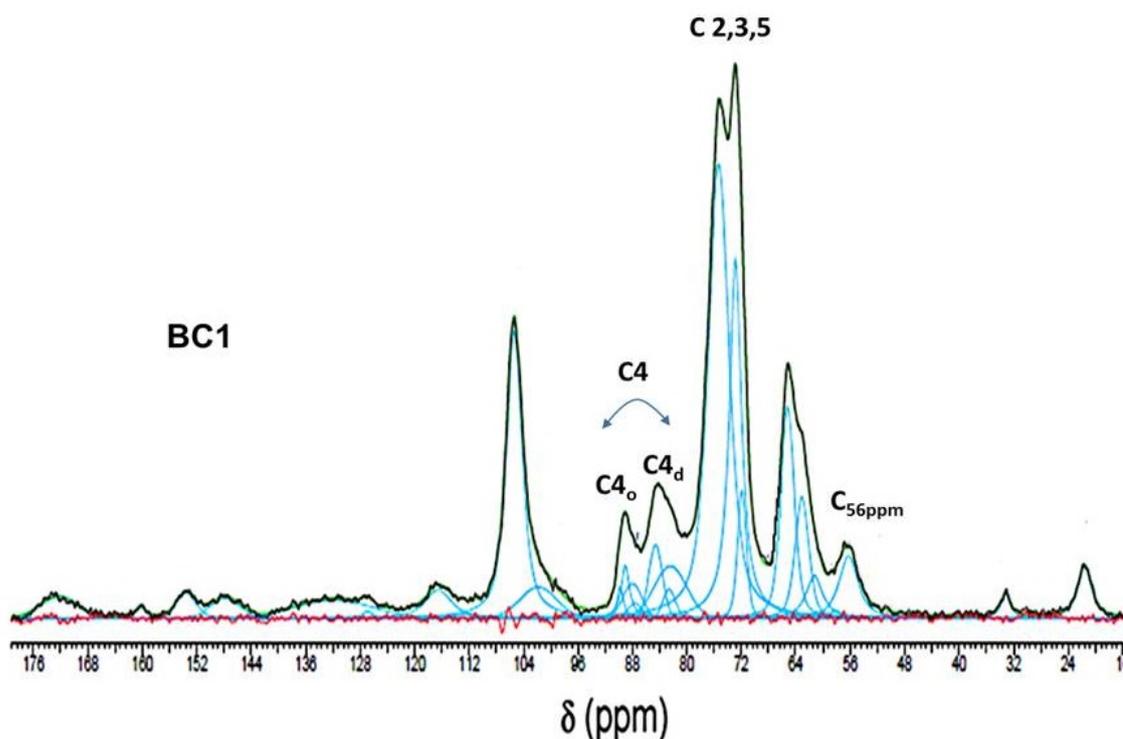


Figura 6.2.4: Espectro de RMN de ^{13}C CP/MAS obtido para a amostra BC1.

outros materiais também foram analisados, mas comparações com eles foram descartadas. Como será discutido mais adiante, os espectros de RMN de ^{13}C registrados para esses materiais apresentaram características bem distintas em comparação com o que é normalmente observado para um material lignocelulósico típico (como madeira ou cascas de frutos, por exemplo), com a presença de picos intensos devidos a componentes como gorduras e proteínas (ver seção 6.5).

6.2.2 Curvas de calibração

Os valores obtidos para as áreas das regiões discutidas na seção anterior são apresentados graficamente nas Figuras 6.2.10 a 6.2.13. Como informado, esses valores foram determinados pela deconvolução dos espectros obtidos para as amostras padrão e as misturas descritas na Tabela 5.3.1.

Dos gráficos pode ser observada uma relação linear entre as áreas das respectivas regiões selecionadas e a massa de cada componente na mistura, o que permite a obtenção de ajustes lineares com coeficientes de determinação aceitáveis. É importante observar que

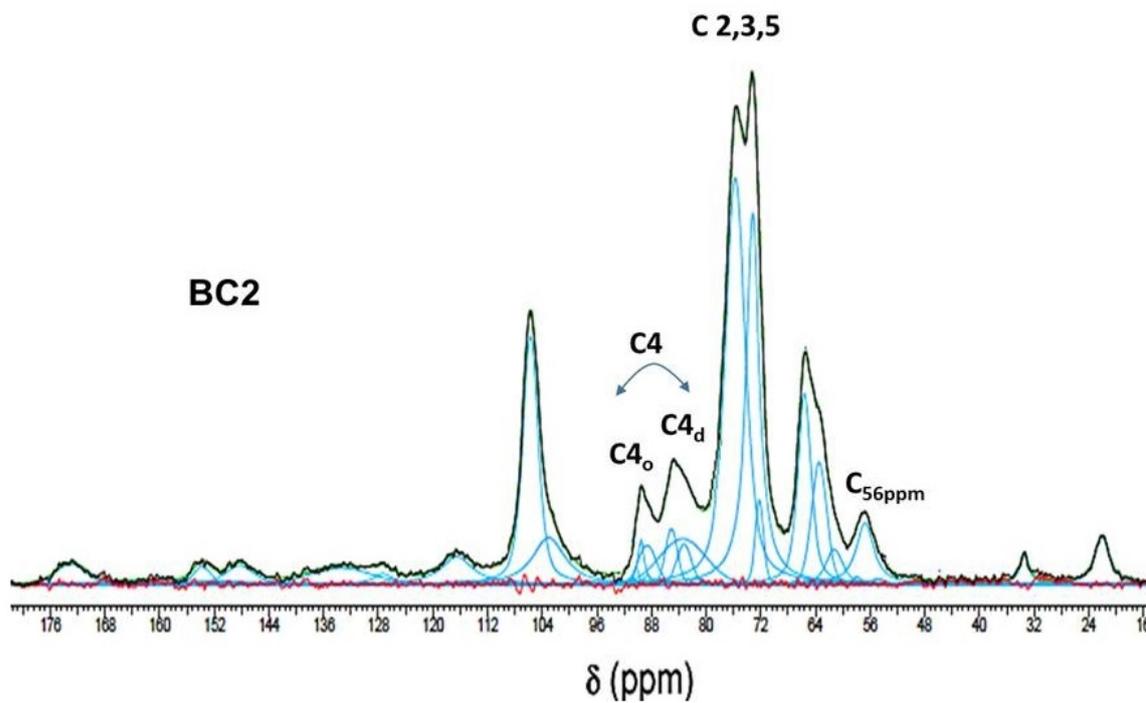


Figura 6.2.5: Espectro de RMN de ^{13}C CP/MAS obtido para a amostra BC2.

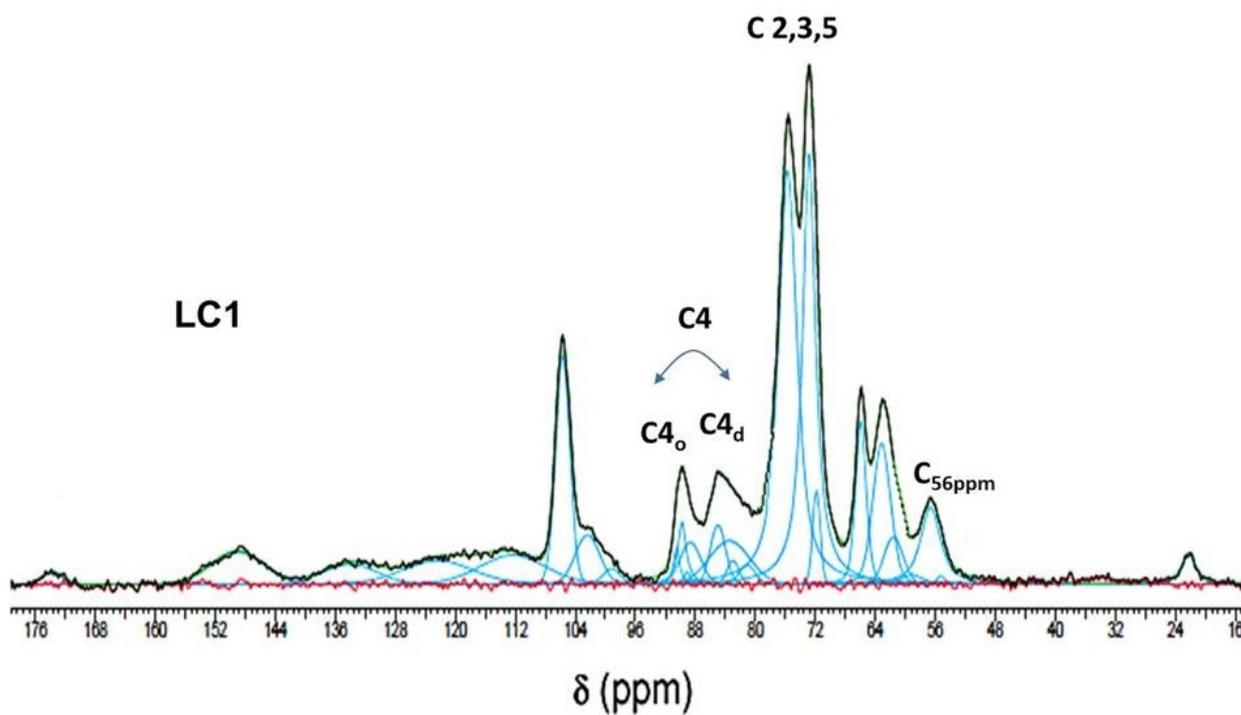


Figura 6.2.6: Espectro de RMN de ^{13}C CP/MAS obtido para a amostra LC1.

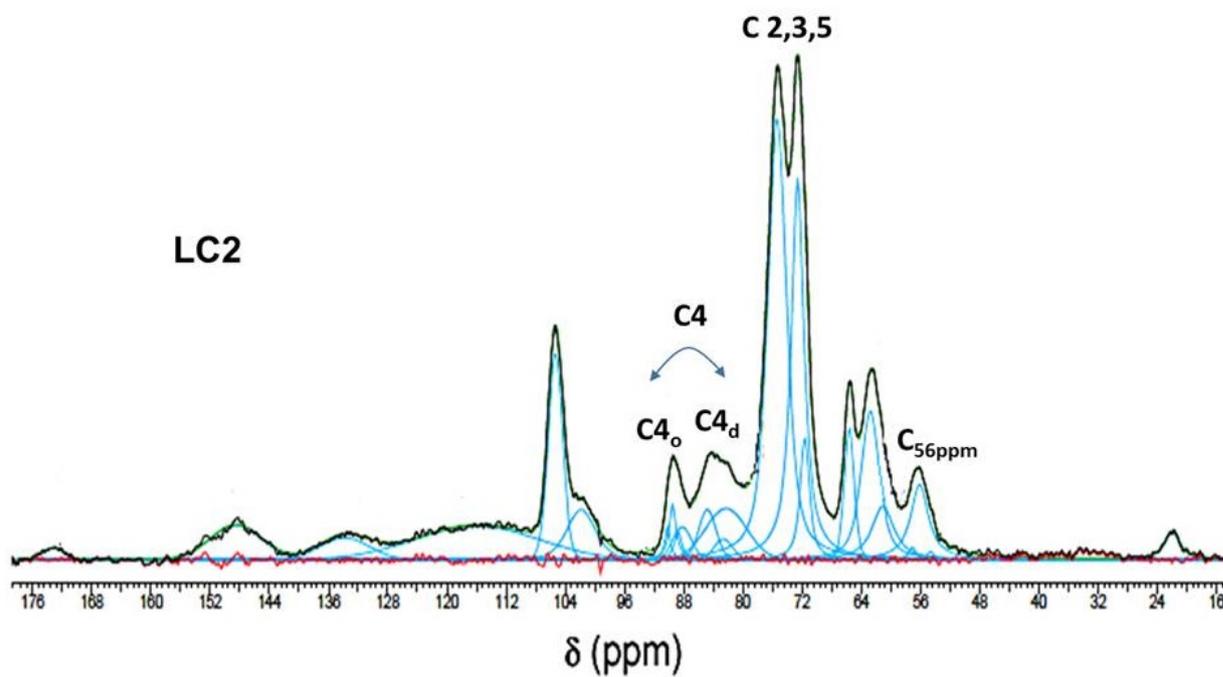


Figura 6.2.7: Espectro de RMN de ^{13}C CP/MAS obtido para a amostra LC2.

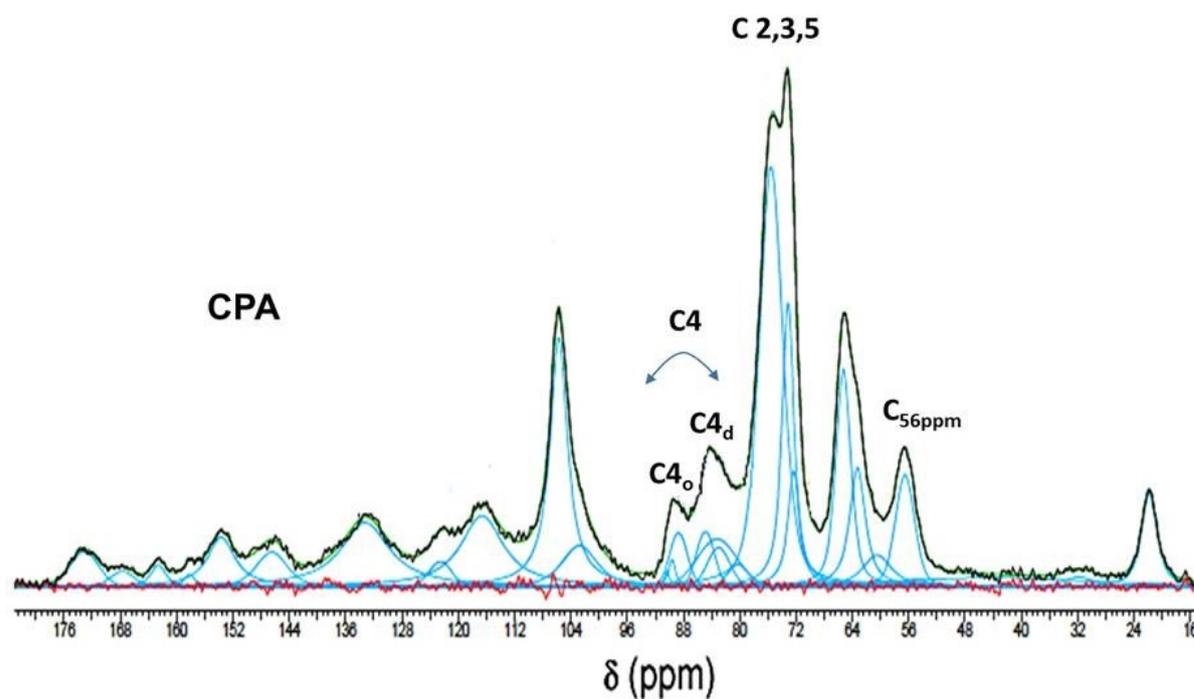


Figura 6.2.8: Espectro de RMN de ^{13}C CP/MAS obtido para a amostra de CPA.

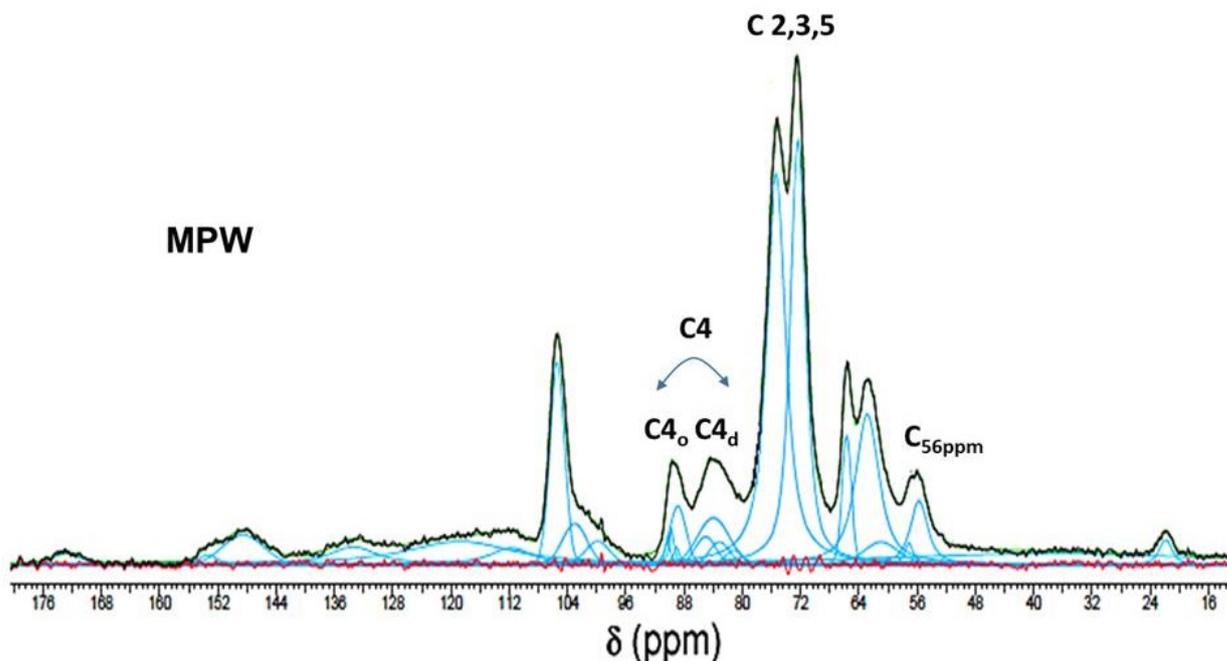


Figura 6.2.9: Espectro de RMN de ^{13}C CP/MAS obtido para a amostra MPW.

as retas obtidas para a lignina e para as fibras ordenadas de celulose têm coeficiente linear igual a zero (levando em conta as respectivas incertezas), visto que nestes casos a área associada aos respectivos picos é considerada zero para massa igual a zero da componente em questão. Já as retas obtidas utilizando toda a região do C4 e a região dos carbonos C2,3,5 têm coeficiente linear diferente de zero, o que é compreensível considerando que para a amostra contendo somente lignina considerou-se, respectivamente, a área do sinal $\text{C}_{84\text{ppm}}$ e $\text{C}_{74\text{ppm}}$ presente no espectro de lignina padrão (Figura 6.2.2).

6.2.3 Avaliação da incerteza nas intensidades obtidas por deconvolução espectral

Com o objetivo de se aferir o grau de incerteza das áreas obtidas a partir da deconvolução dos espectros, foram realizadas medidas em triplicata da mistura Cel_Lig_1_1. Os valores de intensidades absolutas foram normalizados pela massa de amostra e obtidos em experimentos executados em condições rigorosamente iguais. O desvio padrão obtido para a intensidade de alguns picos relevantes neste trabalho é apresentado na Tabela 6.2.1. Estes valores foram propagados no cálculo dos teores de lignina e celulose desenvolvidos

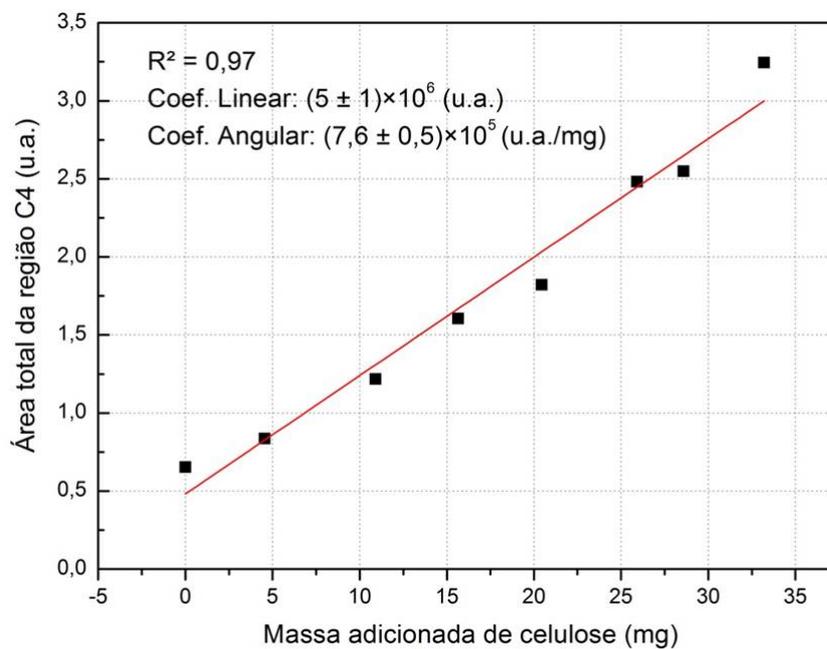
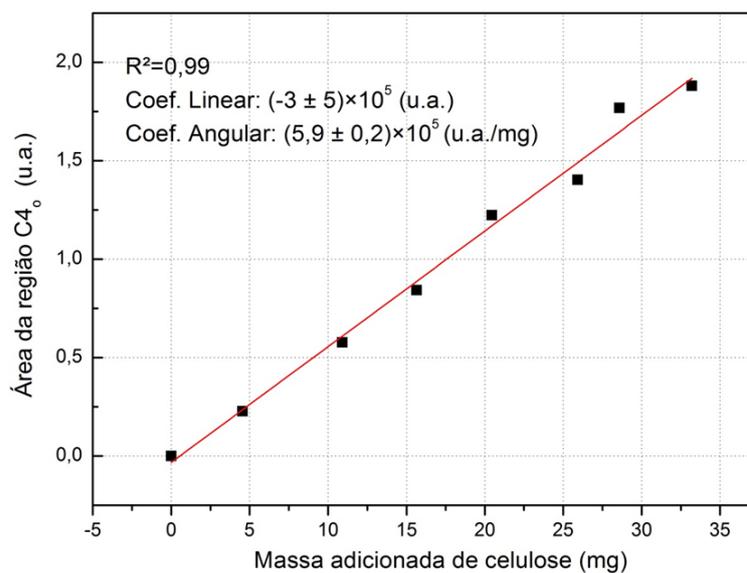


Figura 6.2.10: Curva de calibração do teor de celulose a partir da área total da região C4.

Figura 6.2.11: Curva de calibração do teor de celulose considerando apenas a área da região C4₀.

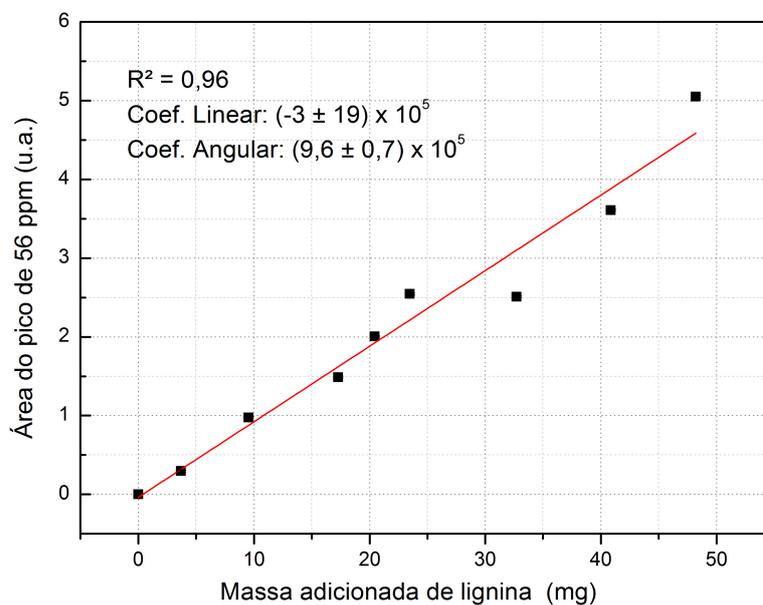


Figura 6.2.12: Curva de calibração do teor de lignina a partir da área C_{56ppm} do pico associado à metoxila.

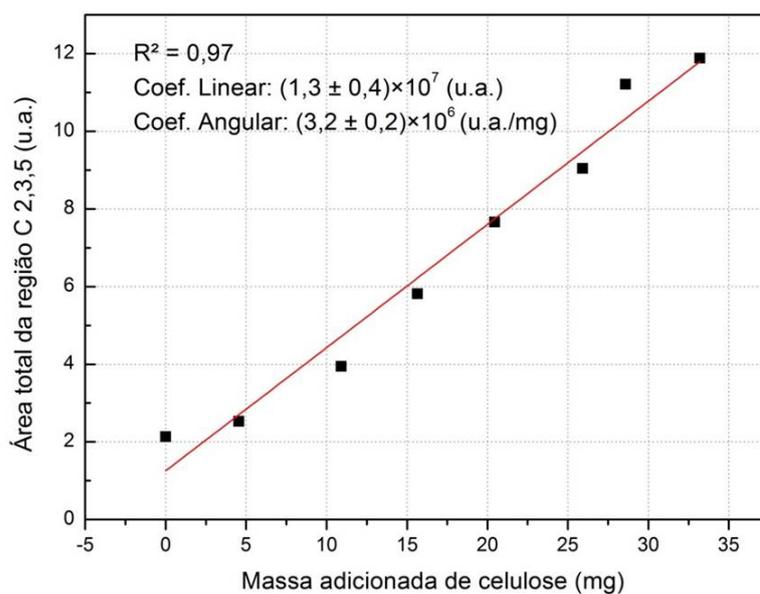


Figura 6.2.13: Curva de calibração do teor de celulose a partir da área associada aos carbonos C2,3,5 da celulose.

Tabela 6.2.1: Intensidades absolutas (10^6 u.a.) dos sinais deconvoluídos do espectro de RMN de ^{13}C CP/MAS obtidos em triplicata para a mistura Cel_Lig_1_1.

Região do Espectro	Medida I	Medida II	Medida III	Média	Desvio Padrão
C4_d	1,664	2,017	1,718	1,800	0,190
C4_o	2,341	2,362	2,109	2,271	0,140
C4	4,006	4,380	3,827	4,071	0,282
C 2,3,5	14,931	15,057	14,370	14,786	0,365
C_{56ppm}	5,012	4,881	5,119	5,004	0,119

neste trabalho.

6.2.4 Validação do modelo

Com os resultados obtidos nas curvas de calibração para as diferentes regiões espectrais, pode-se fazer uma previsão das massas de celulose e lignina em cada amostra analisada por RMN de ^{13}C , utilizando condições experimentais idênticas às empregadas para as misturas. Dessa forma, podem ser determinados os teores de celulose e lignina presentes nos materiais de biomassa analisados. Os resultados são apresentados nas Tabelas 6.2.2 e 6.2.3, onde é feita uma comparação entre os resultados obtidos pelo método de análise quantitativa aqui apresentado e os teores de lignina e celulose obtidos pelo método Klason para as respectivas amostras. Uma comparação gráfica entre esses teores é apresentada nas Figuras 6.2.14 a 6.2.17. As incertezas informadas nos teores foram obtidas por propagação das incertezas nos coeficientes das equações obtidas por ajuste linear em cada curva de calibração e levando também em conta as incertezas nas medidas de áreas das regiões espectrais determinadas por experimentos repetidos em triplicata.

Como pode ser visto, o teor obtido para a lignina pelo método de RMN está em conformidade com o determinado pelo método Klason para quase todos os materiais. Para as amostras de bagaço de cana, madeira de pinho e fibras de madeira os resultados obtidos para o teor de lignina pelos dois métodos são iguais, mas para a amostra de casca de palmiste os valores previstos foram muito distintos um do outro, indicando possíveis limitações para a técnica, a serem melhor discutidas na seção 6.4.

Tabela 6.2.2: Teores de lignina obtidos por RMN de ^{13}C CP/MAS para diferentes materiais lignocelulósicos.

Material analisado	RMN (%)	
	$\text{C}_{56\text{ppm}}$	Klason (%)
BC1	22 (2)	22
BC2	21 (2)	23
MPW	26 (2)	27
CPA	28 (2)	59
LC1	31 (3)	32
LC2	28 (2)	29

Tabela 6.2.3: Teores de celulose ordenada (C4_o) e holocelulose (C4 ou C2,3,5) obtidos por RMN de ^{13}C CP/MAS para diferentes materiais lignocelulósicos.

Material analisado	RMN (%)			Klason (%)
	C4_o	C4	C2,3,5	
BC1	44 (2)	77 (8)	74 (8)	73
BC2	30 (2)	71 (8)	66 (7)	67
MPW	44 (3)	76 (10)	87 (10)	66
CPA	25 (2)	67 (8)	53 (7)	26
LC1	52 (3)	85 (10)	74 (9)	66
LC2	42 (2)	81 (9)	74 (8)	65

Os resultados obtidos utilizando toda a região C4 e a região C2,3,5, não apresentam boa concordância com o método Klason, mesmo ambos estando associados ao teor de holocelulose do material. Todavia é importante observar que a calibração foi feita com um padrão de celulose e não de holocelulose, até mesmo porque não existe um padrão para holocelulose, visto que a hemicelulose é formada por diferentes açúcares. Nesse sentido, para uma previsão correta do conteúdo de carboidratos, é necessária a determinação dos valores separados de celulose e hemicelulose, por meio da integração de sinais no espectro de RMN de ^{13}C associados distintamente a estas componentes; isso é problemático no caso dos carboidratos, visto que há grande sobreposição dos picos devidos à celulose (nas formas ordenada e desordenada) com os sinais de hemicelulose no espectro de RMN de ^{13}C , como foi apresentado na Figura 6.1.1 [92].

No caso da hemicelulose, existem sinais característicos da mesma nos espectros de RMN de ^{13}C , como os picos em torno de 21 e 174 ppm, associados a grupos metila

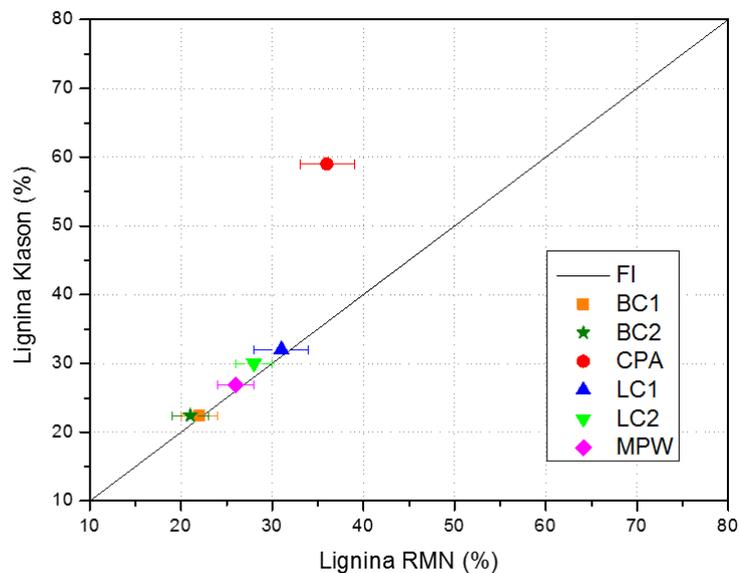


Figura 6.2.14: Comparação entre os resultados obtidos para o teor de lignina pelo método de análise quantitativa aqui apresentado (RMN) e pelo método Klason, para os materiais de biomassa analisados, em comparação com a Função Identidade (FI).

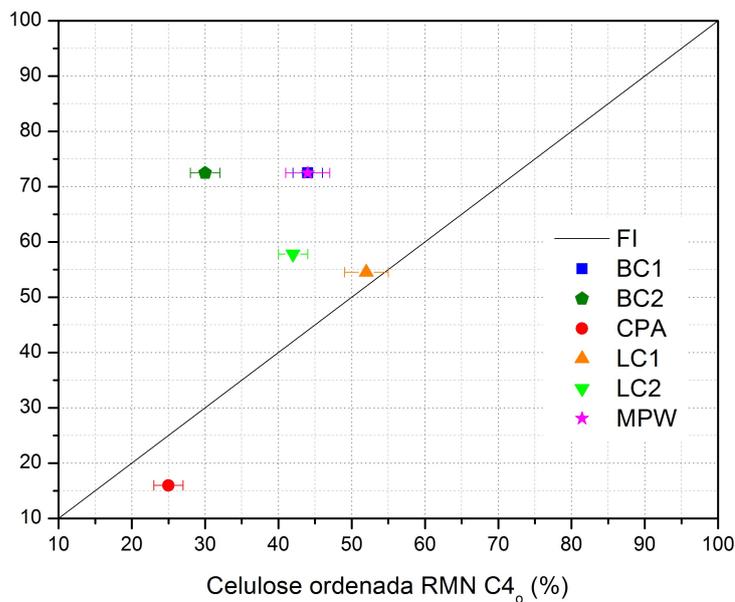


Figura 6.2.15: Comparação entre os resultados obtidos para o teor de celulose ordenada pelo método de análise quantitativa aqui apresentado (RMN C_{4o}) e pelo método Klason, para os materiais de biomassa analisados, em comparação com a Função Identidade (FI).

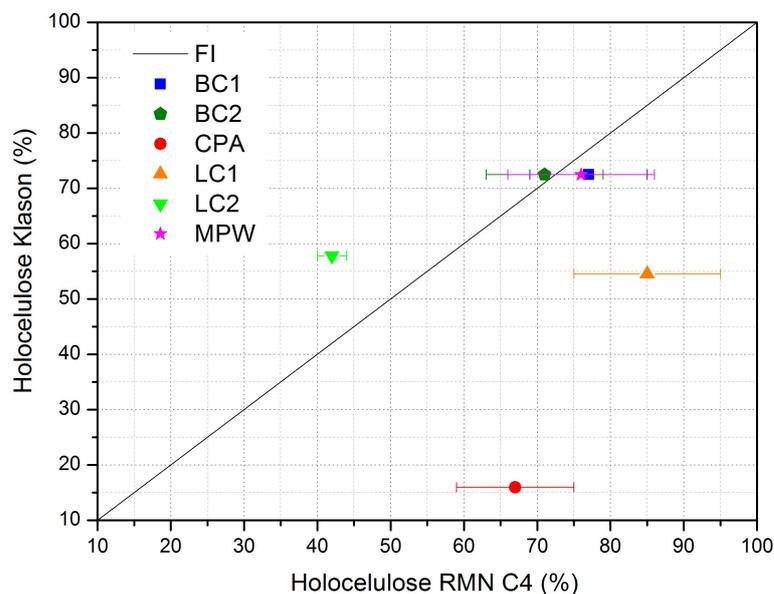


Figura 6.2.16: Comparação entre os resultados obtidos para o teor de holocelulose pelo método de análise quantitativa aqui apresentado (RMN C4) e pelo método Klason, para os materiais de biomassa analisados, em comparação com a Função Idêntidade (FI).

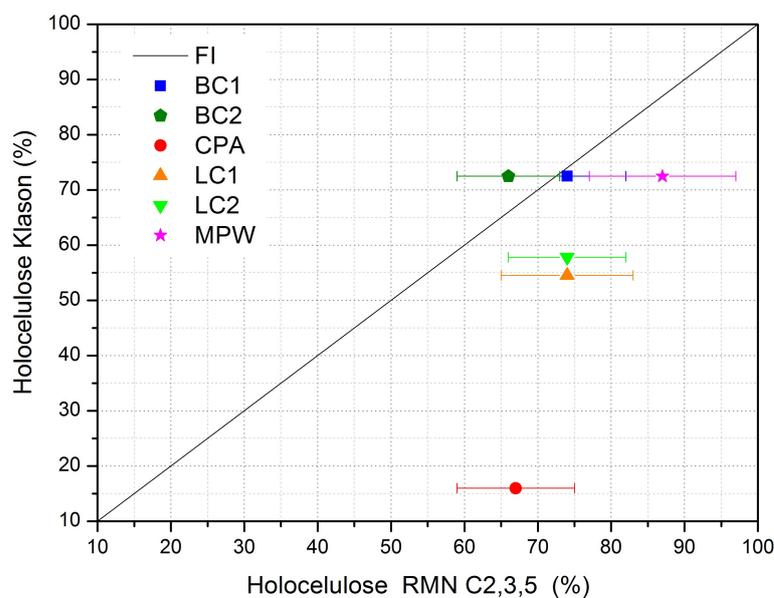


Figura 6.2.17: Comparação entre os resultados obtidos para o teor de holocelulose pelo método de análise quantitativa aqui apresentado (RMN C2,3,5) e pelo método Klason, para os materiais de biomassa analisados, em comparação com a Função Idêntidade (FI).

e carboxila em acetatos [84]. Contudo nem todos os açúcares presentes na hemicelulose contribuem para esses picos, visto que a hemicelulose é constituída por diferentes unidades básicas repetitivas [13,14,96]. De qualquer forma, o método aqui apresentado permite, em quase todos os materiais estudados, uma estimativa razoável para os teores somados de celulose e hemicelulose, utilizando, para isso, os parâmetros obtidos da curva de calibração da região C4 ou C2,3,5. Uma alternativa viável para aprimorar o método seria a utilização de sequências de pulsos que explorassem a diferença de dinâmica para os grupos contendo celulose e hemicelulose; com a conseqüente diferença nos tempos de relaxação spin-rede de prótons no sistema girante de coordenadas ($T_{1\rho H}$), a fim de se investigar a possibilidade de diferenciar as contribuições espectrais devidas a celulose e hemicelulose [101].

Com respeito ao teor previsto para as fibras ordenadas de celulose, é interessante observar que, em uma análise comparativa, o valor encontra-se abaixo tanto do valor estimado para a holocelulose (embora ambos valores tenham sido determinados utilizando curvas de calibração distintas) quanto dos teores citados na literatura [10,13,14] para holocelulose em materiais de natureza similar dos materiais analisados. Vale ressaltar que a informação sobre o teor de fibras ordenadas de celulose (muitas vezes denominadas como celulose cristalina) é de grande relevância prática, porque essas formas mais ordenadas são altamente resistentes aos processos de pré-tratamento químico realizados em materiais lignocelulósicos para posterior produção do etanol celulósico [10]. Em pré-tratamentos com ácidos, por exemplo, pode ocorrer a remoção total da hemicelulose juntamente com a remoção de uma fração de celulose desordenada, mas a fração cristalina resiste ao ataque [10,41].

6.3 Aplicação no estudo de amostras quimicamente tratadas

Considerando o aspecto recalcitrante dos materiais lignocelulósicos, o método de quantificação acima descrito foi utilizado para avaliar os teores de lignina, holocelulose e celulose ordenada em materiais submetidos a tratamentos ácidos. Nas Figuras 6.3.1 a

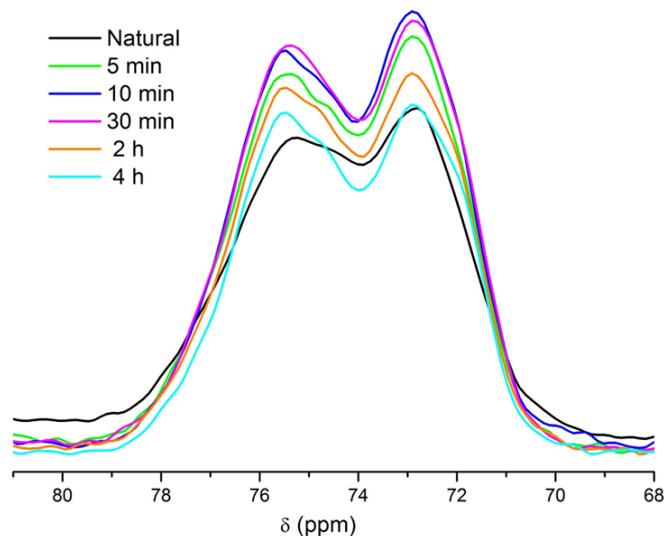


Figura 6.3.1: Espectros de RMN de ^{13}C CP/MAS obtidos para amostras de bagaço de cana submetidas a diferentes tempos de tratamento ácido. Ampliação do espectro na região dos carbonos C 2,3,5 da celulose

6.3.4 são apresentados os espectros de RMN de ^{13}C CP/MAS, com ampliação de diferentes regiões espectrais, obtidos para amostras de bagaço de cana submetidas a diferentes tempos de tratamento ácido. As intensidades em todos os espectros e as áreas calculadas estão todas normalizadas pela massa de amostra.

Uma análise comparativa desses espectros mostra um crescimento inicial das intensidades das regiões correspondentes à celulose. Este crescimento é acompanhado de uma melhor separação dos picos característicos de carbonos pertencentes à celulose. Na Figura 6.3.3 é claramente observado o surgimento, já no espectro correspondente à amostra tratada por 5 min, de dois sinais associados ao carbono C6 (60-68 ppm): um devido à presença de formas ordenadas de celulose (pico mais estreito próximo a 66 ppm) e outro correspondendo às contribuições de hemicelulose e de formas desordenadas de celulose (pico mais largo próximo a 63 ppm) [78]. Este resultado é consistente com a análise da Figura 6.3.4, onde pode ser observada a eficiência do tratamento ácido na retirada da hemicelulose, visto que o pico em 21 ppm (devido unicamente à hemicelulose) [84] desaparece logo após os primeiros minutos do tratamento. Assim, o desdobramento do pico associado ao carbono C6 acompanha a retirada da hemicelulose e possivelmente de

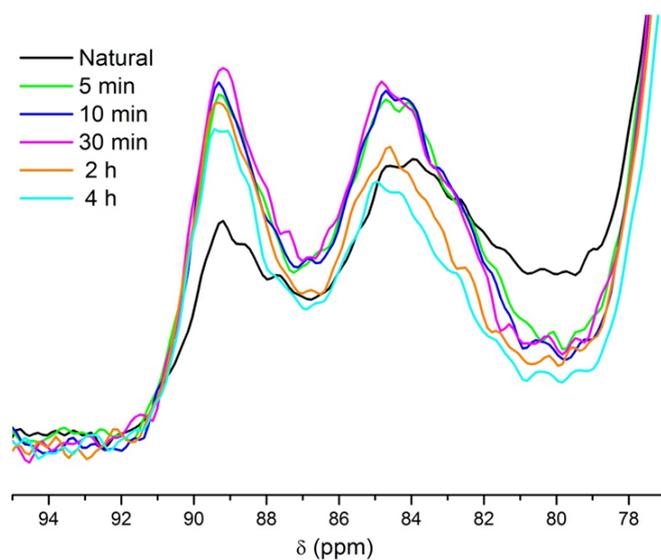


Figura 6.3.2: Espectros de RMN de ^{13}C obtidos para amostras de bagaço de cana submetidas a diferentes tempos de tratamento ácido. Ampliação do espectro na região do carbono C4 da celulose.

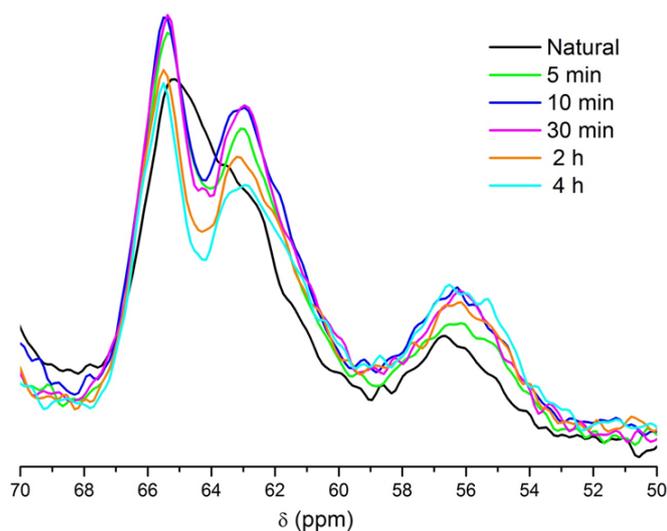


Figura 6.3.3: Espectros de RMN de ^{13}C obtidos para amostras de bagaço de cana submetidas a diferentes tempos de tratamento ácido. Ampliação do espectro na região do carbono C6 da celulose e do pico de 56 ppm da lignina.

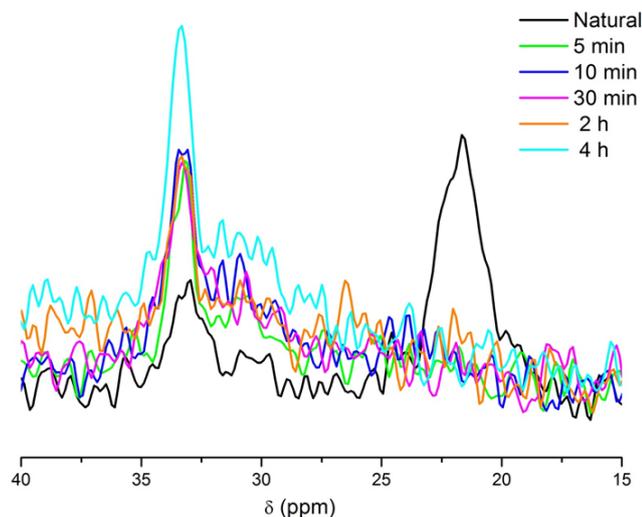


Figura 6.3.4: Espectros de RMN de ^{13}C obtidos para amostras de bagaço de cana submetidas a diferentes tempos de tratamento ácido. Ampliação do espectro na região dos grupos metila associados a hemicelulose e de grupos do tipo metileno.

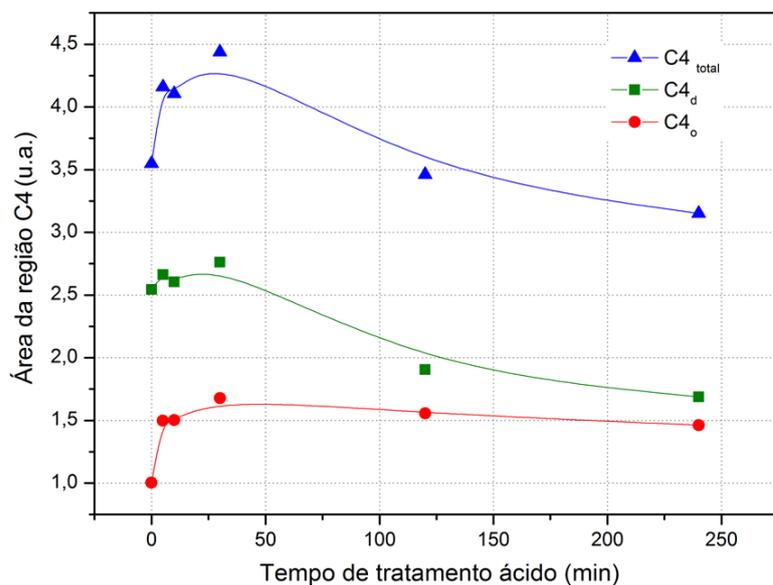
formas desordenadas de celulose. O mesmo pode ser observado também para os sinais correspondentes aos carbonos C4 e C2,3,5.

Da Figura 6.3.2 também pode ser observado o rápido decréscimo de intensidade na região em torno de 80 ppm logo nos primeiros minutos de tratamento. Pela semelhança com o que ocorre na região em torno de 21 ppm, é possível afirmar que também essa intensidade era proveniente de carbonos pertencentes a açúcares de hemicelulose [92]. A Figura 6.3.2 mostra ainda o claro crescimento da região associada a carbonos C4_o (87 a 91 ppm), visto que as fibras ordenadas de celulose são mais resistentes à hidrólise ácida [10,41]. Estas informações podem ser melhor compreendidas observando a Figura 6.3.5, onde são comparadas graficamente as dependências com o tempo de tratamento ácido das intensidades devidas à holocelulose (C4) e às formas ordenadas (C4_o) e desordenadas (C4_d) de carboidratos nas amostras submetidas ao tratamento ácido. Após um rápido crescimento inicial, observa-se uma queda contínua na intensidade de holocelulose; porém, ocorre um relativo crescimento na intensidade devida à celulose ordenada, além de uma grande resistência desta ao tratamento ácido, visto que para longos tempos a queda em sua intensidade é quase desprezível quando comparada à queda de intensidade associada

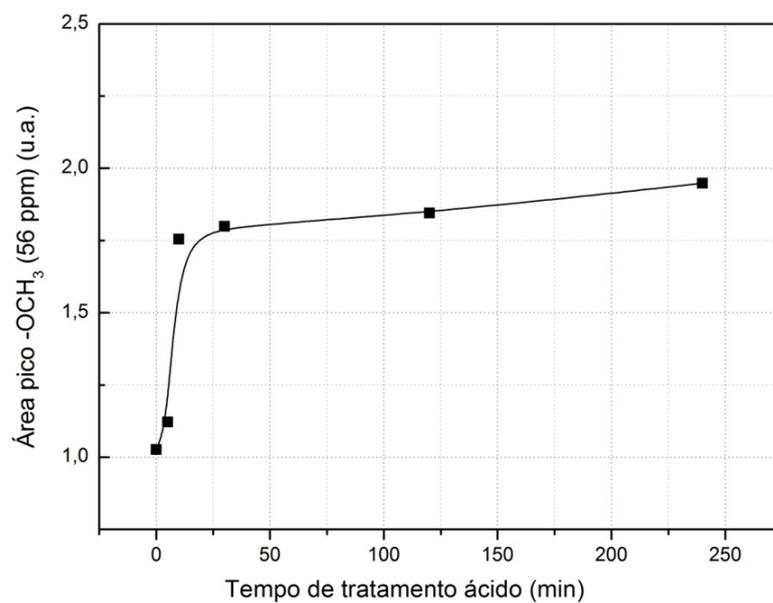
às formas desordenadas.

A Figura 6.3.3 mostra que o pico em 56 ppm característico da lignina mantém sempre um crescimento com a sequência do tratamento ácido. Esta informação também fica mais clara a partir da análise gráfica da evolução da intensidade desse pico em função do tempo de hidrólise, como pode ser visto na Figura 6.3.5. Esse crescimento indica que a lignina é resistente a este tipo de tratamento a que o bagaço de cana foi submetido e que, portanto, as amostras submetidas aos tratamentos ácidos são cada vez mais ricas em lignina.

O método previamente discutido de quantificação dos teores de lignina e celulose foi então aplicado às amostras de bagaço de cana submetidas ao tratamento ácido; os resultados estão apresentados na Tabela 6.3.1, onde também pode ser observado o índice de cristalinidade obtido pela razão entre a área da região $C4_o$ e a região $C4$ [108]. Como já observado, o modelo prevê uma maior concentração de lignina no material com o aumento no tempo de tratamento ácido, o que é observado também para as fibras ordenadas de celulose. É interessante notar que o teor de fibras ordenadas de celulose tem uma ligeira queda para longos tempos de tratamento, ao mesmo tempo em que ocorre uma queda muito mais intensa para o teor de holocelulose previsto, indicando a remoção da hemicelulose e das formas mais desordenadas de celulose. O mesmo problema de superestimação do teor de carboidratos discutido anteriormente para a amostra natural é encontrado na análise das amostras submetidas ao tratamento ácido, levando em alguns casos a teores somados de lignina e holocelulose acima de 100 %. Esse fato mostra claramente uma limitação do método desenvolvido no que diz respeito à determinação acurada do teor de holocelulose, o que possivelmente é devido à sobreposição de sinais com dinâmica de transferência de polarização distinta nos materiais lignocelulósicos reais [41, 101] em comparação com a amostra padrão de celulose utilizada para construção das curvas de calibração.



(a)



(b)

Figura 6.3.5: (a) Evolução com o tempo de tratamento ácido das intensidades devidas a toda região associada ao carbono 4 ($C4_{total}$) e às formas ordenadas ($C4_o$) e desordenadas ($C4_d$) de celulose nas amostras de bagaço de cana submetidas a diferentes tempos de tratamento ácido. (b) Evolução com o tempo de tratamento ácido da intensidade do pico em 56 ppm, característico da lignina nas mesmas amostras. As linhas que ligam os pontos são apenas guias para os olhos.

Tabela 6.3.1: Teores previstos pelo método de quantificação desenvolvido, aplicado para as amostras de bagaço de cana submetidas a tratamentos ácidos.

Tempo de tratamento (min)	Teor (%) - RMN CP/MAS			Índice de Cristalinidade (%)
	Lignina	Holocelulose	Celulose Cristalina	
0	21 (3)	71 (8)	31 (3)	28
5	23 (3)	83 (10)	46 (4)	36
10	36 (5)	81 (10)	46 (4)	37
30	37 (5)	88 (10)	51 (5)	38
120	38 (5)	65 (8)	47 (4)	45
240	40 (5)	57 (7)	45 (4)	46

6.4 Análise de diferentes padrões de lignina

Como pode ser observado nas seções anteriores, o método de quantificação discutido neste trabalho foi capaz de estimar corretamente, dentro de um nível de incerteza da ordem de 10 % do teor previsto (desconsiderando amostra CPA), o teor de lignina para diferentes materiais lignocelulósicos. Entretanto, é de se observar que para a amostra CPA, em particular, o teor de lignina previsto por RMN foi bem inferior ao teor de lignina obtido pelo método Klason. Este resultado coloca em questionamento a utilização da metodologia proposta de forma universal para qualquer material lignocelulósico.

A partir da revisão bibliográfica apresentada nos capítulos iniciais deste trabalho, pode ser observado que a estrutura da lignina é formada por três unidades monoméricas básicas de fenil-propano apresentadas na Figura 2.1.7 e que estas diferem basicamente na quantidade de metoxilas presentes na estrutura. Sabe-se que a proporção destas três unidades precursoras pode variar de um material para outro, como bem discutido anteriormente, podendo a lignina ter diferentes proporções dos grupos metoxilas responsáveis pelo pico de 56 ppm no espectro de RMN de ^{13}C CP/MAS [15, 78].

Nesse sentido, o método discutido neste trabalho não pode ser considerado universalmente aplicável a qualquer biomassa, visto que, qualquer que seja o padrão de lignina utilizado, este responderá apenas por uma parcela da lignina encontrada nos mais diversos materiais de biomassa existentes. Um outro fator a agravar este problema é o fato de que um padrão de lignina é geralmente produzido por meio de tratamentos químicos que

acabam gerando modificações na estrutura inicial da lignina. Como pode ser observado na Figura 5.1.1, a própria lignina utilizada nas análises quantitativas deste trabalho possui grupos sulfonatos que surgem devido o processo químico de isolamento da mesma.

Com o objetivo de avaliar diferenças na lignina, tanto de caráter natural como decorrentes de processos de isolamento, três padrões de lignina foram comparados, a fim de investigar possíveis características que podem contribuir ou não para análises quantitativas, avaliando também o quanto estas diferenças são relevantes ou não na quantificação de materiais lignocelulósicos. Na Figura 6.4.1 é apresentado o resultado da análise térmica por TG em atmosfera oxidante realizada para estes três padrões, juntamente com o resultado obtido para as amostras BC1 e CPA. Como pode ser observado, os padrões A e B (definidos na Tabela 5.1.1) possuem um grande conteúdo de impurezas resistentes a altas temperaturas, enquanto na amostra C é observado um teor de cinzas similar aos observados nas curvas de TG obtidas para os materiais de biomassas. Algumas análises de difração de raios-X indicam que o conteúdo das cinzas das amostras A e B são possivelmente sulfatos de sódio e potássio.

Ao comparar os resultados obtidos por TG com os espectros de RMN de ^{13}C CP/MAS (normalizados pela massa) apresentados na Figura 6.4.2, pode-se observar claramente que o conteúdo de impurezas nas amostras padrões influencia diretamente as intensidades espectrais, de forma que, dos três espectros, o correspondente à amostra C apresenta a melhor relação sinal/ruído e também a maior intensidade; de fato os resultados de TG indicam que esta é justamente a amostra com menor conteúdo de impurezas decorrentes dos processos de separação química.

Com relação aos picos observados nos espectros de RMN, as amostras A e C são espectralmente idênticas, diferindo apenas no conteúdo de impurezas, ocasionando perda de intensidade para o espectro característico da amostra A. Já a amostra B, produzida por um processo distinto das amostra A, apresenta queda expressiva nos sinais característicos de metoxilas (tanto o sinal do carbono da metoxila (56 ppm) como o sinal do carbono aromático ligado à metoxila (154ppm)). Ao mesmo tempo, os sinais aromáticos nesta amostra estão bem menos resolvidos (o pico em 106 ppm associado ao carbono 2 da

unidade guaiacila e aos carbonos 2 e 6 da unidade siringila é bem menos expressivo para esta amostra) [17].

Desta maneira pode-se observar que, de fato, para a determinação do teor de lignina, deve-se tomar o cuidado de se escolher um padrão capaz de representar quantitativamente as amostras em estudo e com o menor conteúdo de impurezas possível. Uma solução para este problema pode ser a integração dos sinais aromáticos [18] ao invés do sinal associado ao metoxil. Entretanto, como visto para a amostra B, estes sinais também podem variar consideravelmente em espectros obtidos com CP para diferentes padrões de ligninas. Desta forma, mostra-se mais sensato tomar alguns cuidados para aplicação da metodologia de quantificação abordada neste trabalho. Uma delas, já discutida na literatura é a obtenção (por extração) de um padrão de lignina a partir da amostra que se deseja analisar [18]. Isso pode não ser viável quando se tem apenas uma amostra da qual se deseja conhecer o teor de lignina, mas, se existem várias amostras do mesmo tipo, vários bagaços de cana, por exemplo, então pode ser mais viável extrair a lignina de uma delas e analisar quantitativamente as outras pelo método aqui discutido do que determinar quimicamente o teor de lignina para todas as amostras em questão.

É importante observar que apesar das restrições relacionadas ao padrão de lignina utilizado, mesmo assim a quantificação dos teores de lignina não ficou ruim na maior parte dos casos analisados neste trabalho. Esta metodologia de quantificação pode não ser válida em alguns casos específicos, quando de fato a região espectral associada à lignina é muito distinta no material a ser analisado e no padrão usado para a quantificação. Assim, mesmo que os diferentes materiais lignocelulósicos apresentem ligninas não necessariamente iguais (quimicamente), as diferenças nas quantidades médias de grupos metoxila, por exemplo, não são tão grandes a ponto de inviabilizar completamente o método de quantificação. Da mesma forma, ainda que o padrão de lignina não seja completamente puro, o erro introduzido na quantificação de lignina não é excessivamente grande, a não ser para amostras com teores de lignina muito altos. Os melhores resultados foram obtidos para amostras com teores de lignina Klason moderados ($\sim 20-30\%$), como discutido na seção anterior.

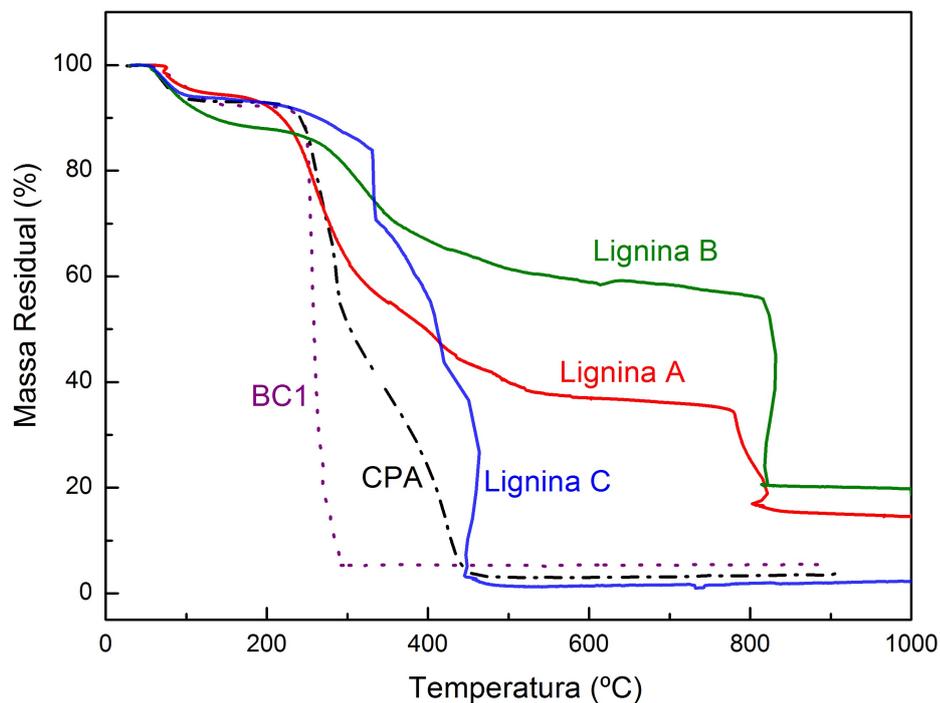


Figura 6.4.1: Curva de TG obtida em atmosfera oxidante das amostras de Lignina A, Lignina B, Lignina C, BC1 e CPA.

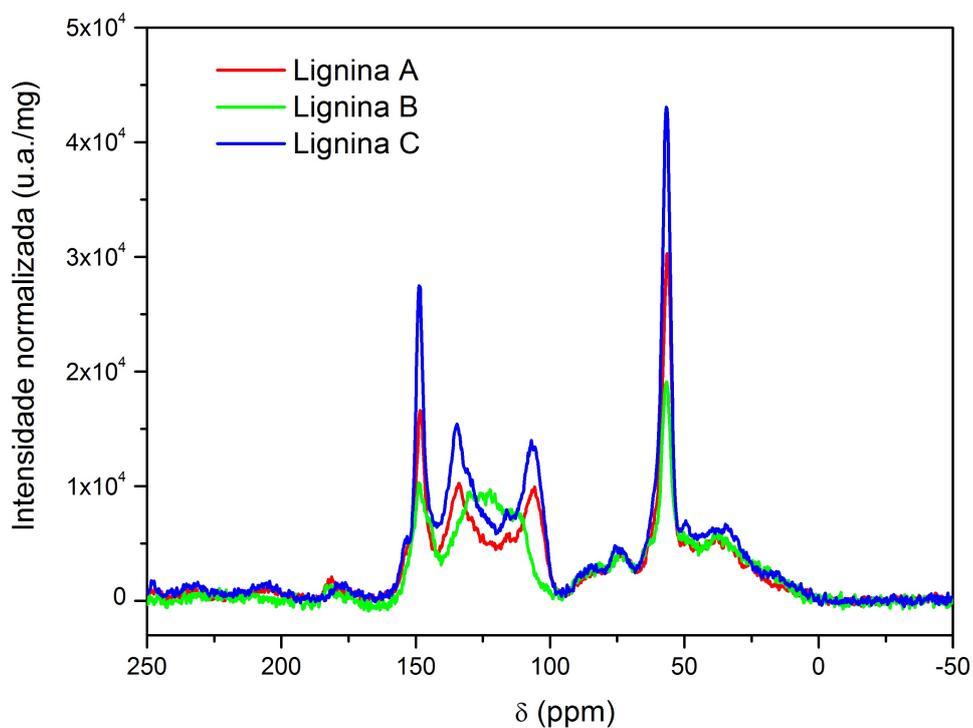


Figura 6.4.2: Espectro de RMN de ^{13}C CP/MAS obtido para os três padrões de linina analisados.

6.5 Critérios de aplicabilidade do método em diferentes materiais de biomassa

De forma geral, um procedimento para avaliação da aplicabilidade do método aqui discutido ainda está em estudo, mas um fator relevante a ser levado em conta de forma inicial é a análise do espectro do material a ser quantificado. Se o material não apresentar um espectro com características (quantidade de picos, deslocamentos químicos, larguras de linha, intensidades relativas) semelhantes aos espectros obtidos para as misturas de celulose e lignina utilizadas na calibração, não há garantias que o método funcionará bem para o mesmo. Este critério foi utilizado para selecionar os materiais utilizados na validação da metodologia abordada neste trabalho. Alguns materiais inicialmente estudados apresentavam diferenças relevantes no espectro, de forma a não se enquadrarem dentro do grupo de materiais para os quais o método poderia ser aplicado.

Para ilustrar esses aspectos, na Figura 6.5.1a são apresentados os espectros de RMN ^{13}C CP/MAS e CPDD/MAS para uma amostra de farelo de mamona. Como pode ser observado esta amostra apresenta sinais característicos de materiais lignocelulósicos (picos em 60 e 70 ppm), todavia há de se notar que estes sinais estão bem menos definidos em comparação com a amostra MPW, por exemplo, cujos espectros correspondentes são mostrados na Figura 6.5.1b. Isto pode ser explicado, possivelmente por um maior teor de hemicelulose no farelo de mamona, mas também pela existência de outros elementos constituintes, como proteínas e gorduras [84]. Uma comparação dos espectros obtidos com DD para as duas amostras mostra que os sinais em ambos os espectros são provenientes de carbonos em diferentes magnitudes do acoplamento dipolar. Isto é claramente observado para o sinal de 56 ppm, pois enquanto este sinal sofre forte atenuação no farelo de mamona devido ao defasamento dipolar, o mesmo permanece inalterado para a amostra MPW. Isso ocorre, provavelmente, devido a presença de outras contribuições sobrepostas na mesma região, que por sua vez sofrem atenuação do seu sinal com o defasamento dipolar.

Desta forma pode-se observar que o espectro obtido para o farelo de mamona não apresenta as características de uma mistura simples de lignina e celulose (como é o caso de

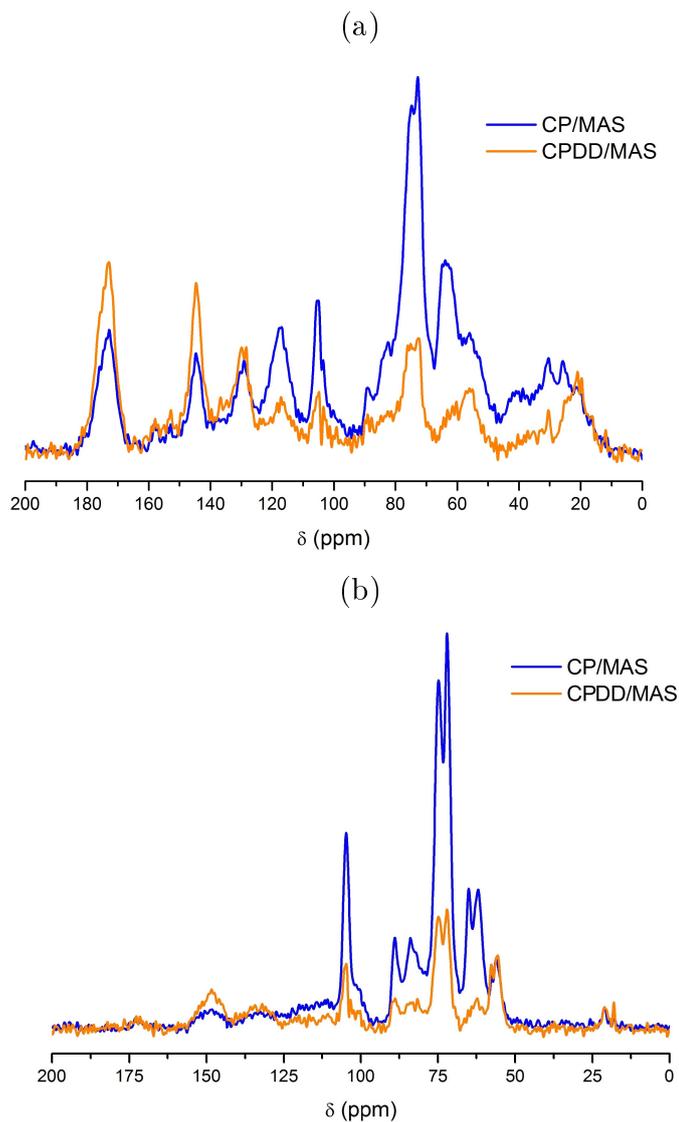


Figura 6.5.1: Espectro de RMN de ^{13}C CP/MAS e CPDD/MAS para uma amostra de farelo de mamona em (a) e madeira de pinho em (b). O tempo de defasamento foi de 0,25 ms.

MPW) e por isso não pode ser quantificado pelo método discutido. Assim, para qualquer material de biomassa com interesse de ser analisado, o critério de aplicabilidade proposto, fundamenta-se na comparação do espectro de RMN de ^{13}C CP/MAS da amostra de interesse com espectros obtidos para misturas simples de lignina e celulose. A similaridade entre esses espectros (em termos de quantidade de picos, deslocamentos químicos, larguras e intensidades relativas) é um indicador da viabilidade ou não do uso do método de quantificação.

Conclusões

A espectroscopia de RMN de ^{13}C no estado sólido com CP/MAS mostrou-se mais uma vez uma ferramenta importante para estudos de materiais lignocelulósicos, tanto em análises qualitativas como também de maneira promissora em análises quantitativa, visto que as curvas de calibração construídas a partir de sinais no espectro característicos da lignina e da holocelulose e obtidas por regressão linear dos pontos experimentais apresentaram coeficiente de determinação entre 95 e 99 %. Esta relação linear entre a massa do componente lignocelulósico e a área dos picos associados a esse componente no espectro de RMN mostra a possibilidade da utilização da técnica de CP, de acordo com o procedimento discutido, para quantificação desses componentes.

Quando comparados com os resultados obtidos pelo método Klason, pode-se observar que o teor de lignina de diferentes amostras de materiais de biomassa determinados pela integração do pico de 56 ppm do espectro de RMN de ^{13}C com CP/MAS apresentou boa concordância com o teor de lignina determinado pelo método Klason. Esta conformidade dos resultados indica que o método pode ser de fato útil para análise quantitativa de materiais lignocelulósicos, sendo necessária ainda a validação do mesmo para um número maior materiais de biomassa, a fim de se avaliar os limites de representatividade do método, visto que a presença do grupo metoxil responsável pelo pico de 56 ppm pode ocorrer em quantidades diferentes dependendo da relação entre as unidades siringil, guaiacil e p-hidroxifenil constituintes da lignina. É verdade que este problema talvez seja contornado ao se determinar o teor de lignina pela integração dos sinais aromáticos, contudo como estes sinais são muito menos intensos, a sua utilização acaba tornando a metodologia muito mais trabalhosa. Nesse sentido a utilização do pico devido ao grupo metoxil

é vantajosa, pelo menos para materiais de biomassa que apresentem contribuições espectrais associadas com a lignina semelhantes às aquelas observadas para o padrão de lignina escolhido para a análise quantitativa. De qualquer forma, é importante ressaltar que o desenvolvimento de um método de quantificação somente baseado em espectroscopia de RMN no estado sólido, sem qualquer manipulação química do material a ser analisado, possui grandes vantagens em comparação com métodos de análise química direta (como o método Klason), por ser a análise por RMN não destrutiva, relativamente rápida e simples e por não envolver a produção de resíduos químicos.

Com relação à determinação do teor de holocelulose, os resultados obtidos pelo método de quantificação apresentam uma tendência de superestimação dos teores de holocelulose quando os resultados são comparados com os obtidos por diferença do teor de lignina Klason. Já a quantificação separada do teor de celulose em fibras ordenadas de celulose demonstrou um claro potencial da técnica de RMN de ^{13}C com CP/MAS para o estudo destas estruturas mais ordenadas, também conhecidas como celulose cristalina. Neste trabalho, por exemplo, foi possível avaliar o crescimento do teor de celulose mais ordenada com o aumento do tempo de hidrólise ácida em amostras de bagaço de cana. Como pode ser observado, as fibras ordenadas de celulose são altamente resistentes à hidrólise ácida, enquanto as formas desordenadas de celulose são mais facilmente desconstruídas.

Com respeito à hemicelulose, os estudos realizados mostraram a rápida extração desse componente logo nos primeiros minutos de tratamento, não só pelo rápido desaparecimento do pico em torno de 21 ppm, mas também pelo rápido surgimento de sinais mais resolvidos característicos de celulose nas regiões dos carbonos C6, C2,3,5 e C4. Estes estudos também indicaram a resistência da lignina ao tratamento realizado, de forma que quanto maior o tempo de tratamento, maior é a concentração de lignina presente no material.

De forma geral, pode-se perceber que todo o conhecimento discutido neste trabalho deve ser aprimorado a partir da análise de outros materiais e também de outras técnicas. As informações obtidas por RMN para as amostras de bagaço de cana tratadas podem ser correlacionadas com informações de cristalinidade obtidas por difração de raios-X, o

que constitui uma atividade a ser realizada na sequência natural deste trabalho. Outros padrões de lignina podem ser comparados e a quantificação de diferentes tipos de materiais de biomassa deve ser também investigada. Com relação à determinação do teor de celulose e hemicelulose, a realização de experimentos de RMN mais sofisticados que sejam sensíveis a aspectos dinâmicos desses dois grupos de carboidratos pode permitir a separação dos sinais superpostos nos espectros de RMN de ^{13}C , viabilizando a determinação desses teores individualmente. Uma outra possibilidade para determinação separada dos teores de celulose e hemicelulose consiste na realização de tratamentos estatísticos (por métodos de quimiometria) para uma gama de espectros de materiais lignocelulósicos com teores de lignina, celulose e hemicelulose previamente determinados por métodos químicos, de forma que seja possível separar a contribuição qualitativa e quantitativa dessas componentes nos espectros de RMN de ^{13}C .

Referências Bibliográficas

- [1] FARIAS, R. *Introdução aos Biocombustíveis*. Rio de Janeiro: Ciência Moderna, 2010.
- [2] AZEVÊDO, J. A. G. et al. Composição químico-bromatológica, fracionamento de carboidratos e cinética da degradação in vitro da fibra de três variedades de cana-de-açúcar (*saccharum* spp.). *R. Bras. Zootec.*, v. 32, n. 6, p. 1443–1453, 2003.
- [3] BACHA, C. B. *Determinação do teor de lignina em amostras de gramíneas ao longo do crescimento através de três métodos analíticos e implicações com as equações de "Cornell Net Carbohydrate and Protein System"*. Dissertação (Mestrado) — Universidade de São Paulo, 2006.
- [4] REIS, A. A. dos et al. Composição da madeira e do carvão vegetal de eucalyptus urophylla em diferentes locais de plantio. *Pesq. Flor. Bras.*, v. 32, n. 71, p. 277, 2012.
- [5] LIMAYEM, A.; RICKE, S. C. Lignocellulosic biomass for bioethanol production: current perspectives, potential issues and future prospects. *Prog. Energy and Combust. Sci.*, v. 38, n. 4, p. 449–467, 2012.
- [6] SOMERVILLE, C. et al. Feedstocks for lignocellulosic biofuels. *Science*, v. 329, n. 5993, p. 790–792, 2010.
- [7] SERVICE, R. Renewable energy. cellulosic ethanol at last? *Science*, v. 345, n. 6201, p. 1111, 2014.
- [8] SINGH, R. et al. A review on delignification of lignocellulosic biomass for enhancement of ethanol production potential. *Renew. Sust. Energ. Rev.*, v. 32, p. 713–728, 2014.

- [9] GOLDEMBERG, J. et al. The brazilian biofuels industry. *Biotechnol. Biofuels*, v. 1, n. 6, p. 1–7, 2008.
- [10] SANTOS, F. A. et al. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. *Quim. Nova*, v. 35, n. 5, p. 1004–1010, 2012.
- [11] BUFALINO, L. et al. Caracterização química e energética para aproveitamento da madeira de costaneira e desbaste de cedro australiano. *Pesq. Flor. Bras.*, v. 32, n. 70, p. 129, 2012.
- [12] WYMAN, C. *Handbook on bioethanol: production and utilization*. Washington: CRC press, 1996.
- [13] MARABEZI, K. *Estudo sistemático das reações envolvidas na determinação dos teores de Lignina e Holocelulose em amostras de Bagaço e Palha de Cana-de-Açúcar*. Dissertação (Mestrado) — Universidade de São Paulo, 2009.
- [14] ALVES, R. E. *Caracterização de fibras lignocelulósicas pré-tratadas por meio de técnicas espectroscópicas e microscópicas ópticas de alta resolução*. Dissertação (Mestrado) — Universidade de São Paulo, 2011.
- [15] HATFIELD, R.; FUKUSHIMA, R. S. Can lignin be accurately measured? *Crop Sci.*, v. 45, n. 3, p. 832–839, 2005.
- [16] FUKUSHIMA, R. S.; HATFIELD, R. D. Extraction and isolation of lignin for utilization as a standard to determine lignin concentration using the acetyl bromide spectrophotometric method. *J. Agr. Food Chem.*, v. 49, n. 7, p. 3133–3139, 2001.
- [17] HATFIELD, G. R. et al. Qualitative and quantitative analysis of solid lignin samples by carbon-13 nuclear magnetic resonance spectrometry. *Anal. Chem.*, v. 59, n. 1, p. 172–179, 1987.
- [18] FU, L. et al. Rapid and accurate determination of the lignin content of lignocellulosic biomass by solid-state NMR. *Fuel*, v. 141, p. 39–45, 2015.

- [19] SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresour. Technol.*, v. 83, n. 1, p. 1–11, 2002.
- [20] SIXTA, H. *Handbook of Pulp*. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH, 2006.
- [21] PENG, F. et al. Fractional study of alkali-soluble hemicelluloses obtained by graded ethanol precipitation from sugar cane bagasse. *J. Agric. Food. Chem.*, v. 58, n. 3, p. 1768–1776, 2009.
- [22] BERG, J. M.; STRYER, L.; TYMOCZKO, J. L. *Bioquímica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.
- [23] LEHNINGER, A. L. *Lehninger Princípios Em Bioquímica*. São Paulo: Sarvier, 2006.
- [24] BETTELHEIM, F. et al. *Introdução a química geral, orgânica e bioquímica*. São Paulo: Cengage Learning, 2012.
- [25] DING, S.-Y.; HIMMEL, M. E. The maize primary cell wall microfibril: a new model derived from direct visualization. *J. Agr. Food Chem.*, v. 54, n. 3, p. 597–606, 2006.
- [26] MOON, R. J. et al. Cellulose nanomaterials review: structure, properties and nanocomposites. *Chem. Soc. Rev.*, v. 40, n. 7, p. 3941–3994, 2011.
- [27] HEINER, A. P.; SUGIYAMA, J.; TELEMAN, O. Crystalline cellulose I α and I β studied by molecular dynamics simulation. *Carbohydr. Res.*, v. 273, n. 2, p. 207–223, 1995.
- [28] IMAI, T.; PUTAUX, J.-L.; SUGIYAMA, J. Geometric phase analysis of lattice images from algal cellulose microfibrils. *Polymer*, v. 44, n. 6, p. 1871–1879, 2003.
- [29] KITTEL, C. *Introdução à Física do Estado Sólido*. Rio de Janeiro: LTC, 2006.
- [30] SUGIYAMA, J.; VUONG, R.; CHANZY, H. Electron diffraction study on the two crystalline phases occurring in native cellulose from an algal cell wall. *Macromolecules*, v. 24, n. 14, p. 4168–4175, 1991.

- [31] NISHIYAMA, Y.; LANGAN, P.; CHANZY, H. Crystal structure and hydrogen-bonding system in cellulose $i\beta$ from synchrotron x-ray and neutron fiber diffraction. *J. Am. Chem. Soc.*, v. 124, n. 31, p. 9074–9082, 2002.
- [32] TSUCHIDA, J. E. et al. Nuclear magnetic resonance investigation of water accessibility in cellulose of pretreated sugarcane bagasse. *Biotechnol. Biofuels*, v. 7, n. 1, p. 127, 2014.
- [33] STÖCKER, M. Biofuels and biomass-to-liquid fuels in the biorefinery: Catalytic conversion of lignocellulosic biomass using porous materials. *Angew. Chem. Int. Ed.*, v. 47, n. 48, p. 9200–9211, 2008.
- [34] FERREIRA, J. P. d. S. *Extração de hemiceluloses com líquidos iônicos*. Dissertação (Mestrado) — Universidade de Aveiro, 2009.
- [35] MILEO, P. C. *Aplicações da celulose de palha de cana-de-açúcar: obtenção de derivados partindo de celulose branqueada e de biocompósitos com poliuretana obtida a partir de óleo de mamona (*Ricinus communis* L.)*. Dissertação (Mestrado) — Universidade de São Paulo, 2011.
- [36] MAICHE, R.; HUBER, C. Desenvolvimento da produção e pesquisa de bioetanol nos Estados Unidos: um enfoque nas rotas bioquímicas. *Rev. Thema*, v. 7, n. 02, p. 1–19, 2010.
- [37] SANTOS, I. D. *Influência dos teores de lignina, holocelulose e extrativos na densidade básica e na contração da madeira e no rendimento e densidade do carvão vegetal de cinco espécies lenhosas do cerrado*. Dissertação (Mestrado) — Universidade de Brasília, 2010.
- [38] FUKUSHIMA, R. S.; HATFIELD, R. D. Composição fenólica de ligninas dioxano determinadas pela reação oxidativa com o nitrobenzeno. *Pesq. Agropec. Bras.*, v. 38, n. 3, p. 373–378, 2003.
- [39] ADLER, E. Lignin Chemistry - Past, Present and Future. *Wood Sci Technol*, v. 11, n. 3, p. 169–218, 1977.

- [40] CARVALHO, W. et al. Uma visão sobre a estrutura, composição e biodegradação da madeira. *Quim. Nova*, v. 32, n. 8, p. 1–5, 2009.
- [41] FOSTON, M. B.; HUBBELL, C. A.; RAGAUSKAS, A. J. Cellulose isolation methodology for NMR analysis of cellulose ultrastructure. *Materials*, v. 4, n. 11, p. 1985–2002, 2011.
- [42] GAMBARATO, B. C. *Estabelecimento e validação de modelos de oxidação de ligninas*. Dissertação (Mestrado) — Universidade de São Paulo, 2010.
- [43] DENCE, C. W. The determination of lignin. In: *Methods in lignin chemistry*. Berlin: Springer, 1992. p. 33–61.
- [44] FUKUSHIMA, R. S.; HATFIELD, R. D. Comparison of the acetyl bromide spectrophotometric method with other analytical lignin methods for determining lignin concentration in forage samples. *J. Agr. Food Chem.*, v. 52, n. 12, p. 3713–3720, 2004.
- [45] NEVES, T. A. *Qualidade da madeira e do carvão vegetal de clones de Eucalyptus cultivados no sul de Minas Gerais*. Dissertação (Mestrado) — Universidade Federal de Lavras, 2012.
- [46] DEMIRBAS, A. Relationships between heating value and lignin, moisture, ash and extractive contents of biomass fuels. *Energ. Explor. Exploit.*, v. 20, n. 1, p. 105–111, 2002.
- [47] NEVES, T. A. et al. Avaliação de clones de *Eucalyptus* em diferentes locais visando à produção de carvão vegetal. *Pesq. Flor. Bras.*, v. 31, n. 68, p. 319, 2011.
- [48] MENDES, R. F. et al. Physical and mechanical properties of particleboard produced with eucalyptus grandis wood in different radial positions. *Sci. For.*, v. 41, n. 99, p. 417–423, 2013.
- [49] VIDAURRE, G. et al. Lenho juvenil e adulto e as propriedades da madeira. *Floresta e Ambiente*, v. 18, n. 4, p. 469–480, 2011.

- [50] PEREIRA, E. S. et al. Determinação das frações proteicas e de carboidratos e taxas de degradação in vitro da cana-de-açúcar, da cama de frango e do farelo de algodão. *Rev. Bras. Zootec.*, v. 29, n. 6, p. 1887–1893, 2000.
- [51] FERNANDES, A. M. et al. Composição químico-bromatológica de variedades de cana-de-açúcar (*saccharum spp l.*) com diferentes ciclos de produção (precoce e intermediário) em três idades de corte. *Rev. Bras. Zootec.*, v. 32, n. 4, p. 977–985, 2003.
- [52] FUKUSHIMA, R. S.; HATFIELD, R. D. Espectros de duas formas de lignina obtidos por ressonância magnética nuclear. *Pesq. Agropec. Bras.*, v. 38, n. 4, p. 505–511, 2003.
- [53] TIPLER, P. *Física: mecânica, oscilações e ondas, termodinâmica, vol. 1*. Rio de Janeiro: LTC–Livros Técnicos e Científicos SA, 2000.
- [54] BRYCE, D. L. et al. Practical aspects of modern routine solid-state multinuclear magnetic resonance spectroscopy: one-dimensional experiments. *Can. J. Anal. Sci. Spect.*, v. 46, n. 2, p. 46–81, 2001.
- [55] KNICKER, H. Solid state CP/MAS ^{13}C and ^{15}N NMR spectroscopy in organic geochemistry and how spin dynamics can either aggravate or improve spectra interpretation. *Org. Geochem.*, v. 42, n. 8, p. 867–890, 2011.
- [56] FREITAS, J. C. C.; CUNHA, A. G.; EMMERICH, F. G. Solid-state nmr methods applied to the study of carbon materials. In: RADOVIC, L. (Ed.). *Chemistry & Physics of Carbon*. New York: Taylor e Francis Group, 2012. v. 31, p. 85–169.
- [57] FREITAS, J. C. C.; BONAGAMBA, T. J. Os núcleos atômicos e a RMN. In: *Fundamentos e aplicações da ressonância magnética nuclear*. Rio de Janeiro: AUREMN, 1999.
- [58] DUER, M. J. *Introduction to solid-state NMR spectroscopy*. Oxford: Wiley-Blackwell, 2005.
- [59] LEVITT, M. H. *Spin dynamics: basics of nuclear magnetic resonance*. Chichester: John Wiley & Sons, 2001.

- [60] RESNICK, R.; HALLIDAY, D.; KRANE, K. S. *Física 1. 5ª edição*. Rio de Janeiro: Editora LTC, 2003.
- [61] EISBERG, R. M.; RESNICK, R. *Física Quântica*. Rio de Janeiro: Elsevier, 1979.
- [62] GIL, V. M.; GERALDES, C. F. G. C. *Ressonância magnética nuclear: fundamentos, métodos e aplicações*. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1987.
- [63] MACKENZIE, K. J.; SMITH, M. E. *Multinuclear solid-state nuclear magnetic resonance of inorganic materials*. Oxford: Elsevier, 2002.
- [64] FREITAS, J. C. C. *Estudo de materiais carbonosos obtidos por decomposição térmica de precursores orgânicos através de ressonância magnética nuclear de alta resolução em conjunção com outras técnicas experimentais. 2000*. Tese (Doutorado) — Programa de Pós-Graduação em Física, Centro Brasileiro de Pesquisas Física, Rio de Janeiro, 2000.
- [65] GUIMARAES, A. P.; OLIVEIRA, I. *Magnetismo e ressonância magnética em sólidos*. Rio de Janeiro: Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas, 2009.
- [66] HONORATO, H. A. *Estudo da aplicação de RMN de ^1H em baixo campo na análise de óleos pesados*. Monografia de conclusão de curso. Vitória: Departamento de Química da Universidade Federal do Espírito Santo, 2009.
- [67] GRANDINETTI, P. J. *Nuclear magnetic resonance for the people*. Notas de aula. 2013. Disponível em: <<http://www.grandinetti.org/resources/Teaching/Chem7160/Notes/NMRftp.pdf>>. Acesso em: 27.05.2015.
- [68] BONAGAMBA, T. *Espectroscopia de alta resolução em sólidos por ressonância magnética nuclear. 141 p.* Tese (Doutorado) — Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1991.
- [69] FREITAS, J. *Espectroscopia de alta resolução por ressonância magnética multinuclear aplicada ao estudo de zeólitas*. Dissertação (Mestrado) — Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1994.

- [70] LOWE, I. Free induction decays of rotating solids. *Phys. Rev. Lett.*, v. 2, n. 7, p. 285, 1959.
- [71] ANDREW, E.; BRADBURY, A.; EADES, R. Removal of dipolar broadening of nuclear magnetic resonance spectra of solids by specimen rotation. *Nature*, v. 183, p. 1802–1803, 1959.
- [72] FUNG, B.; KHITRIN, A.; ERMOLAEV, K. An improved broadband decoupling sequence for liquid crystals and solids. *J. Magn. Reson.*, v. 142, n. 1, p. 97 – 101, 2000.
- [73] SINHA, N. et al. {SPINAL} modulated decoupling in high field double- and triple-resonance solid-state {NMR} experiments on stationary samples. *J. Magn. Reson.*, v. 177, n. 2, p. 197 – 202, 2005.
- [74] BENNETT, A. E. et al. Heteronuclear decoupling in rotating solids. *J. Chem. Phys.*, v. 103, n. 16, p. 6951–6958, 1995.
- [75] LOPES, T. R. *Ressonância magnética nuclear aplicada ao estudo de óxidos de alumínio nanoestruturados dispersos em materiais carbonosos porosos*. Dissertação (Mestrado) — Universidade Federal do Espírito Santo, 2013.
- [76] HARTMANN, S. R.; HAHN, E. L. Nuclear double resonance in the rotating frame. *Phys. Rev.*, v. 128, p. 2042–2053, 1962.
- [77] BERNS, A. E.; CONTE, P. Effect of ramp size and sample spinning speed on CP/MAS ^{13}C NMR spectra of soil organic matter. *Org. Geochem.*, v. 42, n. 8, p. 926–935, 2011.
- [78] HAW, J. F.; MACIEL, G. E.; SCHROEDER, H. A. Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectrometric study of wood and wood pulping with cross polarization and magic-angle spinning. *Anal. Chem.*, v. 56, n. 8, p. 1323–1329, 1984.
- [79] SMERNIK, R. J.; OADES, J. The use of spin counting for determining quantitation in solid state ^{13}C NMR spectra of natural organic matter: 1. Model systems and the effects of paramagnetic impurities. *Geoderma*, v. 96, p. 101 – 129, 2000.

- [80] METZ, G.; WU, X.; SMITH, S. Ramped-Amplitude Cross Polarization in Magic-Angle-Spinning NMR. *J. Magn. Reson.*, v. 110, n. 2, p. 219 – 227, 1994.
- [81] JOHNSON, R. L.; SCHMIDT-ROHR, K. Quantitative solid-state ^{13}C NMR with signal enhancement by multiple cross polarization. *J Magn. Reson.*, v. 239, p. 44–49, 2014.
- [82] SMERNIK, R.; OADES, J. Solid-state ^{13}C -NMR dipolar dephasing experiments for quantifying protonated and non-protonated carbon in soil organic matter and model systems. *Eur. J. Soil Sci.*, v. 52, n. 1, p. 103–120, 2001.
- [83] CONTE, P.; SPACCINI, R.; PICCOLO, A. State of the art of CPMAS ^{13}C -NMR spectroscopy applied to natural organic matter. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.*, v. 44, p. 215 – 223, 2004.
- [84] WILSON, M. A. *NMR Techniques and Applications in Geochemistry and Soil Chemistry*. Oxford: Pergamon Press, 1987.
- [85] SMERNIK, R. J.; BALDOCK, J. A.; OADES, J. Impact of remote protonation on ^{13}C CPMAS NMR quantitation of charred and uncharred wood. *Solid State Nucl. Magn. Reson.*, v. 22, n. 1, p. 71 – 82, 2002.
- [86] CONTE, P. et al. Elemental quantitation of natural organic matter by CPMAS ^{13}C NMR spectroscopy. *Solid State Nucl. Magn. Reson.*, v. 21, p. 158 – 170, 2002.
- [87] SNAPE, C. E. et al. Quantitative reliability of aromaticity and related measurements on coals by ^{13}C NMR. A debate. *Fuel*, v. 68, n. 5, p. 547–548, 1989.
- [88] FREITAS, J. C. C.; BONAGAMBA, T. J.; EMMERICH, F. G. Investigation of biomass- and polymer-based carbon materials using ^{13}C high-resolution solid-state NMR. *Carbon*, v. 39, n. 4, p. 535 – 545, 2001.
- [89] EARL, W. L.; VANDERHART, D.-L. High resolution, magic angle sampling spinning ^{13}C NMR of solid cellulose I. *J. Am. Chem. Soc.*, v. 102, n. 9, p. 3251–3252, 1980.

- [90] ATALLA, R. H. et al. Carbon-13 NMR spectra of cellulose polymorphs. *J. Am. Chem. Soc.*, v. 102, n. 9, p. 3249–3251, 1980.
- [91] ATALLA, R. H.; VANDERHART, D. L. Native cellulose: a composite of two distinct crystalline forms. *Science*, v. 223, n. 4633, p. 283–285, 1984.
- [92] KOŁODZIEJSKI, W.; FRYE, J. S.; MACIEL, G. E. Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectrometry with cross polarization and magic-angle spinning for analysis of lodgepole pine wood. *Anal. Chem.*, v. 54, n. 8, p. 1419–1424, 1982.
- [93] LARSSON, P. T.; WESTERMARK, U.; IVERSEN, T. Determination of the cellulose I α allomorph content in a tunicate cellulose by CP/MAS ^{13}C -NMR spectroscopy. *Carbohydr. Res.*, v. 278, n. 2, p. 339–343, 1995.
- [94] LARSSON, P. T.; WICKHOLM, K.; IVERSEN, T. A CP/MAS ^{13}C NMR investigation of molecular ordering in celluloses. *Carbohydr. Res.*, v. 302, n. 1, p. 19–25, 1997.
- [95] LENNHOLM, H.; LARSSON, T.; IVERSEN, T. Determination of cellulose I α and I β in lignocellulosic materials. *Carbohydr. Res.*, v. 261, n. 1, p. 119–131, 1994.
- [96] LARSSON, P. T.; WESTLUND, P.-O. Line shapes in CP/MAS ^{13}C NMR spectra of cellulose I. *Spectrochim. Acta, Part A*, v. 62, n. 1, p. 539–546, 2005.
- [97] LARSSON, P. T. et al. CP/MAS ^{13}C -NMR spectroscopy applied to structure and interaction studies on cellulose I. *Solid State Nucl. Magn. Reson.*, v. 15, n. 1, p. 31–40, 1999.
- [98] WICKHOLM, K. *Structural Elements in Native Celluloses*. 50 p. Tese (Doutorado) — KTH, Pulp and Paper Technology, 2001. NR 20140805.
- [99] MAUNU, S. NMR studies of wood and wood products. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.*, v. 40, n. 2, p. 151–174, 2002.

- [100] DUCHESNE, I. et al. The influence of hemicellulose on fibril aggregation of kraft pulp fibres as revealed by FE-SEM and CP/MAS ^{13}C -NMR. *Cellulose*, v. 8, n. 2, p. 103–111, 2001.
- [101] LIITIÄ, T. et al. Cellulose crystallinity and ordering of hemicelluloses in pine and birch pulps as revealed by solid-state nmr spectroscopic methods. *Cellulose*, v. 10, n. 4, p. 307–316, 2003.
- [102] SIGMA-ALDRICH. *Catálogo*. Disponível em: <<http://www.sigmaaldrich.com/brazil.html>>. Acesso em: 28.05.2015.
- [103] J RETTENMAIER SOHNE. *Lignocel*. Disponível em: <<http://www.jrs.de>>. Acesso em: 28.05.2015.
- [104] AKIRA, R. *Óleo de palma e palmiste*. Disponível em: <<http://www.japudo.com.br>>. Acesso em: 30.05.2015.
- [105] HARRIS, R. K. et al. Nmr nomenclature. nuclear spin properties and conventions for chemical shifts (iupac recommendations 2001). *Pure and Applied Chemistry*, v. 73, n. 11, p. 1795–1818, 2001.
- [106] ZIARELLI, F. et al. Precision and sensitivity optimization of quantitative measurements in solid state nmr. *J. Magn. Reson.*, v. 188, n. 2, p. 260–266, 2007.
- [107] ACD/LABS. *ACD/NMR Processor Academic Edition*. Disponível em: <<http://http://www.acdlabs.com>>. Acesso em: 29.05.2015.
- [108] PARK, S. et al. Research cellulose crystallinity index: measurement techniques and their impact on interpreting cellulase performance. *Biotechnol. Biofuels*, v. 3, n. 10, p. 1–10, 2010.