Universidade de São Paulo
Instituto de Física de São Carlos

Oigres Daniel Bernardinelli

*Caracterização de biomassa lignocelulósica utilizando
técnicas de ressonância magnética nuclear do estado
sólido (SSNMR)*

São Carlos

2016

Oigres Daniel Bernardinelli

Caracterização de biomassa lignocelulósica utilizando técnicas de ressonância magnética nuclear do estado sólido (SSNMR)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física do Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Física Aplicada.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Ribeiro de Azevêdo

Versão Corrigida
(versão original disponível na Unidade que aloja o Programa)

São Carlos

2016

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica revisada pelo Serviço de Biblioteca e Informação do IFSC,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Bernardinelli, Oigres Daniel
Caracterização de biomassa lignocelulósica
utilizando técnicas de ressonância magnética nuclear
do estado sólido (SSNMR) / Oigres Daniel
Bernardinelli; orientador Eduardo Ribeiro deAzevedo -
versão corrigida -- São Carlos, 2016.
136 p.

Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em
Física Aplicada) -- Instituto de Física de São Carlos,
Universidade de São Paulo, 2016.

1. Ressonância magnética nuclear do estado sólido.
2. Biomassa lignocelulósica. 3. Produção de etanol de
segunda geração. I. deAzevedo, Eduardo Ribeiro,
orient. II. Título.

À memória de Sergio Bernardinelli, meu pai.

Agradecimentos

Primeiramente gostaria de agradecer a toda minha família sem exceções. Agradeço ao companheirismo e união de minha esposa Domila do Prado Pazzini.

Ao meu orientador Prof. Dr. Eduardo Ribeiro de Azevedo, pela presente orientação e todo o ensinamento à pesquisa.

Agradeço ao Dr. Marcelo Luiz Simões, Dr. Luiz Alberto Colnago, Viviane Faria Soares e a EMBRAPA pela viabilização dos experimentos de SSNMR permitindo avanço da caracterização nas amostras.

À Prof^a. Dr^a. Leni Campos Akcelrud e Cláudio Ciulik pela síntese e fornecimento das amostras de polímeros de quitosana possibilitando assim a realização de trabalho em paralelo a essa tese.

Ao Prof. Dr. Igor Polikarpov por fornecer as amostras de biomassa e pelas outras inúmeras contribuições que possibilitaram o andamento desse trabalho.

À Dr^a. Marisa Lima e Dr^a. Camila Rezende pela colaboração de alguns trabalhos no tema de caracterização de biomassa.

Aos amigos Burca, Milena, Arthur, Marcos, Fabiana, Isabela, Marcio, Jerffenson, Rodrigo, Robson, Otávio, Christian, Elton, Tiago, Rafael, Everton, e os esquecidos mas não menos importantes.

Aos técnicos do grupo de RMN Odir, João, José, Aparecido e Edson ajudando na manutenção, reparo e a qualidade de todos os equipamentos utilizados neste trabalho.

Aos técnicos da gráfica do IFSC pela ajuda na impressões e correria nos momentos finais da impressão da tese, especialmente ao Ítalo.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) que pela bolsa de estudo possibilitou a realização deste projeto e a realização de um doutorado sanduíche na Universidade de Cambridge onde gerou muito aprendizado.

Ao Prof. Dr. Ray Dupree, Prof. Dr. Paul Dupree, Prof. Dr. Steven Brown e todos os seus grupos por me receberem tão bem e me ajudarem na estadia na Inglaterra durante meu doutoramento sanduíche, além do grande ensinamento que me passaram no tema de biomassa e ressonância magnética nuclear multidimensional.

À Dra. Sonia Maria Cabral de Menezes, Dr. Etelvino Novotny, Prof. Dr. Mario de Oliveira Neto e Prof. Dr. Francisco Guimarães pelas inúmeras correções que engrandeceram esse trabalho.

Ao serviço de biblioteca e informação Bernhard Gross e ao serviço de Pós-graduação IFSC, principalmente à Neusa Aguiar.

"O que sabemos é uma gota; o que ignoramos é um oceano."

Isaac Newton

Resumo

BERNARDINELLI, O. D. **Caracterização de biomassa lignocelulósica utilizando técnicas de ressonância magnética nuclear do estado sólido (SSNMR)**. 2015. 136p. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2015.

Nesta tese, a ressonância magnética nuclear do estado sólido (SSNMR) foi utilizada para estudar a composição química e estrutura dos componentes da parede celular de plantas. Visando contribuir no desenvolvimento de estratégias de despolimerização da biomassa, SSNMR foi inicialmente utilizada para estudar efeitos dos pré-tratamentos químicos e físicos, e da ação de enzimas sobre algumas biomassas. Os resultados mostraram que, em baixas concentrações, tratamentos ácidos são altamente efetivos na remoção das frações de hemicelulose, com pouco efeito nas frações de lignina e celulose. Já tratamentos alcalinos promovem eficiente deslignificação da biomassa, sendo que a mínima concentração da solução alcalina necessária para obter a máxima deslignificação depende do tipo de biomassa e da temperatura do tratamento. Os estudos por SSNMR foram correlacionados com estudos por outras técnicas, contribuindo para um entendimento mais profundo sobre o efeito dos pré-tratamentos e da hidrólise enzimática em diferentes biomassas. Outra parte da tese aborda a determinação da cristalinidade de celulose nativa (não extraída) de biomassa de bagaço de cana-de-açúcar. Utilizando a técnica de polarização cruzada em múltiplas etapas (Multi-CP) e um procedimento de subtração espectral, foi possível isolar os sinais de RMN da celulose nativa e a partir daí avaliar o índice de cristalinidade (CI). Esse método foi utilizado para avaliar o CI da celulose nativa de bagaço de cana-de-açúcar submetido à pré-tratamentos com H_2SO_4 e NaOH e os resultados não mostraram variações significativas do CI da celulose nas concentrações utilizadas, apesar do aumento da eficiência da hidrólise. Assim, ao contrário de muitos trabalhos encontrados na literatura, não parece que a cristalinidade da celulose seja um fator primordial no aumento de eficiência da hidrólise enzimática. Na parte final da tese, as interações intermoleculares entre os dois principais polissacarídeos da biomassa: celulose e xilano foram investigadas utilizando uma variedade de técnicas avançadas de RMN bidimensional. Neste trabalho, a arquitetura molecular de hastes de plantas de *Arabidopsis Thaliana*, sem nunca serem seca foi estudada. Utilizando a técnica *refocused* J-INADEQUATE (*Incredible Natural Abundance Double Quantum Transfer Experiment via J*

coupling) observamos dois conjuntos de deslocamentos químicos distintos para o xilano, sendo um deles coincidente com aquele observado em solução. Em seguida, utilizamos experimentos SSNMR com o intuito de investigar se algum desses domínios de xilano estaria vinculado com a celulose. Experimentos CP-PDSD (*Proton Driven Spin Diffusion detected via ^{13}C through Cross-Polarization*) demonstram a existência de proximidade espacial entre o novo domínio do xilano e o domínio da celulose. A comparação de resultados entre as amostras de padrão e o seu mutante deficiente em celulose (*irx3*) indicaram que o xilano com novo deslocamento químico é fortemente dependente da presença de celulose. A análise da mobilidade molecular pela técnica Dipolar Chemical Shift Correlation (DIPSHIFT), mostrou que as moléculas do novo domínio do xilano são altamente rígidas - uma característica partilhada com a celulose. Combinados, esses dados fornecem evidências de uma arquitetura molecular específica entre os dois polissacarídeos majoritários da parede celular.

Palavras-chave: Ressonância magnética nuclear do estado sólido. Biomassa lignocelulósica. Produção de etanol de segunda geração.

Abstract

BERNARDINELLI, O. D. **Characterization of lignocellulosic biomass using solid-state nuclear magnetic resonance techniques.** 2015. 136p. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2015.

Solid-state nuclear magnetic resonance (SSNMR) was used to study the chemical composition and structure of plant cell wall components. Aiming the development of depolymerization strategies, SSNMR was initially used to study the effects of chemical and physical pre-treatments, as well as the enzymatic action on the structure and composition of biomasses. The results showed that, at low concentrations, pre-treatments with acids are highly effective for removal of hemicellulose without significant effect on lignin and cellulose. In turn, the alkaline pre-treatment promotes efficient delignification of the biomass. The minimum concentration of the alkaline solution required to achieve the maximum delignification depends on the type of biomass and treatment temperature. SSNMR studies were correlated with studies using other techniques, contributing to an in-depth understanding of the effect of pre-treatments and enzymatic hydrolysis in different biomasses. Another part of the thesis discusses the determination of native cellulose crystallinity (not extracted) of sugarcane bagasse biomasses. Using the cross-polarization technique in multiple blocks (Multi-CP) and a spectral subtraction approach, it was possible to isolate the NMR signals of the native cellulose and to evaluate the crystallinity index (CI). This method was used to access the CI of cellulose in sugarcane bagasse samples pre-treated with H_2SO_4 and NaOH . The results did not show significant variations of the cellulose CI, at the concentration used here, despite the increase in the hydrolysis efficiency. Thus, in contrast to some studies in the literature, it does not appear that the crystallinity of cellulose is a primary limiting factor concerning the enzymatic hydrolysis efficiency in biomasses. In the final part of this thesis, the intermolecular interactions between the two main polysaccharides of the plant cell wall, cellulose and xylan, were investigated using advanced two-dimensional NMR techniques. The molecular architecture of ^{13}C labelled never-dried *Arabidopsis Thaliana* stems was studied. Using refocused J-INADEQUATE (Incredible Natural Abundance Double Quantum Transfer Experiment via J coupling) we observed two distinct chemical shifts in xylan, one of which coincides with that observed in solution. Next, we used SSNMR experiments to investigate the interaction between the novel xylan and cellulose domains. CP-PDSD

(Proton Driven Spin Diffusion detected via ^{13}C through Cross-Polarization) experiments demonstrated spatial proximity between the new xylan and cellulose domains. The same approach was used to study cellulose deficient (*irx3*) mutants and the comparison between the results indicate that the new xylan domain is cellulose-dependent. Dipolar Chemical Shift Correlation (DIPSHIFT) experiments were performed to analyse the molecular mobility of these polysaccharides showing that the novel xylan is highly rigid – a characteristic which is shared with cellulose. Combined, these data provide evidence for a specific molecular architecture between the two most common polysaccharides in plant cell walls.

Keywords: Solid-state nuclear magnetic resonance. Lignocellulosic biomass. Second generation of bioethanol.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – ESBOÇO DAS ESTRUTURAS DA PAREDE CELULAR VEGETAL.....	28
FIGURA 2 – ESBOÇO DAS ESTRUTURAS: A) CELULOSE E HEMICELULOSE B) DOS ALCOÓIS PERCUSSORES DAS LIGNINAS.....	29
FIGURA 3-REPRESENTAÇÃO DE UMA DIFRAÇÃO DE RAIOS-X EM UM CRISTAL PERIÓDICO.....	31
FIGURA 4- REPRESENTAÇÃO DO DIFRATOGRAMA DE RAIOS X PARA UMA AMOSTRA DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR UTILIZANDO DOIS MÉTODOS PARA OBTER O ÍNDICE DE CRISTALINIDADE (CI) A) PADRÃO DOS DIFRATOGRAMAS DE RAIOS-X PARA A BIOMASSA B) MÉTODO DE DECONVOLUÇÃO E C) MÉTODO DA RAZÃO ENTRE INTENSIDADES DE PICOS.	32
FIGURA 5-A) ESBOÇO DO TRAJETÓRIA DA MAGNETIZAÇÃO SOB UM PULSO DE RF $\pi/2$, VISTO NO REFERENCIAL ESTÁTICO. B) MAGNETIZAÇÃO SOB MESMO PULSO DE RF VISTO NO SISTEMA DE COORDENADAS GIRANTES.	37
FIGURA 6-A) SINAL ADQUIRIDO PELO RECEPTOR. B) SINAL APÓS A TRANSFORMADA DE FOURIER.	38
FIGURA 7-ILUSTRAÇÃO DA ROTAÇÃO MACROSCÓPICA DA AMOSTRA EM TORNO DO ÂNGULO MÁGICO.	42
FIGURA 8-ESBOÇO DO AUMENTO DE RESOLUÇÃO EM UM ESPECTRO SSNMR COM UTILIZAÇÃO DO DESACOPAMENTO HETERONUCLEAR E MAS.....	45
FIGURA 9-A) SEQUÊNCIA DE PULSOS CP SEM RAMPA E B) SEQUÊNCIA DE PULSOS CP COM RAMPA.	48
FIGURA 10 – SEQUÊNCIA DE PULSOS CPMAS TOSS	49
FIGURA 11 – A) ILUSTRAÇÃO SEM ESCALA REAL DO EXPERIMENTO MULTICP COM A EVOLUÇÃO DA MAGNETIZAÇÃO DOS NÚCLEOS DE ^1H E ^{13}C PARA DIFERENTES GRUPOS QUÍMICOS B) COMPARAÇÃO ENTRE OS ESPECTROS UTILIZANDO AS TÉCNICAS MULTICP (EM PRETO), DPMAS (EM VERMELHO) E CPMAS (EM AZUL).....	51
FIGURA 12 - SEQUÊNCIAS DE PULSOS J-INADEQUATE PARA ESTADO SÓLIDO A) E SEQUÊNCIA <i>REFOCUSED</i> J-INADEQUATE B). SOB CONDIÇÕES IDEAIS, O GRAU DE CONVERSÃO EM COERÊNCIA DE DUPLO QUANTUM É MÁXIMA EM $\tau=1/(4J_{CC})$ E É ZERO PARA $\tau=1/(2J_{CC})$, ONDE J_{CC} É A CONSTANTE DE ACOPLAMENTO J ENTRE OS ^{13}C	56

FIGURA 13 - SEQUÊNCIAS DE PULSOS PROTON DRIVEN SPIN DIFFUSION COM FILTRO T_1 (T_1 -PDSD) PARA ESTADO SÓLIDO.	58
FIGURA 14-A) SEQUÊNCIA DIPSHIFT: CP REFERE-SE À POLARIZAÇÃO CRUZADA, FSLG É UMA SEQUÊNCIA DE DESACOPAMENTO DIPOLAR HOMONUCLEAR (DO INGLÊS, <i>FREQUENCY SWITCHED LEE-GOLDBURG</i>) , TPPM REFERE-SE A UMA SEQUÊNCIA DE DESACOPAMENTO DIPOLAR HETERONUCLEAR (DO INGLÊS, <i>TIME PROPORTIONAL PHASE MODULATION</i>), T_1 É O TEMPO QUE MANTEMOS FSLG LIGADO, T_2 É TEMPO DE AQUISIÇÃO E T_R É O PERÍODO DE ROTAÇÃO DA AMOSTRA, MAS. B) CURVAS TÍPICAS DE DIPSHIFT CONSIDERANDO DIVERSOS ACOPLAMENTOS DIPOLARES CH , $\langle \omega_{CH} \rangle / 2\pi$ INDICADOS NA FIGURA.	59
FIGURA 15-CURVA CARACTERÍSTICA DIPSHIFT PARA DIFERENTES TEMPOS DE CORRELAÇÃO DE ACOPLAMENTO DIPOLAR CH	61
FIGURA 16 – ESBOÇO DAS ETAPAS DOS PRÉ-TRATAMENTO REALIZADO NAS CASCAS DE EUCALIPTO ¹ A) E EM VARIAS OUTRAS BIOMASSAS ⁴ B).	64
FIGURA 17 – CÂMARA DE CRESCIMENTO.	69
FIGURA 18 - ESPECTROS CPMASSTOSS EM CASCAS DE EUCALIPTO EG E HGU. A) AMOSTRA CONTROLE; B) AMOSTRA APÓS O TRATAMENTO COM ÁCIDO CLORÍDRICO (HCL); E C) AMOSTRA APÓS O TRATAMENTO COM ÁCIDO E 4% NAOH.	74
FIGURA 19 - ESPECTROS CPMASSTOSS EM CASCAS DE EUCALIPTO EG E HGU PARA DIFERENTE ETAPA DO PRÉ-TRATAMENTO.	77
FIGURA 20 - ALTERAÇÃO DA COLORAÇÃO DAS CASCAS DE EUCALIPTO EM FUNÇÃO DA REMOÇÃO DE COMPOSTOS POLIFENÓLICOS COM O AUMENTO DAS CONCENTRAÇÕES DE NAOH.	77
FIGURA 21– ESPECTROS CPMASSTOSS DO LICOR (LIOFILIZADO) DAS CASCAS DE EUCALIPTO PROVENIENTE DE DIFERENTES CONDIÇÕES DE PRÉ-TRATAMENTO. A) DO TRATAMENTO COM 0,25% DE NAOH, COM PRÉVIA ETAPA DE TRATAMENTO ÁCIDO; B) DO TRATAMENTO COM 4% DE NAOH, COM PRÉVIA ETAPA DE TRATAMENTO ÁCIDO;.C) DO TRATAMENTO COM 4% DE NAOH (SEM PRÉVIA ETAPA DE TRATAMENTO ÁCIDO). ONDE H É REFERENTE AOS SINAIS DA HEMICELULOSE.	78
FIGURA 22– RESULTADOS DE EFICIÊNCIA DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA PARA AS AMOSTRAS DE CASCAS DE EUCALIPTO.	79
FIGURA 23– ESPECTROS CPMASSTOSS OBTIDOS PARA AS AMOSTRAS DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR APÓS AS DIFERENTES CONDIÇÕES DE PRÉ-TRATAMENTO. OS SINAIS APROXIMADAMENTE 40 PPM QUE APARECEM EM TODAS AS AMOSTRAS CONTROLE É UM CONTAMINANTE NÃO IDENTIFICADO.	81

FIGURA 24 – ESPECTROS CPMASSTOSS OBTIDOS PARA AS AMOSTRAS DE CASCA DE <i>E. GRANDISX UROPHYLLA</i> (HGU) APÓS AS DIFERENTES CONDIÇÕES DE PRÉ-TRATAMENTO.....	83
FIGURA 25 – RESULTADOS DE EFICIÊNCIA DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA E REDUÇÃO DE AÇÚCARES PARA AS AMOSTRAS DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR.	85
FIGURA 26 – MÉTODO DE SSNMR UTILIZADO. A) ESBOÇO DA SEQUÊNCIA DE PULSOS DA TÉCNICA MULTICP UTILIZADA PARA OBTER ESPECTROS QUANTITATIVOS DE ¹³ C. B) ESBOÇO DA SEQUÊNCIA DE PULSOS DA TÉCNICA MULTICP COM FILTRO DIPOLAR UTILIZADA PARA OBTER ESPECTROS SELETIVOS AOS COMPOSTOS DE HEMICELULOSE E LIGNINA EM BIOMASSAS HIDRATADAS.....	89
FIGURA 27 – ESPECTROS SSNMR MULTICP COM E SEM FILTRO DIPOLAR OBTIDOS EM BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR ANTES E APÓS TRATAMENTOS: A) ESPECTRO DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR HIDRATADA SEM TRATAMENTO ADQUIRIDO COM A TÉCNICA MULTICP; B) ESPECTRO DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR HIDRATADA APÓS O TRATAMENTO COM H ₂ SO ₄ ADQUIRIDO COM A TÉCNICA MULTI-CP; C) ESPECTRO DO SOBRENADANTE LIOFILIZADO DO PRÉ-TRATAMENTO 1% H ₂ SO ₄ + 0.25% NaOH ADQUIRIDO COM A TÉCNICA MULTI-CP; D) ESPECTRO DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR HIDRATADA SEM TRATAMENTO ADQUIRIDO COM A TÉCNICA MULTI-CP EM CONJUNTO COM FILTRO DIPOLAR; E) ESPECTRO DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR HIDRATADA APÓS PRÉ-TRATAMENTO COM H ₂ SO ₄ ADQUIRIDO COM A TÉCNICA MULTICP EM CONJUNTO COM FILTRO DIPOLAR. A LINHA PONTILHADA É CENTRALIZADA EM UM SINAL DA LIGNINA COM MAIOR DESLOCAMENTO QUÍMICO (178 PPM) PARA MOSTRAR CLARAMENTE QUE DIFERE DO SINAL DA HEMICELULOSE QUE SOBREPOEM ESSE SINAL.	91
FIGURA 28 – ESPECTROS MULTICP OBTIDOS PARA AS AMOSTRAS DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR EM TRÊS ETAPAS DO PRÉ-TRATAMENTO (CONTROLE - UNTREATED, ETAPA ÁCIDA E ETAPA ÁCIDA + ALCALINA) COMPARADOS COM O ESPECTRO PADRÃO DA LIGNINA (VERMELHO PONTILHADO). EM ANEXO, O GRÁFICO DOS VALORES DE LIGNINA PRESENTE EM CADA ETAPA DO PRÉ-TRATAMENTO OBTIDOS PELA NORMALIZAÇÃO DO ESPECTRO DE LIGNINA PADRÃO COM OS ESPECTROS DA BIOMASSA EM CADA ETAPA DO PRÉ-TRATAMENTO.....	93
FIGURA 29 – ESBOÇO DE COMO FOI REALIZADO A SUBTRAÇÃO ESPECTRAL DO ESPECTRO DA BIOMASSA APÓS TER PASSADO POR UM PRÉ-TRATAMENTO ÁCIDO, COM O INTUITO DE REMOVER POR COMPLETO A HEMICELULOSE, POR UM ESPECTRO DA LIGNINA DE MODO A OBTER COMO PRODUTO FINAL UM ESPECTRO SOMENTE COM RELAÇÃO A CELULOSE PRESENTE EM CADA ETAPA DO PRÉ-TRATAMENTO.....	95
FIGURA 30 – ESPECTROS MULTICP APÓS A SUBTRAÇÃO ESPECTRAL DO SINAL DE LIGNINA DE TRÊS ETAPAS DO PRÉ-TRATAMENTO: CONTROLE, ÁCIDO E ÁCIDO + ALCALINO.	96

- FIGURA 31 – A) ESPECTROS MULTI¹³C FOCADOS NA REGIÃO ESPECTRAL ENTRE 80 - 94 ppm COM AS RESPECTIVAS DECONVOLUÇÃO POR GAUSSIANAS E LORENTZIANAS PARA AS AMOSTRAS SEM TRATAMENTO, PRÉ-TRATADAS COM 1% DE ÁCIDO SULFÚRICO E COM 1% DE ÁCIDO SULFÚRICO MAIS 4% DE NaOH. B) VALORES DOS ÍNDICES DE CRISTALINIDADE OBTIDO POR SSNMR ATRAVÉS DE INTEGRAL E DECONVOLUÇÃO POR GAUSSIANAS/LORENTZIANAS PARA AS AMOSTRAS DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR COM E SEM O MÉTODO DE SUBTRAÇÃO. AS BARRAS DE ERRO FORAM CALCULADAS COM ESTIMATIVA NA VARIAÇÃO CAUSADA PELA RAZÃO DA RELAÇÃO SINAL/RUÍDO SOBRE A INTEGRAL DO SINAL EM QUESTÃO. 98
- FIGURA 32 – A) DIFRATOGRAMAS DE RAIOS-X DAS AMOSTRAS DE BAGAÇO: CONTROLE, COM PRÉ-TRATAMENTO ÁCIDO E PRÉ-TRATADA COM ÁCIDO MAIS A ETAPA COM 4% NaOH, COM A DECONVOLUÇÃO POR CINCO GAUSSIANAS, SENDO QUE QUATRO SÃO REFERENTES A CELULOSE CRISTALINA (101, $10\bar{1}$, 002, 040) E UMA REFERENTE FRAÇÃO AMORFA DA AMOSTRA (CELULOSE AMORFA, HEMICELULOSE E LIGNINA). B) VALORES DE ÍNDICE DE CRISTALINIDADE OBTIDOS POR XRD COM O MÉTODO DE DECONVOLUÇÃO PARA AS AMOSTRAS DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR. 101
- FIGURA 33 – A) DIFRATOGRAMAS DE RAIOS-X DAS AMOSTRAS DE BAGAÇO: CONTROLE, COM PRÉ-TRATAMENTO ÁCIDO E PRÉ-TRATADA COM ÁCIDO MAIS A ETAPA COM 4% NaOH, COM AS SETAS INDICANDO ONDE É REALIZADO O MÉTODO DE OBTENÇÃO DO CI PELA SUBTRAÇÃO DAS INTENSIDADES DO PICO EM (002) PELO AMORFO. B) VALORES DE ÍNDICE DE CRISTALINIDADE OBTIDOS POR XRD COM O MÉTODO DA RAZÃO ENTRE INTENSIDADES PARA AS AMOSTRAS DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR. 104
- FIGURA 34 – COMPARAÇÃO DOS ESPECTROS QUANTITATIVOS MULTI¹³C OBTIDOS PARA AS AMOSTRAS DE BAGAÇO DURANTE O PRÉ-TRATAMENTO ÁCIDO/ALCALINO (LINHA CONTINUA PRETA) COM OS ESPECTROS QUE PASSARAM PELO TRATAMENTO ENZIMÁTICO (LINHA TRACEJADA VERMELHA). ESSES ESPECTROS FORAM NORMALIZADOS PELO PICO EM 56,2 ppm (GRUPOS OCH₃) REFERENTE AO PICO MAIS INTENSO DA LIGNINA CONSIDERANDO QUE A QUANTIDADE DE LIGNINA NÃO VARIOU APÓS O TRATAMENTO ENZIMÁTICO. ASSIM CONSEGUIMOS OBTER UMA ESTIMATIVA DA QUANTIDADE DE CELULOSE CONSUMIDA COM O TRATAMENTO ENZIMÁTICO QUE ESTÁ POSTO EM GRÁFICO NA PARTE SUPERIOR DA FIGURA. 105
- FIGURA 35 – A) ESPECTROS QUANTITATIVOS MULTI¹³C FOCADOS NA REGIÃO ESPECTRAL ENTRE 80 - 94 ppm COM AS RESPECTIVAS DECONVOLUÇÃO POR DUAS GAUSSIANAS PARA AS AMOSTRAS QUE PASSARAM PELO TRATAMENTO ENZIMÁTICO APÓS O PRÉ-TRATADAS COM ÁCIDO SULFÚRICO E ÁCIDO MAIS 4% NaOH. B) VALORES DOS ÍNDICES DE CRISTALINIDADE OBTIDO POR SSNMR ATRAVÉS DE DECONVOLUÇÃO POR DUAS GAUSSIANAS PARA AS AMOSTRAS DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR APÓS O TRATAMENTO ENZIMÁTICO. 107

FIGURA 36–A) UNIDADE REPETITIVAS NA CELULOSE E HEMICELULOSES B) ESBOÇO DAS ESTRUTURAS: DA CELULOSE, XILANO, XILOGLUCANO E PECTINA C) POSSÍVEIS CONFORMAÇÕES ASSUMIDAS PELO XILANO QUANDO INTERAGENTE E NÃO INTERAGE COM A CELULOSE.	110
FIGURA 37 – ESPECTROS DE RMN UNIDIMENSIONAIS 1D SOB ROTAÇÃO DAS AMOSTRAS (WT E <i>IRX3</i>) EM TORNO DO ÂNGULO MÁGICO UTILIZANDO EXCITAÇÃO POR: A) POLARIZAÇÃO CRUZADA (CP) COM TEMPO DE CONTATO IGUAL A 1 MS B) POLARIZAÇÃO DIRETA (DP) COM TEMPO DE CICLAGEM ENTRE EXPERIMENTO IGUAL A 2 S C) POLARIZAÇÃO DIRETA (DP) COM TEMPO DE CICLAGEM ENTRE EXPERIMENTO IGUAL A 20 S.	113
FIGURA 38 – ESPECTROS DE SSNMR MULTIDIMENSIONAIS CP-J-INADEQUATE NA AMOSTRA DE <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i> EM NATURA (WT) A) ESPECTRO COMPLETO COM TEMPO DE MISTURA 0,6 MS COM LINHAS QUE MOSTRAM AS DUAS FORMAS DO XILANO B) ZOOM NA REGIÃO DOS CARBONOS 5 E 6 COM TEMPO DE CONTATO DE 1,1 MS C) ZOOM NA REGIÃO DOS CARBONOS 5 E 6 COM TEMPO DE CONTATO DE 2,2 MS.	115
FIGURA 39 – ESPECTROS DE SSNMR MULTIDIMENSIONAIS 2D CP-PDSD NA AMOSTRA DE <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i> EM NATURA (WT) COM TEMPO DE MISTURA IGUAL: A) 50 MS, MOSTRANDO INTERAÇÕES DE PROXIMIDADE INTRAMOLECULAR E B) 1 S MOSTRANDO INTERAÇÕES DE PROXIMIDADE INTRA E INTERMOLECULAR.	117
FIGURA 40 – ESPECTROS DE SSNMR MULTIDIMENSIONAIS 2D CP-J-INADEQUATE NAS AMOSTRAS DE <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i> IN NATURA (WT) (EM AZUL) E MUTANTE COM DEFICIÊNCIA EM CELULOSE NA PAREDE CELULAR SECUNDÁRIA <i>IRX3</i> (EM VERDE). ADICIONAL A FIGURA É MOSTRADO A FATIA EM AMBAS AS AMOSTRAS EM 146,8 PPM DE DUPLO-QUANTUM, DE MODO A EVIDENCIAR OS SINAIS DO XILANO DOMÍNIO 1.	119
FIGURA 41 – ESPECTROS DE SSNMR MULTIDIMENSIONAIS 2D DP-J-INADEQUATE NAS AMOSTRAS DE <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i> EM NATURA (WT), ESPECTRO NA COR AZUL, E MUTANTE COM DEFICIÊNCIA EM CELULOSE NA PAREDE CELULAR SECUNDÁRIA <i>IRX3</i> , ESPECTRO NA COR VERDE.....	121
FIGURA 42 – ESPECTROS DE SSNMR 2D CP-DP(2 s e 20 s)-DIPSHIFT NAS AMOSTRAS DE <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i> EM NATURA (WT) E MUTANTE COM DEFICIÊNCIA EM CELULOSE NA PAREDE CELULAR SECUNDÁRIA <i>IRX3</i>	123
FIGURA 43 – CURVAS DIPSHIFT COM SIMULAÇÃO DE MODO A OBTER O PARÂMETRO DE ORDEM PARA CADA DESLOCAMENTO QUÍMICO DOS POLISSACARÍDEOS PRESENTES NA PAREDE CELULAR SECUNDARIAS DAS PLANTAS DE <i>ARABIDOPSIS</i>	124
FIGURA 44– PARÂMETRO DE ORDEM OBTIDOS POR SSNMR 2D DPSHIFT NAS AMOSTRAS DE <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i> EM NATURA (WT) E NO MUTANTE <i>IRX3</i>	125

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	27
2.1 BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA	27
2.2 DIFRAÇÃO DE RAIOS-X (XRD).....	29
2.3 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DO ESTADO SÓLIDO SSNMR.....	33
2.4 TÉCNICAS DE SSNMR	41
2.4.1 Rotação da amostra em torno do ângulo mágico (MAS)	41
2.4.2 Desacoplamento da interação dipolar	44
2.4.3 Métodos de edição espectral	46
2.4.4 Polarização cruzada (CP).....	46
2.4.5 Espectros quantitativos de RMN	49
2.4.6 Polarização Cruzada em Múltiplas Etapas (MultiCP).....	50
2.4.7 RMN bidimensional.....	53
2.4.9 J-INADEQUATE ^{13}C - ^{13}C 2D.....	55
2.4.10 Proton Driven Spin Diffusion com filtro t_1 (t_1 -PDSD).....	57
2.4.11 DIPSHIFT	58
3 METODOLOGIA	63
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES	73
4.1 ESTUDO DOS EFEITOS DOS PRÉ-TRATAMENTOS NA COMPOSIÇÃO DE BIOMASSAS LIGNOCELULÓSICAS.....	73
4.2 ANÁLISE DO ÍNDICE DE CRISTALINIDADE DA CELULOSE EM BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR UTILIZANDO TÉCNICAS DE SSNMR QUANTITATIVA.....	85
4.3 PROPRIEDADES MORFOLÓGICA, ESTRUTURAL E DINÂMICAS EM PLANTAS ENRIQUECIDA COM ^{13}C UTILIZANDO TÉCNICAS DE SSNMR MULTIDIMENSIONAIS	108
5 CONCLUSÃO	127
REFERÊNCIAS	131

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é conhecido mundialmente pela sua capacidade em geração de energia utilizando fontes renováveis e consequentes programas para substituição dos combustíveis fósseis por alternativas mais limpas e renováveis, além de ser o segundo maior produtor mundial de etanol, atrás apenas dos Estados Unidos, isso se deve principalmente por apresentar uma vasta área agrícola, uma densa rede hidrográfica e clima predominantemente tropical. Contudo o Brasil tem um imenso potencial para produção e exportação de biocombustíveis, e dada a necessidade de expansão da produção de etanol devido ao crescimento econômico, a utilização do etanol de segunda geração pode evitar o comprometimento de novas áreas de floresta e a concorrência com a produção de alimentos.

O processo de produção do etanol a partir da sacarose presente no caldo da cana-de-açúcar, maior fonte de etanol brasileiro, mostra-se extremamente vantajoso quando comparado ao etanol derivado do milho produzido nos Estados Unidos, pois através do caldo da cana-de-açúcar é possível produzir mais etanol por uma mesma quantidade de área de plantio (valores que podem ser até três vezes superior), além dos açúcares presentes no caldo da cana-de-açúcar serem menores e facilmente fermentescíveis. No entanto uma melhor utilização da energia presente nas biomassas lignocelulósicas podem levar a uma maior sustentabilidade na cadeia produtiva aumentando significativamente a produtividade. Esse aumento pode ser alcançado através da utilização dos polissacarídeos estruturais presentes na parede celular das plantas, como, por exemplo, no bagaço e palha da cana-de-açúcar, resíduos da primeira geração de etanol. Os principais polissacarídeos constituintes da parede celular são a hemicelulose e a celulose que se encontram imersos numa matriz de lignina. A lignina é um composto aromático que confere resistência à estrutura da planta, dificultando o acesso e ataque enzimático a esses polissacarídeos estruturais. Assim, quanto maior o esforço em degradar a biomassa, maior a sua recalcitrância, ou seja, mais difícil é fracionar a parede celular em açúcares fermentescíveis.¹⁻⁵

A conversão de biomassa lignocelulósica para açúcares fermentescíveis representa um desafio técnico e econômico. Seu sucesso depende fortemente do efeito das técnicas empregadas nos pré-tratamentos e do menor custo do processo de hidrólise enzimática. Esses pré-tratamentos são essenciais para diminuir a recalcitrância das biomassas em questão, facilitando assim a hidrólise enzimática e gerando açúcares fermentescíveis, preferencialmente, sem formação de inibidores do processo de obtenção do bioetanol.⁶⁻¹⁰

O processo de produção de etanol a partir desses polissacarídeos estruturais presentes na parede celular das plantas, também chamado etanol segunda geração, tem como princípio a hidrólise das cadeias de celulose para liberação de açúcares simples que são facilmente fermentados, assim como a sacarose. Para que ocorra a hidrólise da celulose, os constituintes da parede celular das plantas devem ser fracionados e, para isso, a biomassa é submetida a processos de pré-tratamento. Esta etapa tem como principal objetivo o enriquecimento da fração de celulose através da remoção da hemicelulose e da lignina, diminuindo, assim, a recalcitrância dessa biomassa e aumentando a sua susceptibilidade ao ataque enzimático.

Os processos de pré-tratamento podem ser classificados em: químicos (com a utilização de ácidos, bases, oxidantes etc.), físicos (submetidos à moagem, explosão de vapor etc.) ou biológicos (utilizando fungos lignolíticos, por exemplo), sendo que a combinação de mais de um desses pré-tratamentos é também muito comum. Como as porcentagens dos constituintes principais das biomassas lignocelulósicas podem variar bastante (celulose 35-50%; hemicelulose 20-35% e lignina 10-25%), dependendo do tipo (por exemplo, lenhosas ou herbáceas), da espécie ou da região, não existe um único pré-tratamento eficientemente estabelecido.¹¹⁻¹³

Diferentes métodos de pré-tratamentos podem apresentar um mecanismo semelhante de atuação de modo a aumentar a eficiência em geração de açúcares fermentescíveis.³⁹ Adicionalmente, os diferentes pré-tratamentos adotados podem diminuir o grau de polimerização em biomassa, remover seletivamente hemicelulose e lignina da matriz de biomassas bem como aumentar a acessibilidade ao ataque enzimático.⁵ Para uma estratégia de pré-tratamento ser considerada eficiente, ela tem que minimizar ao máximo a degradação dos carboidratos e a produção de inibidores enzimáticos.⁴¹⁻⁴². Pensando nisso, várias estratégias de

pré-tratamento podem ser empregadas em biomassas, sendo classificados de pré-tratamentos físicos,^{18-19,43-44} físicos-químicos,⁴⁵⁻⁵¹ e biológicos que fazem utilização de bactérias e fungos.⁵²⁻⁵³ No entanto, o tratamento ideal deve garantir uma alta eficiência hidrolítica, a recuperação da fração hemicelulósica, recuperação de uma lignina de alto valor agregado, não levar a formação de inibidores devido à degradação dos açúcares, apresentar uma baixa demanda energética e ser de baixo custo.¹⁻⁵

Após a etapa de pré-tratamento, a biomassa, rica em celulose, deve ser submetida a uma etapa de hidrólise que pode ser ácida ou enzimática. A hidrólise ácida, utilizada inicialmente, vem sendo promissora substituída por enzimas chamadas celulasas. Entre as principais vantagens da hidrólise enzimática, pode-se citar as condições de reação mais severas - sem a necessidade de equipamentos resistentes à corrosão - devido a não utilização de ácidos e a não geração de resíduos tóxicos. Além disso, por utilizar enzimas altamente específicas, esse tipo de hidrólise pode atingir taxas de conversão da celulose próximas de 100%, uma vez que não ocorre a degradação da mesma e, conseqüentemente, a formação de inibidores para etapa de fermentação. A principal desvantagem da hidrólise enzimática é associada ao alto custo das enzimas. Entretanto, com o grande número de estudos para aumentar a capacidade dos microrganismos produtores, bem como elevar a eficiência hidrolítica, os custos dessa etapa vem sendo reduzidos.

A hidrólise enzimática, também chamada sacarificação, ocorre através da ação conjunta de três grupos principais de enzimas: exoglucanases, endoglucanases e beta-glucosidases. As exoglucanases atuam nas extremidades das cadeias de celulose, liberando celobiose (dissacarídeo formado por duas moléculas de glucose); já as endoglucanases atuam randomicamente ao longo da cadeia, liberando oligossacarídeos maiores, com novas extremidades para ação do primeiro grupo de enzimas; por fim, a completa hidrólise da celulose é realizada pelas beta-glucosidases, que hidrolisam as moléculas de celobiose (produto da hidrólise incompleta da celulose), disponibilizando duas moléculas de glucose passíveis de serem fermentadas.

Os principais obstáculos para a produção do etanol de segunda geração se encontram na etapa de pré-tratamento e hidrólise enzimática, em que estão intimamente ligados. Uma

vez que os custos da produção de celulasas vêm sendo significativamente reduzidos e a eficiência das enzimas aumentada, o pré-tratamento e a consequentemente obtenção de biomassas fermentescíveis passam a ser a maior dificuldade de todo esse processo. Outro motivo que dificulta a obtenção do bioetanol está associado ao fator de recalcitrância das biomassas; e um melhor entendimento a nível molecular da estrutura (arquitetura) da parede celular em material lignocelulósico levaria a melhores formas de desconstrução da mesma.

A fim de compreender a estrutura da parede celular, os efeitos dos pré-tratamentos e a eficiência da hidrólise enzimática, várias técnicas físicas vêm sendo estabelecidas para caracterização dessas biomassas antes e após os tratamentos. Entre as principais características do material lignocelulósico, que influenciam a ação enzimática, estão: composição química (baixo conteúdo de lignina e alta porcentagem de celulose); porosidade (garante o acesso das enzimas às fibras de celulose) e cristalinidade. Nesse sentido, uma técnica capaz de avaliar todas essas características do material, de forma eficiente, é a ressonância magnética nuclear do estado sólido (SSNMR), tema que é bem discutido em trabalhos representado pelas referências.¹⁻⁵ Essa técnica pode ser empregada em plantas nunca secas ou até mesmo bagaço de plantas como, por exemplo, o bagaço de cana-de-açúcar que é sobra do processo de moagem para o etanol de primeira geração, além de ser uma técnica que permite uma abordagem não destrutiva.

Referente ao tema de efeitos dos pré-tratamentos em biomassas lignocelulósicas, vale ressaltar um estudo pioneiro onde o bagaço de cana-de-açúcar foi inicialmente submetido a uma etapa com ácido sulfúrico, com intuito de remover hemicelulose. Posteriormente remover a lignina com a utilização de uma segunda etapa alcalina com NaOH em concentrações crescentes.⁵ Com isso, mostrou-se que após esses pré-tratamentos em duas etapas a eficiência do coquetel enzimático chegou a 97%. Nesse estudo foram utilizadas técnicas de SSNMR padrões e outras com edição espectral capaz de fornecer importantes informações a respeito da morfologia e composição química em cada etapa do tratamento empregado. As conclusões desse trabalho⁵ mostraram que a dupla etapa de pré-tratamento (ácido/alcalino) foram muito eficientes na remoção e separação das frações de lignina (~85%) e hemicelulose (~95%), além de obter uma fração final rica em celulose que apresentou uma alta eficiência hidrolítica em

comparação a amostra in natura (sem tratamento). Essa melhora é devida principalmente à remoção da lignina, pois possibilitou a perda de coesão entre as paredes celulares adjacentes, além de aumentar consideravelmente a porosidade das amostras, o que facilita a inserção da enzima ao ataque da celulose.⁵

Esse trabalho citado anteriormente foi uma referência inicial para os estudos realizados durante o doutoramento. Assim, seguindo esse mesmo raciocínio, foi possível estender o estudo de efeito causados por pré-tratamentos em diversas biomassas com uma metodologia semelhante utilizando SSNMR e outras técnicas espectroscópicas. No entanto, a SSNMR, além de proporcionar informação a respeito de modificações da composição química que ocorrem nas biomassas após pré-tratamentos, pode também fornecer informações valiosas a respeito da estrutura e morfologia da parede celular, tanto características intrínsecas das plantas ou características modificadas pelos pré-tratamentos. E para uma completa caracterização é necessário a utilização de novas metodologias de SSNMR com edição espectral e amostras desenvolvidas especialmente para análise por SSNMR multidimensionais. Assim a segunda parte desta tese tende a tratar com novas metodologias de SSNMR, propriedades estruturais da parede celular de plantas, mostrando as vantagens de se utilizar SSNMR na caracterização de biomassas lignocelulósicas.

O objetivo principal desta tese é a caracterização química e estrutural de materiais lignocelulósicos por novas metodologias de SSNMR, melhorando assim o entendimento de quais são as propriedades que influenciam a recalcitrância da parede celular de plantas, de modo a fornecer ferramentas para a construção de processos mais eficientes na produção do etanol de segunda geração. No entanto a dificuldade principal desse estudo está no entendimento detalhado da complexa estrutura de materiais lignocelulósicos.¹⁴ E para facilitar a discussão nesta tese, os resultados foram divididos em três partes: a primeira foi realizada uma caracterização química de diversas biomassas lignocelulósicas após pré-tratamentos; segunda parte foi criada uma metodologia com intuito de sondar seletivamente o índice de cristalinidade da celulose em biomassas de cana-de-açúcar submetidas a pré-tratamentos em duas etapas (ácida e básica) e a hidrólise enzimática, além de proporcionar uma sondagem quantitativa de quais componentes da parede celular é removida em cada etapa do tratamento;

e a última parte foi uma análise em *Arabidopsis thaliana* com parede celular secundária enriquecidas com ^{13}C utilizando técnicas de SSNMR multidimensionais de modo a obter informação sobre a estrutura, a interação entre os constituintes da parede celular e a mobilidade.

A tese foi organizada em cinco (5) capítulos, sendo o primeiro este introdutório, que propõe uma apresentação do que será desdobrado nos próximos capítulos. O segundo trata de uma revisão bibliográfica acerca das técnicas utilizadas neste trabalho, ou seja, destinadas à caracterização de biomassas. O terceiro capítulo é a metodologia empregada nesta tese, parte importante para tornar as técnicas aqui utilizadas possíveis de serem reproduzidas. O quarto capítulo voltado aos resultados obtidos com essas técnicas na caracterização de biomassas lignocelulósicas de interesse nacional para a cadeia produtiva do bioetanol. E o quinto e último capítulo, destinado à conclusão geral da tese.

2 REVISÃO DA LITERATURA

Neste capítulo apresentaremos, de forma concisa, o material estudado e alguns dos atributos descritivos gerais das técnicas de caracterização utilizadas neste trabalho. Ressaltamos que não é nosso objetivo fazer uma descrição aprofundada dos tópicos apresentados, mas fornecer algumas informações e conceitos necessários para o entendimento das análises realizadas e que serão apresentadas nos próximos capítulos.

2.1 Biomassa lignocelulósica

O uso de bioetanol para produção de biocombustível cresceu em todo o mundo devido a questões ambientais e econômicas. Ultimamente, o etanol é utilizado em vários países para reduzir a poluição emitida pelos automóveis e aliviar a importação do combustível derivado do petróleo.¹² A biomassa lignocelulósica é um material de origem vegetal que possui alto potencial energético, podendo ser empregada em diversas áreas, como, por exemplo, na criação de ração para animais agropecuários, queima para geração direta de calor ou criação de biocombustíveis.

Apesar do etanol ser usualmente obtido pela fermentação dos açúcares do caldo de cana-de-açúcar, esse processo ainda não é muito eficiente, pois ele gera muito resíduo, como por exemplo, o bagaço gerado resultante do processo de obtenção de etanol pela cana-de-açúcar é em torno de 25 a 30 toneladas para cada 100 toneladas de cana-de-açúcar ou 10 toneladas de açúcar.¹⁵ A matriz de ligno(hemi)celulose presente nas biomassas é fonte de muita energia, que pode ser muito bem empregada. Como, por exemplo, o bagaço de cana-de-açúcar pode ser queimado para obtenção de calor que é utilizado no processo de aquecimento das caldeiras na obtenção de bioetanol, e o calor excedente pode gerar energia elétrica que pode ser comercializada. No entanto, biorefinarias do futuro próximo podem utilizar toda a planta de cana-de-açúcar ou outra biomassa lignocelulósica, para produção de energia (combustíveis líquidos e sólidos), açúcar e possivelmente uma larga variedade de produtos químicos.¹³

A organização estrutural da parede celular de biomassa é composta por três camadas principais: primeiramente e mais externa à lamela média, uma fina camada que mantém as células coesas e o tecido vegetal íntegro; a parede celular primária, depositada após a lamela média, sendo de grande importância para o acúmulo e controle do crescimento celular, e; por último e mais interna, a parede celular secundária responsável principalmente pela resistência mecânica da parede celular (Figura 1). A respeito da composição química da parede celular, ela é basicamente composta por carboidratos (celulose e hemicelulose), lignina e outros materiais em menor proporção como, por exemplo ácidos graxos, amido, proteínas e outros contaminantes não identificados (CNI). Dependendo da espécie e região, a proporção dos três principais componentes da planta (celulose, hemicelulose e lignina) varia consideravelmente. Sendo, em geral: 35-50% de celulose, 20-35% de hemicelulose e 10-25% de lignina.¹⁴

Figura 1 – Esboço das estruturas da parede celular vegetal.
Fonte: Adaptada de RAVEN¹⁴

A celulose (Figura 2a) é o mais abundante polímero natural, sendo constantemente renovada pelo processo de fotossíntese. A celulose é quimicamente um polímero linear simples formado por anéis de β -D-glicopirranose unidos por ligações do tipo β -1,4 carbono-carbono e por ligações de hidrogênio, entre as unidades de glicose, intra- e intermoleculares. As orientações das ligações, assim como a quantidade de ligações de hidrogênio presentes nas moléculas de celulose, vão definir sua forma: amorfa ou cristalina.

O termo hemicelulose é um termo coletivo que representa uma família de polissacarídeos, como glucomananas, arabinoxilanas, galactanas, entre outros. O tipo mais comum encontrado na fração hemicelulósica são as xilanas, Figura 2a. Um fator importante a se observar é a semelhança entre a celulose e o xilano - tipo mais comum de hemicelulose - causando, em ressonância magnética nuclear, sinais no espectro sobrepostos responsável por grandes esforços experimentais para tentar separar os sinais desses dois componentes nos espectros de biomassa. No entanto, a estrutura da hemicelulose, diferentemente da celulose, ela não apresenta cristalinidade, principalmente, devido às ramificações e a presença de grupos acetil conectados a cadeia principal. A lignina é uma macromolécula complexa formada por unidades de fenilpropano, cujos os principais precursores são: álcool cumarílico, coniferílico e o sinapílico, Figura 2b. Esses são incorporados pela lignina sob a forma de fenilpropanoides p-hidroxifenil (H), guaiacil (L), e siringil (S), respectivamente.

Figura 2 – Esboço das estruturas: a) celulose e hemicelulose b) dos alcoóis precursores das ligninas.

Fonte: Elaborada pelo autor

2.2 Difração de Raios-X (XRD)

Difração de raios-X é a interferência provocada por um objeto na trajetória do feixe de radiação eletromagnética na faixa dos raios-X e que as distâncias intra(inter)moleculares possuem dimensões comparáveis com os comprimentos de onda da radiação utilizada. A

XRD é, atualmente, uma técnica poderosíssima para determinação das estruturas.¹⁶⁻¹⁸ Os raios-X são radiações eletromagnéticas com comprimento de onda (λ) da ordem de 10^{-10} m que podem ser gerados, por exemplo, por elétrons de alta energia bombardeados em um metal resfriado. Esses elétrons são desacelerados ao penetrarem no metal e geram radiação num intervalo contínuo de frequência da ordem dos raios-X. Dependendo do material utilizado, superposto a esse espectro contínuo, pode aparecer alguns máximos estreitos de elevada intensidade que provêm das colisões dos elétrons do feixe com os elétrons das camadas internas dos átomos.¹⁰ Quando a colisão é forte o suficiente para arrancar um elétron da camada interna, outro elétron do átomo, de energia mais elevada, ocupa a vacância e emite o excesso em forma de fóton com energia de raios-X e a radiação emitida por este átomo recebe o nome da camada onde o elétron foi arrancado.¹⁶⁻¹⁸

Outra forma de geração de feixes de raios-X, utilizada ultimamente, é a partir de fontes de luz síncrotron, gerada no anel de aceleração de um síncrotron onde em virtude da aceleração centrípeta de um feixe de elétrons acelerados, a radiação eletromagnética é emitida em uma região com ampla faixa de frequência incluindo o infravermelho e os raios-X é constantemente criada. Essa radiação síncrotron é muito intensa com energia da ordem de 6 a 12 keV (Laboratório Nacional de Luz Síncrotron - LNLS), aumentando a sensibilidade da técnica, porém necessita de um imenso espaço territorial, além de ter custo de instalação e manutenção elevados.¹⁶⁻¹⁸

Em materiais cristalinos, periódicos que apresentam planos paralelos igualmente espalhados a uma distância de feixe monocromático, a condição para que haja interferências construtivas e destrutivas é visualizável através da lei de Bragg:

$$n\lambda = 2d\sin\theta \quad (1)$$

Onde n corresponde à ordem de difração, λ ao comprimento de onda da radiação incidente, d corresponde ao espaço entre planos do cristal e θ ao ângulo de difração. De acordo com a Figura 3, feixes monocromáticos incidem sobre o plano do cristal gerando linhas de interferências construtivas e destrutivas, sendo caracterizadas pela diferença de

caminho ótico entre essas linhas que depende da diferença de caminho óptico $n\lambda$ traçado pela luz, Lei de Bragg.¹⁶⁻¹⁸

Figura 3-Representação de uma difração de raios-X em um cristal periódico.
Fonte: Adaptada de BERNARDINELLI¹⁷

Até agora tratamos apenas de cristais periódicos, porém, em um sistema polimérico complexo como o caso de biomassas lignocelulósicas, isso se torna bem mais complicado, pois como essas biomassas não apresentam uma estrutura periódica bem definida e possuem alternâncias aleatórias de fase organizada e desorganizada, os difratogramas de raios-X terão existência de anéis largos (halos), anéis concêntricos e arcos de difração tornando possível associá-los com distâncias intermoleculares menos organizadas ou mais organizadas, Figura 4a.

Figura 4- Representação do difratograma de raios x para uma amostra de bagaço de cana-de-açúcar utilizando dois métodos para obter o índice de cristalinidade (CI) a) padrão dos difratogramas de raios-X para a biomassa b) método de deconvolução e c) método da razão entre intensidades de picos.

Fonte: Elaborada pelo autor

O índice de cristalinidade (CI) do material pode ser obtido de maneira bastante confiável por XRD ^{19, 20} utilizando o método por deconvolução de picos, Figura 4b. Nesse método utilizam-se Gaussianas de diferentes larguras para deconvoluir o padrão de XRD e diferenciar a fração cristalina da amorfa. Para amostras de biomassa lignocelulósica, em que a celulose é responsável pelas difrações cristalinas, quatro gaussianas são utilizadas para ajustar a curva de celulose cristalina (reflexões 101, 101̄, 002, 040) e uma Gaussiana é usada para fração amorfa da biomassa (celulose amorfa, hemicelulose e lignina). O índice de cristalinidade (CI) é calculado a partir da razão entre a área de todos os picos cristalinos e a área total.

Outro método de análise dos resultados CI por XRD, conhecido como método de comparação de intensidades dos picos Figura 4c, também pode ser utilizado para obter o CI

em biomassas. Esse método é o mais empregado em biomassas e se baseia na comparação direta da intensidade do pico cristalino em I_{002} , sendo esse pico corrigido pela intensidade da região referente a região amorfa ($I_{002}-I_{AM}$), após a subtração de fundo com recipiente de amostra vazio, ou seja, dado pela formula $CI=((I_{002}-I_{AM})/I_{002})$.^{19, 20} Nesta análise, embora seja a mais empregada na literatura, fica evidente que a fase cristalina é superestimada, uma vez que a largura do pico 002 é consideravelmente maior que a do pico amorfo.¹⁹⁻²⁰ No entanto, os valores de índice de cristalinidade fornecem apenas uma estimativa relativa da cristalinidade, sendo útil apenas na comparação de qual amostra é mais cristalina em comparação a outra. Vale a pena lembrar que os valores CI obtidos por ambos os métodos de XRD referem-se a amostra por completo, ou seja, a região amorfa observada em XRD não faz distinção entre os compostos (celulose amorfa, hemicelulose e lignina). Portanto, se ocorrer remoção de lignina ou hemicelulose da amostra o CI tende a aumentar devido a uma redução proporcional a remoção no halo amorfo do difratograma.

2.3 Ressonância Magnética Nuclear do estado sólido SSNMR

A Ressonância Magnética Nuclear (RMN), assim como todas as formas de espectroscopia, se baseia na da interação da radiação eletromagnética com a matéria. Aquié utilizado uma onda eletromagnética na faixa de radiofrequência (RF) que interage com o momento magnético dos núcleos atômicos na presença de um campo magnético externo possibilitando o estudo da matéria via uma combinação de pulsos de RF. Como é sabido, o núcleo atômico é formado por prótons e nêutrons, partículas que possuem momento angular tanto orbital como de spin. Associado a esses momentos angulares, existem momentos magnéticos, de modo que um núcleo possui um momento angular total ($\mathbf{J}$) ao qual está associado um momento magnético ($\boldsymbol{\mu}$), que são relacionados por $\vec{\mu} = \gamma \vec{J}$, sendo γ o fator magnetogírico, que é uma constante com um valor característico para cada tipo distinto de núcleo. Na presença de um campo magnético uniforme $\vec{B}$, os momentos magnéticos nucleares interagem com esse campo e devido ao efeito Zeeman Nuclear ocorre um desdobramento de energia.¹⁷

Adotando a direção do campo magnético como $\hat{z}$, $\vec{B} = B_o \hat{z}$, a energia de interação do momento magnético com o campo é dada por $E = -\mu_z B_o$, onde a quantização da componente z do momento magnético é expressa matematicamente como $\mu_z = m\hbar\gamma$. Com $m = -I$ a I em passos semi-inteiros, sendo I o valor do spin nuclear $I = J/\hbar$, ou seja, os níveis de energia são restritos devido aos valores de I , havendo $(2I+1)$ níveis. Portanto, a diferença de energia entre os dois níveis sucessivos é $\Delta E = \hbar\gamma B_o$, sendo $\gamma B_o = \omega_o$ chamada de frequência de Larmor.^{17,21}

Como a maioria dos núcleos tem γ da ordem de MHz/Tesla, em campos magnéticos da ordem de Tesla as frequências de transição são da ordem de MHz, ou seja, na faixa de ondas de rádio. Assim, RMN é um fenômeno de baixa energia conferindo a facilidade de manipulação na forma das excitações fazendo com que exista uma enorme variedade de sequências de pulso para RMN (mais de mil métodos), que são aplicados em diversas áreas do conhecimento.¹⁷

O momento magnético total de uma amostra constituída por núcleos é denominada de magnetização nuclear, sendo dada por $\vec{M} = \sum_i \vec{\mu}_i$. Numa amostra diamagnética macroscópica há núcleos magnéticos que na ausência de campo magnético tem seus momentos magnéticos orientados aleatoriamente, assim, na ausência de um campo magnético externo, não existe uma orientação privilegiada, todas as orientações são possíveis com igual probabilidade para os momentos magnéticos dos núcleos fazendo com que a magnetização total da amostra seja nula. A aplicação de um campo magnético $\vec{B} = B_o \hat{z}$ e o fato do sistema de spins estar em equilíbrio térmico a uma temperatura T , faz com que a ocupação dos estado de energia Zeeman (diferentes orientações dos momentos magnéticos em relação a $\vec{B}$) seja definida pelo campo magnético aplicado e pela temperatura.

Um fenômeno importante na ressonância magnética nuclear é a relaxação de spins, causado por flutuações de campos magnéticos devido a modulações temporais das interações magnéticas. Para cada um dos tipos de relaxação existe um tempo característico (T_1 , T_2) e esses são sensíveis a processos dinâmicos, tornando assim possível o estudo da mobilidade por sondagem desses tempos de relaxação.

A condição de equilíbrio da magnetização ($\vec{M} = M_0 \hat{z}$) na componente longitudinal, supõe transferência de energia do sistema de spins para o meio, exclusivamente devido aos campos magnéticos locais flutuantes produzido pela rede (vizinhança) oriunda da agitação térmica do sistema. Essa relaxação é conhecida como relaxação longitudinal ou relaxação spin-rede e está associada a recuperação da distribuição de Boltzmann, após a amostra ser inserida em uma região de campo magnético externo ou após a retirada da magnetização de equilíbrio por um pulso de RF. A rede produz campos magnéticos locais flutuantes, transversais ao campo externo aplicado, que segundo a regra de ouro de Fermi, produzirão transições entre os níveis de energia que dependem da frequência de Larmor, sendo maior taxa de transição para frequências próximas a frequência de Larmor. A rede é importante nesse processo de relaxação pois a probabilidade de transição espontânea é praticamente nula nestes sistemas, uma vez que as frequências de RMN são baixas (região de RF). Esse mesmo processo de relaxação longitudinal ocorre após a amostra ser inserida em uma região de campo magnético externo ou após a magnetização ser retirada do equilíbrio por um pulso de RF, levando um tempo característico de cinco vezes T_1 ($5 T_1$) devido a relação $M_z = M_0 \left[1 - \exp \left(-t/T_1 \right) \right]$.

Em uma amostra real não existe somente a frequência de Larmor para spins da mesma espécie. Isso ocorre devido a uma variação de campos magnéticos decorrentes dos campos magnéticos produzidos pelos próprios momentos magnéticos em regiões de campo ligeiramente diferente. Esses momentos magnéticos com frequências ligeiramente diferentes causam um espalhamento dos spins no plano transversal, fazendo com que a magnetização total desapareça ao longo de um tempo. Como o sinal de RMN corresponde a variação do fluxo de campo magnético no plano transversal, o FID (*Free Inductions Decay*) tende a zerar após esse tempo, denominado tempo de Relaxação Transversal (T_2), que é devido a essa relaxação transversal ou relaxação spin-spin, referente a perda de coerência dos diferentes momentos magnéticos no plano transversal. A equação referente ao sinal do FID tem relação com o tempo T_2 e é dada por $M_{x,y} = M_{xy} \cos[\omega_0 t] \exp \left(-t/T_2 \right)$.

Assim após a aplicação do campo magnético, o sistema encontra-se em equilíbrio depois de um tempo T_1 , e a diferença de população é dada pela distribuição de Boltzmann. O

estabelecimento da distribuição de população dos níveis de spin nuclear de acordo com a distribuição de Boltzmann, faz com que a diferença entre as populações de spins nucleares em cada nível cresça com a magnitude do campo magnético externo B_0 e o inverso da temperatura. No caso de spins $\frac{1}{2}$ essa diferença de população é dada por $\frac{N_+}{N_-} = \exp\left\{-\frac{\hbar\gamma B_0}{KT}\right\} \Rightarrow N_- - N_+ \approx \frac{\hbar\gamma B_0}{k_B T} N$, onde N_+ e N_- representam respectivamente a população de spins nuclear no estado anti-paralelo ao campo (nível de maior energia) e paralelo ao campo (nível de menor energia) e N o número total de spins na amostra. Essa diferença de população é responsável pela magnetização da amostra, ou seja exista uma magnetização total $M_0 = \sum_i \mu_{iz}$ na direção do campo magnético, que é proporcional a diferença de população $N_- - N_+ \approx \frac{\hbar\gamma B_0}{k_B T} N$. Para B_0 da ordem de alguns Teslas, a razão entre a diferença de populações dos níveis Zeeman e o total de núcleos é de aproximadamente 10^{-6} , o que significa que a magnetização total é muito pequena (parte por milhão – ppm).¹⁷

Com a magnetização em equilíbrio devido a aplicação de um campo magnético estático (B_0) e a amostra em equilíbrio térmico, o sistema pode ser perturbado com aplicação de um campo magnético oscilante na faixa da RF próxima a frequência na faixa de RF com energia próxima à separação energética entre os níveis de energia e perpendicular ao campo. Isso porque, somente a componente perpendicular à magnetização pode causar um torque efetivo, ou seja, de forma a obter uma maior eficiência na perturbação do sistema. A partir disso, transições podem ser induzidas entre os níveis de energia, alterando consideravelmente as populações, e conseqüentemente tirando o vetor magnetização do equilíbrio. Com isso, é possível manipular a magnetização da amostra, aplicando pulsos de RF, como ilustrado pela Figura 5a.

Para uma melhor visualização do que ocorre com a magnetização, adota-se um sistema de coordenadas que gira (SG - sistema girante) com frequência próxima a frequência de Larmor dos spins nucleares. Nesse sistema de coordenadas, a magnetização nuclear executa um movimento de precessão em torno do campo magnético dado pela relação: $\vec{B}_{eff} = (B_0 - \omega/\gamma)\hat{z}$. Assim, se a frequência do sistema de coordenadas girante estiver em ressonância com a de Larmor $\omega = \gamma B_0$, o campo magnético efetivo sentido pela magnetização

no SG será nulo, ou seja, não haverá precessão, com o observador girando com a mesma frequência do vetor de magnetização resultante. Por outro lado, se além do campo B_0 for aplicando também um campo magnético de RF dado por: $\vec{B}_1(t) = B_1 \cos(\omega t) \hat{x}$, esse campo será estático e na direção $\hat{x}$ do SG. Isso significa que o único campo magnético sentido pela magnetização é o campo $\vec{B}_1 = B_1 \hat{x}$ e, portanto, ela irá executar um movimento de precessão em torno desse campo, conforme mostrado na Figura 5b. Se o campo de RF for interrompido depois de um certo instante τ_1 , (pulso de RF) a magnetização é perturbada e novo ângulo da magnetização em relação ao eixo z é dado pela relação: $\theta = \gamma B_1 \tau_1$. Com isso, é possível tirar a magnetização de sua situação de equilíbrio aplicando um pulso de RF. No sistema de coordenadas estático o que acontece é um movimento do tipo espiral esférica, tal como ilustrado pela Figura 5a.¹⁷

Figura 5-a) Esboço do trajetória da magnetização sob um pulso de RF $\pi/2$, visto no referencial estático. b) magnetização sob mesmo pulso de RF visto no sistema de coordenadas girantes.

Fonte: Elaborada pelo autor

Imediatamente após a aplicação de um pulso de RF com um ângulo de deslocamento de $\pi/2$, a magnetização irá girar no plano xy apenas na presença de B_0 , com a frequência de Larmor. Normalmente, em um espectrômetro de RMN, a mesma bobina que é utilizada para aplicar os pulsos de RF é empregada também para a detecção do sinal. O movimento de precessão da magnetização $\vec{M}$ causa uma variação de fluxo de campo magnético no interior da bobina de RF e, segundo a Lei de indução de Faraday, uma força eletromotriz gera corrente elétrica nos terminais da bobina na forma $S(t) = M_0 \cos(\omega t) e^{-t/T_2^*}$, onde o termo de

decaimento se refere a perda de coerência que a magnetização sofre devido as interações de spin nuclear (interações anisotrópicas) e a não homogeneidades do campo. Esse sinal é universalmente denominado FID (*Free Induction Decay*), que significa o decaimento dos sinais dos spins após o pulso de RF, ilustrado na Figura 6a.¹⁷

Normalmente, trabalha-se com amostras cujos núcleos apresentam várias frequências de ressonância, de maneira que os sinais podem se sobrepuser, dificultando a determinação das frequências corretas. Para sanar esse problema, o FID é usualmente representado através de sua Transformada de Fourier (TF) que corresponde à transformação de sinais no domínio do tempo para um gráfico no domínio da frequência com as intensidades de cada frequência proporcional ao número de spins que formaram aquela magnetização resultante, Figura 6b.¹⁷

Figura 6-a) Sinal adquirido pelo receptor. b) Sinal após a Transformada de Fourier.

Fonte: Elaborada pelo autor

Todas as aplicações de RMN para caracterização do estado sólido dependem do comportamento das interações internas que é associada com o acoplamento do spin nuclear, por exemplo, campos magnéticos originados por movimentos orbitais dos elétrons induzidos por um campo magnético estático (interação deslocamento químico – CS) e interação de spins nucleares através de seus momentos de dipolo magnético (interação dipolar – DD).^{17, 21}

Essas interações tem componentes isotrópica e anisotrópicas, podendo ser representadas por tensores em um sistema de eixos principais, ou seja sistema diagonalizado, onde o tensor da interação (Sistema de eixos principais – SEP). Pode ser caracterizado por três valores principais, isto é, R_{xx} , R_{yy} e R_{zz} ou de forma equivalente pelo valor isotrópico $R_{iso} = (R_{xx} + R_{yy} + R_{zz})/3$, que representa o valor médio, da interação, o

parâmetro de anisotropia $\delta = (R_{zz} - R_{iso})/3$, que representa o grau de anisotropia da interação e o parâmetro de assimetria $\eta = (R_{yy} - R_{xx})/\delta$ que representa o desvio da simetria do tensor em relação a simetria axial. Usando propriedades de rotação dessas interações em primeira ordem a contribuição da frequência de SSNMR para cada uma das interações pode ser escrita como:

$$\omega = \omega_{iso} + \omega_{aniso}(\theta, \phi) = \gamma B_0 \left[R_{iso} + \frac{\delta}{2} (3 \cos^2 \theta - 1 + \eta \sin^2 \theta \cos 2\phi) \right] \quad (2)$$

Onde os ângulos θ e ϕ representam os ângulos esféricos que descrevem a orientação do campo magnético $\vec{B}_0$ no SEP do tensor da interação. É interessante notar que como o SEP é fixo em relação a orientação molecular, as frequências de ressonância magnética nuclear em estado sólido (SSNMR) dependem da orientação da molécula. Por exemplo, na interação dipolar entre um núcleo de carbono e um hidrogênio, temos que $R_{iso} = 0$ e $\eta = 0$ (de fato é uma característica da interação dipolar de modo geral) e o valor principal R_{zz} é escolhido de modo a facilitar a resolução como orientado ao longo da direção do vetor internuclear C-H, sendo então o ângulo θ , o ângulo entre o campo magnético $\vec{B}_0$ e o eixo C-H. Isso faz com que a frequência de SSNMR traga informação sobre a orientação dos segmentos moleculares além de ser sensível a mudanças nessas orientações, ou seja, a dinâmica molecular, tais como mobilidade, *melting* ou cristalização. Assim, o cálculo dos parâmetros do tensor R_{iso} , δ e η , bem como as orientações dos ângulos (θ e ϕ), é um dos principais objetivos da espectroscopia de SSNMR. Em princípio, eles podem ser obtidos diretamente pela forma de linha de SSNMR para uma dada interação.

De fato, em amostras policristalinas ou amorfas, mesmo para uma única interação de spin nuclear, os espectros de RMN contém várias frequências, ou seja, os espectros de sólidos são muito alargados na presença das interações anisotrópicas.[†] Note, porém, que em solução - especificamente soluções isotrópicas - a média dos valores anisotrópicos das interações internas é nula devido ao rápido movimento molecular e assim o alargamento não existe e as linhas de RMN tem larguras da ordem de alguns Hz. Em resumo, existem diversos fatores que

[†]Valores típicos são até 10 kHz para a interação de deslocamento químico, até 100 kHz para interação dipolar magnética. Além disso, núcleos situados em moléculas distintas sentem interações internas distintas e os espectros de RMN é uma superposição da contribuição de todas as interações, tornando o alargamento ainda maior.

acarretam mudanças em experimentos de RMN e que dificultam a obtenção dos parâmetros que caracterizam a interação interna dos spins em estado sólido. Assim, para obter informações sobre a características dessas interações sua relação com a estrutura local e dinâmica molecular nos materiais é necessário projetar especificamente o experimento a ser realizado.^{17,21-22}

Particularmente para sólidos orgânicos, como o caso de biomassa lignocelulósica, os núcleos mais importantes são os de hidrogênio, carbono, nitrogênio e fósforo que têm spin 1/2, as duas interações de spin nuclear que dominam os espectros de RMN são a interação de deslocamento químico e a interação dipolar magnética entre núcleos de mesma espécie (homonuclear) ou de espécies diferentes (heteronuclear). Essas interações dipolares magnéticas e deslocamento químico têm frequências de ressonância com dependência anisotrópica que provocam um alargamento do sinal mencionado acima. A SSNMR de alta resolução consiste em obter espectros em que os núcleos em segmentos moleculares diferentes possam ser distinguidos (como em RMN de solução), mas para isso há muitos problemas para serem resolvidos, como o alargamento devido à anisotropia do deslocamento químico e o alargamento devido às interações dipolares heteronucleares tipicamente (^{13}C , ^1H) e dipolares homonucleares entre os hidrogênios.

A interação de deslocamento químico é definida pelas características da nuvem eletrônica ao redor do núcleo. Portanto, é extremamente local e muito sensível a variações na constituição química e na estrutura local das moléculas, já que tanta mudança no caráter como na orientação das ligações químicas afetam a estrutura eletrônica ao redor do núcleo. Nesse mesmo sentido, a interação dipolar heteronuclear tem caráter bastante local já que os campos magnéticos dipolares decaem com $1/r^3$, onde r é a distância internuclear. Para um par carbono hidrogênio, a interação dipolar pode ser desprezar para distâncias maiores que 4 Angstroms, o que é de extrema importância para alguns estudos que serão apresentados a seguir. No caso da interação dipolar homonuclear, embora também varie localmente com $1/r^3$, a situação é mais complicada, devido aos efeitos denominados de multi-spin.

Neste caso, a energia associada a um par de núcleos onde um dos núcleos tem *spins up* e o outro tem *spins down*, isto é, estados do tipo $|\uparrow\downarrow\rangle$ ou $|\downarrow\uparrow\rangle$, é invariante sobre uma troca dos dois spins. Uma vez que no Hamiltoniano na interação dipolar homonuclear existem

termos do tipo $I_1^+ I_2^-$ e $I_1^- I_2^+$ (termos de flip-flop), trocas como $|\uparrow\downarrow\rangle \Rightarrow |\downarrow\uparrow\rangle$ ou $|\downarrow\uparrow\rangle \Rightarrow |\uparrow\downarrow\rangle$ são induzidas pela interação dipolar. Isto faz com que ocorra uma troca de magnetização entre os núcleos. No caso de um sistema de muitos spins acoplados, essa transferência de magnetização entre os vários spins pode ocorrer sucessivamente, fazendo com que a interação dipolar homonuclear tenha um efeito de longo alcance conferindo um caráter não local a interação dipolar homonuclear. Esse fenômeno é denominado difusão de spin e no caso de núcleos de ^1H pode chegar a distância de centenas de nanômetros.²¹

Como será mostrado a seguir, é necessário utilizar uma combinação de várias técnicas para obter espectros de SSNMR de alta resolução que são rotação da amostra em torno do ângulo mágico (do inglês, *magic angle spinning* - MAS), desacoplamento no canal do hidrogênio e polarização cruzada (CP).

2.4 Técnicas de SSNMR

2.4.1 Rotação da amostra em torno do ângulo mágico (MAS)

A primeira técnica a ser mencionada utiliza rotação da amostra em torno do ângulo mágico (MAS) e possibilita reduzir consideravelmente a anisotropia do deslocamento químico e um pouco da interação dipolar em biomassas. Pois, como pode ser visto na equação (2), as interações deslocamento químico anisotrópico e interações dipolares têm dependência geométrica do tipo $(3\cos^2\theta - 1)$, onde θ é o ângulo entre o eixo z do SEP e o campo magnético $\mathbf{B}_0$, que causam um alargamento considerável dos sinais de SSNMR.

Considerando a interação de deslocamento químico com $\eta = 0$ e usualmente representando um eixo principal como um vetor que aponta na direção deste eixo, cuja magnitude representa o valor principal correspondente, como por exemplo, o vetor indicado com σ_{zz} (σ representa os valores principais do tensor de deslocamento químico) na Figura 7, enquanto que o eixo principal do SEP é correspondente ao valor principal R_{zz} . Um espectro de SSNMR na presença da interação deslocamento químico tem a forma de um padrão largo, denominado espectro de pó e que está ilustrado na Figura 8. Como a função $(3\cos^2\theta - 1)$ é

nula para $\theta=54,74^\circ$ (ângulo mágico), então se todos os eixos principais σ_{zz} estivessem orientados neste ângulo em relação a $\vec{B}_0$ a anisotropia da interação dipolar se anularia. Mas como em um sólido não cristalino não é possível orientar simultaneamente todos os vetores internucleares segundo esse ângulo mágico, precisamos em média que todos os vetores da interação fiquem ao longo de uma direção que faz o ângulo mágico com $\vec{B}_0$.^{17,21-23}

Figura 7-Ilustração da rotação macroscópica da amostra em torno do ângulo mágico.
Fonte: Adaptada de BERNARDINELLI¹⁷

Para que isso ocorra uma rápida[‡]rotação macroscópica na amostra em torno de um eixo localizado a um ângulo de $54,74^\circ$ com a direção de $\mathbf{B}_0$ tem que ser causada, como mostrado na Figura 7. Repare na equação (2) que somente as componentes anisotrópicas em média seriam anuladas, restando ainda os valores isotrópicos das interações. Esta técnica é denominada rotação da amostra em torno do ângulo mágico (MAS). De fato, embora aqui foi apenas apresentado uma ideia do procedimento e usado a interação de deslocamento químico

[‡]Para anular ou reduzir consideravelmente as componentes anisotrópicas das interações a frequência de rotação macroscópica da amostra deve ser comparável à largura da banda estática. Essa condição é facilmente satisfeita para a anisotropia dos deslocamentos químicos, cujas anisotropias estão na faixa de até 10 kHz, mais dificilmente, para os acoplamentos dipolares heteronucleares, cujas anisotropias estão na faixa de até 30 kHz, interações dipolares homonucleares, cujas anisotropias estão na faixa de até 100 kHz, ou a interações quadrupolares, que podem ir das dezenas de kHz aos MHz.

e $\eta = 0$, ele é válido também para a interação dipolar magnética ou deslocamento químico com $\eta \neq 0$. A teoria formal da técnica MAS pode ser encontrada em vários livros especializados em RMN de sólidos.²¹⁻²²

Quando a frequência de rotação da amostra ν_r for menor que a largura espectral estática, o sinal isotrópico aparece ladeado de réplicas do sinal, denominados de bandas laterais, as quais são separadas de ν_r . Se ν_r for baixo, as intensidades das bandas laterais continuam a delinear o espectro estático, mas quando ν_r aumenta essas intensidades diminuem rapidamente e as bandas laterais afastam-se da linha central isotrópica, representado na Figura 8. Por isso que conseguimos diferenciar os picos isotrópicos das bandas laterais, pois mudando ν_r as bandas laterais se movimentam enquanto que o pico central isotrópico permanece estacionário.^{17,21}

A fase acumulada na técnica MAS pela magnetização transversal durante seu movimento de precessão quando a amostra é rotacionada sob um ângulo θ , a frequência de RMN adquire uma dependência temporal periódica $\theta(t)$ e $\phi(t)$, com o período igual ao período de rotação, e consequentemente a frequência de deslocamento químico ($\omega_{CS} = \omega_{iso} + \omega_{CSA}(\theta, \phi)$) também tem a mesma periodicidade. Assim a fase acumulada pela magnetização transversal em um tempo t é dado por:

$$\Phi_{CSA}(t) = \int_0^t (\omega_{iso} + \omega_{CSA}(t')) dt' = \omega_{iso} t + \int_0^t \omega_{CSA}(t') dt' \quad (3)$$

Em cada período completo a fase acumulada devido a anisotropia é nula, ou seja, a defasagem acumulada na primeira metade do ciclo desaparece ao fim da segunda metade do ciclo de rotação. Na visão dos spins, se todos os momentos magnéticos dos núcleos estiverem em fase inicialmente eles voltaram a ficar após um período de rotação, ou seja produz-se um eco conhecido como eco rotacional e aparecem a cada período de rotação da amostra t_r . Note que a parte isotrópica da interação de deslocamento químico é independente da orientação e não está sujeita a defasagem, assim é possível definir a fase total acumulada durante um período de rotação como sendo somente a componente isotrópica, pois a componente anisotrópica é anulada. Se a rotação da amostra é baixa de modo que durante a aquisição do sinal vários ecos rotacionais contribuirão para o sinal de RMN no tempo (FID) e após a

transformada de Fourier aparecerão como uma modulação periódica do espectro (bandas laterais). Porém, se a frequência de rotação da amostra for aumentada, os ecos rotacionais apareceram mais juntos no domínio do tempo e, portanto, mais afastados no domínio da frequência, resultando no afastamento das bandas laterais, Figura 8. Para frequências de rotação maiores que a anisotropia da interação as bandas laterais não aparecerão e, portanto, não haverá ecos rotacionais, Figura 8.

2.4.2 Desacoplamento da interação dipolar

Como estudamos neste trabalho biomassas lignocelulósicas que possuem núcleos com spin $\frac{1}{2}$, as interações relevantes são o deslocamento químico e as interações dipolares homonuclear e heteronuclear. No caso específico de amostras pouco abundantes, por exemplo, a abundância natural do ^{13}C é de apenas da ordem de 1%, a interação dipolar homonuclear entre os carbonos podem ser desprezados, restando o deslocamento químico, a interação dipolar heteronuclear $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ e homonuclear entre os hidrogênios. Geralmente, as interações dipolares heteronuclear e homonuclear predominam no espectro, tornando-se extremamente difícil observar o deslocamento químico, já que o espectro resultante é uma superposição dessas interações que torna praticamente impossível a observação dos padrões de pó de deslocamento químico para ^{13}C com a presença das interações dipolares com os hidrogênios, Figura 8. Existem técnicas tradicionais capazes de eliminar ou reduzir drasticamente estes efeitos. Dentre essas técnicas, a mais utilizada é o método de desacoplamento heteronuclear por irradiação contínua.

No caso específico de sistemas com núcleos de ^{13}C e ^1H , o desacoplamento é feito através da redução do campo magnético efetivo produzido pelo dipolo magnético do núcleo ^1H ao longo da direção $\hat{z}$, a partir da aplicação de um campo de radiofrequência contínuo, que mantém o momento de dipolo magnético do mesmo em alta rotação. Deste modo, o valor médio do campo de dipolo magnético na posição do núcleo ^{13}C na direção $\hat{z}$ torna nulo não afetando o espectro RMN do núcleo ^{13}C , pois as frequências de ressonância dos dois núcleos são muito distintas para altos campos magnéticos externos, Figura 8.

Figura 8 - Esboço do aumento de resolução em um espectro SSNMR com utilização do desacoplamento heteronuclear e MAS.

Fonte: Elaborada pelo autor

A técnica comentada acima elimina o efeito da interação heteronuclear (C-H) no espectro de RMN. Porém, obviamente, não funciona no caso interação homonuclear (H-H), interação utilizada como sonda na técnica DIPSHIFT que obtém informação sobre mobilidade na faixa intermediária e será melhor detalhada a seguir, já que ambos os spins acoplados sentem o mesmo efeito da RF usada no desacoplamento. Assim, para eliminar a interação dipolar homonuclear é necessário utilizar esquemas de desacoplamento especiais, o chamado desacoplamento homonuclear. Uma dessas técnicas é chamada de desacoplamento homonuclear de *Lee-Goldburg* (LG), onde um pulso de RF aplicado fora de ressonância de

uma quantidade $\Delta\Omega$ de modo que o campo efetivo sentido pelos spins esteja a $54,7^\circ$ do eixo onde o campo externo é aplicado do sistema de coordenadas girante. Isso faz com que em média o termo da interação dipolar magnética homonuclear, que é proporcional a $3I_z^1 I_z^2 - \vec{I}^1 \cdot \vec{I}^2$, onde I representa os operadores de spin dos dois núcleos acoplados, seja nulo, eliminando assim o efeito da interação dipolar homonuclear. Em uma variante mais sofisticada, o offset de ressonância é alternado entre valores $\pm \Delta\Omega$, aumentando a eficiência do desacoplamento. Neste caso a técnica passa a se chamar *Frequency Switched Lee Goldberg (FSLG)*.²¹⁻²²

2.4.3 Métodos de edição espectral

Um estudo comum em SSNMR é avaliar a composição química da amostra estudada utilizando uma série de sequências editadas de modo a obter uma completa caracterização do material. Essas técnicas editadas são capazes de realizar medidas quantitativas ou qualitativas e selecionar grupos químicos específicos, contornando o problema de sobreposição espectral que é um dos piores empecilhos encontrados na caracterização de biomassas. As técnicas que serão focadas aqui são técnicas voltadas para a observação do núcleo de carbono treze (^{13}C) e que podem estar quimicamente ligados aos núcleos de carbono, hidrogênio, oxigênio e nitrogênio.

2.4.4 Polarização cruzada (CP)

A técnica que será descrita a seguir é uma das técnicas mais utilizadas em experimentos de alta resolução em sólidos, onde se utiliza a transferência de polarização de um núcleo abundante e com alto fator magnetogírico, - como o caso do hidrogênio - para um núcleo pouco abundante e menor fator magnetogírico, sendo muito utilizada no estudo de núcleos pouco abundantes -como é o caso do isótopo ^{13}C do carbono. No caso de biomassas lignocelulósicas essa técnica se aproveita da interação dipolar heteronuclear, entre ^1H e ^{13}C , para realizar a transferência de magnetização cruzada, ou seja, entre esses núcleos diferentes.

É claro que o hidrogênio é muito usado como fonte de magnetização devido a sua abundância, e ao alto valor de sua razão magnetogírica, que comparada a do ^{13}C é cerca de 4 vezes maior.

Para viabilizar a o CP inicialmente é aplicado um pulso $\pi/2$ no ^1H e logo após faz o sistema entrar em ressonância através da aplicação de pulsos de RF com amplitudes $\gamma_H B_{1H}$ e $\gamma_C B_{1C}$ simultaneamente nos dois núcleos ^1H e ^{13}C , durante um tempo denominado tempo de contato - Figura 9a. A transferência é maximizada quando $\gamma_H B_{1H} = \gamma_C B_{1C}$ (condição de Hartmann-Hahn), ou seja, se essa condição é satisfeita, quando os campos de RF para ^1H e ^{13}C , são respectivamente aplicados simultaneamente B_{1H} e B_{1C} , teremos a transferência de polarização que pode induzir um aumento máximo na intensidade do sinal de RMN do ^{13}C por um fator 4,^{21, 22} relativo à magnetização direta dos núcleos de ^{13}C que seria obtida através da polarização da magnetização ao longo de B_0 e posterior pulso $\pi/2$.

Além disso, a magnetização nuclear leva um tempo $5T_1$ para voltar ao seu estado de equilíbrio, ao longo de B_0 . Assim em uma excitação direta dos núcleos de ^{13}C , para repetir o experimento e acumular o sinal, teríamos de aguardar um intervalo de tempo de aproximadamente 5 vezes o T_1 do ^{13}C mais longo da amostra para que a magnetização retornasse praticamente por completo ao seu estado de equilíbrio. Nos experimentos CP, ao invés de esperarmos a relaxação do ^{13}C , o tempo de espera para a aquisição do experimento é de $5T_1$ do ^1H já que iniciamos o CP pela magnetização do ^1H .

Como em sistemas poliméricos o T_1 do ^1H é usualmente 10 vezes mais curto que o de carbono, isso representa um ganho considerável em termos de tempo de experimento. A combinação das técnicas de desacoplamento heteronuclear, MAS (rotação da amostra em torno do ângulo mágico, do inglês, *Magic angle spinning*) e Polarização cruzada (CP, do inglês, *Cross polarization*) em um único experimento foi primeiramente proposto por Schaefer e Stejskal²⁴ que de certa forma marcou o nascimento da espectroscopia de alta resolução em sólidos via RMN para núcleos pouco abundantes.

Com o uso dessas técnicas é possível obter espectros - quando não é necessário obter espectros quantitativos - em que a presença de diferentes grupos químicos pode ser identificada, com uma alta relação sinal/ruído, utilizando um tempo menor de experimento em amostras que possuem núcleos pouco abundantes, como é o caso do isótopo ^{13}C .^{21-22,25-26} No

entanto, a união dessas técnicas apresenta a desvantagem de obtenção de espectros apenas qualitativos, no sentido que não revelam a abundância de um dado grupo químico na amostra, além do mais quando é aplicado aos experimentos altos valores da MAS as curvas de transferência de magnetização começam a depender drasticamente da velocidade de rotação (MAS) e cada grupo químico apresenta uma curva de resposta diferente, com máximos e mínimos na curva de potência para a condição de Hartmann-Hahn.

Assim, uma forma de tentar tornar a excitação mais homogênea, para diferentes velocidades da MAS, é utilizando uma técnica de polarização cruzada com variação na potência da RF durante o tempo de contato, conhecida com CP com rampa, em que comumente a variação de potência da RF ocorre entre os valores próximos ao calibrado pela maximização da relação sinal/ruído para grupos onde apresentam fraco acoplamento dipolar, Figura 9b.

Figura 9-a) sequência de pulsos CP sem rampa e b) sequência de pulsos CP com rampa.

Fonte: Elaborada pelo autor

Nesse sentido, o experimento mais utilizado para caracterização de biomassas é um que agrega desacoplamento heteronuclear, MAS e CP com rampa de RF. Outra técnica usualmente utilizada em união as anteriores citadas é a técnica TOSS (do inglês, *Total suppression of sidebands*), nomeada como CPMASTOSS Figura 10, que permite obter informações importantes sem superposição de sinais com às bandas laterais em um experimento com rotação menor que a banda espectral da interação deslocamento químico (~ 5 kHz).^{21,25-26} Essa técnica se baseia na diferença de fase que as bandas laterais possuem em

relação aos picos isotrópicos, e através da aplicação de um trem de pulsos, que na figura está representado como quatro pulsos de 180° espaçados por diferentes tempos, causa uma supressão somente das bandas laterais, Figura 10.^{21,25-26} Tornando possível a obtenção de informações sobre a composição química e fração amorfa/cristalina da celulose em biomassas estudadas em função da etapa de pré-tratamento aplicado, o qual resultou em algumas publicações que serão detalhadas nessa tese.¹⁻⁵

Figura 10 – Sequência de pulsos CPMAS TOSS

Fonte: Elaborada pelo autor

2.4.5 Espectros quantitativos de RMN

A quantificação da composição de biomassas lignocelulósicas é de extrema importância na caracterização desses materiais. Em SSNMR o método mais utilizado e aceito para a quantificação é uma simples sequência de pulsos com a excitação através de polarização direta em ^{13}C (DP, do inglês, *direct polarization*) submetido a alta rotação da amostra em torno do ângulo mágico (MAS), desacoplamento heteronuclear e um tempo de espera entre experimentos que permita essencialmente a completa relaxação longitudinal (T_1) do núcleo observado que dura em torno de 5 vezes o T_1 do ^{13}C mais longo da amostra²⁷. Tempo esse que pode ser verificado utilizando uma técnica de edição espectral, em que se utiliza de uma janela onde a magnetização do carbono é retornada para o eixo z por um período variável t_z (filtro t_z) após a excitação por polarização cruzada²⁷ a vantagem de utilizar essa sequência é o ganho em tempo e da razão sinal/ruído, além dessa técnica ter a adição da sequência TOSS (do inglês, *total sidebands suppression*) que permite uma menor rotação macroscópica da amostra em torno do ângulo mágico. No entanto, a baixa abundância natural

dos núcleos de ^{13}C aproximadamente, 1,1%, diminui drasticamente a razão sinal/ruído nesse experimento. Devido ao longo tempo de relaxação longitudinal T_1 , a utilização da sequência DPMAS, com intuito de obter espectros quantitativos, demanda muito tempo de aquisição. Por exemplo, em biomassas lignocelulósicas um espectro quantitativo com boa (~ 70) razão sinal/ruído (~ 70), pode demorar de um a dois dias (24-48 horas) para cada amostra. Dependendo do número de amostras a serem estudadas, o estudo quantitativo por SSNMR utilizando a técnica tradicional pode tornar-se inviável. Como por exemplo, se fosse realizado um estudo quantitativo em todas as amostras (~ 200 amostras) aqui estudadas isto levaria em torno de 7 a 13 meses de medidas sem intervalo.

2.4.6 Polarização Cruzada em Múltiplas Etapas (MultiCP)

Muitas técnicas foram criadas para tentar contornar o altíssimo tempo de espera em um experimento quantitativo em SSNMR, porém muitas delas funcionam para um dado tipo de amostra bem controlada ou enriquecida com ^{13}C ²⁸. Pensando nisso, Robert L. Johnson e Klaus Schmidt-Rohr ²⁸ publicaram um trabalho em que, finalmente, obtêm-se um espectro quantitativo utilizando uma sequência com vários períodos de polarização cruzada separados por outros períodos (t_z) destinados à recuperação da magnetização ^1H perdida na transferência durante o CP.

Em uma amostra real de biomassa lignocelulósica com diferentes grupos químicos, a quantificação utilizando um único período de polarização cruzada CP, se possível, requer longos períodos de tempo de contato para completa polarização de carbonos ²⁹. Porém quando um experimento com longo tempo de contato (~ 10 ms) é realizado, grupos que possuem curta relaxação $T_{1\rho}$ têm uma perda significativa de polarização devido ao longo tempo de contato, o que inviabiliza a quantificação utilizando apenas um único CP. A nova sequência utilizando pulsos de múltiplas etapas de CP elimina o problema descrito anteriormente, viabilizando assim um espectro quantitativo em amostras reais que apresentam grupos com diferentes tempos de relaxação dos ^1H nos sistemas girantes de coordenadas ($T_{1\rho}$), Figura 11a. A principal inovação da técnica de múltiplos CP é que os blocos de CP são separados por um

tempo t_z (0,9 s, para biomassas lignocelulósicas) em que a magnetização ^1H pode se recompor a um valor bem próximo ao valor de equilíbrio dado pela estatística de Boltzmann, Figura 11a. Nesse tempo, as magnetizações dos ^1H e ^{13}C são armazenadas ao longo do campo magnético estático por um pulso $\pi/2$ em ambos os canais. Durante t_z , a magnetização ^1H relaxa como $T_{1,H}$ até atingir o equilíbrio térmico ou um valor bem próximo, o qual reverte quase toda a magnetização perdida por $T_{1\rho H}$ durante o período de polarização cruzada. Além disso, a magnetização local, dos núcleos ^1H próximos aos ^{13}C perdida durante a transferência de polarização para o ^{13}C repolarizará por difusão de spins, já que o núcleo abundante de ^1H representa um grande reservatório de magnetização interconectado.

Figura 11 – a) Ilustração sem escala real do experimento MultiCP com a evolução da magnetização dos núcleos de ^1H e ^{13}C para diferentes grupos químicos b) Comparação entre os espectros utilizando as técnicas MultiCP (em preto), DPMAS (em vermelho) e CPMAS (em azul).

Fonte: Adaptada de JOHNSON²⁸

A repolarização do ^1H pela relaxação $T_{1,H}$ durante t_z e o resultado da saturação da magnetização de ^{13}C são mostrados na Figura 11a, o qual foi gerado a partir de um modelo simples de simulação que leva em consideração as constantes de tempos $T_{1\rho H}$, $T_{1,H}$, T_{CH} , e $T_{1,C}$ ²⁸. Nesta simulação Johnson e Schmidt-Rohr mostraram que $t_z = 2T_{1,H}$ é suficiente para a repolarização da magnetização de ^1H para um valor $> 95\%$ do valor de equilíbrio, para o caso de $T_{1\rho H}/T_{CP} > 4$ ²⁸. O qual leva para biomassas lignocelulósicas da ordem de $t_z = 0,9$ s. Esse valor não pode ser muito longo por dois fatores: primeiro, com seu aumento, maior é o tempo entre cada medida, o que aumenta drasticamente o tempo total do experimento; segundo, durante t_z , ocorre a relaxação da magnetização do ^{13}C por $T_{1,C}$, se t_z for maior que $T_{1,C}$,

impede a completa saturação da magnetização do ^{13}C . Felizmente os valores $T_{1,C}$ geralmente são bem longos o que torna viável a utilização de t_z longos. No entanto, os sinais de carbonos com curto $T_{1,C}$, como é o caso de alguns grupos como CH_3 e CH_2 móveis ²⁸, são muito afetados pela relaxação $T_{1,C}$ durante t_z , porém esses grupos têm a propriedade de rápida transferência de magnetização por CP o que, no final das contas, com a utilização de um último CP com tempo de contato mais curto (igual a 0,8 ms, para evitar a relaxação por $T_{1,C}$ durante esse tempo) é possível uma completa saturação da magnetização de ^{13}C para esses grupos em questão.

A técnica MultiCP ²⁸ foi implementada e a sua funcionalidade testada em bagaço de cana-de-açúcar comparando os resultados obtidos com os obtidos pela técnica quantitativa tradicional DPMAS e a semi-quantitativa CPMAS, esses resultados são apresentados na Figura 11b com os espectros normalizados pelo pico do carbono 1 da celulose (C1) em 105 ppm.

A Figura 11b mostra os espectros das técnicas de SSNMR, os espectros de DPMAS (em vermelho) e MultiCP (em preto) são semelhantes nas intensidades de todos os picos variando apenas a relação sinal/ruído, mostrando assim, a validade da quantificação utilizando a técnica MultiCP, o qual acarreta em um ganho de tempo de experimento muito significativo. Por exemplo, um experimento utilizando a técnica DPMAS de duração 29 horas obtém a mesma relação sinal/ruído que um experimento de MultiCP de apenas 30 minutos, que é equivalente a um ganho de tempo igual a 58 vezes. Essa validade quantitativa não é satisfeita utilizando somente a técnica CPMAS convencional (em azul) como apresentado pela Figura 11b, pois as intensidades dos sinais diferem do valor quantitativo esperado como apresentado pelo espectro quantitativo padrão DPMAS (em vermelho).

Uma vez conhecido uma excitação capaz de fornecer espectros de SSNMR quantitativos com um tempo relativamente curto, é possível obter, a partir de agora, informações das quantidades dos diferentes grupos presentes nas biomassas lignocelulósicas, além de usar a excitação por MultiCP nas outras análises estruturais como por exemplo no estudo de cristalinidade em biomassas que será melhor discutido nos resultados dessa tese.

Além da obtenção de um espectro quantitativo reduzindo dramaticamente o tempo de aquisição, SSNMR é capaz de utilizar sequência de pulsos de radiofrequência para edição espectral de modo a separar diferentes grupos químicos nos espectros e assim torna possível conhecer as várias componentes em biomassas lignocelulósicas de forma mais clara. Em outras palavras utilizando técnicas de SSNMR com edição espectral é possível separar componentes da biomassa referentes a lignina, hemicelulose, celulose amorfa e celulose cristalina. Contornando assim o problema de sobreposição espectral quando utilizada técnicas unidimensionais em amostras com abundância natural do ^{13}C de aproximadamente 1%. Com isso, é possível melhorar a compreensão da composição das ligninas presentes nas biomassas, além de obter uma noção quantitativa da razão de celulose cristalina e amorfa.

2.4.7 RMN bidimensional

A técnica SSNMR pode fornecer informações relevantes no entendimento estrutural, interacional e dinâmico das paredes celulares de biomassas lignocelulósicas, propriedades que ainda são muito pouco conhecidas, além de fornecer informações que podem melhorar o entendimento sobre a recalcitrância das biomassas tornando o processo de obtenção de etanol mais vantajoso. Por exemplo, como a lignina interage com a celulose e hemicelulose formando uma matriz resistente ao ataque enzimático e químico. Outra questão é como a dinâmica dos componentes da parede celular assim como as interações entre eles são afetados pela desidratação da planta. Pontos como esses podem ser melhores compreendidos com técnicas avançadas de SSNMR multidimensionais desenvolvidas especificamente para avaliar essas interações de interesse. Porém, a maioria dessas técnicas necessitam de amostras enriquecidas com carbono 13 (^{13}C) e equipamentos de alta resolução com alto campo magnético.

Plantas com parede celular secundárias enriquecidas com ^{13}C podem ser obtidas através de uma atmosfera abundante em gás carbônico enriquecido com ^{13}C promovendo assim, através da fotossíntese, um enriquecimento homogêneo em todos os constituintes da parede celular secundária: polissacarídeo, lignina e proteína.

Em um trabalho realizado pelo grupo de pesquisa do Prof. Ray Dupree e Prof. Brown em Warwick em parceria com o grupo do Prof. Paul Dupree em Cambridge foi mostrado evidências que o xilano apresenta uma variedade de conformações em amostras de parede celular de *Arabidopsis* secas, e a maioria dos xilanos assumem uma conformação diferente a encontrada em solução³⁰, conclusão obtida baseada em reconhecer mudança no ângulo de ligação dos glicosídicos. Além desse trabalho outros trabalhos³¹⁻³² indicam que a interação entre a celulose e o xilano, em amostra de plantas de parede celular secundária, causa uma mudança conformacional no xilano diferenciando-o da sua conformação assumida quando em solução (*three-fold helical screw*), que é responsável por formar uma estrutura de microfibras cristalinas. Isto possibilita pensar que os novos sinais do xilano em distintos deslocamentos químicos ao adotado quando em solução seja uma conformação específica (*two-fold helical screw*) no xilano quando interage com a celulose. Apesar dos artigos³⁰⁻³² terem evidenciados uma possível existência de uma nova conformação do xilano (em possível interação com a celulose) em amostras de plantas com parede celular secundária secas, não é claro se essa conformação existe somente quando essas amostras são secas, nem que realmente esse xilano estava em interação com a celulose. Necessitando assim de trabalhos em amostras de parede celular secundária nunca secas. E para alcançar as informações necessárias uma alternativa seria o emprego de experimentos 2D de correlação de ^{13}C - ^{13}C permitindo o assinalamento dos deslocamentos químicos dos diversos polissacarídeos da parede celular secundária com maior precisão. O experimento 2D J-INADEQUATE^{30,33-34} (do inglês, *incredible natural abundance double quantum transfer experiment*) que pode ser traduzido por correlação de duplo quantum ou soma dos valores dos deslocamentos químicos em cada ^{13}C quimicamente ligados utilizando duas formas diferentes de excitação (CP e DP com curto tempo de ciclagem), possibilitando assim analisar melhor grupos com diferentes tempos de relaxação, possivelmente causada por uma diferença de mobilidade desses grupos, grupos esses que antes eram encobertos nos espectros unidimensionais devido a sobreposição de sinais.

2.4.9 *J-INADEQUATE* ^{13}C - ^{13}C 2D

A espectroscopia de RMN bidimensional (RMN 2D) é um conjunto de métodos de espectroscopia de RMN que fornece dados representados num espaço definido por dois eixos de frequência ao invés de um. Os espectros de RMN bidimensionais podem fornecer mais informações sobre uma molécula do que espectros de RMN unidimensional, e são especialmente úteis para determinar a estrutura de uma molécula, em particular para moléculas que são complicadas como o caso de biomassa, onde a utilização de RMN unidimensional apresenta sobreposições de sinais de diferentes constituintes da biomassa (celulose, lignina e hemicelulose).

Quase todos os experimentos bidimensionais tem quatro fases: o período de preparação, onde uma coerência da magnetização é criado através de um conjunto de pulsos de RF; o período de evolução, no qual não há aplicação de pulsos, onde os spins nucleares executam precessão livremente; o tempo de mistura, onde a coerência é criada por outra série de pulsos em um estado que lhe tornará um sinal observável; e o período de detecção, em que o sinal decai livremente (FID), de um modo idêntico ao RMN unidimensional.²¹ As duas dimensões de uma experiência de RMN bidimensional tratados aqui serão dois eixos frequência, sendo cada um representando um determinado desvio químico. Cada eixo de frequência está associado com uma das duas variáveis de tempo, dependente do comprimento do período de evolução (tempo de evolução) e o tempo decorrido durante o período de detecção (tempo de detecção). Eles são convertidos em frequências a partir de cada um dos eixos no domínio do tempo através da transformada de Fourier bidimensional. Uma única experiência bidimensional é gerada como uma série de experiências unidimensionais, com um tempo de evolução diferente específico em experiências sucessivas, com toda a duração do período de detecção gravado em cada experiência, ou seja, pode se dizer que um experimento bidimensional é basicamente uma coleção de experimentos unidimensionais em um mesmo experimento.

Figura 12 - Sequências de pulsos J-INADEQUATE para estado sólido a) e sequência *refocused* J-INADEQUATE b). Sob condições ideais, o grau de conversão em coerência de duplo quantum é máxima em $\tau=1/(4J_{\text{CC}})$ e é zero para $\tau=1/(2J_{\text{CC}})$, onde J_{CC} é a constante de acoplamento J entre os ^{13}C .

Fonte: Adaptada de LESAGE³⁶

J-INADEQUATE ^{13}C - ^{13}C 2D é útil para determinar quais os sinais são referentes aos carbonos quimicamente ligados, auxiliando assim um profundo assinalamento dos grupos químicos da amostra estudada. No entanto, essa técnica é muito insensível quando trabalhamos com amostras naturais onde apenas 1% dos átomos de carbono são excitáveis, ou seja a abundância do ^{13}C em amostras naturais é aproximadamente 1%. Se a amostra for enriquecida com ^{13}C , aumentando o número de ^{13}C para um mínimo de 10%, esse experimento pode ser executado. E quanto maior a porcentagem de ^{13}C menor será o tempo de experimento, pois a intensidade do sinal é intimamente dependente da fração de enriquecimento da amostra por ^{13}C . O espectro J-INADEQUATE aparece no eixo F_2 como o deslocamento químico de carbono e o eixo F_1 como a frequência de duplo quantum, ou seja, a soma das duas frequências correlacionadas dos carbonos quimicamente ligados (soma dos dois deslocamentos químicos dos grupos quimicamente ligados), sem sinais diagonais em um experimento J-INADEQUATE.³⁶ Nesse experimento a transferência de coerência é mediada exclusivamente pela interação J entre os carbonos (da ordem de dezenas de Hz), fornecendo assim informação sobre as conectividades de carbonos quimicamente ligados e auxiliando quais são os assinalamento dos diferentes grupos químicos antes encoberto nos espectros unidimensionais.

É mostrado duas versões da sequência de pulsos do experimento J-INADEQUATE, Figura 12a, e *refocused* J-INADEQUATE, Figura 12b. Em ambas sequências após a excitação por CP (nada impede que seja outro tipo de excitação) a magnetização do ^{13}C evolui durante o tempo 2τ sobre o Hamiltoniano do acoplamento J homonuclear ^{13}C - ^{13}C isotrópico, enquanto que o acoplamento dipolar homonuclear entre carbonos é cancelado pela alta MAS, enquanto que o deslocamento químico é refocalizado pelo pulso de 180° no carbono. No experimento padrão, J-INADEQUATE, a coerência de duplo quantum é criada pelo primeiro pulso de 90° no carbono e evolui durante t_1 , resultando em soma das frequências dos dois spins quimicamente ligados $\omega_{\text{DQ}} = \omega_{\text{SQ}}(\text{a}) + \omega_{\text{SQ}}(\text{b})$, e convertida novamente em anti-fase pelo último pulso de 90° , fornecendo assim um espectro com a abscissa sendo os deslocamentos químicos isotrópicos dos ^{13}C enquanto que o eixo transversal apresenta somente a soma dos deslocamentos químicos dos carbonos que estão quimicamente ligados (ω_{DQ}).³⁶ Se uma reta for traçada na diagonal passando entre todos os sinais do espectro de frequências, ela será para todos os sinais a metade do valor da soma das duas frequências do deslocamento químico isotrópico dos dois carbonos quimicamente ligados, isso serve como uma referência. O experimento J-INADEQUATE tem a aquisição do sinal após esse último pulso detectando assim a componente anti-fase, enquanto que no experimento *refocused* J-INADEQUATE após esse último pulso é acrescido a sequência τ -pulso π - τ , com τ sincronizado com MAS, fazendo com que o sinal seja convertido em fase, gerando assim uma frequência de duplo quantum comum. O advento desses experimentos possibilita a sondagem mais detalhadas dos sinais de grupos químicos que eram antes encobertos nos espectros unidimensionais em uma amostra complexa como por exemplo amostras lignocelulósicas.

2.4.10 Proton Driven Spin Diffusion com filtro t_1 (t_1 -PDSD)

Para observar as interações de proximidade intra- e intermoleculares, pode ser utilizado a técnica 2D do inglês ^1H -driven ^{13}C spin diffusion^{30,33-34} (PDSD) com dois tempos de mistura (t_m) distintos, um longo (da ordem de segundos) e outro curto (da ordem de dezenas de milisegundos). Nesse experimento pode ser utilizado a excitação por CP, o qual

vai privilegiar a aparição nos espectros dos grupos com restrição móvel. Após a excitação, um filtro para eliminar o efeito causado pela relaxação T_1 é introduzido para evitar comparações errôneas devido ao alto tempo de mistura, fazendo com que a soma do tempo de mistura (t_{mix}) e do filtro t_1 nos dois diferentes experimentos se mantenham constante de modo que o efeito da relaxação T_1 em ambos os experimentos sejam compatíveis, Figura 13. No experimento t_1 -PDSD a magnetização é transferida do hidrogênio para o carbono, pela excitação por CP, e do carbono para o carbono, durante o tempo de mistura (t_{mix}), uma vez que essas amostras são enriquecidas com ^{13}C e por difusão de spin esses núcleos e proximidade espacial esses núcleos permitem a troca de magnetização. O período t é responsável pela criação da informação bidimensional tornando assim um experimento bidimensional com informação de proximidade espacial devido ao tempo de mistura (t_{mix}), Figura 13. Com t_{mix} curto (tempo da ordem de dezenas de milissegundos) o espectro apresentará somente componentes da macromolécula, ou seja, ^{13}C com curta proximidade espacial e a medida que esse tempo é aumentado (para tempos da ordem de segundos) o espectro terá contribuição também de ^{13}C fora da macromolécula mas com proximidade espacial, fornecendo assim informação sobre proximidade intra e intramolecular.

Figura 13 - Sequências de pulsos Proton Driven Spin Diffusion com filtro t_1 (t_1 -PDSD) para estado sólido.

Fonte: Elaborada pelo autor

2.4.11 DIPSHIFT

A metodologia de SSNMR 2D denominada *Dipolar Chemical Shift Correlation* (DIPSHIFT)³⁷ utiliza a interação dipolar heteronuclear (no caso entre ^{13}C e ^1H) para estudar

movimentos moleculares. A técnica DIPSHIFT serve para estudar movimentos moleculares no chamado regime intermediário (com tempos de correlação na faixa de μs a ms), fornecendo informações sobre a escala de tempo e em certa medida sobre a geometria de reorientação das moléculas.

Figura 14 - a) Sequência DIPSHIFT: CP refere-se à Polarização Cruzada, FSLG é uma sequência de desacoplamento dipolar homonuclear (do inglês, *Frequency Switched Lee-Goldburg*), TPPM refere-se a uma sequência de desacoplamento dipolar heteronuclear (do inglês, *Time Proportional Phase Modulation*), t_1 é o tempo que mantemos FSLG ligado, t_2 é tempo de aquisição e t_r é o período de rotação da amostra, MAS. b) Curvas típicas de DIPSHIFT considerando diversos acoplamentos dipolares CH, $\langle \omega_{CH} \rangle / 2\pi$ indicados na figura.

Fonte: Adaptada de BERNARDINELLI¹⁷

Como ilustrado pela Figura 14a, na técnica de DIPSHIFT a excitação ocorre via Polarização Cruzada (CP) ^1H para o ^{13}C . Após os pulsos de CP, a magnetização do ^{13}C evolui livremente sob a interação dipolar heteronuclear ^{13}C - ^1H durante um período t_1 , que varia de zero a um período de uma rotação do rotor (MAS). Durante t_1 é aplicada uma sequência de desacoplamento homonuclear de ^1H FSLG para eliminar o acoplamento entre os núcleos de hidrogênio.

A aplicação do desacoplamento homonuclear de ^1H é essencial, pois a interação dipolar entre os hidrogênios levaria ao fenômeno denominado difusão de spins, ou seja, transferência de magnetização entre os ^1H que pode chegar a distância de centenas de nanômetros³⁸ como já mencionado, devido a esse fenômeno, um dado núcleo de ^{13}C fica em média acoplado com toda a rede de ^1H ao redor, ou seja a interação CH deixa de ser local

(definida somente pelo hidrogênios a distâncias menores que 0,4 nm). Portanto, com a aplicação do desacoplamento homonuclear apenas o caráter local da interação dipolar CH é mantido.³⁷

Assim, durante o primeiro período de evolução, as magnetizações transversais do ^{13}C são moduladas pelo acoplamento local ^{13}C - ^1H . No restante do período, é aplicado o desacoplamento heteronuclear e exatamente após um período de rotação macroscópica, aplicamos um pulso de refocalização de 180° , no canal do ^{13}C que produzirá um eco de spin em $2t_r$, devido à refocalização da interação de deslocamento químico. No entanto, a amplitude desse eco será modulada pela evolução sob a interação dipolar ^{13}C - ^1H ocorrida durante t_1 .

Medindo a amplitude do sinal em função de t_1 e, normalizando pela amplitude obtida para $t_1 = 0$, obtemos uma curva que inicia com amplitude 1 decai até um valor que depende da magnitude da interação dipolar magnética heteronuclear entre o núcleo de ^{13}C e o ^1H vizinho em $t_1 = t_r/2$ e retorna a 1 quando $t_1 = t_r$ devido a formação do eco rotacional da interação CH (Figura 14b). Logo, a magnitude da interação dipolar é obtida através do ajuste das curvas DIPSHIFT.

Como a interação dipolar é promediada por movimentos moleculares rápidos, ver Figura 15, (tempos de correlação $\tau_C \sim \mu\text{s}$) é possível determinar a magnitude do acoplamento dipolar promediado pelo movimento ($\langle \omega_{CH} \rangle$), o que já provê alguma informação sobre o movimento molecular.

Por exemplo, se o movimento é isotrópico $\langle \omega_{CH} \rangle = 0$, a intensidade no experimento de DIPSHIFT permanece constante independente de t_1 , ou seja, a curva DIPSHIFT é constante com amplitude igual a 1. No entanto, se o movimento molecular não é isotrópico ou se somente parte das moléculas executam movimentos moleculares, $\langle \omega_{CH} \rangle$ não é totalmente promediado a zero, assim mesmo com $\tau_C < 1 \mu\text{s}$ a curva decai para um valor que depende do grau de anisotropia do movimento molecular, Figura 15. Para grupos com completamente rígidos não existe promediação da interação dipolar e a curva DIPSHIFT decai para zero quando t_1 é igual a $t_r/2$ e volta para 1 quando completar um ciclo de rotação $t_1 = t_r$ (Figura 14b).

Em outras palavras podemos utilizar as curvas de DIPSHIFT de regime rápido para inferir se a dinâmica molecular da referida cadeia é isotrópica ou se somente parte dos segmentos executam movimentos moleculares.

Figura 15 - Curva característica DIPSHIFT para diferentes tempos de correlação de acoplamento dipolar CH.
Fonte: Adaptada de BERNARDINELLI¹⁷

O limite rígido da interação dipolar C-H utilizado para o modelo cristalino para esse experimento e amostras de biomassa é da ordem 22,5 kHz que pode ser verificado por uma amostra padrão como a alanina CH enriquecida com ^{13}C . A razão entre as medidas de acoplamento dos polissacarídeos e o limite rígido (amostra padrão) fornece informação sobre o parâmetro de ordem para cada deslocamento químico. Nesta tese será mostrado nos resultados um trabalho realizado com técnicas SSNMR multidimensionais (J-INADEQUATE, t_1 -PDSD e DIPSHIFT) em amostra de plantas enriquecidas com ^{13}C durante o doutoramento sanduíche na Inglaterra nas Universidade de Cambridge e Warwick na Inglaterra.

3 METODOLOGIA

Estudo dos efeitos dos pré-tratamento na composição de biomassas lignocelulósicas

Pré-tratamentos e hidrólise enzimática

Neste estudo,¹ cascas de eucalipto passaram por uma etapa de remoção de açúcares solúveis utilizando água a 80°C por 1 hora, e foram posteriormente secas em uma estufa de circulação de ar a 60°C por 24 horas. Então, as cascas foram moídas em moinho de facas tipo Wiley, e o tamanho de partículas foram padronizados entre 40-60 *meshes*. Posteriormente, elas foram submetidas a duas etapas de pré-tratamentos. Na primeira etapa, a biomassa foi tratada com ácido clorídrico (HCl – 1% v/v em água), enquanto na segunda etapa, foram tratadas com concentrações crescentes de hidróxido de sódio (NaOH): 0,25; 0,5; 1,0; 2,0 e 4,0% (p/v), Figura 16a. As condições de pré-tratamento em ambas as etapas foram: temperatura de 120°C em autoclave; pressão de 1,05 bar; relação sólido:líquido de 1:10 (grama de casca/ml de solução). Após ambas as etapas de tratamento, a fração sólida foi separada por filtração e lavada com água abundante até a neutralidade, a fim de remover os resíduos do ácido e da base. Em seguida, as biomassas foram submetidas à secagem em estufa a 60°C por 24 horas.

Um segundo conjunto de pré-tratamentos foi realizado em outras biomassas estudadas, em um trabalho posterior,⁴ utilizando ampolas com 400 mg de biomassa e 16 mL de solução de pré-tratamento (água; 1% de ácido sulfúrico; 1% de NaOH; e 3% de bissulfito de sódio (p/v)). Os pré-tratamentos foram realizados em estufa, numa faixa crescente de temperatura (50; 90; 130; e 180°C), e um tempo de residência de 40 minutos de modo a entender o efeito da temperatura no pré-tratamento, Figura 16b. Depois do tratamento e resfriamento das amostras, essas foram transferidas para tubos falcon e centrifugadas a 4000 x g por 15 minutos. O licor obtido de cada amostra foi transferido para um novo frasco e reservado para análises posteriores. A fração sólida foi ressuspensa com 5 mL de etanol, homogeneizada e

centrifugada. A lavagem foi repetida 3x e a biomassa seca em estufa de circulação de ar, a 30°C por 12 horas.

Posteriormente ao pré-tratamento, as amostras das biomassas aqui estudadas passaram por uma hidrólise enzimática, realizado pelo grupo do Prof. Dr. Igor Polikarpov, nas seguintes condições: concentração de substrato de 2,5% (p/v), em tampão citrato de sódio/ácido cítrico 50 mM, pH 5,0, temperatura de 50°C e agitação de 200 RPM, por 72 horas. Foram utilizados 25 FPU de Accellerase 1500 (Genencor, Dinamarca) e 50 BGUs do coquetel Novozymes 188 (Novozymes, Dinamarca) por grama de biomassa.

a)

b)

Figura 16 – Esboço das etapas dos pré-tratamento realizado nas cascas de eucalipto¹ a) e em varias outras biomassas⁴ b).

Fonte: Elaborada pelo autor

SSNMR

Foram obtidos espectros de carbono 13 (^{13}C) SSNMR, para as biomassas, em um espectrômetro Varian Inova nas frequências de 100,5 MHz para ^{13}C e 400 MHz para o hidrogênio (^1H). Foi utilizada uma sonda Jackobsen 7 mm de dupla ressonância com sistema pneumático de rotação da amostra em torno do ângulo mágico integrado. Nesse sistema a amostra foi rotacionada com frequência de 4,5 kHz com precisão em torno de 2 Hz. A

sequência de pulso utilizada, nomeada apenas como CPMAS TOSS, integra excitação através de polarização cruzada entre os núcleos de ^1H e ^{13}C com rampa (CP, do inglês: *Ramped cross-polarization*), rotação da amostra em torno do ângulo mágico (MAS, do inglês: *Magic angle spinning*), eliminação das bandas laterais (TOSS, do inglês: *Total suppression of spinning sidebands*)^{26,55} e desacoplamento heteronuclear no canal do ^1H , o que possibilita a obtenção de um espectro de alta resolução de ^{13}C .²⁷ Foram utilizados em todos os experimentos de SSNMR, tempo de pulso $\pi/2$, com duração de 5 μs (^{13}C) e 5 μs (^1H), tempo de contato do CP de 1 ms, tempo de aquisição de 20 ms e intervalo de repetição entre experimento de 2 s, totalizando aproximadamente 4000 repetições para cada experimento o que leva a aproximadamente um tempo total de experimento de 2 horas e meia. Todos os resultados foram processados utilizando transformada de Fourier com 2K pontos complexos, e utilizando a ferramenta de atenuação de ruído com alargamento de linha de 60 Hz por multiplicação exponencial (EM do inglês *exponential multiplication*).

XRD

Os dados de XRD foram obtidos em um Rigaku Rotaflex diffractometer model RU200B (Tokyo, Japan) utilizando um monocromador CuK α com radiação em 1.54 Å. O goniômetro foi digitalizado em um intervalo 2 θ entre 5 ° e 65 ° a uma taxa de varrimento de 2 °/min. A subtração de fundo foi realizada considerando o espectro obtido por um recipiente sem amostra na mesma faixa de 2 θ .

Análise do índice de cristalinidade da celulose em bagaço de cana-de-açúcar utilizando técnicas de SSNMR quantitativas

Pré-tratamentos e hidrólise enzimática

Neste segundo estudo², em que foi realizado uma análise do índice de cristalinidade da celulose em bagaço de cana-de-açúcar. Foi proposto um esquema de edição espectral que

consiste na subtração dos espectros das biomassas por um referente a lignina “pura”. O espectro da lignina foi obtido via a fração líquida (licor), remanescente da etapa do pré-tratamento com 0,25% de NaOH. Esse licor foi submetido a um processo de diálise para remover as moléculas grandes (hemicelulose) e então liofilizadas para obter uma amostra sólida de lignina proveniente do espectro do bagaço de cana-de-açúcar, ou seja, assim foi possível obter um espectro de lignina referente ao bagaço de cana-de-açúcar.

As biomassas utilizadas nas análises passaram por um processo de pré-tratamento em duas etapas, a primeira destinada a remoção de hemicelulose, onde foi utilizado ácido sulfúrico (H_2SO_4) diluído a 1%, enquanto que a segunda etapa foi utilizado um tratamento alcalino com hidróxido de sódio (NaOH) em cinco diferentes concentrações (0,25%, 0,5%, 1%, 2%, 3% e 4%), destinada na remoção de lignina, essas etapas do pré-tratamento são semelhantes as apresentadas pela Figura 16. Todos os resultados desse trabalho foram comparados com os obtidos no artigo⁵, onde é possível encontrar uma boa caracterização do bagaço de cana-de-açúcar utilizando várias técnicas sendo uma delas SSNMR.

SSNMR

Experimentos de SSNMR foram realizados, na Embrapa instrumentação em São Carlos, utilizando um espectrômetro Bruker Avance 400, equipado com uma sonda Bruker 4 mm com sistema de MAS e dupla ressonância, as frequências de ^{13}C e ^1H são respectivamente 100,5 e 400,0 MHz. As frequências de rotação utilizada foram de 14 kHz que foram controlados por um sistema pneumático que assegura uma estabilidade de rotação maior do que ~ 2 Hz. Típicos valores de pulso $\pi/2$ iguais a 4 μs e 3,5 μs foram aplicados respectivamente para o ^{13}C e ^1H . O desacoplamento no próton foi da ordem de $\gamma B_1/2\pi = 70$ kHz, e todos os resultados foram processados utilizando transformada de Fourier com 2K pontos complexos, e utilizando a ferramenta de atenuação de ruído com alargamento de linha de 60 Hz por multiplicação exponencial (EM do inglês *exponential multiplication*). Os espectros quantitativos de ^{13}C foram medidos utilizando o método de excitação utilizando múltiplos-CP (MultiCP) descrito por Johnson e Schmidt-Rohr.²⁸ Um total de nove blocos de

CP de 1 ms cada foram implementados e o incremento na amplitude de rf (rampa) foi de (90-100%), ao passo que o último CP antes da aquisição foi executado com 0,8 ms e o mesmo incremento de amplitude na rampa. O tempo de reciclagem entre experimentos foi de 2 s e a duração do período de repolarização t_z foi de 0,9 s.²⁸

Esses valores são específico da amostra estudada e devem ser calibrados sempre comparando a um espectro quantitativo (DPMAS) característico da amostra. No caso de biomassas lignocelulósicas os períodos de duração característico são $t_z = 2T_{1,H} = 0,9$ s, o qual é referente a recuperação da relaxação ^1H spin-rede perdida devido a relaxação $t_{1\rho\text{H}}$ durante o período de polarização cruzada CP. Assim a soma de todos os períodos CP pode ser longo o suficiente para completa polarização de carbonos não protonados sem significant perda de magnetização por $t_{1\rho\text{H}}$. Os períodos CP padrões utilizados são de 1 ms enquanto que o último tem um período mais curto (0,8 ms) para evitar a perda de magnetização dos grupos com curto $T_{1,C}$ (como por exemplo CH_3 e CH_2 moveis), assim no final de todos os períodos CP somam 9,8 ms, ou seja, ao todo utilizamos 10 períodos CP. Todos os períodos CP possuíam uma rampa em que a amplitude de potência variava de 90 a 100%. No final da sequência, após o último CP, antes da aquisição é aplicado um pulso π no ^{13}C , conhecido como spin eco Hahn, para evitar adquirir sob o tempo morto e causa distorção espectral.

A técnica com excitação utilizando multi-CP seguido por um filtro dipolar tipo DIPSHIFT com duração $[1/2\nu_{\text{MAS}} - 180^\circ - 1/2\nu_{\text{MAS}}]$ foi aplicada nas amostras hidratadas, de modo a obter um espectro de ^{13}C seletivo aos sinais de hemicelulose e lignina de bagaço de cana-de-açúcar.⁶¹

XRD

XRD foram coletados em um difratômetro modelo Rigaku Rotaflex RU200B (Tóquio, Japão), utilizando radiação CuKalfa monocromática (1,54 Å). Com goniômetro digitalizado em uma faixa de 2θ entre 5° e 65° a uma velocidade de varredura de $2^\circ/\text{min}$. As amostras foram moídas antes da análise, até tamanhos menores que de 2 mm. Os valores de CI para todas as amostras foram calculados de acordo com os métodos de desconvolução e

intensidade de altura do pico. A deconvolução dos difractogramas foi realizada utilizando quatro picos Gaussianos para contabilizar as difrações cristalinas da celulose nos planos (101, $10\bar{1}$, 002 and 040) e uma Gaussiana referente a fracção amorfa da amostra. O índice de cristalinidade foi calculado como a razão entre a soma das áreas de todos os picos cristalinos e a área total do difratograma. O método da altura de pico considera a intensidade total do pico (I_{200}) e a intensidade devido a apenas o pico cristalino, o qual é obtido pela subtração da intensidade do halo amorfo ($I_{200}-I_{AM}$). Os valores de CI desse método é obtido como a razão $(I_{200}-I_{AM})/I_{200}$. A subtração de background foi realizada considerando o espectro obtido para um suporte de amostras vazio na mesma faixa de 2θ .

Propriedades morfológicas, estruturais e dinâmicas em plantas enriquecidas com ^{13}C utilizando técnicas de SSNMR multidimensionais

Enriquecimento com ^{13}C

Plantas com parede celular secundárias enriquecidas com ^{13}C são obtidas através de uma atmosfera abundante em gás carbônico enriquecido com ^{13}C , como mostrado na Figura 17, promovendo assim, através da fotossíntese, um enriquecimento homogêneo em todos os constituintes da parede celular secundária: polissacarídeo, lignina e proteína. Essas plantas são biomassas que, por sua vez, são fontes de materiais renováveis que podem gerar energia de forma renovável, como por exemplo na forma do bioetanol. Isso pode ser alcançado através da utilização dos açúcares estruturais presentes no interior da parede celular das biomassas. Esses açúcares encontram-se na forma polimérica constituindo a parede celular das plantas. Os principais polissacarídeos constituintes da parede celular são a hemicelulose e a celulose que se encontram imersos numa matriz de lignina. A lignina é um composto aromático que confere resistência à estrutura da planta, dificultando o acesso e ataque enzimático a esses polissacarídeos estruturais. Assim, quanto maior a quantidade de lignina presente numa determinada biomassa, maior a sua recalcitrância, ou seja, menor a sua digestibilidade.¹⁻⁵

Figura 17 – Câmara de crescimento.

Fonte: Elaborada pelo autor

SSNMR

Todos os experimentos de SSNMR foram conduzidos em temperatura ambiente em dois equipamentos distintos, sendo o primeiro utilizando uma sonda de 3,2 mm de dupla ressonância widebore Bruker (Karlsruhe, Alemanha) em um espectrômetro AVANCE III 850 MHz referente a um campo magnético superior a 20 T, que corresponde uma frequência de Larmor para o ^1H e o ^{13}C respectivamente igual a 850,2 e 213,8 MHz; e o segundo utilizando uma sonda de 3,2 mm de dupla ressonância Bruker (Karlsruhe, Alemanha) em um espectrômetro AVANCE III 600 MHz referente a um campo magnético superior a 14 T, que corresponde uma frequência de Larmor para o ^1H e o ^{13}C respectivamente igual a 599,4 e 150,8 MHz.

A calibração do deslocamento químico do ^{13}C foi determinada utilizando o pico da carbonila em 177,8 ppm da amostra padrão L-alanina, e a largura típica do pulso de 90° utilizada foi 3,5 μs para o hidrogênio ^1H e 3,0 μs para o ^{13}C . O desacoplamento típico utilizado no canal do ^1H foi *two-pulse phase-modulated* (TPPM) em que a frequência era aproximadamente 80 kHz e todos os resultados foram processados no programa Bruker Topspin 3.2 utilizando transformada de Fourier com 2K pontos complexos, e utilizando a ferramenta de atenuação de ruído com alargamento de linha de 60 Hz por multiplicação exponencial (EM do inglês *exponential multiplication*). Nos experimentos unidimensionais

1D, foram utilizados três formas diferentes de excitação, a primeira utilizando polarização cruzada ^1H - ^{13}C (CP, do inglês *cross-polarization*) em que moléculas rígidas das paredes celulares secundárias eram priorizada na magnetização, como é o caso da celulose, em que a rampa utilizada na excitação por CP teve uma variação de potência de 70-100% durante um tempo de contato de 1 ms; e as outras duas formas de excitação utilizando excitação direta no ^{13}C (DP, do inglês *direct-polarization*) com tempos de ciclagem longo e curto. Na excitação DP utilizando tempo de ciclagem curto ($d1 = 2$ s) moléculas com alta mobilidade, como por exemplo polissacarídeos, tem a magnetização priorizada, enquanto utilizando tempo de ciclagem longo (20 s) os espectros obtidos têm caráter quantitativo. Assim utilizando essas três formas diferentes de excitação é possível obter informações a respeito da mobilidade de alguns componentes moleculares da parede celular secundária de plantas e sobre as quantidades das mesmas.

Experimentos 2D de correlação de ^{13}C - ^{13}C foram conduzidos para permitir o assinalamento dos deslocamentos químicos dos diversos polissacarídeos da parede celular secundária. O experimento 2D J-INADEQUATE^{30,33-34} (do inglês, *incredible natural abundance double quantum transfer experiment*) correlação duplo quantum ou soma dos valores dos deslocamentos químicos de cada ^{13}C diretamente ligados quimicamente utilizaram, assim como os experimentos unidimensionais, duas formas diferentes de excitação (CP e DP 2 s) para permitir analisar melhor a diferença de mobilidade em alguns grupos que antes eram encobertos nos espectros unidimensionais devido a sobreposição de sinais. Os experimentos ^{13}C - ^{13}C acoplamento J-INADEQUATE usando DP foram realizados com a amostra girando a 14 kHz, com um tempo de ciclagem igual a 2 s que foi escolhido para priorizar a matriz móvel dos polissacarídeos, enquanto que a versão utilizando CP com tempo de contato de 1 ms foi utilizada para avaliar a fração rígida presente na parede celular secundária.

Para analisar as interações de proximidade intra e intermoleculares, foi utilizado a técnica 2D (PDSD), do inglês ^1H -driven ^{13}C spin diffusion^{30,33-34} com dois tempos de mistura (t_m) distintos: 50 ms e 1 s. Nesse experimento foi utilizado excitação por CP com tempo de contato igual a 1 ms de modo a privilegiar a aparição nos espectros dos grupos com restrição

móvel, e após a excitação foi inserido um filtro para eliminar o efeito causado pela relaxação T_1 quando o tempo de mistura é aumentado, em que a soma do tempo de mistura e do filtro T_1 nos dois diferentes experimento se mantivessem constantes, de modo que o efeito da relaxação T_1 em ambos os experimentos sejam compatíveis.

A mobilidade foi analisada utilizando a técnica 2D de correlação dipolar $^{13}\text{C}-^1\text{H}$ em cada deslocamento químico ⁶⁸ (DIPSHIFT, do Inglês *dipolar chemical shift correlation*) sob velocidade de rotação da amostra igual a 7812 Hz. O desacoplamento homonuclear no ^1H foi obtido utilizando sequência FSLG que utiliza o fator de escala igual a 0.577. O limite rígido da interação dipolar C-H utilizado para o modelo cristalino foi obtido através da amostra padrão alanina CH enriquecida com o valor de 22,5 kHz. A razão entre as medidas de acoplamento dos polissacarídeos e o limite rígido (22,5 kHz) forneceu o parâmetro de ordem para cada deslocamento químico estudado, ou seja quão móvel aquele grupo químico é em relação a uma amostra rígida padrão.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os resultados desta tese foram organizados em três subpartes, onde se discutirão os resultados obtidos por SSNMR comparando com os resultados de eficiência da hidrólise enzimática de uma coletânea de artigos publicados durante o doutorado. Na primeira parte são apresentados os trabalhos referentes aos estudos realizados em biomassas lignocelulósicas secas de modo a avaliar mudanças causadas por pré-tratamentos destinados a aumentar a eficiência da hidrólise enzimática, essa parte se constitui principalmente de dois artigos^{1,4} que foram publicados durante o doutoramento, apesar de serem publicados três artigos^{1,3-4} no gênero nesse período. A segunda parte dos resultados refere-se a um artigo² que relaciona o índice de cristalinidade da celulose em bagaço de cana-de-açúcar utilizando uma metodologia de técnicas de SSNMR propriamente desenvolvida para essa finalidade. Na terceira parte, um estudo minucioso da estrutura da parede celular é realizado com amostras de plantas enriquecida com ¹³C. Para isso foi utilizado uma metodologia de técnicas de SSNMR multidimensionais com auxílio das universidades de Cambridge e Warwick durante o doutoramento sanduíche realizado na Inglaterra.

4.1 Estudo dos efeitos dos pré-tratamentos na composição de biomassas lignocelulósicas

No artigo intitulado "*Effects of pretreatment on morphology, chemical composition and enzymatic digestibility of eucalyptus bark: a potentially valuable source of fermentable sugars for biofuel production – part I*"¹ são apresentados os resultados referentes aos estudos das cascas de eucalipto submetidos a um pré-tratamento ácido\alcalino. Nesse trabalho foram utilizadas a técnica CPMAS TOSS para uma caracterização da composição química das cascas, controle (somente lavada com água após a aquisição) e pré-tratadas, em dois clones *Eucalyptus grandis* (EG) e *Eucalyptus grandis* x *urophylla* (HGU). A atribuição dos deslocamentos químicos foi baseada em dados da literatura e na comparação direta das amostras de casca de eucalipto com as de bagaço de cana de artigos anteriores, sendo um utilizando as mesmas condições de pré-tratamento.^{5, 56-57}

Figura 18 - Espectros CPMAS TOSS em cascas de eucalipto EG e HGU. a) amostra controle; b) amostra após o tratamento com ácido clorídrico (HCl); e c) amostra após o tratamento com ácido e 4% NaOH.

Fonte: Adaptada de LIMA¹

A Figura 18 mostra os espectros CPMAS TOSS das amostras de casca de eucalipto antes e depois do pré-tratamento. Analisando a Figura 18a das amostras controle dos dois clones, os picos na região de 50 a 120 ppm são predominantemente característicos de carbonos da celulose, entretanto, com contribuições de sinais da hemicelulose e lignina. Os picos 3 em 62,6 ppm e 7 em 84 ppm são característicos, respectivamente, de carbonos C6 e C4 da fração amorfa da celulose, enquanto os picos 4 em 65,0 ppm e 8 em 88,9 ppm são característicos aos carbonos C6 e C4 da fração cristalina da celulose.^{6-7,9} Os sinais de lignina estão distribuídos ao longo de toda região espectral, porém, têm os picos indicados por 2, 11, 12, 13, 14, 15 e 16 exclusivos da lignina. Assim como a lignina, a hemicelulose tem sinais distribuído ao longo de toda região espectral, no entanto, a hemicelulose tem principais contribuições nos sinais em 1, 3, 6, 7, 9 e 17.^{5,56-57}

Após o pré-tratamento com ácido clorídrico (HCl), Figura 18b, nas amostras de EG e HGU ocorre uma melhora significativa na definição dos picos na região espectral entre 50 a 120 ppm, acompanhada por uma diminuição na intensidade dos picos 1 e 17. Isso está relacionado a uma eficiente remoção da hemicelulose, confirmando a eficiência do pré-tratamento com ácido na remoção da hemicelulose em cascas de eucalipto. Observando novamente a comparação entre as amostras controle EG e HGU, Figura 18a, nota-se que a amostra HGU tem uma melhor resolução espectral na região de 50 a 120 ppm que a amostra EG, assim como uma definição dos picos 5 e 6 na amostra controle HGU não observada na amostra EG, que apresenta apenas um ombro na região de campo baixo. Isso se deve ao fato da amostra HGU apresentar uma quantidade menor de hemicelulose que amostra EG, isso é corroborado pela comparação da integral do pico 17 nas duas amostras, que é visivelmente menor na amostra HGU.

Uma vez que todos os espectros estão normalizados pelo pico 10 (carbono C1 da celulose), o tratamento com NaOH 4%, após o HCl, reduz consideravelmente a fração lignina em ambas as amostras (EG e HGU), que pode ser verificado pela diminuição da intensidade dos picos 2 e 11-15 (Figura 14c). Isso indica uma considerável redução da fração de lignina em relação à celulose devido ao pré-tratamento com 4% de NaOH realizado após o tratamento com ácido. Outra informação importante obtida, como mencionado anteriormente, é a respeito da cristalinidade das cascas utilizando SSNMR. Isso foi obtido analisando os picos em 84 e 88,9 ppm (picos 7 e 8 na Figura 18) que são característicos respectivamente da celulose amorfa e cristalina. Assim, comparando esses picos nos espectros das Figura 18b e Figura 18c é possível perceber um aumento significativo na intensidade do sinal do pico da região cristalina em relação ao da região amorfa, o que pode indicar um possível aumento na cristalinidade das amostras.^{5,25} Porém essa análise é comprometida pela sobreposição dos sinais de lignina e hemicelulose na mesma região de análise e uma vez que o pré-tratamento remove essas unidades a alteração da intensidade do sinal dessa região pode estar ligada tanto a remoção de lignina ou hemicelulose.² No entanto, como na amostra submetida aos pré-tratamentos ácido e com NaOH a contribuição dos picos de lignina e hemicelulose deve ser inferior a 5%, a porcentagem de celulose cristalina e amorfa foi estimada a partir da relação

entre a intensidade de cada pico (área sob o sinal da região amorfa e cristalina) e a intensidade total (cristalina mais amorfa). O método aqui adotado utiliza duas Gaussianas, uma para região amorfa e outra para cristalina, como apresentado na Figura 18c pela figura inserida na parte superior direita. Com base nas áreas das Gaussianas, o índice de cristalinidade (CI) para as amostras de cascas de eucalipto está em torno de 40% com um erro estimado em $\pm 5\%$.

A Figura 19 mostra os espectros CPMAS^{TOSS} nos dois clones em função do pré-tratamento. Aqui é possível notar claramente que a diminuição dos picos 2, e 11-15 é gradual com o aumento das concentrações de NaOH. Ou seja, isso revela que quanto maior é a concentração na solução de NaOH mais eficiente é a remoção de lignina. Se for comparado os espectros nas amostras tratadas com 4% NaOH para as duas cascas, a intensidade relativa dos sinais da lignina na amostra HGU é menor que em EG, revelando assim, que o tratamento alcalino foi mais eficiente na amostra de HGU. Analisando os espectros das cascas para o pré-tratamento somente com NaOH que não passa pela etapa ácida, é possível observar que eles se assemelham muito com os espectros do pré-tratamento com mesma concentração de NaOH o qual passou primeiramente pela etapa ácida. Isso indica a eficiência do tratamento alcalino, com concentrações mais elevadas de NaOH, para remoção tanto de hemicelulose quanto da lignina sem a necessidade de ter passado por uma etapa ácida. Um fato interessante ocorre na região espectral entre 140 a 160 ppm. Aqui foi ajustado, para uma melhor observação, três curvas Gaussianas centradas respectivamente em 153, 148 e 144,6 ppm. De acordo com Martínez e colaboradores, o sinal em 153 ppm refere-se a carbonos aromáticos C3 e C5 em derivados esterificados da unidade de siringil da lignina, já o sinal em 148 ppm é devido a carbonos aromáticos C3 e C4 em derivados fenólicos da siringil da lignina e carbonos aromáticos C3 e C5 em derivados fenólicos da guaiacil da lignina.⁵⁸ A relação entre a intensidade dos picos em 153 e 148 ppm na amostra EG tratada com ácido é um indicativo de que essa amostra possui um maior conteúdo de lignina siringil quando comparada à mesma amostra de HGU. Enquanto que o sinal intenso em 144,6 ppm é relacionado a composto polifenólicos condensados com a lignina, responsáveis pela coloração avermelhada de algumas madeiras.^{1,58-59} A intensidade deste sinal diminui progressivamente com o aumento das concentrações de NaOH, modificando assim a coloração das amostras de vermelho escuro

para um tom de amarelo escuro, como mostrado pela Figura 20 que foi retirada da tese de doutorado da Marisa Aparecida de Lima.⁶⁰

Figura 19 - Espectros CPMAS TOSS em cascas de eucalipto EG e HGU para diferente etapa do pré-tratamento.
Fonte: Adaptada de LIMA¹

Figura 20 - Alteração da coloração das cascas de eucalipto em função da remoção de compostos polifenólicos com o aumento das concentrações de NaOH.

Fonte: Adaptada de LIMA⁶⁰

Além da análise dos resíduos sólidos, os licores provenientes de cada etapa do pré-tratamento também foram analisados. Na Figura 21, são apresentados os espectros CPMAS TOSS dos licores liofilizados de EG e HGU tratados com 0,25% ou 4% de NaOH, após o tratamento ácido, além do licor proveniente da amostra tratada apenas com 4% de NaOH. Esses espectros são basicamente constituídos por sinais de lignina e hemicelulose, sendo os sinais de hemicelulose indicados pela letra h. Nas amostras tratadas com 0,25% de NaOH, Figura 21a, os sinais de hemicelulose que remanesceram do tratamento ácido nas duas cascas mostram que o pré-tratamento com ácido não foi capaz de remover por completo toda a hemicelulose, no entanto, os sinais da lignina no hidrolisado de HGU são mais intensos que aqueles característicos da hemicelulose, enquanto no hidrolisado de EG observa-se o oposto. Isso está de acordo com o maior conteúdo de hemicelulose encontrado na amostra de EG. Os sinais da lignina são predominantes no licor da amostra tratada com 4% de NaOH, confirmando que a hemicelulose pode ser removida em concentrações menores, entretanto, para uma eficiente remoção da lignina, concentrações maiores de NaOH são requeridas, Figura 21b. Os resultados das amostras tratadas apenas com 4% de NaOH, Figura 19 e Figura 21c, com auxílio de outras técnicas espectroscópicas ¹ confirmam que o tratamento apenas com 4% de NaOH é efetivo para remoção de ambos os compostos, hemicelulose e lignina.

Figura 21– Espectros CPMAS TOSS do licor (liofilizado) das cascas de eucalipto proveniente de diferentes condições de pré-tratamento. a) do tratamento com 0,25% de NaOH, com prévia etapa de tratamento ácido; b) do tratamento com 4% de NaOH, com prévia etapa de tratamento ácido; c) do tratamento com 4% de NaOH (sem prévia etapa de tratamento ácido). Onde h é referente aos sinais da hemicelulose.

Fonte: Adaptada de LIMA¹

Figura 22– Resultados de eficiência da hidrólise enzimática para as amostras de cascas de eucalipto.
Fonte: Adaptada de LIMA¹

Os resultados obtidos por SSNMR desse primeiro trabalho ¹ foram comparados com os resultados das porcentagens dos rendimentos da hidrólise enzimática (Figura 22). De acordo com essa figura, quanto maior a concentração de NaOH nos pré-tratamentos, passando pela etapa ácida, maior é o rendimento da hidrólise enzimática e como mostrado pelos resultados de SSNMR mais eficiente é a remoção de lignina e hemicelulose. Portanto a quantidade de lignina está fortemente relacionada com a recalcitrância das biomassas. Um fato interessante de mostrar é que o pré-tratamento com NaOH a 4%, sem passar pela etapa ácido, foi o que obteve melhor índice de rendimento, mesmo os resultados de SSNMR mostrarem remoção de lignina e hemicelulose compatíveis com aquele pré-tratamento com Ácido 1% + NaOH 4%. Isso se deve ao fato que o pré-tratamento ácido causa formação de inibidores para o processo de hidrólise enzimática. ¹

O segundo artigo, intitulado: “*Evaluating the composition and processing potential of novel sources of Brazilian biomass for sustainable biorenewables production*” ⁴ contribuiu para o entendimento dos efeitos das diferentes condições de pré-tratamento sobre diferentes temperaturas em seis biomassas lignocelulósicas: novamente nas duas cascas de eucalipto já estudadas, *Eucalyptus grandis* (EG) e *Eucalyptus grandis x urophylla* (HGU), e em quatro biomassas de gramíneas, *Saccharum officinarum* (bagaço de cana-de-açúcar), *Panicum maximum*, *Pennisetum purpureum* e *Brachiaria brizantha*.

Na Figura 23 são mostrados os espectros CPMAS^{TOSS} obtidos para as amostras de bagaço de cana-de-açúcar submetidas às diferentes condições de pré-tratamento, o qual se mostraram muito semelhantes aos obtidos para todas as gramíneas aqui estudadas e vai ser mostrado apenas os espectros referentes ao bagaço de cana-de-açúcar para não ocupar demasiado espaço. Novamente aqui, todos os espectros foram normalizados pelo pico referente ao carbono C1 da celulose (pico 10) para uma possível comparação entre espectros. A atribuição dos deslocamentos químicos foi realizada com base na comparação com trabalhos previamente publicados.^{5,56-57}

Figura 23– Espectros CPMAS TOSS obtidos para as amostras de bagaço de cana-de-açúcar após as diferentes condições de pré-tratamento. Os sinais aproximadamente 40 ppm que aparecem em todas as amostras controle é um contaminante não identificado.

Fonte: Adaptada de LIMA⁴

Os espectros das amostras pré-tratadas como água quente (Figura 23a) ou bissulfito de sódio (Figura 23b) em diferentes temperaturas mostraram-se muito semelhante aos espectros obtidos para as amostras controles, referente as amostras sem pré-tratamentos, em todas as

gramíneas, sugerindo assim que esses pré-tratamentos mesmo em alta temperatura não promovem uma remoção eficiente da hemicelulose e lignina.

Já para as amostras pré-tratadas com ácido sulfúrico (H_2SO_4), a temperatura de até 90°C , também apresentam espectros muito semelhantes aos da amostra controle (Figura 23c). Porém, para temperaturas iguais ou acima de 130°C ocorre uma clara redução nos sinais de hemicelulose, picos 1 e 17, com pouco alteração nos sinais de lignina, picos 2, 11-16. Isso mostra que para o bagaço e as demais gramíneas, o pré-tratamento utilizando ácido sulfúrico a uma temperatura igual ou acima de 130°C já é suficiente para uma eficaz remoção de hemicelulose, sem uma alteração significativa sobre a fração de lignina. Para as amostras pré-tratadas com hidróxido de sódio (Figura 23d), os sinais de hemicelulose já estão ausentes mesmo para temperaturas mais baixas, 50°C , enquanto os sinais de lignina são reduzidos gradualmente com o aumento da temperatura do pré-tratamento. No entanto, para as temperaturas de 130°C e 180°C o teor de lignina nas amostras (gramíneas) parece ser semelhante, assim o pré-tratamento com NaOH para temperaturas iguais ou acima de 130°C é suficiente para remoção tanto da lignina quanto da hemicelulose.

As análises utilizando SSNMR também forneceram informação sobre possíveis alterações na cristalinidade das celulosas nas amostras após diferentes tratamentos. No caso das amostras submetidas ao pré-tratamento alcalino em temperatura elevada (180°C), uma diminuição na proporção da intensidade entre os picos 3 e 4, bem como entre os picos 7 e 8, foi observada, evidenciando assim um possível aumento na cristalinidade da celulose, o que pode ser interpretado como uma consequência da remoção da fração amorfa da celulose. Porém como já comentado aqui, essa análise pode ser prejudicada devido a sobreposição dos sinais de hemicelulose, lignina e celulose na região de análise, ou seja, não podemos afirmar precisamente se as alterações nas intensidades daquela região são referentes à uma alteração na cristalinidade ou devido à remoção de umas das frações.² Para sanar isso é necessário utilizar um método que consiga separar o espectro em diversas componentes, uma somente referente a hemicelulose, outra referente somente a fração de lignina e outra referente à celulose. E essa separação espectral é um dos estudos que será discutido a seguir.²

Figura 24 – Espectros CPMAS TOSS obtidos para as amostras de casca de *E. grandis x urophylla* (HGU) após as diferentes condições de pré-tratamento

Fonte: Adaptada de LIMA⁴

A Figura 24 mostra os espectros CPMAS TOSS das cascas de *E. grandis x urophylla* (HGU), submetidas aos diferentes pré-tratamentos. As análises utilizando SSNMR foram realizadas para as demais gramíneas, e essas apresentaram resultados muito semelhantes aos discutidos anteriormente. Entretanto, no caso das cascas de eucalipto, foram observadas algumas distinções importantes. Aqui, como nas gramíneas, somente os espectros para uma

espécie de casca será mostrado devido a semelhança entre eles. Porém como discutido no trabalho anterior as amostras EG e HGU tem suas diferenças intrínsecas, sendo apresentado maior recalcitrância na amostra EG devido maior quantidade na composição de lignina e hemicelulose.¹

Assim como observado para as gramíneas, os espectros de HGU tratados com água quente (Figura 24a) e bissulfito de sódio (Figura 24b) mostraram-se muito semelhantes aos obtidos para a amostra controle, confirmando a ineficácia para remoção da hemicelulose e lignina desses tratamentos. Além disso, os espectros CPMAS TOSS mostraram que nas amostras submetidas ao pré-tratamento ácido (Figura 24c), o teor de hemicelulose apenas diminuiu com temperaturas acima de 130°C, o que também ocorreu nas gramíneas. Entretanto, para as cascas submetidas ao tratamento alcalino, observou-se uma eficiente remoção da hemicelulose em todas as temperaturas (Figura 24d), enquanto que o teor de lignina foi gradualmente reduzido até 180°C. Mostrando aqui a necessidade de temperaturas mais elevadas para a remoção da lignina devido a uma maior recalcitrância das cascas em relação às gramíneas.

Os resultados obtidos por SSNMR desse trabalho⁴ também foram comparados com os resultados das porcentagens dos rendimentos da hidrólise enzimática (Figura 25). De acordo com essa figura, os pré-tratamentos com água quente e bissulfito de sódio não mostraram mudanças significativas no rendimento da hidrólise enzimática em relação à amostra controle e como mostrado pelos resultados de SSNMR não ocorre remoção de lignina e hemicelulose. Reforçando assim, que a quantidade de lignina está fortemente relacionada com a recalcitrância das biomassas. Os pré-tratamentos que mostraram alteração significativa na hidrólise enzimática em relação à amostra controle, foram os pré-tratamentos com ácido e os com NaOH, onde os resultados obtidos por SSNMR mostraram remoção de hemicelulose e lignina. Um fato interessante de mostrar é que a temperatura nos pré-tratamentos é um fator importante, pois como mostrado por SSNMR e os resultados de rendimento da hidrólise enzimática (Figura 25) é necessária uma temperatura superior à temperatura de ativação para que o pré-tratamento seja mais eficiente aumentando assim a eficiência na remoção de hemicelulose e lignina e consequentemente um aumento na eficiência da hidrólise enzimática.⁴

Figura 25 – Resultados de eficiência da hidrólise enzimática e redução de açúcares para as amostras de bagaço de cana-de-açúcar.

Fonte: Adaptada de LIMA⁴

4.2 Análise do índice de cristalinidade da celulose em bagaço de cana-de-açúcar utilizando técnicas de SSNMR quantitativa

O índice de cristalinidade (CI) vem sendo utilizado para interpretar mudanças que ocorrem na estrutura da celulose após uma etapa de pré-tratamento, que pode ser físico, físico-químico e/ou biológico. Enquanto alguns resultados obtidos em biomassas lignocelulósicas mostraram um progressivo aumento dos valores de CI em função do pré-tratamento realizado,^{9,62-63} outros estudos publicados demonstram que o índice de cristalinidade permanece quase inalterado após tratamento ácido.⁶⁴ Por outro lado, também foi mostrado que os valores de CI pode variar significativamente, dependendo da escolha do método de medição.²⁰ Além disso, tal como referido nas referências⁶⁵⁻⁶⁶ o índice de cristalinidade de biomassa, dependendo da forma que é obtido, é também sensível a alterações na composição, que é provável ocorra durante a etapa de pré-tratamentos, por exemplo, a remoção de lignina e hemicelulose. Por isso, é crucial diferenciar entre a cristalinidade da biomassa em geral do CI da celulose no interior da biomassa.

Os valores de índice de cristalinidade de biomassa lignocelulósica, calculados por difração de raios-X (XRD) ou ^{13}C SSNMR, usualmente refletem o total da cristalinidade da amostra. Por outro lado, a informação específica sobre a cristalinidade da celulose nativa, ou seja, a fração dos domínios ordenados *in situ*, na biomassa, sem a necessidade de extraí-la da biomassa (geralmente referidos como celulose cristalina) é difícil de ser obtida. Isso acontece porque a hemicelulose, lignina e a celulose desordenada contribuem em conjunto para o mesmo sinal de fase amorfa.²⁰ Assim, a possibilidade de avaliar os valores de CI da celulose nativa em biomassa com menor influência das frações de lignina e hemicelulose é altamente desejável. Na verdade, isso é particularmente importante para uma melhor avaliação das possíveis variações na CI ocorrendo como consequência de pré-tratamentos, quando as frações de hemicelulose e lignina variam significativamente.

Nesse tema, uma importante conquista foi realizada por Ragauskas e outros cooperadores, o qual propuseram um método de isolamento da celulose. O efeito do isolamento na ultraestrutura foi estudado por técnicas de SSNMR,⁷ o qual mostraram que aparentemente ocorre um aumento da cristalinidade da celulose de até 10%. Esse método particularmente foi importante para uma melhor elucidação da variação dos valores de CI em consequência dos pré-tratamentos aplicados, quando a proporção de hemicelulose e lignina variam significante.

Como mostrado pelas referências,^{7;62} a influência do índice de cristalinidade sobre a recalcitrância em biomassas lignocelulósicas foi por longo tempo mau interpretado, porém recentes resultados obtidos apontam que uma eficiência dos pré-tratamentos em reduzir a recalcitrância não é claramente correlacionada com um decréscimo nos valores de CI, no entanto, mudanças nas frações e distribuição de lignina e hemicelulose, morfologia e porosidade, e grau de polimerização mostram-se mais importantes que mudanças na cristalinidade da amostra.^{7,54,65} Em particular, como concluído pela referência,⁷ melhora na acessibilidade das enzimas, de modo a clivar com maior facilidade a celulose, é o principal fator para reduzir a recalcitrância, levando a cristalinidade como aspecto de ordem secundário menos importante.

Uma motivação para o estudo de cristalinidade em biomassas é que na literatura não existe uma clara distinção entre cristalinidade em celulose pura e em biomassas lignocelulósicas. Assim, encontramos métodos de análise de cristalinidade criados para celulose pura sendo utilizados em biomassas, sem a mesma distinção, os quais podem causar certa confusão nos dados disponíveis. Os métodos de determinação da cristalinidade (ou mais especificamente do índice de cristalinidade - CI) utilizando difração de raios-X (XRD) e SSNMR se baseiam na comparação entre a intensidade (ou área) de sinais identificados como sendo proveniente da fase amorfa e da fase cristalina da amostra. Neste sentido, em amostras que contém um único componente, por exemplo, celulose pura, essa comparação provê diretamente o índice de cristalinidade daquele componente. No entanto, quando a amostra é constituída por mais de um componente, por exemplo, biomassas lignocelulósicas, deve-se tomar um certo cuidado com a aplicação desses métodos, já que de fato se obtém é a cristalinidade da amostra como um todo e não as frações individuais.^{19-20,62} Outro fator importante na análise de cristalinidade diz respeito a escolha correta de instrumento e a análise aplicada na medida, pois isso pode acarretar variações nos índices de cristalinidade.¹⁹ Nesse trabalho, utilizaremos um esquema de edição espectral em SSNMR para obter informação sobre possíveis variações da cristalinidade da celulose em biomassas lignocelulósicas, durante o pré-tratamento e o ataque enzimático. Os resultados serão comparados aos valores de cristalinidade obtidos por XRD utilizando duas análises: uma pelo método de deconvolução e outra por comparação de intensidades.¹⁹⁻²⁰

No trabalho² apresentado aqui, foi proposto um método para obter informação a respeito da variação que ocorre no índice de cristalinidade da celulose em bagaço de cana-de-açúcar após específicos tratamentos utilizando SSNMR. Isso foi alcançado utilizando técnicas de SSNMR com edição espectral de modo a remover os sinais de lignina dos espectros padrões de bagaço. Aqui foi utilizada a técnica quantitativa MultiCP recentemente proposta pela referência²⁸, o qual obtém os espectros de alta resolução quantitativo em um tempo de aquisição reduzido e boa relação sinal/ruído se comparado com a técnica padrão DPMAS. O método tem o inconveniente de exigir um espectro padrão de lignina, mas pode ser eficientemente utilizado para estimar o CI da celulose dentro de biomassa intacta na análise

das variações da cristalinidade de celulose em amostras com origem semelhante. Além disso, os resultados obtidos de CI por SSNMR foram comparados com os XRD usando métodos de deconvolução e altura de pico, revelando que, apesar do aumento claro do índice de cristalinidade da biomassa, conforme medido pela XRD, não existem diferenças significativas no CI da celulose in situ induzida pelos pré-tratamentos químicos submetidos aqui. Esses resultados definitivamente confirmam que deve se ter grande cuidado ao associar o índice de cristalinidade da biomassa como um dos principais fatores modificantes da taxa hidrólise enzimáticas em biomassa lignocelulósica.^{7,66}

No trabalho², o índice de cristalinidade (CI) em amostras de bagaço de cana-de-açúcar em função do pré-tratamento ácido/alcalino foi estudado utilizando técnicas quantitativas de SSNMR, isso mostrou-se necessário devido ao erro causado por medidas não quantitativas realizadas em trabalhos anteriores que inferiam CI não muito confiável.

As sequências de pulsos utilizadas na análise por SSNMR são apresentados na Figura 26. A sequência de pulsos MultiCP (Figura 26a) fornece espectros quantitativo ¹³C SSNMR²⁸ com boa sensibilidade, permitindo assim obter espectros com boa relação sinal-ruído em um tempo reduzidos. Usando este processo, as alterações na amostra do bagaço de cana foram seguidas após cada etapa do pré-tratamento e hidrólise enzimática.

Figura 26 – Método de SSNMR utilizado. a) esboço da sequência de pulsos da técnica MultiCP utilizada para obter espectros quantitativos de ^{13}C . b) esboço da sequência de pulsos da técnica MultiCP com filtro dipolar utilizada para obter espectros seletivos aos compostos de hemicelulose e lignina em biomassas hidratadas.

Fonte: Adaptada de BERNARDINELLI²

O papel principal desse trabalho é elucidar mudanças que ocorrem nos valores de CI da celulose da biomassa utilizando técnica quantitativa de SSNMR. Anterior a isso, é necessário identificar as linhas dos espectros SSNMR para cada componente das biomassas. Na Figura 27a é mostrado o espectro da amostra sem tratamento de bagaço de cana-de-açúcar. O padrão espectral dos picos se assemelha bastante com a referência⁵, no entanto, com algumas diferenças na intensidade relativa dos sinais devido agora ser espectros quantitativos utilizando a técnica MultiCP.

A primeira informação sobre a composição química das amostras de bagaço de cana, obtida aqui, mostra semelhança aos trabalhos.^{1,3-5}. Baseado nessas referências^{1,3-5,56-57} as linhas de 1 a 17 são similarmente assinaladas, com diferentes cores para cada componente principal da biomassa, sendo utilizado as cores, preto, vermelho e azul para representar respectivamente a celulose, hemicelulose e lignina. No entanto, devido à complexidade química da biomassa, linhas com forte sobreposição são esperadas e observadas. Isso torna-se

evidente na Figura 27b, que mostra o espectro de Multi-CP da amostra de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com 1% de H_2SO_4 . Pois a ausência das linhas 9, 16 e 17 (devido à remoção da fração da hemicelulose), mostra um aumento na resolução espectral na região de 50-70 ppm, o que sugere a completa remoção de outras linhas de hemicelulose que se sobreponham os sinais de celulose nessa região. Além disso, também há uma sobreposição com os sinais de lignina, como se mostra na Figura 27c, em que o espectro do hidrolisado liofilizado (sobrenadante), resultante do pré-tratamento de duas etapas da amostra de bagaço (primeiro com 1% de H_2SO_4 e, em seguida, com 0,25% de NaOH) é apresentada. Como anteriormente discutido ⁵, este espectro é composto apenas de sinais de lignina, que se encontram distribuídos ao longo de toda a região espectral. Sinais rotulados como 2 (55,7 ppm), 11 (115,3 ppm), 12 (126,5 ppm), 13 (133,5 e 137,5 ppm), 14 (147,6 ppm) e 15 (153,0 ppm) na Figura 27a são exclusivamente devido à lignina^{5,58-59}, enquanto outros sinais de lignina coincidem com picos de celulose, por exemplo, para 61,6; 73,6; 84,0; 88,0 e 104,7 ppm.⁵⁸⁻⁵⁹

Figura 27 – Espectros SSNMR MultiCP com e sem filtro dipolar obtidos em bagaço de cana-de-açúcar antes e após tratamentos: a) Espectro de bagaço de cana-de-açúcar hidratada sem tratamento adquirido com a técnica MultiCP; b) Espectro de bagaço de cana-de-açúcar hidratada após o tratamento com H_2SO_4 adquirido com a técnica Multi-CP; c) Espectro do sobrenadante liofilizado do pré-tratamento 1% H_2SO_4 + 0.25% NaOH adquirido com a técnica Multi-CP; d) Espectro de bagaço de cana-de-açúcar hidratada sem tratamento adquirido com a técnica Multi-CP em conjunto com filtro dipolar; e) Espectro de bagaço de cana-de-açúcar hidratada após pré-tratamento com H_2SO_4 adquirido com a técnica MultiCP em conjunto com filtro dipolar. A linha pontilhada é centralizada em um sinal da lignina com maior deslocamento químico (178 ppm) para mostrar claramente que difere do sinal da hemicelulose que sobrepoem esse sinal.

Fonte: Adaptada de BERNARDINELLI²

Embora a maior parte dos sinais de lignina na Figura 27c podem ser atribuídos exclusivamente à lignina, existem picos, particularmente aqueles na região de 50-120 ppm, que necessitam ser certificados como não tendo uma contribuição da hemicelulose. Assim, para uma avaliação mais precisa dos valores de CI da celulose, é importante confirmar praticamente todos os sinais quem desaparecem devido a remoção da hemicelulose com o tratamento com 1% de H_2SO_4 . Para fazê-lo, o método descrito por Kikuchi Komatsu⁶⁹ foi aplicado. Nesse momento, o espectro SSNMR MultiCP utilizando um filtro dipolar de ^{13}C (Figura 26b) é obtido de uma amostra lignocelulósica hidratada. O filtro dipolar remove os

sinais dos segmentos rígidos (celulose). Isso ocorre pois os movimentos moleculares das cadeias de celulose não são afetados pela hidratação, entretanto ela leva a um aumento na taxa de movimentos moleculares nos segmentos de hemicelulose e lignina hidratados.

Portanto, a aquisição do espectro utilizando filtro dipolar em amostras de biomassa hidratadas resulta num espectro contendo apenas sinais de hemicelulose e lignina. Esse procedimento foi empregado em amostra de bagaço de cana-de-açúcar hidratada com água Milli-Q e em seguida aplicando o MultiCP filtro dipolar (Figura 26b), o que resultou no espectro mostrado na Figura 27d. A supressão dos sinais de celulose é evidente, uma vez que apenas os sinais da lignina e hemicelulose permanecem^{58-59; 69} (indicado na Figura 27d). Note que os sinais de lignina aparecem com os mesmos desvios químicos do espectro da Figura 27c, mas, devido à aplicação do filtro dipolar e a hidratação da amostra, as intensidades relativas e as larguras não são diretamente comparáveis por não se tratar mais de espectros quantitativos. Apesar disso, por exclusão, os sinais da hemicelulose podem ser identificados, incluindo as linhas 1 e 17, que são claramente visíveis no espectro de bagaço sem tratamento; esses sinais da hemicelulose são detectados a 63; 73,2; 102,6; 107,8 e 159,4 ppm, que estavam antes escondidos devido sobreposição com a celulose no espectro do bagaço-de-cana sem tratamento.

Figura 27e mostra o espectro MultiCP com filtro dipolar do bagaço de cana hidratado após o pré-tratamento ácido (H_2SO_4). A remoção de todas as linhas de hemicelulose é claramente observada, que mostra a eficácia do tratamento com ácido para remover os componentes de hemicelulose. Note-se que os deslocamentos químicos das duas linhas, presentes entre 170-200 ppm, não têm o mesmo deslocamento químico como o pico hemicelulose mostrado em Figura 27a e d (linha vertical tracejada). Comprovando assim, que esse sinal remanescente é referente apenas a lignina.

Informações sobre CI pode ser obtido usando SSNMR por deconvolução das linhas em 84 e 88 ppm, os quais são atribuídos aos átomos de carbono da celulose C4 amorfa e cristalina, respectivamente. No entanto, como mostrado na Figura 27c, os sinais de lignina também podem contribuir para o espectro nessa região. O ponto positivo é que a contribuição dos sinais da hemicelulose é menor e pode ser suprimido pelo tratamento das amostras de

bagaço com H_2SO_4 . Assim, a idéia geral por trás do cálculo do CI da celulose nativa é a obtenção de espectros quantitativos de ^{13}C associados apenas aos carbonos de celulose, isso é, sem a interferência da lignina. Isso pode ser conseguido através da subtração do espectro multiCP da lignina pura pelos espectros da biomassa escalonado por um fator determinado combinando as amplitudes dos sinais em comuns em ambos os espectros, por exemplo, linhas 12 e 13 na Figura 27a. O espectro de lignina pura podem ser, em princípio, obtido a partir de uma amostra padrão, mas como a composição da lignina varia de acordo com a origem e o tipo de biomassa, é mais adequado utilizar uma amostra de lignina extraída a partir da mesma biomassa. Felizmente, o espectro do sobrenadante liofilizado obtido após o pré-tratamento de duas etapas com 1% de H_2SO_4 e 0,25% de NaOH contém apenas os sinais da lignina,⁵ como mostrado na Figura 27c, assim é possível obter o espectro de lignina padrão.

Figura 28 – Espectros MultiCP obtidos para as amostras de bagaço de cana-de-açúcar em três etapas do pré-tratamento (controle - untreated, etapa ácida e etapa ácida + alcalina) comparados com o espectro padrão da lignina (vermelho pontilhado). Em anexo, o gráfico dos valores de lignina presente em cada etapa do pré-tratamento obtidos pela normalização do espectro de lignina padrão com os espectros da biomassa em cada etapa do pré-tratamento.

Fonte: Adaptada de BERNARDINELLI²

A Figura 28 mostra os espectros MultiCP obtidos para o bagaço de cana-de-açúcar apenas em três etapas do pré-tratamento (amostra controle que foi lavada apenas com água – sem tratamento, amostra que passou por um tratamento com ácido sulfúrico e amostra que após ter passado pelo tratamento ácido passou também por um tratamento alcalino com 4% de NaOH). Os assinalamentos são idênticos aos dos resultados anteriores.^{1,4-5} Todos os espectros dos pré-tratamentos foram comparados com o espectro da lignina, curva vermelha pontilhada da Figura 28, obtido como descrito anteriormente.² Esse espectro característico da lignina foi normalizado com os espectros das biomassas pré-tratadas pelo sinal em 147 ppm (linha 14) que é o sinal da lignina sem sobreposição com outro grupo. É possível observar uma boa concordância entre os sinais do espectro de lignina com os sinais atribuídos a lignina na amostra de bagaço em todas as amostras, com e sem tratamento. A semelhança entre os sinais da lignina no sobrenadante liofilizado e aqueles nas amostras com pré-tratamento pode ser notado. No entanto, deve-se indicar que, para as biomassas de tipos diferentes o padrão de lignina pode ser diferente e esta seria uma desvantagem do método. De fato, pelo menos para as gramíneas, o tratamento com (1%) de H_2SO_4 + (0,25%) NaOH em condições de temperatura e tempo descritos na seção experimental, seria um método adequado para a extração de lignina que podem ser utilizados como padrão em nosso método de subtração e avaliação dos valores de CI. Com a normalização do espectro de lignina padrão ao da biomassa foi possível obter uma a quantidade de lignina presente em cada etapa do pré-tratamento, assim esses valores foram inseridos na Figura 28. Podemos perceber que a remoção de lignina é gradativa e crescente com o aumento de concentração de NaOH^{1,5} e concordam com os resultados obtidos por HPLC do artigo.⁵ Mostrando que a partir de um pré-tratamento com concentrações maiores que 2% de NaOH a remoção de lignina é maior que 80%.

Figura 29 – Esboço de como foi realizado a subtração espectral do espectro da biomassa após ter passado por um pré-tratamento ácido, com o intuito de remover por completo a hemicelulose, por um espectro da lignina de modo a obter como produto final um espectro somente com relação a celulose presente em cada etapa do pré-tratamento.

Fonte: Adaptada de BERNARDINELLI²

Conhecido o espectro da lignina, é possível remover a contribuição desse composto da biomassa em cada etapa do pré-tratamento através de subtração espectral. Assim, podemos obter os sinais referentes à celulose em cada etapa do pré-tratamento sem a sobreposição dos sinais da lignina. Porém para que isso funcione a etapa de remoção da hemicelulose é necessária. E como mostrado anteriormente, a etapa do pré-tratamento com ácido mostrou-se muito eficiente na remoção da hemicelulose, o qual viabiliza a subtração espectral e a obtenção dos espectros somente com a fração da celulose no bagaço de cana-de-açúcar. Somente com a obtenção de um espectro exclusivo da celulose presente na biomassa podemos realizar as estimativas do índice de cristalinidade (CI) da celulose referente a cada etapa do pré-tratamento. A subtração é realizada nas etapas do pré-tratamento após o tratamento ácido como o mostrado na Figura 29, resultando apenas nos sinais da celulose. Portanto, com base na deconvolução dos sinais carbonos C4 da celulose^{9, 20, 62}, é possível obter o CI da celulose nativa em bagaço de cana. Note-se que, na amostra de bagaço de cana-de-açúcar não tratada

na Figura 30, os sinais de hemicelulose estão ainda presentes, no entanto esses sinais não contribuem de forma significativa no intervalo de 80 para 88 ppm, assim o CI da celulose ainda pode ser aproximadamente estimada a partir da abordagem subtração com um pequeno erro associado a medida.

A Figura 30 mostra os espectros MultiCP após a subtração espectral, ou seja, sem a presença dos sinais de lignina. Com isso, evidenciou que na amostra controle tem somente a contribuição da celulose e hemicelulose. Essa hemicelulose é completamente removida pelo pré-tratamento ácido, obtendo após isso, uma amostra somente com lignina e celulose. Ou seja, No espectro tratado com ácido sulfúrico (H_2SO_4), a utilização da subtração espectral de um espectro característico da lignina confirmou claramente a completa remoção de hemicelulose.

Desse modo, após a edição espectral proposta aqui pode-se obter um espectro somente da fração da celulose presente na biomassa, o que permite que a cristalinidade seja avaliada pelos métodos desenvolvidos para celulose pura.^{9,20,62} Essa análise da cristalinidade torna-se possível, pois, uma vez que possui espectros predominantemente de celulose, é possível analisar a região espectral onde tem diferenciação dos sinais das frações cristalina (65 - linha 4 - e 88 ppm - linha 8-) e amorfa (63 - linha 3 - e 84 ppm - linha 7) da celulose sem a contribuição dos sinais de lignina e hemicelulose - Figura 30.

Figura 30 – Espectros MultiCP após a subtração espectral do sinal de lignina de três etapas do pré-tratamento: controle, ácido e ácido + alcalino.

Fonte: Adaptada de BERNARDINELLI²

Depois de realizar esse procedimento de subtração espectral, as regiões espectrais de 80 a 86 ppm e 86 ppm a 94 foram integradas para avaliar a intensidade das linhas associadas com as fases da celulose ordenados e desordenados, respectivamente.^{9,20,62} Utilizamos para isto, duas Gaussianas centradas em 84 ppm e 88 ppm como mostrado pela Figura 31a para as amostras sem tratamento, pré-tratada com ácido e a pré-tratada com ácido e 4% NaOH. Para avaliar a influência da remoção de lignina nos valores de CI para a celulose obtido por SSNMR, o mesmo procedimento também foi realizado usando os espectros sem subtração. Os resultados de CI são mostrados na Figura 31b. Os valores de CI obtidos sem utilizar a abordagem por subtração espectral (círculo na Figura 31b) revela um ligeiro aumento progressivo mediante pré-tratamento alcalino, devido à remoção da lignina. No entanto, os valores de CI obtidos utilizando a subtração espectral (estrela em Figura 31b) permaneceu praticamente constante mediante o pré-tratamento. Portanto, dentro das incertezas experimentais, ambos os cálculos apontam para uma constância de CI da celulose in situ. Assim, apesar do método de subtração fornecer uma avaliação provavelmente mais exata do CI, o método Multi-CP também fornece uma estimativa fiel do CI da celulose in situ mesmo subtração espectral. Isso é justificado pela pequena presença de sinais de lignina e hemicelulose apenas na região espectral do C4 até mesmo para a biomassa intacta.

Figura 31 – a) Espectros MultiCP focados na região espectral entre 80 - 94 ppm com as respectivas deconvolução por Gaussianas e Lorentzianas para as amostras sem tratamento, pré-tratadas com 1% de ácido sulfúrico e com 1% de ácido sulfúrico mais 4% de NaOH. b) Valores dos índices de cristalinidade obtido por SSNMR através de integral e deconvolução por Gaussianas/Lorentzianas para as amostras de bagaço de cana-de-açúcar com e sem o método de subtração. As barras de erro foram calculadas com estimativa na variação causada pela razão da relação sinal/ruído sobre a integral do sinal em questão.

Fonte: Adaptada de BERNARDINELLI²

A possibilidade de obter um espectro da celulose sem interferentes permite o uso de uma abordagem baseada em deconvolução para avaliar os valores de índice de cristalinidade da celulose. Para isso, com base nas referências,^{9;61;64} a linha 7 na Figura 28, que é atribuída ao átomo de carbono C4 de celulose desordenadas, foi ajustada utilizando duas linhas

Gaussianas em 83,1 e 84,2 ppm, devido às superfícies de fibrila acessíveis; e uma em 81,4 ppm, devido às superfícies de fibrila inacessíveis. Na região da linha 8 da Figura 28 (C4 da celulose ordenada), uma linha Gaussiana em torno de 88,5 ppm foi utilizada para contabilizar a celulose para-cristalinas, e três linhas Lorentzianas foram usadas para explicar a celulose cristalina, em 87,9 ppm para a fase β da celulose em 88,7 ppm para a fase $\alpha + \beta$ e em 89 ppm para a fase α . Assim, o CI é calculado pela razão entre as intensidades integradas das linhas associadas à celulose ordenada e a área total das linhas atribuídos ao átomo de C4 (celulose ordenada + desordenadas).^{9,20,62} Figura 31a mostra um exemplo da deconvolução do sinal do carbono C4 da celulose, usando linhas de Gaussianas e Lorentzianas para amostras não tratadas e amostras de bagaço pré- tratadas com 1% de H₂SO₄ e 1% de H₂SO₄ + 4% de NaOH.

Os valores de CI foram calculados pela deconvolução dos espectros subtraído e são mostrados Figura 31b para a amostra não tratada, bem como para as amostras pré-tratadas com H₂SO₄ e NaOH em diferentes concentrações. O cálculo dos valores de CI foram realizados para todas as amostras, mostrando assim que o índice da celulose é praticamente constante (CI ~ 45%), sugerindo que a cristalinidade de celulose não é consideravelmente alterada pelos pré-tratamentos.

Para proporcionar uma comparação entre os valores de CI calculados utilizando a análise acima mencionada por SSNMR com os obtidos utilizando pelos métodos de difração de raios-X padrão, difractogramas de XRD foram adquiridos e são apresentados nas Figura 32a e Figura 33a. Os resultados de CI para as amostras do bagaço também foram obtidos por XRD comum dos métodos mais confiáveis,¹⁹⁻²⁰ conhecido como método por deconvolução XRD, em que se utilizam Gaussianas para diferenciar a fração cristalina da amorfa. Esse método requer um software, aqui nesse trabalho foi utilizado o PeakFit 4, para separar fase amorfa e cristalina dos difractogramas de XRD. Além disso, quatro gaussianas foram utilizadas para ajustar a curva de celulose cristalina (reflexões 101,10 $\bar{1}$,002,040) e uma Gaussiana foi usada para fração amorfa da biomassa (celulose amorfa, hemicelulose e lignina). O índice de cristalinidade (CI) foi calculado a partir da razão entre a área de todos os picos cristalinos e a área total.

Outro método de análise dos resultados CI por XRD, conhecido como método de comparação de intensidades dos picos, foi realizado para comparar os resultados, método esse que é o mais empregado em biomassas e se baseia na comparação direta da intensidade do pico cristalino em I_{002} e esse pico corrigido pela intensidade da região referente a região amorfa ($I_{002}-I_{AM}$), após a subtração de fundo com recipiente de amostra vazio.¹⁹⁻²⁰ Nessa análise, embora de fato seja a mais empregada na literatura, fica evidente que a fase cristalina é superestimada, uma vez que a largura do pico 002 é consideravelmente maior que a do pico amorfo.^{64;66} Vale a pena lembrar que o CI obtido por XRD refere-se a amostra por completo e não somente a fração de celulose como obtido por SSNMR, pois a região amorfa observada em XRD não faz distinção entre os compostos (extrativos, celulose amorfa, hemicelulose e lignina). Portanto, se ocorrer remoção de lignina ou hemicelulose da amostra, o CI tende a aumentar devido a uma redução proporcional do halo amorfo do difratograma. No entanto, os valores obtidos em celulose pura pelos métodos de XRD por deconvolução e SSNMR tendem a concordar, enquanto que o método de XRD por comparação de intensidades tende a superestimar a fração cristalina.^{64;66}

Figura 32 – a) Difratomogramas de raios-X das amostras de bagaço: controle, com pré-tratamento ácido e pré-tratada com ácido mais a etapa com 4% NaOH, com a deconvolução por cinco Gaussianas, sendo que quatro são referentes a celulose cristalina (101, $10\bar{1}$, 002, 040) e uma referente fração amorfa da amostra (celulose amorfa, hemicelulose e lignina). b) valores de índice de cristalinidade obtidos por XRD com o método de deconvolução para as amostras do bagaço de cana-de-açúcar.

Fonte: Adaptada de BERNARDINELLI²

A Figura 32a mostra os difratogramas de XRD para as amostras de bagaço: controle, pré-tratada com ácido e pré-tratada com 4% NaOH após ter passado pelo tratamento ácido, com as respectivas deconvoluções por Gaussianas, com o intuito de obter o índice de cristalinidade (CI). Com o método de deconvolução do difratograma XRD foi possível obter os valores CI para todas as amostras. Esses valores estão apresentados no gráfico da Figura 32b. O valor de CI para amostra controle é da ordem de 35% enquanto que para amostra pré-tratada com ácido sulfúrico é da ordem de 47%, esse aumento de cristalinidade (12%) no bagaço evidenciado aqui, não pode ser atribuído à variação na cristalinidade da celulose, e sim, causado pela remoção da hemicelulose, como evidenciado pelas medidas de SSNMR, componente que contribui para a fração amorfa da amostra. A medida que é realizado o pré-tratamento com NaOH em altas concentrações ocorre um novo aumento na cristalinidade, para valores de CI da ordem de 57%, nesse aumento podemos dizer novamente que não ocorre alteração na cristalinidade da fração de celulose como os resultados mostrados por SSNMR, e sim esse aumento é devido à remoção da lignina, que também contribui para o halo amorfo, resultando no aumento da cristalinidade da amostra como um todo. Porém essa remoção da lignina, como mostrado na Figura 28, tem valores em torno de 80% de remoção para os pré-tratamentos com NaOH em concentrações maiores que 2%, ponto em que os valores de CI são constantes, ou seja pré-tratamentos com concentração de NaOH maior que 2% não apresenta mudança nos do CI, comprovando novamente que a variação na CI, observada por XRD, é causada somente pela remoção da hemicelulose ou lignina.

Para fins de comparação utilizamos também o método de comparação das intensidades descrito anteriormente para analisar o CI das biomassas, Figura 33. Utilizando esse método obtivemos o mesmo caráter de crescimento dos valores de CI e assim a mesma discussão anterior pode ser aplicada, Figura 33b. Porém, fica evidente que os valores de CI estão superestimando a fase cristalina, já que a variação de CI ocorre em torno de 45 a 75% diferentemente de 35 a 55% pelo método de deconvolução.

Um ponto que vale mencionar é que técnicas de SSNMR avaliam a cristalinidade de todo o domínio que apresenta conformação local, enquanto XRD analisa a cristalinidade da

amostra principalmente em domínios que apresentam ordem de longo alcance. Portanto, a CI visto por SSNMR e XRD pode não ter exatamente o mesmo valor.^{64;66}

De modo a entender os efeitos causados pelo tratamento enzimático, obtemos os espectros MultiCP das amostras que passaram por esse tratamento (linha tracejada em vermelho, Figura 34) após ter passado por cada etapa do pré-tratamento ácido/básico, essas etapas da hidrólise enzimática estão representadas pela parte em vermelho da Figura 16, e comparamos esses espectros com aqueles obtidos para amostras após os pré-tratamentos correspondentes (linha contínua em preto na Figura 28).

Os espectros apresentados na Figura 28 foram normalizados pelo sinal em 56,2 ppm (grupos OCH_3) que é referente ao sinal mais intenso da lignina. Supondo que o tratamento enzimático não consome lignina da amostra, podemos obter uma estimativa das quantidades de celulose consumidas durante esse tratamento. O consumo de celulose nas amostras foi colocado no gráfico apresentado no canto esquerdo da Figura 34. Assim, percebemos que ocorre uma diminuição progressiva nos sinais da celulose quanto mais severo foi o pré-tratamento ácido/alcalino, ou seja menos celulose está presente na biomassa, isso está de acordo com a quebra da recalcitrância devido a remoção de lignina que ocorre quando aplicado o pré-tratamento com altas concentrações de NaOH, facilitando assim, a digestibilidade da celulose pelas enzimas. O consumo de celulose chega a valores maiores que 90% em amostra tratadas enzimaticamente após ter passado por um pré-tratamento com concentrações maiores que 2% de NaOH, onde pela Figura 28, foi mostrado que nesse caso a remoção de lignina é superior a 80%. Esses valores de remoção estão de acordo com os valores de eficiência do tratamento enzimático, obtidos no artigo da referência.⁵

Figura 33 – a) Difratomogramas de raios-X das amostras de bagaço: controle, com pré-tratamento ácido e pré-tratada com ácido mais a etapa com 4% NaOH, com as setas indicando onde é realizado o método de obtenção do CI pela subtração das intensidades do pico em (002) pelo amorfo. b) valores de índice de cristalinidade obtidos por XRD com o método da razão entre intensidades para as amostras do bagaço de cana-de-açúcar.

Fonte: Adaptada de BERNARDINELLI²

Figura 34 – Comparação dos espectros quantitativos MultiCP obtidos para as amostras de bagaço durante o pré-tratamento ácido/alcalino (linha contínua preta) com os espectros que passaram pelo tratamento enzimático (linha tracejada vermelha). Esses espectros foram normalizados pelo pico em 56,2 ppm (grupos OCH₃) referente ao pico mais intenso da lignina considerando que a quantidade de lignina não variou após o tratamento enzimático. Assim conseguimos obter uma estimativa da quantidade de celulose consumida com o tratamento enzimático que está posto em gráfico na parte superior da figura.

Fonte: Adaptada de BERNARDINELLI²

Os espectros quantitativos MultiCP SSNMR também foram utilizados para estimar a quantidade de celulose removido por hidrólise enzimática. Isso foi conseguido através da

comparação dos espectros das amostras não hidrolisadas com os da fracção sólida remanescente após a hidrólise enzimática⁵, Figura 34. Tendo em conta que o tratamento enzimático não provocaria alterações na fracção da lignina, não se espera que os sinais de lignina sejam alterados pela hidrólise enzimática. Esses espectros foram normalizados pelo pico em 56,2 ppm (grupos OCH₃) referente ao pico mais intenso da lignina considerando que a quantidade de lignina não variou após o tratamento enzimático. Assim, os sinais de lignina nos espectros da fracção sólida remanescente após a hidrólise podem ser dimensionados para que correspondam as amostras não hidrolisadas, como mostrado na Figura 34. Ao fazer isso, a relação entre as intensidades da linha 10 em 104,7 ppm, atribuída a C1 de carbono de celulose, é uma medida da quantidade relativa da celulose digerida, inserção na Figura 34.

Como pode ser observado, Figura 34, a digestão da celulose atinge valores superiores a 90% para as amostras pré-tratadas com 1% de H₂SO₄ e NaOH a 2% ou superior. Esses resultados seguem as mesmas tendências que foram previamente observados para os rendimentos enzimáticas em bagaço de cana-de-açúcar sob pré-tratamentos similares e quantificados por HPLC.^{5,67}

Os valores de índice de cristalinidade da celulose na fracção sólida remanescente após a hidrólise enzimática também foram avaliadas por SSNMR, utilizando o processo de subtração. As deconvoluções dos sinais dos carbonos C4 da celulose para as amostras não tratadas, as amostras pré-tratadas com 1% de H₂SO₄ e 1% de H₂SO₄ + 4% de NaOH são mostrados na Figura 35a. Os valores de CI da celulose de todas as amostras analisadas foram calculados usando integração²⁰ simples e deconvolução^{9,62} são mostrados na Figura 35b. Pode-se observar que os valores de CI mostrar apenas 10% de aumento sobre a hidrólise enzimática, que indica que o coquetel enzimático utilizado aqui tem uma pequena preferência na digestão da celulose cristalina ou amorfa, essa idéia de que as enzimas usadas aqui não mostram uma clara preferência pela celulose na fase organizada ou desorganizada deve ser tomado com cautela.⁷ No entanto, deve-se salientar que a fracção de celulose em cada espectro SSNMR refere-se à celulose remanescente nas amostras, isso é, a fracção que não foi consumido pelas enzimas. Por exemplo, a fracção remanescente de celulose nas amostras pré-tratadas com NaOH em concentrações superiores a 2%, é inferior a 10% da quantidade inicial

de celulose. Além disso, não se deve desconsiderar a possibilidade de *hornification*⁶⁹⁻⁷⁴ após secagem, que é o processo de assumir uma fase cristalina bem estruturada que dificilmente pode ser revertida. Assim, essa hipótese não pode ser excluída, como sendo a causa da não variação significativa dos valores de CI da celulose sobre os pré-tratamentos. Esse fato seria algo que poderia ser investigado e o método aqui apresentado seria uma excelente ferramenta para isso.

Figura 35 – a) Espectros quantitativos MultiCP focados na região espectral entre 80 - 94 ppm com as respectivas deconvolução por duas Gaussianas para as amostras que passaram pelo tratamento enzimático após o pré-tratadas com ácido sulfúrico e ácido mais 4% NaOH. b) Valores dos índices de cristalinidade obtido por SSNMR através de deconvolução por duas Gaussianas para as amostras de bagaço de cana-de-açúcar após o tratamento enzimático.

Fonte: Adaptada de BERNARDINELLI²

Os resultados mostram a eficácia do método proposto como uma ferramenta para avaliar as variações de CI da celulose in situ de biomassas de tipos semelhantes. Apesar de um aumento claro na CI da biomassa como medido por XRD, não observou variações significativas de CI da celulose dentro de biomassa depois de um pré-tratamento especial de 1% H_2SO_4 / 0,25-4% NaOH por SSNMR, mostrando que o pré-tratamento alcalino aparentemente não causa alteração na cristalinidade da celulose proporcionando uma nova releitura dos resultados obtidos por XRD. Avaliou-se também que os valores de CI da celulose em fração sólida de biomassa variou aproximadamente 10% depois da hidrólise enzimática, que mostra um ligeiro aumento na cristalinidade, no entanto essa celulose é referente apenas a 10% da celulose que remanesce do tratamento enzimático.

4.3 Propriedades morfológica, estrutural e dinâmicas em plantas enriquecida com ^{13}C utilizando técnicas de SSNMR multidimensionais

Essa terceira parte dos resultados é referente à um trabalho desenvolvido nos últimos meses em um Doutorado Sanduíche no exterior, realizado durante cinco meses na Universidade de Cambridge no grupo de Bioquímica e na Universidade de Warwick com o grupo de ressonância magnética nuclear do estado sólido (SSNMR); ambos grupos da Inglaterra que trabalham em cooperação.

Este projeto teve como objetivo principal a realização de um estágio de Doutorado Sanduíche junto ao grupo do Prof. Paul Dupree do departamento de Bioquímica da Universidade de Cambridge, em que utilizou técnicas de SSNMR mais avançadas e também amostras especialmente desenvolvidas para compreender melhor os aspectos fundamentais das paredes celulares das plantas e suas relações com as suas propriedades físico-químicas. Os objetivos mais específicos foram utilizar técnicas de SSNMR multidimensionais em alto campo magnético na avaliação de modificações estruturais, dinâmicas e interacionais que ocorrem nas paredes celulares secundária de plantas. Uma vez que o grupo do Prof. Dupree é renomado na produção de plantas com componentes da parede celular secundária enriquecidos em ^{13}C e o grupo dos Profs. Ray Dupree e Steven Brown é conceituado em

SSNMR foi possível realizar experimentos de RMN multidimensionais em equipamentos de última geração com alto campo magnético em amostras especialmente desenvolvidas com alto teor de ^{13}C , possibilitando assim, dar um passo adiante no entendimento estrutural da parede celular secundária de plantas. Além disso, esse estágio de doutoramento sanduíche contribuiu para uma melhor formação do bolsista tanto na área de biomassa como na especialização na área de SSNMR.

Em um trabalho anterior realizado pelo grupo de pesquisa do Prof. Ray Dupree e Prof. Brown em Warwick em parceria com o grupo do Prof. Paul Dupree em Cambridge foi mostrado evidências que o xilano apresenta uma variedade de conformações em amostras de parede celular de *Arabidopsis Thaliana* secas, e a maioria dos xilanos assumem uma conformação diferente a encontrada em solução,³⁰ interpretação essa que foi obtida baseada em reconhecer mudança no ângulo de ligação dos glicosídicos. Além desse trabalho outros trabalhos³¹⁻³² indicam que a interação entre a celulose e o xilano em amostra de plantas de parede celular secundária causa uma mudança conformacional no xilano diferenciando assim a assumida quando em solução (*three-fold helical screw*), Figura 36c, o qual era responsável assim por formar uma estrutura de microfibras cristalinas. Isso possibilitou inferir que os novos sinais do xilano com deslocamentos químicos distinto ao adotado quando em solução fosse uma conformação específica (*two-fold helical screw*, Figura 36c) no xilano quando interage com a celulose.

Figura 36— a) unidade repetitivas na celulose e hemiceluloses b) Esboço das estruturas: da celulose, xilano, xiloglucano e pectina c) possíveis conformações assumidas pelo xilano quando interagente e não interage com a celulose.

Fonte: Elaborada pelo autor

Nesse trabalho foi realizado uma análise utilizando SSNMR multidimensional em amostras de hastes de *Arabidopsis Thaliana* em seu estado natural (sem secagem). Em paralelo as medidas de SSNMR multidimensional o grupo dos Prof. Dupree e Prof. Brown da Universidade de Warwick estão desenvolvendo uma análise de predição espectral *in silico* que será capaz de obter se as conformações adotadas pelo xilano quando interagindo com a celulose são realmente *two-fold helical screw* como sugerida nesse trabalho. Esses dados de predição preliminares mostraram promissores e indicaram que o xilano coexiste em duas

distintas conformações na parede celular secundária sendo a conformação adotada pelos xilanos quando interagindo com a celulose bem próxima a proposta aqui, pois na predição a mudança da conformação *three-fold helical screw* para a *two-fold helical screw* o carbono 4 tem uma mudança de deslocamento químico brusca para maiores frequências. No entanto esses resultados de predição espectral não serão mostrados aqui, pois as análises ainda não estão concluídas.

Evidências experimentais mostram que os sinais referentes ao xilano com conformação *two-fold helical screw* se refere ao xilano com proximidade espacial da celulose. E esse xilano está presente apenas na amostra *Arabidopsis Thaliana* sem mutação, pois o mutante com deficiência de celulose na parede celular secundária (*irx3*) não apresenta essa conformação no espectro de RMN, o que comprova novamente que esses sinais se referem ao xilano em interação com a celulose. Além disso, os resultados mostram que o *irx3* apresenta maior mobilidade devido a deficiência em celulose. Em resumo, esse trabalho apresenta evidências da interação entre os dois polissacarídeos majoritários nas paredes celulares secundárias facilitando assim o entendimento maior sobre a estrutura da parede celular secundária em plantas, que pode viabilizar o desenvolvimento de uma abordagem mais eficiente na obtenção de energia na forma de biocombustíveis a partir de biomassas similares.

Apesar dos artigos³⁰⁻³² terem evidenciados uma possível existência de uma nova conformação do xilano (em possível interação com a celulose) em amostras de plantas com parede celular secundária secas, não era claro se essa conformação existe somente quando essas amostras são secas, nem que realmente esse xilano estava em interação com a celulose. Portanto, foram realizadas medidas utilizando SSNMR multidimensional em amostras nunca secas de *Arabidopsis Thaliana* com parede celular secundária enriquecidas com ¹³C na forma natural (WT) e uma mutação que apresentava deficiência na síntese da celulose na parede celular secundária (*irx3*).

Na Figura 37 são mostrados os espectros de RMN unidimensionais com as amostras em natura (WT) e a mutação (*irx3*) sob rotação da amostra em torno do ângulo mágico (10 kHz) utilizando distintas formas de excitação (polarização cruzada CP e direta DP). É possível constatar, através da comparação direta entre os espectros de ambas as amostras, que

o mutante *irx3* apresenta uma deficiência considerável de celulose, como é facilmente visualizado pela redução de intensidade dos sinais referentes a celulose assinalados pela abreviatura C nos espectros da amostra *irx3* em comparação com amostra em natura WT. Contudo, uma discussão mais aprimorada sob os espectros unidimensionais a respeito dos sinais do xilano em diferentes conformações é muito difícil devido a sobreposição desses sinais com os sinais de celulose que são os mais intensos nos espectros. Assim, a utilização de técnicas de SSNMR multidimensionais se mostra muito vantajosa para esse caso, porém para realizar essas medidas multidimensionais o enriquecimento das amostras com ^{13}C é essencial.

Figura 37 – espectros de RMN unidimensionais 1D sob rotação das amostras (WT e *irx3*) em torno do ângulo mágico utilizando excitação por: a) polarização cruzada (CP) com tempo de contato igual a 1 ms b) polarização direta (DP) com tempo de ciclagem entre experimento igual a 2 s c) polarização direta (DP) com tempo de ciclagem entre experimento igual a 20 s.

Fonte: Elaborada pelo autor

A Figura 38 mostra os espectros de SSNMR 2D utilizando a técnica CP-J-INADEQUATE em que possibilita acompanhar a estrutura molecular dos diferentes constituintes da parede celular secundária de plantas com uma maior definição espectral que as técnicas 1D, essa definição espectral é referente a contornar o problema de sobreposição espectral visualizada nos experimento 1D. Assim, via J-INADEQUATE, através da utilização do acoplamento J, é possível avaliar claramente os deslocamentos químicos dos distintos grupos e assim inferir informação sobre diferentes conformações e definições da estrutura. Na Figura 38a é mostrado o espectro 2D completo da amostra de *Arabidopsis Thaliana* em natura utilizando CP como excitação e um tempo de mistura igual a 0,6 ms. O espectro mostra picos alargados (valores maiores que 2 ppm de alargamento) indicando rigidez dinâmica na matriz dos polissacarídeos. Como o esperado os sinais mais intensos nesses espectros são referentes a celulose, mostrando maior proporção dos mesmos, seguidos por sinais de xilano e xiloglucano.

A partir desse espectro completo (Figura 38) é possível perceber pelo menos 6 tipos distintos de celulose em dois domínios bem distintos (referentes a uma fração da celulose organizada e outra desorganizada). Para os sinais do xilano (Xn) que estão acompanhados por linhas guias, é possível constatar dois domínios, sendo um o domínio 2 que apresentam sinais pouco intensos, como mostrado pela Figura 38a com o mesmo deslocamento químico ao xilano em solução (*three-fold helical screw*) e o outro domínio 1 apresentando sinais bem intensos, referente ao xilano com deslocamento químico distinto ao xilano em solução (*two-fold helical screw*). Esse último ocorre quando o xilano interage com a celulose devido à proximidade espacial, como será mostrado posteriormente.

Figura 38 – espectros de SSNMR multidimensionais CP-J-INADEQUATE na amostra de *Arabidopsis Thaliana* em natura (WT) a) espectro completo com tempo de mistura 0,6 ms com linhas que mostram as duas formas do xilano b) zoom na região dos carbonos 5 e 6 com tempo de contato de 1,1 ms c) zoom na região dos carbonos 5 e 6 com tempo de contato de 2,2 ms.

Fonte: Elaborada pelo autor

Para o xilano, o carbono que mais sente a mudança conformacional é o carbono 4, que no *domínio* 1 encontra-se em 82,5 ppm, enquanto que para o xilano no *domínio* 2 é em ~78 ppm, Figura 38a. Assim, na amostra de *Arabidopsis Thaliana* in natura o xilano se

apresenta majoritariamente no domínio 1, sendo evidenciado apenas um resquício no domínio 2, Figura 38a.

Um fator importante de observar é que a visualização dos sinais do xilano necessita nos experimentos de CP-J-INADEQUATE de um tempos de mistura (t_m) curtos, pois com o aumento do tempo de mistura reduzimos drasticamente os sinais desse xilano até o completo desaparecimento, como mostrado pela Figura 38b,c. Na Figura 38b é mostrado um zoom da região dos carbonos 4-5 no espectro CP-J-INADEQUATE utilizando tempo de mistura de 1,1 ms, os sinais do xilano domínio 1 estão bem reduzidos em comparação com a Figura 38a para tempo de mistura de 0,6 ms, enquanto para o xilano no domínio 2 para $t_m = 1,1$ ms não é visualizado como mostrado na Figura 38b. Na Figura 38c é apresentado um zoom da região dos carbonos 4-5 no espectro CP-J-INADEQUATE utilizando tempo de mistura de 2,2 ms, aqui não é possível visualizar nenhum sinais referente ao xilano, mostrando a necessidade de utilizar tempo de mistura curto para a visualização do xilano.

Outro ponto a ressaltar, é que alguns sinais referentes a celulose são suprimidos em t_m longo o que mostra que provavelmente o xilano compartilha a mesma propriedade dinâmica que uma parte da celulose causando um rápido tempo de relaxação transversal T_2 resultando em uma não visualização desses sinais nos espectros 2D CP-J-INADEQUATE com tempo de mistura longo.

Para investigar a hipótese que a grande diferença do deslocamento químico do carbono 4 do xilano no domínio 1 é devido a interação de proximidade com a celulose, foram realizados experimentos capazes de inferir sobre proximidade espacial intermolecular: 2D CP-PDSD (Figura 39).

No experimento 2D CP-PDSD usando tempo de mistura bem curto (50 ms), Figura 39a, assim, é possível observar somente picos de correlação intramoleculares, assim realizando esse experimento foi identificado quais são os espectros da celulose domínio 1 e 2 e o xilano domínio 1. No entanto, realizando o mesmo experimento com tempo de mistura longo, como por exemplo 1 s, é possível observar os picos de correlação intra- e intermolecular e assim é possível verificar interações intermoleculares de proximidade

Figura 39 – espectros de SSNMR multidimensionais 2D CP-PDSD na amostra de *Arabidopsis Thaliana* em natura (WT) com tempo de mistura igual: a) 50 ms, mostrando interações de proximidade intramolecular e b) 1 s mostrando interações de proximidade intra e intermolecular.

Fonte: Elaborada pelo autor

No lado direito da Figura 39 são mostrados os espectros das fatias nos espectros 2D CP-PDSD em um determinado valor de deslocamento químico, sendo o espectro em azul referente a fatia do espectro com tempo de mistura curto (50 ms) e vermelho o espectro para fatia do espectro com tempo de mistura longo (1 s). Na fatia em 62,6 ppm referente ao carbono 6 da celulose desorganizada domínio 2 (C_6^2), para o espectro em azul (t_m curto) é mostrado somente conectividade intramolecular referente a celulose domínio 2, como claramente visto pela interação C_4^2 - C_6^2 , ou seja celulose desorganizada, enquanto que para o espectro em vermelho referente a t_m longo é claramente visível a interação intermolecular

entre as celulosas domínio 1 (organizada) com a celulose domínio 2 (desorganizada) mostrada pelo aparecimento dos sinais da celulose domínio 1 em C4 e C6, mostrando assim a proximidade espacial entre as celulosas em ambos os domínios organizado e desorganizado. As mesmas conclusões obtidas pela fatia em 62,6 ppm podem ser obtidas pelas fatias em 65,3 ppm (C_6^1), 84,1 ppm (C_4^2) e 89,0 ppm (C_4^1) que são sinais da celulose em diferente deslocamento químicos e domínio. Como por exemplo, a fatia azul (t_m curto) em 65,3 ppm mostra somente interações intramoleculares da celulose no domínio 1, ou seja, celulose organizada. Se for analisado essa mesma fatia para t_m longo (vermelha), é possível visualizar interações intermoleculares da celulose domínio 1 com a celulose domínio 2, ou seja interação da celulose organizada com a desorganizada, similar ao obtido pela fatia em 62,6 ppm.

Agora analisando os sinais referentes ao xilanos, para a fatia em 64,2 ppm referente ao carbono 5 do xilano em ambos domínios ($Xn_5^{1,2}$). Em t_m curto (linha azul) é possível visualizar a interação intramolecular do $Xn_5^{1,2}$ com o Xn_4^1 em 82,5 ppm, o inverso também pode ser dito se for analisado a fatia em 82,5 ppm (Xn_4^1). Já em t_m longo (linha vermelha) é observado a interação intermolecular entre xilano e celulose, ou seja entre $Xn_5^{1,2}$ e $C_6^{1,2}$ e entre Xn_4^1 e Xn_5^1 , $C_6^{1,2}$, como melhor apresentado pelo zoom em A e B no lado esquerdo da Figura 39. Em outras palavras, o espectro azul (tempo de mistura curto) só mostra interação intramolecular entre os sinais do xilano enquanto que o espectro vermelho apresenta além de contribuição de sinais do xilano, os sinais da celulose. Constatando assim a proximidade espacial entre o xilano e a celulose, o que provavelmente causa a grande diferença do valor de deslocamento químico para o carbono 4 da xilose nessas plantas de parede celular secundária nunca seca. Vale comentar que todas as informações obtidas pelo lado esquerdo da Figura 39 poderiam ser obtidas pelo lado direito (espectro 2D), no entanto achei mais fácil utilizar essa discussão pela familiaridade dos leitores com espectros unidimensionais.

Para constatar realmente se a interação entre a celulose e o xilano são responsáveis pela grande diferença de deslocamento químico do carbono 4 do xilano foram realizados experimentos 2D CP- e DP-J-INADEQUATE, respectivamente Figura 40 e Figura 41, em ambas as amostras de *Arabidopsis Thaliana* in natura e a mutação com deficiência de celulose (*irx3*), deficiência essa comprovada por espectros de SSNMR 1D, Figura 37.

Figura 40 – espectros de SSNMR multidimensionais 2D CP-J-INADEQUATE nas amostras de *Arabidopsis Thaliana* in natura (WT) (em azul) e mutante com deficiência em celulose na parede celular secundária *irx3* (em verde). Adicional a figura é mostrado a fatia em ambas as amostras em 146,8 ppm de duplo-quantum, de modo a evidenciar os sinais do xilano domínio 1.

Fonte: Elaborada pelo autor

Na Figura 40 são mostrados os espectros, 2D utilizando a técnica CP-J-INADEQUATE, de comparação das amostras *Arabidopsis Thaliana* em natura (WT) e o mutante com deficiência de celulose *irx3*. Quando CP é utilizado como excitação, assim os sinais de grupos rígidos (devido ao forte acoplamento dipolar CH) como a celulose serão priorizados, no entanto a única diferença entre as amostras ocorre nos sinais do xilano, sendo que a amostra WT apresenta apenas sinais de xilano no domínio 1 enquanto que a amostra *irx3* somente xilano domínio 2, como claramente mostrados pela fatia no duplo-quantum em 146,8 ppm a ausência do xilano domínio 1 na amostra *irx3*. Como aqui foi realizado o experimento utilizando polarização cruzada uma dúvida poderia surgir: o não aparecimento de xilano domínio 1 na amostra *irx3* pode ser devido esse grupo ser altamente dinâmico a ponto

de o CP não ser capaz de excitá-lo. E para não restar dúvida, foram realizadas medidas 2D DP-J-INADEQUATE com tempo de ciclagem curto ($d_1 = 2$ s), Figura 41, que prioriza grupos móveis (grupos com t_1 curto). Os espectros utilizando polarização direta mostram picos estreitos comprovando espectros seletivos a grupos com mobilidade dinâmica. E novamente, apesar da celulose não aparecer no espectro devido a sua rigidez, foi observado somente xilano no domínio 2 na amostra *irx3*, pois o xilano no domínio 1 tem propriedades comparadas a celulose o que inviabilizam a sua visualização na amostra WT mostrando que a celulose provavelmente tem um papel primordial na diferença de deslocamento químico que ocorre no carbono 4 do xilano no domínio 1, ou seja, no favorecimento da formação dessa nova conformação no xilano. Ou seja, na amostra que não possui celulose na parede celular secundária o xilano domínio 1 não está presente, além dos resultados anteriores mostrarem que provavelmente o xilano no domínio 1 compartilha algumas propriedades semelhantes a celulose.

Figura 41 – espectros de SSNMR multidimensionais 2D DP-J-INADEQUATE nas amostras de *Arabidopsis Thaliana* em natura (WT), espectro na cor azul, e mutante com deficiência em celulose na parede celular secundária *irx3*, espectro na cor verde.

Fonte: Elaborada pelo autor

Como mostrado anteriormente se o xilano está intimamente ligado com a celulose na amostra in natura WT e não na amostra mutante *irx3*, provavelmente a mobilidade do xilano na amostra *irx3* será maior que na amostra WT. Assim foram realizados experimentos para analisar mobilidade molecular dos polissacarídeos: DIPSHIFT com diferentes formas de excitação (CP, DP 2 s e DP 20 s) de modo a contornar o problema de sobreposição que ocorre nos espectros 1D pela supressão dos sinais da celulose.

A metodologia de SSNMR denominada Dipolar Chemical Shift Correlation (DIPSHIFT) utiliza a interação dipolar heteronuclear (no caso entre ^{13}C e ^1H) local para

avaliar movimentos moleculares. A técnica DIPSHIFT serve para estudar movimentos moleculares no chamado regime intermediário (com tempos de correlação na faixa de μs a ms), fornecendo informações sobre a escala de tempo e da geometria de reorientação das moléculas. Onde a amplitude do sinal é modulada pela evolução sob a interação dipolar ^{13}C - ^1H .

Assim, medindo a amplitude do sinal em diferentes grupos químicos, ditados por distintos deslocamentos químicos Figura 42, em função do tempo em que a interação dipolar heteronuclear é refocalizada t_1 é possível obter uma curva que inicia com amplitude 1 decai até um valor que depende da magnitude da interação dipolar magnética heteronuclear entre o núcleo de ^{13}C e o ^1H vizinho em $t_1 = t_r/2 = 64 \text{ ms}$ e retorna ao valor 1 quando t_1 for igual a t_r (tempo de rotação macroscópico da amostra - MAS) devido a formação do eco rotacional da interação CH, Figura 43. E através da simulação dessa curva DIPSHIFT é possível obter um parâmetro de ordem comparando o valor da interação dipolar C-H com o valor obtido para uma amostra padrão rígida, que aqui foi utilizada a glicina com o valor padrão igual a 22,5 kHz. Com esse valor de parâmetro de ordem, é possível inferir se o grupo estudado está rígido ou com dinâmica na faixa intermediária, resultados que serão mostrados na Figura 44.

Figura 42 – espectros de SSNMR 2D CP-DP(2 s e 20 s)-DIPSHIFT nas amostras de *Arabidopsis Thaliana* em natura (WT) e mutante com deficiência em celulose na parede celular secundária *irx3*.

Fonte: Elaborada pelo autor

Figura 43 – curvas DIPSIFT com simulação de modo a obter o parâmetro de ordem para cada deslocamento químico dos polissacarídeos presentes na parede celular secundária das plantas de Arabidopsis.

Fonte: Elaborada pelo autor

Na Figura 44 são mostrados os parâmetros de ordem obtidos pela curva DIPSIFT para diferentes formas de excitação. A barra em preto corresponde aos parâmetros de ordem utilizando polarização cruzada CP onde privilegia aparição dos sinais de grupos rígidos como por exemplo a celulose e suprime sinais de grupos muito móveis como o caso dos sinais de Arabinose como mostrado pelas Figura 40 e Figura 41, e a barra em vermelho corresponde aos parâmetros de ordem obtidos utilizando polarização direta no ^{13}C com tempo curto de ciclagem 2 s de modo a suprimir os sinais de celulose devido alto T_1 e privilegiar a aparição de grupos com curto T_1 como por exemplo Arabinose; enquanto que a barra em azul

corresponde aos parâmetros de ordem obtidos utilizando polarização direta no ^{13}C com tempo longo de ciclagem 20 s de modo a obter pontos de um espectro quantitativo, ou seja sem seletividade.

Os valores de parâmetro de ordem da amostra *irx3* são em média menores que a amostra WT, mostrando que no geral a matriz de polissacarídeos na amostra *irx3* tem maior mobilidade que a amostra in natura. Os sinais do xilano, especificamente o carbono 4 no domínio 1 (Xn_4^1) sinal em 82,5 ppm, na amostra WT apresenta no geral praticamente os mesmos valores de parâmetro de ordem que o carbono 4 da celulose desorganizada (C_4^2) indicando que mesma condição dinâmica em ambos grupos, principalmente devido a interação existente entre xilano e celulose, como mostrado pelos resultados de PDSD. Enquanto que os sinais do xilano, especificamente o carbono 4 no domínio 2 (Xn_4^2) sinal em 77,6 ppm, na amostra *irx3* apresenta valores de parâmetro de ordem inferiores que o (Xn_4^1) na amostra WT, indicando aqui que o xilano apresenta maior dinâmica que na amostra WT, devido a não interação desse grupo com a celulose.

Figura 44— parâmetro de ordem obtidos por SSNMR 2D DPSHIFT nas amostras de *Arabidopsis Thaliana* em natura (WT) e no mutante *irx3*.

Fonte: Elaborada pelo autor

Para a utilização de biomassas de vegetais como fonte de energia renovável e outros biomateriais é necessário desenvolver uma forma eficiente de disponibilizar seus constituintes para processamento. A recalcitrância de biomassas lignocelulósicas é, em parte, devido à sua composição, arranjos moleculares e conformação dos constituintes da parede celular, ou seja, a arquitetura molecular da parede celular. Apesar dos avanços aqui obtido no conhecimento da composição de parede celular, a precisa natureza da arquitetura da parede celular ainda é pouco entendida. O entendimento da natureza da interação entre as componentes da parede celular é crucial para contornar a recalcitrância dos vegetais aos processos utilizados em biorrefinarias. Entendimento esse que tem necessidade de ser avançado a nível molecular.

5 CONCLUSÃO

A utilização de ressonância magnética nuclear do estado sólido (SSNMR) permitiu uma detalhada caracterização de algumas biomassas lignocelulósicas, desde avaliar mudanças que ocorrem na composição das biomassas devido a pré-tratamentos ácido/alcalino ou hidrólise enzimática, até mesmo mudanças estruturais, como cristalinidade da celulose avaliada in situ, além de compreender melhor a estrutura complexa da parede celular, como, por exemplo, os aspectos fundamentais das paredes celulares das plantas e suas relações com suas propriedades físico-químicas: modificações estruturais, dinâmicas e interações que ocorrem nas paredes celulares secundárias de plantas.

Na primeira parte dos resultados realizou um estudo em dois clones de cascas de eucalipto (*Eucalyptus grandis* - EG e *Eucalyptus grandis* x *urophylla* - HGU) submetidas a um pré-tratamento em duas etapas (ácido/alcalino). As análises utilizando SSNMR qualitativa (CPMASTOSS) nesse trabalho mostrou a eficiência do pré-tratamento com ácido clorídrico em baixa concentração (1% HCl) na remoção seletiva da hemicelulose das cascas de eucalipto. Enquanto que o pré-tratamento alcalino com concentração superior a 4% de NaOH se mostrou eficiente para remoção tanto de hemicelulose quanto da lignina.

Em outras palavras, se o intuito não é separar as componentes de hemicelulose e lignina da biomassa, a etapa do pré-tratamento com ácido não é necessária. Constatou também pela comparação dos resultados de SSNMR e da eficiência da hidrólise enzimática, que a etapa ácida causa inibição na hidrólise, assim se o intuito é obter somente o etanol de segunda geração percebeu vantagem quando pulava a etapa ácida direto para o pré-tratamento com 4% de NaOH.

A análise dos resultados de SSNMR auxiliaram no entendimento dos efeitos causados pelos pré-tratamento nas cascas, ponto que tem papel fundamental na eficiência da ação da enzima na hidrólise, eficiência que chegou próximo de 100% em uma das cascas. Enquanto que na comparação entre os dois clones, a amostra EG apresentou uma recalcitrância maior que a HGU por conter maiores quantidades de hemicelulose e lignina na composição.

Em um segundo trabalho nesse tema do efeito dos pré-tratamentos, foram estudadas novamente os dois clones das cascas de eucalipto e outras quatro biomassas de gramíneas: *Saccharum officinarum* (bagaço de cana-de-açúcar), *Panicum maximum*, *Pennisetum purpureum* e *Brachiaria brizantha*. Esse estudo auxiliou no mapeamento de uma fração das biomassas presentes na matriz brasileira que poderiam ser potencialmente eficazes na obtenção de etanol de segunda geração.

As análises utilizando SSNMR qualitativa (CPMASTOSS) mostraram que os pré-tratamentos com água quente e bissulfito de sódio não são eficientes na remoção de hemicelulose e lignina, enquanto que o pré-tratamento ácido é eficiente na remoção seletiva da hemicelulose e o pré-tratamento alcalino é eficiente na remoção tanto da lignina quanto da hemicelulose, em todas as biomassas estudadas. Já a temperatura tem um papel fundamental no pré-tratamento, sendo necessária temperaturas superiores que 130°C nas amostras de gramíneas para uma eficiente funcionalidade dos pré-tratamento, enquanto que para as cascas de eucalipto a temperatura requerida tem que ser superior a 180 °C. Mostrando uma maior recalcitrância das cascas de eucalipto em relação as gramíneas.

Em uma segunda parte dos resultados foi realizado um estudo com técnicas quantitativas de SSNMR (Multi-CP) onde possibilitou a análise dos efeitos causado pelo pré-tratamento ácido/alcalino e hidrólise enzimática na cristalinidade da celulose em bagaço de cana-de-açúcar. Para isso, foi criado um método de subtração espectral do espectro do bagaço por um da lignina padrão ao bagaço de cana-de-açúcar.

Para os espectros de bagaço pré-tratados com NaOH concentrações de 0.25% a 4% após pré-tratamento ácido, foram mostrados a progressiva remoção de lignina com escala quantitativa. Para obter informação sobre o índice de cristalinidade, foi necessário obter um espectro com somente contribuição da celulose presente nas biomassas e isso foi alcançado utilizando o método proposto aqui, em que se utilizava um espectro de lignina obtido pela fração sólida remanescente do processo de tratamento com 0.25% de NaOH após a etapa ácida de modo a utilizar como uma subtração escalada aos espectros analisados. Com isso, vários métodos de análise por SSNMR foram utilizados para obtenção do índice de cristalinidade, além de serem comparados com os resultados obtidos por difração de raios-X,

mostrando que praticamente o pré-tratamento ácido/alcalino não alteram os valores de CI, enquanto que o tratamento enzimático aumenta ligeiramente a cristalinidade da celulose, sugerindo que uso do coquetel enzimático não apresenta uma forte preferência de digestão da celulose organizada e desorganizada. Mostrando assim que provavelmente os valores de CI não interferem fortemente na recalcitrância da biomassa, ponto que faz repensar no conceito de recalcitrância, o qual necessita ser profundamente estudada e analisada a relação dela com a cristalinidade da celulose nas biomassas.

A última parte dos resultados foi mostrado um estudo aprofundado na caracterização de biomassas lignocelulósicas utilizando amostras de hastes de *Arabidopsis Thaliana* em seu estado natural (sem secagem) especialmente desenvolvidas para facilitar a caracterização, ou seja, amostras enriquecidas com ^{13}C , e técnicas de SSNMR avançadas de modo a obter informações valiosas a respeito de modificações estruturais, dinâmicas e de interação que ocorrem nas paredes celulares secundária de plantas. Nesse trabalho foi utilizada a técnica J-INADEQUATE que mostrou a presença de uma conformação do xilano (*three-fold helical screw*) com deslocamento químico distinto ao xilano encontrado em solução (*two-fold helical screw*), os xilanos nessa conformação distinta chamado aqui de xilano do estado sólido está intimamente interagente com a celulose, como mostrados pelos resultados utilizando a técnica PDSD, sendo que em amostra com deficiência em celulose (*irx3*) essa conformação não existe.

Além disso, foi realizado um estudo dinâmico utilizando a técnica DIPSHIFT através do parâmetro de ordem, onde inicialmente mostrou que a amostra mutante *irx3* tem uma dinâmica maior que a amostra in Natura. Isso é evidente, pois claramente na amostra mutante o principal componente responsável pela estruturação e sustentação desse vegetal, a celulose, é deficiente. No entanto, foi realizado um estudo dinâmico direcionado ao xilano do estado sólido (componente com nova conformação), constatando que esse xilano apresenta dinâmica semelhante as encontradas para a celulose na amostra in Natura, ou seja, esse xilano está rígido. Enquanto que o xilano com deslocamento químico semelhante ao xilano em solução, apresenta uma maior mobilidade.

A união desses resultados evidência para uma interação entre os dois principais componentes da parede celular secundária: o xilano e a celulose. Essa interação faz com que esse xilano apresente uma conformação característica e tenha restrição na sua mobilidade. Notoriamente essa é a primeira vez que essa interação entre esses dois principais componentes da parede celular é comprovada, fazendo com que o entendimento da arquitetura da parede celular seja aprimorado. No entanto, apesar desse avanço no conhecimento da composição de parede celular, a natureza da arquitetura da parede celular ainda é pouco entendida.

REFERÊNCIAS

- 1 LIMA, M.A. et al. Effects of pretreatment on morphology, chemical composition and enzymatic digestibility of eucalyptus bark: a potentially valuable source of fermentable sugars for biofuel production - part 1. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, n. 1, p. 75, 2013.doi: 10.1186/1754-6834-6-75.
- 2 BERNARDINELLI, O.D.; LIMA, M.A.; REZENDE, C.A.; POLIKARPOV, I.; DEAZEVEDO, E.R. Quantitative (13)C MultiCP solid-state NMR as a tool for evaluation of cellulose crystallinity index measured directly inside sugarcane biomass. **Biotechnology for Biofuels**, v. 8, p. 110, 2015. doi: 10.1186/s13068-015-0292-1.
- 3 CHANDEL, A.K. et al. Multi-scale structural and chemical analysis of sugarcane bagasse in the process of sequential acid-base pretreatment and ethanol production by *Scheffersomyces shehatae* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology for Biofuels**, v. 7, p. 63, 2014.doi: 10.1186/1754-6834-7-63.
- 4 LIMA, M.A. et al. Evaluating the composition and processing potential of novel sources of Brazilian biomass for sustainable biorenewables production. **Biotechnology for Biofuels**, v. 7, p. 10, 2014.doi: 10.1186/1754-6834-7-10.
- 5 REZENDE, C.A. et al. Chemical and morphological characterization of sugarcane bagasse submitted to a delignification process for enhanced enzymatic digestibility. **Biotechnology for Biofuels**, v. 4, p. 1-18, 2011.doi: 10.1186/1754-6834-4-54
- 6 HALLAC, B.B. et al. Biomass characterization of *buddleja davidii*: apotential feedstock for biofuel production. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 57, n. 4, p. 1275-1281, 2009.
- 7 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.
- 8 EL HAGE, R.; BROSSE, N.; SANNIGRAHI, P.; RAGAUSKAS, A. Effects of process severity on the chemical structure of *Miscanthus* ethanol organosolv lignin. **Polymer Degradation and Stability**, v. 95, n. 6, p. 997-1003, 2010.
- 9 SANNIGRAHI, P.; MILLER, S.J.; RAGAUSKAS, A.J. Effects of organosolv pretreatment and enzymatic hydrolysis on cellulose structure and crystallinity in Loblolly pine. **Carbohydrate Research**, v. 345, n. 7, p. 965-970, 2010.
- 10 FOCHER, B.; MARZETTI, A.; CATTANEO, M.; BELTRAME, P.L.; CARNITI, P. Effects of structural features of cotton cellulose on enzymatic-hydrolysis. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 26, n. 6, p. 1989-1999, 1981.
- 11 PAUL, E.A. **Soil microbiology, ecology, and biochemistry**. 3rd ed. Amsterdam: Academic Press, 2007. 532 p.

- 12 WALL, J.D.; HARWOOD, C.S.; DEMAINE, A.L. **Bioenergy**. Washington, D.C.: ASM Press, 2008. 437 p.
- 13 MIELENZ, J.R. **Biofuels: methods and protocols**. New York, N.Y.: Humana Press, 2009. 293 p.
- 14 RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; EICHCHORN, S.E. **Biologia vegetal**. 6a. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.
- 15 SEABRA, J.E.A.; MACEDO, I.C. Comparative analysis for power generation and ethanol production from sugarcane residual biomass in Brazil. **Energy Policy**, v. 39, n. 1, p. 421-428, 2011.
- 16 CANEVAROLO, S.V. **Técnicas de caracterização de polímeros**. São Paulo: Artliber Editora, 2003.
- 17 BERNARDINELLI, O.D. **Estudo espectroscópico da dinâmica molecular e empacotamento em semicondutores orgânicos**. 2011. 148 p. Dissertação (Mestrado em Física Básica) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2011.
- 18 ATKINS, P.W.; DE PAULA, J. **Físico-química**. 7a. ed. Rio de Janeiro: LTC Editora, 2002.
- 19 PARK, S.; JOHNSON, D.K.; ISHIZAWA, C.I.; PARILLA, P.A.; DAVIS, M.F. Measuring the crystallinity index of cellulose by solid state C-13 nuclear magnetic resonance. **Cellulose**, v. 16, n. 4, p. 641-647, 2009.
- 20 PARK, S.; BAKER, J.O.; HIMMEL, M.E.; PARILLA, P.A.; JOHNSON, D.K. Cellulose crystallinity index: measurement techniques and their impact on interpreting cellulase performance. **Biotechnology for Biofuels**, v. 3, p. 10, 2010. doi: 10.1186/1754-6834-3-10.
- 21 SCHMIDT-ROHR, K.; SPIESS, H.W. **Multidimensional solid-state NMR and polymers**. San Diego, CA: Academic Press, 1994.
- 22 GIL, V.M.S.; GERALDES, C.F.G.C. **Ressonância magnética nuclear**. Lisboa: Fundacao Calouste Gulbenkian, 1978.
- 23 VEEMAN, W.S. **C-13 chemical-shift anisotropy**. New York: Pergamon Press, 1984. p. 193-235. (Progress in nuclear magnetic resonance spectroscopy, v. 16).
- 24 STEJSKAL, E.O. **High resolution NMR in the solid state: fundamentals of CP/MAS**. New York: Oxford University Press, 1994.
- 25 XIAO, L.P.; SHI, Z.J.; XU, F.; SUN, R.C. Hydrothermal treatment and enzymatic hydrolysis of Tamarix ramosissima: evaluation of the process as a conversion method in a biorefinery concept. **Bioresource Technology**, v. 135, p. 73-81, 2013. doi:10.1016/j.biortech.2012.08.143.
- 26 DIXON, W.T.; SCHAEFER, J.; SEFCIK, M.D.; STEJSKAL, E.O.; MCKAY, R.A. Total suppression of sidebands in Cpmas C-13 Nmr. **Journal of Magnetic Resonance**, v. 49, n. 2, p. 341-345, 1982.

- 27 MAO, J.D.; SCHMIDT-ROHR, K. Accurate quantification of aromaticity and nonprotonated aromatic carbon fraction in natural organic matter by ^{13}C solid-state nuclear magnetic resonance. **Environmental Science & Technology**, v. 38, n. 9, p. 2680-2684, 2004.
- 28 JOHNSON, R.L.; SCHMIDT-ROHR, K. Quantitative solid-state ^{13}C NMR with signal enhancement by multiple cross polarization. **Journal of Magnetic Resonance**, v. 239, p. 44-49, 2014. doi:10.1016/j.jmr.2013.11.009.
- 29 METZ, G.; ZILIOX, M.; SMITH, S.O. Towards quantitative CP-MAS NMR. **Solid State Nuclear Magnetic Resonance**, v. 7, n. 3, p. 155-160, 1996.
- 30 DUPREE, R. et al. Probing the molecular architecture of Arabidopsis thaliana secondary cell walls using two- and three-dimensional (^{13}C) solid state nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Biochemistry**, v. 54, n. 14, p. 2335-2345, 2015.
- 31 BROMLEY, J.R. et al. GUX1 and GUX2 glucuronyltransferases decorate distinct domains of glucuronoxylan with different substitution patterns. **Plant Journal**, v. 74, n. 3, p. 423-434, 2013.
- 32 BUSSE-WICHER, M. et al. The pattern of xylan acetylation suggests xylan may interact with cellulose microfibrils as a twofold helical screw in the secondary plant cell wall of Arabidopsis thaliana. **Plant Journal**, v. 79, n. 3, p. 492-506, 2014.
- 33 DICK-PEREZ, M.; WANG, T.; SALAZAR, A.; ZABOTINA, O.A.; HONG, M. Multidimensional solid-state NMR studies of the structure and dynamics of pectic polysaccharides in uniformly ^{13}C -labeled Arabidopsis primary cell walls. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 50, n. 8, p. 539-550, 2012.
- 34 WANG, T.; SALAZAR, A.; ZABOTINA, O.A.; HONG, M. Structure and dynamics of Brachypodium primary cell wall polysaccharides from two-dimensional (^{13}C) solid-state nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Biochemistry**, v. 53, n. 17, p. 2840-2854, 2014.
- 35 AUE, W.P.; BARTHOLDI, E.; ERNST, R.R. Two-dimensional spectroscopy. application to nuclear magnetic resonance. **Journal of Chemical Physics**, v. 64, n. 5, p. 2229-2246, 1976.
- 36 LESAGE, A., BARDET, M. & EMSLEY, L. Through-bond carbon-carbon connectivities in disordered solids by NMR. **Journal of the American Chemical Society**, v. 121, n. 47, p. 10988-10993, 1999.
- 37 DEAZEVEDO, E.R. et al. Intermediate motions as studied by solid-state separated local field NMR experiments. **Journal of Chemical Physics**, v. 128, n. 10, p. 104505, 2008.
- 38 BACON, A.D.; ZERNER, M.C. Intermediate neglect of differential overlap theory for transition-metal complexes - Fe, Co and Cu chlorides. **Theoretica Chimica Acta**, v. 53, n. 1, p. 21-54, 1979.
- 39 HIMMEL, M.E. et al. Biomass recalcitrance: engineering plants and enzymes for biofuels production. **Science**, v. 315, n. 5813, p. 804-807, 2007.

- 40 MOSIER, N. et al. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 96, n. 6, p. 673-686, 2005.
- 41 TAHERZADEH, M.J.; KARIMI, K. Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: a review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 9, n. 9, p. 1621-1651, 2008.
- 42 KRISHNAN, C. et al. Alkali-based AFEX pretreatment for the conversion of sugarcane bagasse and cane leaf residues to ethanol. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 107, n. 3, p. 441-450, 2010.
- 43 CHANG, V.S. & HOLTZAPPLE, M.T. Fundamental factors affecting biomass enzymatic reactivity. **Applied Biochemical Biotechnology**, v. 84-86, p. 5-37, 2000.
- 44 GHARPURAY, M.M.; LEE, Y.H.; FAN, L.T. Structural modification of lignocellulosics by pretreatments to enhance enzymatic hydrolysis. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 25, n. 1, p. 157-172, 1983.
- 45 LASER, M. et al. A comparison of liquid hot water and steam pretreatments of sugar cane bagasse for bioconversion to ethanol. **Bioresource Technology**, v. 81, n. 1, p. 33-44, 2002.
- 46 SASAKI, M.; ADSCHIRI, T.; ARAI, K. Fractionation of sugarcane bagasse by hydrothermal treatment. **Bioresource Technology**, v. 86, n. 3, p. 301-304, 2003.
- 47 GOLLAPALLI, L.E.; DALE, B.E.; RIVERS, D.M. Predicting digestibility of ammonia fiber explosion (AFEX)-treated rice straw. **Applied Biochemical Biotechnology**, v. 98-100, p. 23-35, 2002.
- 48 ZHANG, Z.; ZHAO, Z.K. Solid acid and microwave-assisted hydrolysis of cellulose in ionic liquid. **Carbohydrate Research**, v. 344, n. 15, p. 2069-2072, 2009.
- 49 SWATLOSKI, R.P.; SPEAR, S.K.; HOLBREY, J.D.; ROGERS, R.D. Dissolution of cellulose [correction of cellose] with ionic liquids. **Journal of American Chemical Society**, v. 124, n. 18, p. 4974-4975, 2002.
- 50 ZHU, J.Y.; PAN, X.J.; WANG, G.S.; GLEISNER, R. Sulfite pretreatment (SPORL) for robust enzymatic saccharification of spruce and red pine. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 8, p. 2411-2418, 2009.
- 51 SHUAI, L. et al. Comparative study of SPORL and dilute-acid pretreatments of spruce for cellulosic ethanol production. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 9, p. 3106-3114, 2010.
- 52 KURAKAKE, M.; IDE, N.; KOMAKI, T. Biological pretreatment with two bacterial strains for enzymatic hydrolysis of office paper. **Current Microbiology**, v. 54, n. 6, p. 424-428, 2007.
- 53 SRILATHA, H.R.; NAND, K.; BABU, K.S.; MADHUKARA, K. Fungal pretreatment of orange processing waste by solid-state fermentation for improved production of methane. **Process Biochemistry**, v. 30, p. 327-331, 1995.

- 54 BALI, G.; MENG, X.; DENEFF, J.I.; SUN, Q.; RAGAUSKAS, A.J. The effect of alkaline pretreatment methods on cellulose structure and accessibility. **ChemSusChem**, v. 8, n. 2, p. 275-279, 2015.
- 55 DIXON, W.T. Spinning-Sideband-Free and Spinning-Sideband-Only Nmr-Spectra in Spinning Samples. **Journal of Chemical Physics**, v. 77, n. 4, p. 1800-1809, 1982.
- 56 WICKHOLM, K.; LARSSON, P.T.; IVERSEN, T. Assignment of non-crystalline forms in cellulose I by CP/MAS C-13 NMR spectroscopy. **Carbohydrate Research**, v. 312, n. 3, p. 123-129, 1998.
- 57 TEMPLETON, D.W.; SCARLATA, C.J.; SLUITER, J.B.; WOLFRUM, E.J. Compositional Analysis of Lignocellulosic Feedstocks. 2. Method Uncertainties. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 58, n. 16, p. 9054-9062, 2010.
- 58 MARTINEZ, A.T.; ALMENDROS, G.; GONZALEZ-VILA, F.J.; FRUND, R. Solid-state spectroscopic analysis of lignins from several Austral hardwoods. **Solid State Nuclear Magnetic Resonance**, v. 15, n. 1, p. 41-48, 1999.
- 59 MARTINEZ, A.T. et al. Solid-State Nmr-Studies of Lignin and Plant Polysaccharide Degradation by Fungi. **Holzforschung**, v. 45, p. 49-54, 1991.
- 60 LIMA, M.A.D. **Caracterização bioquímica e biofísica da enzima β -glicosidase Bgl1 de *Aspergillus niger* e avaliação de potenciais biomassas para produção de bioetanol**. 2013. 249 p. Tese (Doutorado em Física Aplicada) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2013.
- 61 KOMATSU, T.; KIKUCHI, J. Selective signal detection in solid-state NMR using rotor-synchronized dipolar dephasing for the analysis of hemicellulose in lignocellulosic biomass. **Journal of Physical Chemistry Letters**, v. 4, p. 2279-2283, 2013.
- 62 PU, Y.Q.; ZIEMER, C.; RAGAUSKAS, A.J. CP/MAS C-13 NMR analysis of cellulase treated bleached softwood kraft pulp. **Carbohydrate Research**, v. 341, n. 5, p. 591-597, 2006.
- 63 PU, Y.; HU, F.; HUANG, F.; DAVISON, B.; RAGAUSKAS, A. Assessing the molecular structure basis for biomass recalcitrance during dilute acid and hydrothermal pretreatments. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, n. 1, p. 15, 2013.
- 64 CAO, S.; PU, Y.; STUDER, M.; WYMAN, C.; RAGAUSKAS, A. Chemical transformations of *Populus trichocarpa* during dilute acid pretreatment. **RSC Advances**, v. 2, p. 10925 - 10936, 2012.
- 65 HUBBELL, C.A.; RAGAUSKAS, A.J. Effect of acid-chlorite delignification on cellulose degree of polymerization. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 19, p. 7410-7415, 2010.
- 66 KUMAR, R.; MAGO, G.; BALAN, V.; WYMAN, C.E. Physical and chemical characterizations of corn stover and poplar solids resulting from leading pretreatment technologies. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 17, p. 3948-3962, 2009.

67 TSUCHIDA, J.E. et al. Nuclear magnetic resonance investigation of water accessibility in cellulose of pretreated sugarcane bagasse. **Biotechnology for Biofuels**, v. 7, p.127, 2014.doi: 10.1186/s13068-014-0127-5.

68 DEAZEVEDO, E.R. et al. Intermediate motions as studied by solid-state separated local field NMR experiments. **Journal of Chemical Physics**, v. 128, n. 10, p. 104505-104517, 2008.