

Artigo

Aplicação da RMN de ^{13}C no Estado Sólido ao Estudo dos Teores de Lignina e Carboidratos em Amostras de Bagaço de Cana Submetidas a Tratamento Ácido

Cipriano, D. F.;* Gonçalves, G. R.; Cunha, A. G.; Schettino Jr., M. A.; Chinelatto Jr., L. S.; Menezes, S. M. C.; Freitas, J. C. C.

Rev. Virtual Quim., 2020, 12 (3), 639-658. Data de publicação na Web: 19 de Maio de 2020

<http://rvq.sbg.org.br>

Application of Solid State ^{13}C NMR in the Study of Lignin and Carbohydrate Contents in Acid-Treated Sugarcane Bagasse Samples

Abstract: In a worldwide scenario of search for renewable fuels, the knowledge of the contents of cellulose, lignin and hemicellulose in different biomass materials is of great importance for their use in the biofuels industry. However, the current methods used for the determination of these contents are long, involve laborious procedures and make use of hazardous chemicals. In this context, solid-state ^{13}C nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy appears as one of the possible spectroscopic methods to be used for quantification of the lignin and carbohydrate contents in lignocellulosic materials. In this work, this method was used to monitor the evolution of the lignin and carbohydrate contents as function of treatment time for a sample of Brazilian sugarcane bagasse treated with hydrochloric acid. The recorded ^{13}C NMR spectra allowed the observation of the fast removal of hemicellulose and of cellulose in structurally disordered regions, as well as the process of depolymerization of the lignin structure for long treatment times. Through the construction of calibration curves from commercial samples of lignin and cellulose, it was possible to estimate the lignin, holocellulose and crystalline cellulose contents in the studied samples. An increase in the lignin and crystalline cellulose contents was then observed for the samples with long treatment times. The analysis of the crystallinity index by X-ray diffraction corroborated the information obtained by solid-state NMR, whereas the images obtained by scanning electron microscopy allowed to observe general characteristics of the surface of the fibers of the natural and acid-treated sugarcane bagasse samples.


Keywords: Solid-state NMR; lignocellulosic materials; sugarcane bagasse.

Resumo

Em meio a um cenário mundial de busca por combustíveis renováveis, o conhecimento dos teores de celulose, lignina e hemicelulose em diferentes materiais de biomassa mostra-se de grande importância para sua utilização na indústria de biocombustíveis. Entretanto, os métodos atuais de determinação desses teores são procedimentos longos, trabalhosos e fazem uso de reagentes químicos nocivos ao meio ambiente. Nesse cenário, a espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) de ^{13}C no estado sólido tem se mostrado uma das possíveis ferramentas espectroscópicas úteis para determinação dos teores de lignina e carboidratos em materiais lignocelulósicos. Neste trabalho, esse método foi utilizado para acompanhar as alterações nos teores de lignina e carboidratos em amostras de bagaço de cana de safra brasileira submetidas a tratamento com ácido clorídrico por diferentes tempos. Por meio da análise dos espectros de RMN de ^{13}C , foi possível observar a rápida remoção de hemicelulose e de celulose em regiões estruturalmente desordenadas, bem como observou-se um processo de despolimerização da estrutura da lignina para longos tempos de tratamento. Por meio da construção de curvas de calibração a partir de amostras padrões comerciais de lignina e celulose, foi possível estimar os teores de lignina, holocelulose e celulose cristalina nas amostras estudadas, o que permitiu observar um aumento nos teores de lignina e celulose cristalina nas amostras tratadas. Análises do índice de cristalinidade por difração de raios X corroboraram as informações obtidas por RMN, enquanto que imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura permitiram observar características gerais da superfície das fibras do bagaço de cana natural e submetido ao tratamento ácido.

Palavras-chave: RMN no estado sólido; materiais lignocelulósicos; bagaço de cana.

* Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Exatas, Departamento de Física, Laboratório de Materiais Carbonosos e Cerâmicos (LMC), CEP 29075-910, Goiabeiras, Vitória-ES, Brazil.

 daniel.cipriano@ufes.br
DOI: [10.21577/1984-6835.20200051](https://doi.org/10.21577/1984-6835.20200051)

Aplicação da RMN de ^{13}C no Estado Sólido ao Estudo dos Teores de Lignina e Carboidratos em Amostras de Bagaço de Cana Submetidas a Tratamento Ácido

Daniel F. Cipriano,^{a,*} Gustavo. R. Gonçalves,^a Alfredo G. Cunha,^a Miguel A. Schettino Jr.,^a Luiz S. Chinelatto Jr.,^b Sonia M. C. Menezes,^b Jair C. C. de Freitas^a

^a Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Exatas, Departamento de Física, Laboratório de Materiais Carbonosos e Cerâmicos (LMC), CEP 29075-910, Goiabeiras, Vitória-ES, Brasil.

^b Centro de Pesquisas e Desenvolvimento Leopoldo Américo Miguez de Mello (CENPES/PDISO/QM), Cidade Universitária, CEP 21941-915, Rio de Janeiro-RJ, Brasil.

*daniel.cipriano@ufes.br

Recebido em 9 de Maio de 2019. Aceito para publicação em 6 de Maio de 2020.

1. Introdução

2. Materiais e Métodos

2.1. Materiais

2.2. Análises químicas

2.3. Tratamento ácido

2.4. Experimentos de RMN de ^{13}C CP/MAS

2.5. Difração de raios X

2.6. Análise microestrutural

3. Resultados e Discussão

3.1. Curvas de calibração

3.2. Determinação dos teores de lignina, holocelulose e celulose cristalina no bagaço de cana *in natura*

3.3. Estudo de amostras de bagaço de cana quimicamente tratadas

4. Conclusão

1. Introdução

Nos últimos anos, com a possível escassez de recursos energéticos provenientes de fontes não renováveis e levando-se em conta os danos que o uso de combustíveis fósseis causa ao meio ambiente, esforços vêm sendo empregados na busca de combustíveis renováveis que possam ser usados de maneira sustentável. Nesse contexto, o reconhecimento do etanol proveniente do caldo da

cana-de-açúcar como fonte potencial de energia renovável, sustentável e de baixo custo tem ampliado o investimento agrícola no cultivo da cana-de-açúcar, o que também leva à geração de uma maior quantidade de resíduos agrícolas como a palha (quando não queimada) e o bagaço de cana. Tais resíduos são exemplos de materiais de biomassa que atraem grande interesse da comunidade científica devido a várias possibilidades de aproveitamento dos componentes lignocelulósicos no setor de bioenergia.^{1,2}

Os materiais lignocelulósicos são a matéria orgânica renovável mais abundante na superfície de nosso planeta, tendo como principais componentes a celulose, a hemicelulose e a lignina, juntamente com uma pequena parcela de cinzas e extrativos. Esses componentes estão presentes nas paredes celulares das plantas com parcelas distintas e que podem variar dependendo da idade, fase de desenvolvimento, tipo de espécie vegetal, além de outros possíveis fatores. No caule das árvores, por exemplo, há cerca de 40-55 % (em massa) de celulose, 24-40 % de hemicelulose e 18-25 % de lignina, podendo este último componente chegar a 30 % para madeiras mais resistentes.^{3,4} Para o bagaço de cana são encontrados valores típicos de 40-44 % de celulose, 20-22 % de lignina e 25-27 % de hemicelulose.⁵

Esses materiais, entretanto, possuem estruturas altamente complexas devido às características químicas e morfológicas dos seus componentes e à forma como esses componentes se ligam para formar o material lignocelulósico. Isso torna difícil a sua decomposição a fim de se aproveitar as propriedades de seus componentes. No material lignocelulósico, uma matriz constituída de fibras de celulose com maior grau de ordem estrutural é envolvida por uma matriz mais desordenada de hemicelulose e lignina. Tais aspectos também dificultam as análises que visam a quantificação desses componentes no material, exigindo muitas vezes o uso de métodos nos quais a amostra é submetida a tratamentos químicos que permitem a obtenção separadamente de cada componente lignocelulósico.^{1,2}

Para determinação do teor de lignina, por exemplo, o procedimento oficial adotado pela ABNT (ABNT NBR 7989:2010) é o método Klason, e o teor de lignina obtido é denominado lignina Klason.⁶ Nesse método, a amostra é submetida a um tratamento com ácido sulfúrico em duas etapas distintas em que se varia principalmente a temperatura da reação e a concentração de ácido. No final do processo é obtida uma massa de lignina que é então utilizada para calcular o teor de lignina Klason da amostra analisada.⁵ Outros métodos também podem ser adotados para quantificação desses teores em materiais lignocelulósicos, os quais fazem uso de outros reagentes químicos ou até mesmo de técnicas como espectroscopia ótica ou ressonância magnética nuclear (RMN) de alta resolução em sólidos.^{2,7}

A aplicação da técnica de RMN de ^{13}C de alta resolução no estado sólido tem se mostrado uma ferramenta muito útil no estudo de materiais lignocelulósicos, podendo ser observadas no espectro de RMN contribuições características de cada um dos componentes lignocelulósicos. Trabalhos utilizando técnicas de RMN de ^{13}C com polarização cruzada (CP, do inglês “*cross polarization*”) têm permitido o estudo da ultraestrutura da celulose, com a detecção separadamente dos sinais característicos de fibras de celulose com melhor ordem estrutural e regiões contendo celulose em forma estruturalmente desordenada, além de ser possível diferenciar sinais correspondentes a diferentes polimorfos de celulose.⁷⁻⁹

Entretanto, espectros de RMN obtidos via CP em geral não podem ser diretamente utilizados em análises quantitativas relativas, uma vez que as intensidades dos sinais detectados dependem da transferência de polarização entre núcleos ^1H e ^{13}C presentes na amostra, e essa transferência não necessariamente ocorre com a mesma eficiência para diferentes grupos químicos presentes no material analisado.^{10,11}

Mesmo não sendo quantitativos em primeira análise, os experimentos de CP são muitas vezes preferidos aos experimentos com polarização direta dos núcleos ^{13}C por permitirem a obtenção de um espectro com boa relação sinal ruído em um tempo relativamente menor.¹²

Experimentos de RMN de ^{13}C com polarização direta podem demorar algumas horas ou até mesmo dias, devido à baixa abundância natural e o baixo fator giromagnético, aliado também ao fato de que os valores de T_1 para os núcleos ^{13}C tendem a ser grandes em materiais sólidos principalmente para os núcleos em átomos sem ligação direta com átomos de hidrogênio.^{12,13}

A largura e forma de linha nos espectros de RMN de ^{13}C no estado sólido são principalmente afetados pela interação dipolar heteronuclear e pela anisotropia do deslocamento químico, uma vez que não há interação quadrupolar (spin igual a 1/2) e nem interação dipolar homonuclear (a baixa abundância natural garante que os núcleos de ^{13}C estão suficientemente afastados para que não haja interação dipolar entre eles).¹⁴

A interação dipolar é, nos casos favoráveis, removida por desacoplamento de núcleos ^1H combinado com rotação em torno do ângulo mágico (MAS, do inglês “*magic angle spinning*”);

a anisotropia de deslocamento químico pode ser bastante grande no caso de materiais contendo anéis aromáticos (como é o caso da lignina e dos carvões), situação em que é comum a presença de bandas laterais, em particular quando são usados altos campos magnéticos.^{8,15}

Assim, devido à ineficiente relaxação spin-rede para alguns grupos e à baixa sensibilidade dos núcleos ^{13}C , a técnica de CP com desacoplamento de núcleos ^1H e MAS é a abordagem experimental mais utilizada para a análise de materiais orgânicos sólidos.

No caso de materiais lignocelulósicos, há três problemas principais envolvidos com a quantificação de grupos químicos utilizando CP: a variação na eficiência da transferência de magnetização dos núcleos ^1H para os núcleos ^{13}C para diferentes grupos químicos no material (a proximidade a átomos de hidrogênio potencializa a transferência de polarização); a presença de centros paramagnéticos que tornam os átomos de carbono próximos insensíveis ao processo de CP, pois tais centros promovem uma redução considerável no tempo de relaxação longitudinal no sistema girante de coordenadas dos núcleos ^1H ; e a perda de intensidade e distorção das linhas de ressonâncias (em especial as aromáticas) devidas às bandas laterais.

Nesse sentido, para se fazer análises quantitativas relativas por CP é necessário otimizar os tempos de contato em experimentos de variação de tempo de contato (VCT) a fim de se obter a intensidade corrigida para cada sinal a ser quantificado. Também é necessário evitar a análise de amostras com impurezas magnéticas e utilizar campos magnéticos com magnitude moderada (ou frequências de MAS elevadas) a fim de minimizar a ocorrência de bandas laterais.^{8,14}

Todavia, os experimentos de variação de tempo de contato que permitem a realização de análises quantitativas com CP são trabalhosos e longos, o que muitas vezes torna inviável o método na análise de diversas amostras submetidas a diferentes processos de tratamento.

Nesse contexto, em busca de métodos quantitativos e menos demorados que os experimentos de polarização direta e VCT, esforços foram dedicados à elaboração e validação de um procedimento experimental que, utilizando RMN de ^{13}C com CP, permita, de maneira confiável, a determinação dos teores de lignina, celulose e hemicelulose em materiais de biomassa.

Os procedimentos experimentais realizados fundamentaram-se na construção de curvas de calibração da intensidade do sinal obtido no espectro de RMN registrado com tempo de contato fixo em função da massa previamente conhecida dos componentes em misturas padrões preparadas com lignina e celulose puras.

Os resultados obtidos para os teores de lignina com o procedimento desenvolvido mostram-se promissores; contudo, para determinação dos teores de celulose e hemicelulose permaneceu o problema de sobreposição do sinal desses dois componentes, sendo somente possível estimar o teor de holocelulose, que consiste no conteúdo total dos dois tipos de carboidratos.

Essa metodologia acima descrita foi empregada em diferentes materiais de biomassa de cultivo brasileiro para determinar o teor de lignina e os resultados foram comparados com os obtidos pelo método Klason.¹⁶

Neste trabalho, foi realizado um estudo comparativo com amostras de bagaço de cana submetidas a diferentes tempos de tratamento ácido, o que permitiu observar variações consideráveis no conteúdo de carboidratos e lignina com o procedimento empregado.¹⁷⁻¹⁹

Os resultados obtidos com uso dos métodos de RMN no estado sólido foram ainda complementados pela análise de resultados de difração de raios X e de microscopia eletrônica de varredura, o que permitiu acompanhar as alterações químicas e estruturais nas amostras submetidas ao tratamento ácido.

2. Materiais e Métodos

2.1 Materiais

Os padrões de celulose (“*cellulose powder*”) e lignina (“*lignosulfonic acid sodium salt*”) utilizados neste trabalho foram adquiridos junto à Sigma-Adrich. A amostra de bagaço de cana utilizada no tratamento ácido provém de safra brasileira e foi fornecida pelo *Centro de Pesquisas e Desenvolvimento Leopoldo Américo Miguez de Mello (CENPES/Petrobras, Rio de Janeiro)*.

2.2 Análises químicas

Os teores de lignina e holocelulose foram obtidos pelo método Klason para a amostra

natural.²⁰ O procedimento foi conduzido no CENPES/Petrobras.

Para determinação do teor de lignina, a amostra após trituração e seca, foi submetida a uma determinação inicial do teor de extrativos com acetona, seguida de um tratamento com ácido sulfúrico a 72 % e a 30 °C por 1 h; na sequência o caldo obtido foi diluído em água e levado a um reator onde permaneceu a 120 °C por mais 1 h. O teor de lignina foi obtido a partir da massa do material retido após a filtração, que por sua vez foi submetido a análise de termogravimetria (TG) para correção dos teores de cinzas e umidade. O percentual de holocelulose foi obtido por diferença, subtraindo do total (em base seca) o percentual de lignina, extrativos e cinzas.

2.3 Tratamento ácido

Foram preparadas cinco amostras de bagaço de cana submetidas a diferentes tempos de tratamento ácido. Para esses tratamentos, foram utilizados 930 mg de uma amostra de bagaço de cana em pó misturados em 40 ml de HCl 2,5 M a 100 °C em um sistema de refluxo. Os tempos de tratamento foram 5, 10, 30, 120 e 240 min.

2.4 Experimentos de RMN de ¹³C CP/MAS

2.4.1 Condições de análise

As análises por RMN de ¹³C foram efetuadas utilizando um espectrômetro Varian-Agilent 400 MHz, operando em frequências de 399,73 MHz para ¹H e 100,52 MHz para ¹³C, o que corresponde a um campo magnético de 9,4 T. Utilizou-se uma sonda de radiofrequência (RF) de tripla ressonância com rotores de zircônia com 4 mm de diâmetro, apropriada para experimentos com CP e MAS em frequências de rotação de até 18 kHz. Como sinal de referência para os espectros de RMN de ¹³C foi utilizado o pico associado aos grupos metila no espectro do hexametilbenzeno (HMB), o qual possui deslocamento químico igual a 17,3 ppm em relação à referência primária para ¹³C, que é o pico único observado no espectro de RMN de ¹³C do tetrametilsilano (TMS).¹⁵

Inicialmente foram realizados experimentos com variação de tempo de contato a fim de determinar um tempo de contato ideal para análise dos componentes lignocelulósicos nos

espectros de RMN com boa relação sinal/ruído.¹¹ Ao fim destes experimentos escolheu-se trabalhar com um tempo de contato fixo igual a 1 ms para todas as medidas realizadas.

Fixado o tempo de contato, realizou-se uma otimização das condições de Hartmann-Hahn (condições experimentais necessárias para ocorrência do processo de CP) para análises com MAS à frequência de 10 kHz.¹² Também foram realizados experimentos para determinar a magnitude do campo de RF utilizado na sequência de desacoplamento heteronuclear do tipo SPINAL.²¹

Após a otimização de todos os parâmetros experimentais, foram realizados experimentos de CP/MAS com aplicação de pulso de 3,6 μs nos núcleos ¹H, intervalo de 5 s entre pulsos, tempo de aquisição de 20,48 ms, janela espectral de 50 kHz e aquisição de 1500 transientes para os experimentos com misturas de celulose e lignina e 750 transientes para as amostras tratadas quimicamente.

2.4.2 Metodologia de calibração da intensidade nos espectros de RMN ¹³C CP/MAS

Para calibração das intensidades espectrais, foram realizados experimentos de RMN ¹³C CP/MAS para amostras padrões de celulose e lignina e misturas desses padrões nas proporções em massa 1:9, 1:3, 2:3, 1:1, 3:2, 3:1, 9:1. Os mesmos experimentos foram realizados para amostras de bagaço de cana submetidas a tratamento ácido.

Obtidos os espectros de RMN, foram construídos gráficos relacionando a intensidade de regiões selecionadas dos espectros em função da massa do componente responsável por tal intensidade. As intensidades foram obtidas por deconvolução dos espectros de RMN, com utilização de curvas gaussianas e lorentzianas, como será detalhado mais adiante.⁷ Por regressão linear aplicada ao conjunto de pontos experimentais foram obtidas curvas de calibração para cada região espectral selecionada. As equações correspondentes a essas regressões lineares foram utilizadas na determinação dos teores dos componentes lignocelulósicos presentes no bagaço de cana e nas amostras tratadas quimicamente. Também foram realizadas medidas em triplicata de uma mesma amostra, para avaliar a incerteza nas intensidades obtidas e, por propagação, nos teores de lignina e holocelulose determinados.

2.4.3 Cálculo do índice de cristalinidade (IC) por RMN

O índice de cristalinidade das amostras tratadas quimicamente foi determinado por RMN por meio da comparação das áreas associadas a carbonos C4 da celulose em fibras mais ordenadas ($C4_o$) e regiões contendo celulose em formas mais desordenadas ($C4_d$) através da equação $IC_{RMN} (\%) = C4_o / (C4_o + C4_d)$.²²

2.5 Difração de raios X

Os difratogramas de raios X foram obtidos em um difratômetro Shimadzu XRD-6000, usando uma radiação Cu-K α ($\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$), num intervalo de 10° a 80° a $0,02^\circ/\text{min}$.

Dos difratogramas de raios X, foi extraído o índice de cristalinidade das amostras estudadas, a fim de se comparar com os valores obtidos por RMN. Para determinação do IC por difração de raios X (DRX), foi calculada a relação entre a altura do pico cristalino mais intenso I_{002} e a contribuição amorfa I_{AM} por meio da equação $IC_{DRX} = (I_{002} - I_{AM})/I_{002}$.²³ As alturas foram calculadas em relação à linha de base obtida após a análise do porta amostra vazio.

2.6 Análise microestrutural

A microestrutura superficial das fibras do bagaço de cana das amostras natural e tratada durante 240 min também foi analisada por microscopia eletrônica de varredura (MEV), utilizando um microscópio Shimadzu SSX-550 com filamento de tungstênio. As amostras foram previamente metalizadas com um metalizador Shimadzu IC-50 por 10 minutos com uma corrente de 1 mA.

3. Resultados e Discussão

3.1 Curvas de calibração

Na Figura 1, é apresentado um espectro típico de RMN de ^{13}C no estado sólido obtido com CP/MAS para uma amostra de bagaço de cana, onde pode ser observada a contribuição de cada componente lignocelulósico no espectro.

Na Figura 2 é mostrado um gráfico da intensidade de alguns picos do espectro obtido

para o bagaço de cana em função do tempo de contato; pode-se observar que todos apresentam intensidade máxima em torno de 1 ms. Os parâmetros obtidos a partir do ajuste dos pontos experimentais, como discutido por Smernik et al., são apresentados na Tabela 1.¹¹

Como pode ser observado, a dinâmica de transferência de polarização é muito semelhante para os carbonos de 1 a 5 da celulose, enquanto que para o carbono 6 há uma pequena redução no tempo de transferência de polarização (T_{CH}) e no tempo de relaxação dos núcleos ^1H no referencial girante de coordenadas ($T_{1\rho H}$).^{11,12} Já para o sinal associado ao grupo metoxil, enquanto T_{CH} é quase cinco vezes maior que para os carboidratos, $T_{1\rho H}$ não apresenta grandes variações, o que indica que o tempo de contato ótimo para o sinal associado ao grupo metoxil deve ser maior que para os carboidratos.

Na Figura 3 são apresentados os espectros deconvoluídos dos padrões de celulose e lignina, respectivamente, com identificação das regiões cujas áreas são utilizadas para construção das curvas de calibração, a saber: a região associada ao carbono C4 da celulose e a região associada ao sinal do grupo metoxil da lignina (indicado como $C_{56\text{ppm}}$).

A região assinalada como C4 foi subdividida em duas classes: $C4_o$ e $C4_d$, respectivamente associadas a carbonos C4 da celulose em fibras mais ordenadas e regiões contendo celulose em formas mais desordenadas.⁷⁻⁹

Na elaboração da curva de calibração do teor de celulose é importante também considerar o pico indicado por $C_{84\text{ppm}}$ no espectro da lignina, visto que esse pico, presente nas misturas, contribuirá para a área correspondente à região desordenada $C4_d$ nos espectros registrados para as misturas. Na Figura 4 é apresentado o espectro deconvoluído de uma amostra de bagaço de cana onde essas regiões também são indicadas.

Uma análise comparativa entre os espectros de celulose e lignina padrão pode ser feita observando a Figura 5. Nessa figura é possível observar que o pico $C_{56\text{ppm}}$ característico da lignina é o sinal mais intenso desse componente lignocelulósico. Nesse sentido, relacionar a área deste sinal com a massa de lignina mostra-se a melhor escolha. Todavia, é importante notar que a variação na composição química da lignina de diferentes tipos de biomassa lignocelulósica limita a acurácia do método, principalmente quando

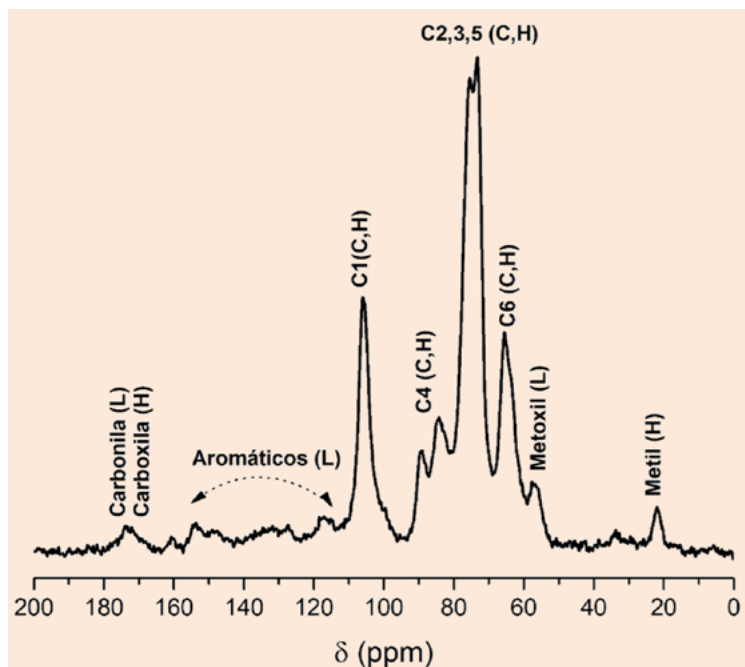


Figura 1. Espectro de RMN de ^{13}C CP/MAS no estado sólido para bagaço de cana de safra brasileira. As letras C, H e L indicam contribuições correspondentes respectivamente a celulose, hemicelulose e lignina. A letra C seguida dos números de 1 a 6 indica o tipo de carbono presente nas unidades básicas de celulose e hemicelulose, correspondente ao sinal assinalado no espectro

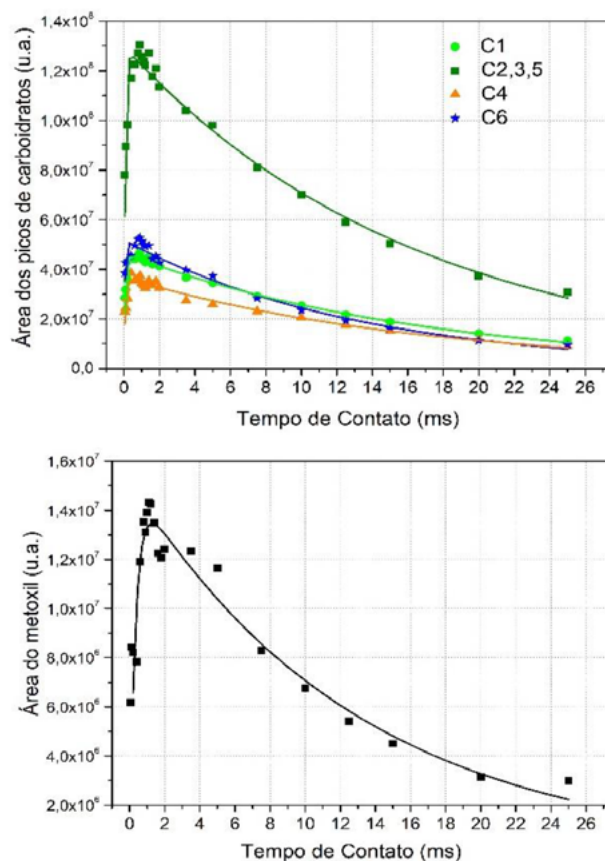


Figura 2. Ajuste dos pontos obtidos no experimento de VCT para diferentes picos associados a carboidratos (acima) e para o sinal associado ao grupo metoxil da lignina (abaixo) presentes no espectro de RMN de ^{13}C com CP/MAS

Tabela 1. Parâmetros do ajuste dos pontos experimentais obtidos dos experimentos de VCT para bagaço de cana *in natura*. A incerteza dos resultados é apresentada entre parenteses

| Pico | R ² | T _{CH} (μs) | T1 _{pH} (ms) |
|---------|----------------|----------------------|-----------------------|
| C1 | 0,95 | 75 (8) | 16,8 (1,2) |
| C2,3,5 | 0,95 | 78 (9) | 16,5 (1,2) |
| C4 | 0,93 | 75 (9) | 16,9 (1,4) |
| C6 | 0,95 | 43 (6) | 13,3 (1,0) |
| Metoxil | 0,94 | 338 (46) | 13,0 (1,2) |

uma única curva de calibração é aplicada a um conjunto de amostras muito distintas.²⁴

Para a celulose, a região do C4 é a menos influenciada por sinais associados à lignina. Uma vez que na região C4_o, em materiais de biomassa, há também contribuição de açúcares de hemicelulose (a ser discutida posteriormente) foram elaboradas curvas de calibração tanto para região total do C4 como somente para a região ordenada C4_o. A análise dessa região mais ordenada pode em princípio ser utilizada para a determinação do teor de fibras de celulose em estruturas mais ordenadas.^{2,7}

Os valores obtidos para as áreas das regiões discutidas no parágrafo anterior são apresentados graficamente nas Figuras 6, 7, e 8. Como também já informado, esses valores foram determinados pela deconvolução dos espectros obtidos para as amostras padrões e suas respectivas misturas.

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

É importante observar que as retas obtidas para a lignina e para as fibras ordenadas de celulose têm coeficiente linear igual a zero, visto que nesses casos a área associada aos respectivos picos é considerada zero para massa igual a zero da componente em questão. Já a reta obtida utilizando toda a região do C4 tem coeficiente linear diferente de zero, o que é compreensível considerando que para massa nula de celulose considerou-se a área do sinal C_{84ppm} presente no espectro de lignina padrão (Figura 3).

3.2 Determinação dos teores de lignina, holocelulose e celulose cristalina no bagaço de cana *in natura*

Com os resultados obtidos nas curvas de calibração para as diferentes regiões do espectro, pode-se fazer uma previsão das massas de

holocelulose e lignina em cada amostra analisada por RMN de ¹³C, utilizando condições experimentais idênticas às empregadas para as misturas. Dessa forma, podem ser determinados os teores de lignina, holocelulose e celulose cristalina presentes em uma amostra de bagaço de cana.

A princípio, esperava-se que por meio da curva de calibração construída com amostras contendo somente celulose e lignina, seria possível estimar o teor exclusivo de celulose em materiais de biomassa. Todavia, os resultados obtidos indicam que o teor previsto está associado ao conteúdo total de carboidratos (holocelulose) e não somente ao teor de celulose. Os resultados são apresentados na Tabela 2. Como pode ser visto, o teor obtido para a lignina pelo método de RMN está em conformidade com o determinado pelo método Klason, bem como o teor de holocelulose.

Como mencionado, o teor obtido para holocelulose foi estimado a partir de uma curva de calibração da região C4 de amostras contendo apenas celulose. Todavia a área deconvoluída da região C4 total do espectro obtido para o bagaço de cana, apresentado na Figura 4, tem considerável contribuição da matriz amorfa de hemicelulose presente no bagaço. Nesse sentido, para uma previsão correta dos valores separados de celulose e hemicelulose seriam necessários sinais no espectro de RMN de ¹³C associados distintamente a esses componentes; isso é problemático no caso dos carboidratos, visto que há grande sobreposição dos sinais devidos à celulose (nas formas ordenada e desordenada) com os sinais de hemicelulose no espectro de RMN de ¹³C, como foi apresentado na Figura 1.⁹

No caso da hemicelulose, existem sinais característicos nos espectros de RMN de ¹³C, como os picos em torno de 21 e 174 ppm, associados a grupos metil e carboxil em grupos acetatos comumente presentes em hemicelulose.⁸ Contudo nem todos os açúcares presentes na

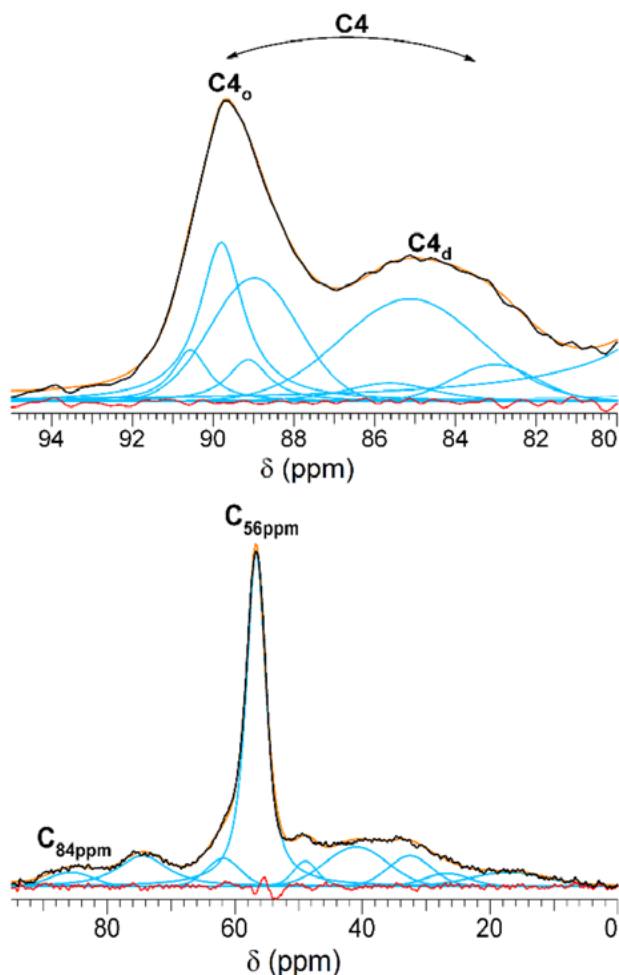


Figura 3. Espectros de RMN de ^{13}C CP/MAS obtidos para uma amostra de celulose padrão (acima) e lignina padrão (abaixo). O símbolo C4 representa a região de deslocamento químico utilizada para construção das curvas de calibração, onde C4_o e C4_d estão associados a regiões com maior e menor ordem cristalina, respectivamente. Os símbolos $\text{C}_{56\text{ppm}}$ e $\text{C}_{84\text{ppm}}$ representam os picos presentes na amostra de lignina, utilizados na construção das curvas de calibração. Em vermelho temos a diferença entre o espectro experimental (preto) e o ajustado (laranja) a partir da soma das curvas em azul

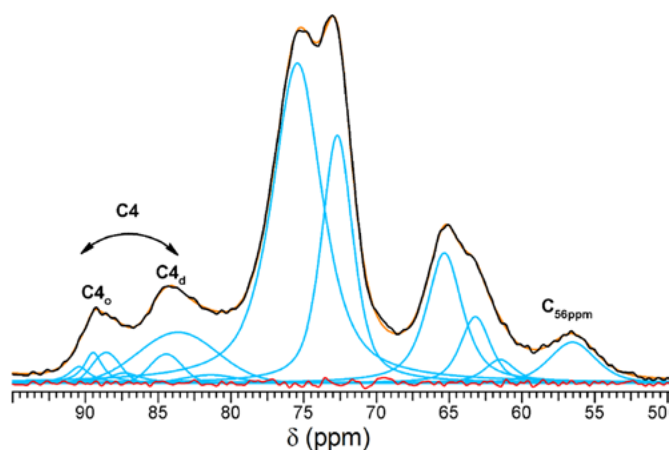


Figura 4. Espectro de RMN de ^{13}C CP/MAS obtido para uma amostra de bagaço de cana. Em vermelho temos a diferença entre o espectro experimental (preto) e o ajustado (laranja) a partir da soma das curvas em azul

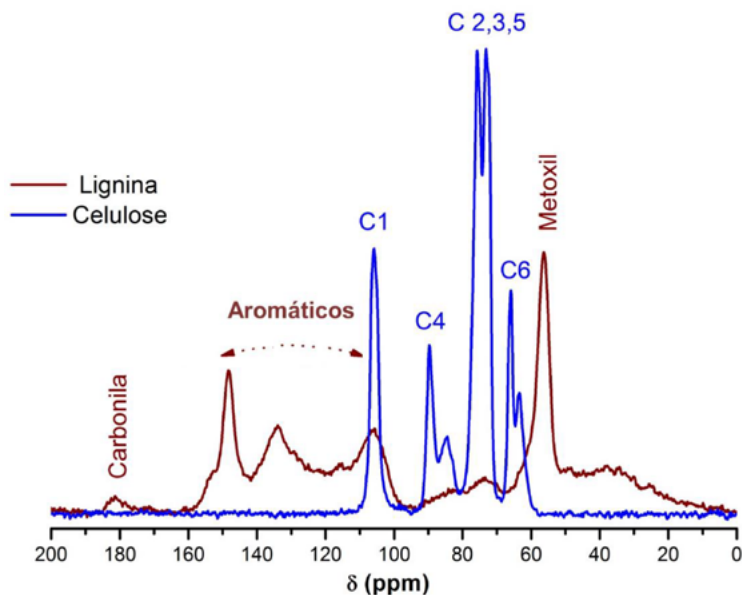


Figura 5. Comparação dos espectros de RMN de ¹³C CP/MAS para os padrões de celulose e lignina utilizados

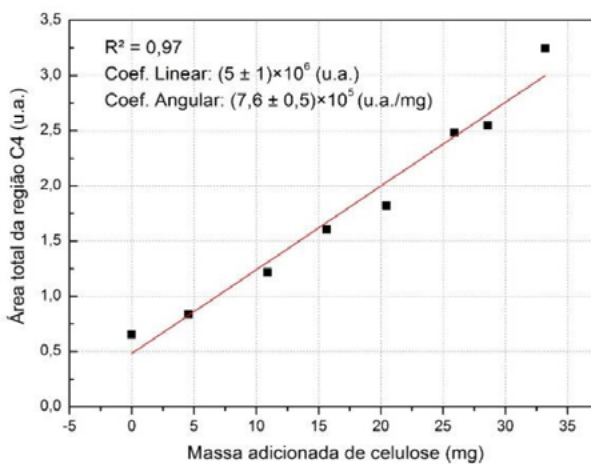


Figura 6. Curva de calibração do teor de celulose o partir da área total da região C4

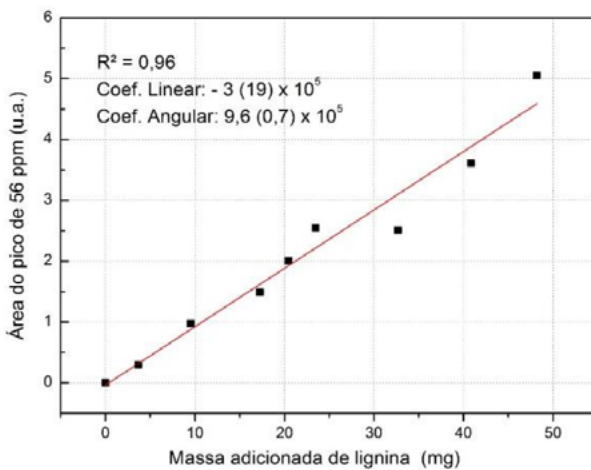


Figura 7. Curva de calibração do teor de celulose considerando apenas a área da região ordenada C4°

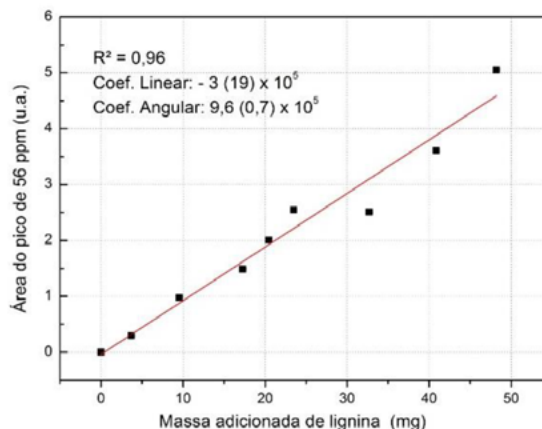


Figura 8. Curva de calibração do teor de lignina a partir da área C^{56ppm} do pico associado ao grupo metoxil

Tabela 2: Teores de lignina, celulose cristalina e holocelulose obtidos para o bagaço de cana natural pelo método de RMN de ^{13}C CP/MAS e pelo método Klason em base seca. A incerteza dos resultados é apresentada entre parenteses

| Método | Lignina (%) | Holocelulose (%) | Celulose ordenada (%) |
|--------|-------------|------------------|-----------------------|
| RMN | 21 (2) | 71 (8) | 30 (2) |
| Klason | 23 | 67* | - |

*100 % - (Lignina Klason)% - (Extrativos)% - (Cinzas)%

hemicelulose contribuem para para esses sinais, visto que a hemicelulose é constituída por diferentes unidades básicas repetitivas.^{4,5,7,8}

Dessa maneira, o método aqui apresentado permite uma estimativa razoável para os teores somados de celulose e hemicelulose, utilizando, para isso, os parâmetros obtidos da curva de calibração da região C4 total. Uma alternativa viável para aprimorar o método seria a utilização de sequências de pulsos que explorassem a diferença de dinâmica para os grupos contendo celulose e hemicelulose; com a consequente diferença nos tempos de relaxação spin-rede de 1H no sistema girante de coordenadas, seria possível então diferenciar as contribuições espectrais associadas à celulose e à hemicelulose.²⁵

Com respeito ao teor previsto para as fibras ordenadas de celulose, é interessante observar que, em uma análise comparativa, o valor encontra-se abaixo tanto do valor estimado para a holocelulose (embora ambos valores tenham sido determinados utilizando curvas de calibração distintas) quanto dos teores citados na literatura para o teor total de celulose em materiais de natureza similar à do material aqui analisado.^{1,4,5} Vale ressaltar que a informação sobre o teor de fibras ordenadas de celulose (muitas vezes denominadas como celulose cristalina) é de grande relevância prática,

porque essas formas mais ordenadas são altamente resistentes aos processos de pré-tratamento químico realizadas em materiais lignocelulósicos para posterior produção do etanol celulósico.¹ Em pré-tratamentos com ácidos, por exemplo, pode ocorrer a remoção total da hemicelulose juntamente com a remoção de uma fração de celulose desordenada, mas a fração cristalina é mais resistente ao ataque.^{1,2,6}

3.3 Estudo de amostras de bagaço de cana quimicamente tratadas

3.3.1 Avaliação qualitativa do tratamento ácido por meio dos espectros de RMN

O método de quantificação acima descrito foi a seguir utilizado para avaliar os teores de lignina, holocelulose e celulose ordenada em materiais submetidos a tratamentos ácidos. Nas Figuras 9, 10, 11 e 12 são apresentados os espectros de RMN de ^{13}C CP/MAS, com ampliação de diferentes regiões espectrais, obtidos para amostras de bagaço de cana submetidas a diferentes tempos de tratamento ácido.

Uma análise comparativa desses espectros mostra um crescimento inicial das intensidades das regiões correspondentes à celulose. Este crescimento

é acompanhado de uma melhor separação dos picos característicos de carbonos pertencentes à celulose.

Na Figura 11 é claramente observado o surgimento, já no espectro correspondente à amostra tratada por 5 min, de dois sinais associados ao carbono C6 (60-68 ppm): um devido à presença de formas ordenadas de celulose (pico mais estreito próximo a 66 ppm) e outro correspondendo às contribuições de hemicelulose e de formas desordenadas de celulose (pico mais largo próximo a 63 ppm).²⁶ Esse resultado é consistente com a análise da Figura 12, onde pode ser observada a eficiência do tratamento ácido na retirada da hemicelulose, visto que o pico em 21 ppm (devido unicamente à hemicelulose) desaparece logo após os primeiros minutos do tratamento. Assim, o desdobramento do pico associado ao carbono C6 acompanha a retirada

da hemicelulose e possivelmente de formas desordenadas de celulose. O mesmo pode ser observado também para os sinais correspondentes aos carbonos C4 e C2,3,5 (Figuras 9 e 10).

Da Figura 10 também pode ser observado o rápido decréscimo de intensidade na região em torno de 80 ppm logo nos primeiros minutos de tratamento. Pela semelhança com o que ocorre na região em torno de 21 ppm, é possível afirmar que também essa intensidade era proveniente de carbonos pertencentes a açúcares de hemicelulose.⁹

Na Figura 12 também se observa a presença de um pico em 34 ppm associado a grupos metilenos presentes na estrutura macromolecular da lignina.²⁷ O crescimento desse sinal pode ser associado à resistência da lignina ao tratamento ácido empregado, bem como ao possível surgimento de grupos metilenos decorrentes do processo.

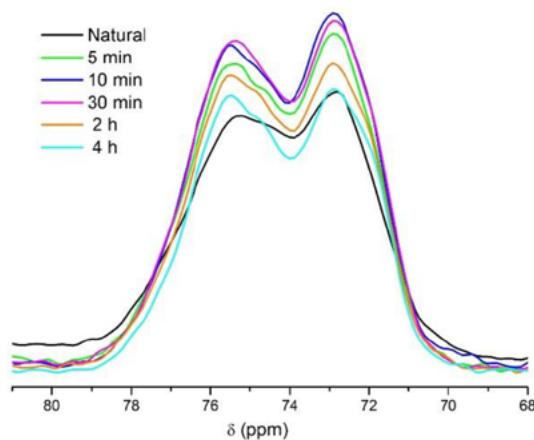


Figura 9. Espectros de RMN de ^{13}C CP/MAS obtidos para amostras de bagaço de cana submetidas a diferentes tempos de tratamento ácido. Ampliação do espectro na região dos carbonos C 2,3,5 da celulose

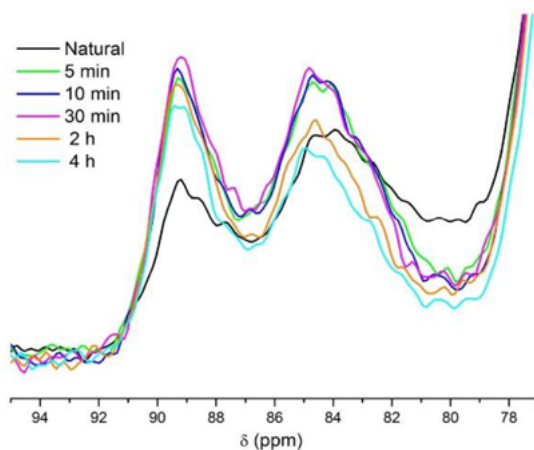


Figura 10. Espectros de RMN de ^{13}C obtidos para amostras de bagaço de cana submetidas a diferentes tempos de tratamento ácido. Ampliação do espectro na região do carbono C4 da celulose

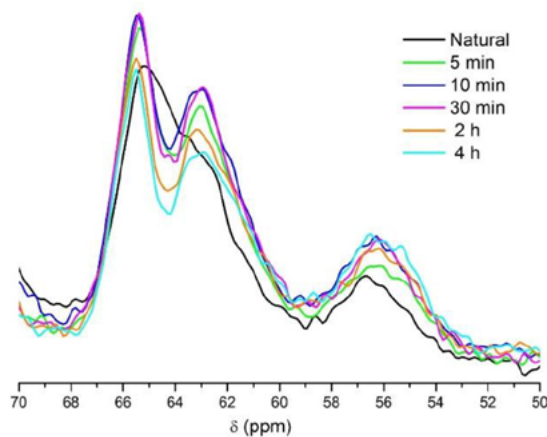


Figura 11. Espectros de RMN de ^{13}C obtidos para amostras de bagaço de cana submetidas a diferentes tempos de tratamento ácido. Ampliação do espectro na região do carbono C6 da celulose e do pico de 56 ppm da lignina

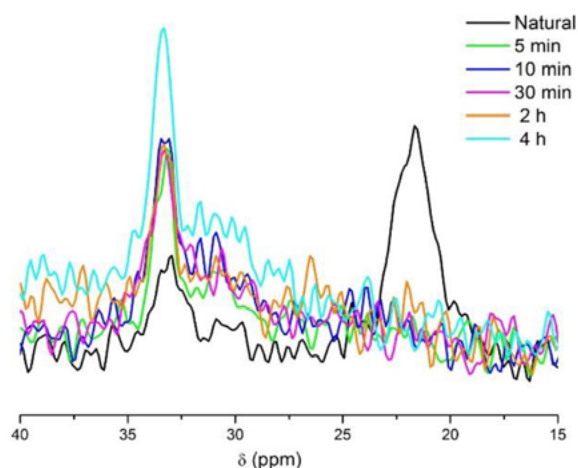


Figura 12. Espectros de RMN de ^{13}C obtidos para amostras de bagaço de cana submetidas a diferentes tempos de tratamento ácido. Ampliação do espectro na região dos grupos metil associados a hemicelulose e de grupos do tipo metileno

A Figura 10 mostra ainda o claro crescimento da região associada a carbonos C4_o , visto que as fibras ordenadas de celulose são mais resistentes à hidrólise ácida.¹ Estas informações podem ser melhor compreendidas observando a Figura 13, onde são comparadas graficamente as dependências com o tempo de tratamento das intensidades devidas à holocelulose (C4) e às formas ordenadas (C4_o) e desordenadas (C4_d) de celulose nas amostras submetidas ao tratamento ácido. Após um rápido crescimento inicial, observa-se uma queda contínua na intensidade de holocelulose; porém, ocorre um relativo crescimento na intensidade devida à celulose ordenada, além de uma grande resistência desta ao tratamento ácido, visto que para longos

tempos a queda em sua intensidade é quase desprezível quando comparada à queda de intensidade associada às formas desordenadas.

A Figura 11 mostra que o pico em 56 ppm característico da lignina mantém sempre um crescimento com a sequência do tratamento ácido. Essa informação também fica mais clara a partir da análise gráfica da evolução da intensidade desse pico em função do tempo de hidrólise, como pode ser visto na Figura 14. Esse crescimento constante indica que a lignina é resistente a esse tipo de tratamento a que o bagaço de cana foi submetido e que, portanto, as amostras submetidas aos tratamentos ácidos tornaram-se cada vez mais ricas em lignina.

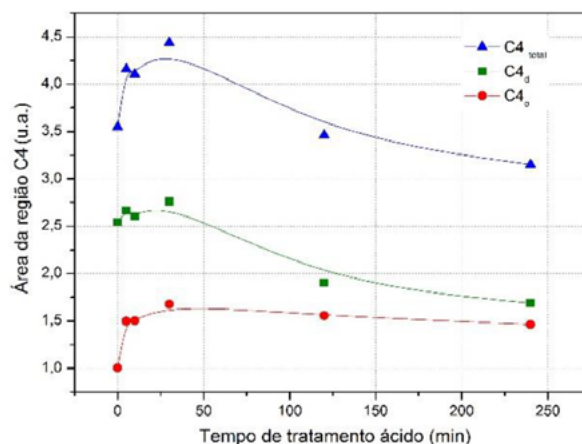


Figura 13. Evolução com o tratamento ácido das intensidade devidas à holocelulose (C4) e às formas ordenadas (C4^o) e desordenadas (C4^d) de celulose nas amostras de bagaço de cana submetidas a diferentes tempos de tratamento ácido. As linhas que ligam os pontos são apenas guias para os olhos

3.3.2 Aplicação do método de quantificação por RMN

O método previamente discutido de quantificação dos teores de lignina e carboidratos foi então aplicado às amostras de bagaço de cana submetidas ao tratamento ácido; os resultados estão apresentados na Tabela 3.

Como já observado, os resultados da análise quantitativa indicam uma maior concentração de lignina no material com o aumento no tempo de tratamento ácido, o que é observado também para as fibras ordenadas de celulose. É interessante notar que o teor de fibras ordenadas de celulose tem uma ligeira queda para longos tempos de tratamento, ao mesmo tempo em

que ocorre uma queda muito mais intensa para o teor de holocelulose previsto. Todavia, uma vez que na fase final do tratamento já não há mais hemicelulose, o teor de holocelulose corresponde ao teor total de celulose no material. Dessa forma a redução no teor total de celulose numa taxa mais rápida que o teor de celulose cristalina indica a remoção das formas mais desordenadas de celulose.

Pode-se observar que os teores de holocelulose previstos apresentam um problema de superestimação, levando em alguns casos a teores somados de lignina e holocelulose acima de 100%. Esse fato mostra claramente uma limitação do método desenvolvido no que diz respeito à determinação acurada do teor de holocelulose, o

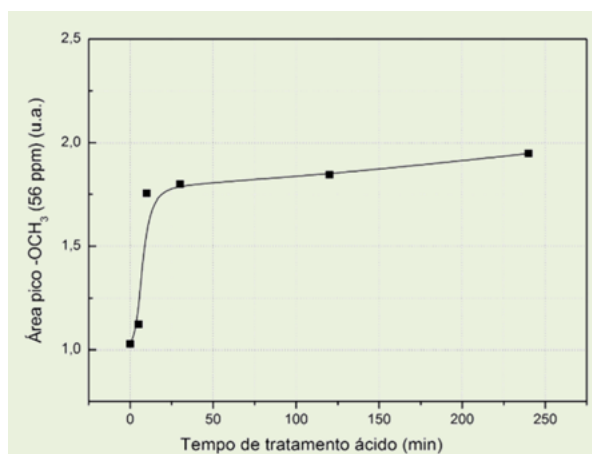


Figura 14. Evolução com o tempo de tratamento ácido da intensidade do pico em 56 ppm, característico da lignina, nas amostras de bagaço de cana submetidas a diferentes tempos de tratamento ácido. A linha que liga os pontos é uma guia para os olhos

Tabela 3. Teores previstos pelo método de quantificação desenvolvido, aplicado para as amostras de bagaço de cana submetidas a tratamentos ácidos. A incerteza dos resultados é apresentada entre parenteses

| Tempo (min) | Teor (%) – RMN CP/MAS | | |
|-------------|-----------------------|-------------------|--|
| | Lignina | Holocelulose (C4) | Celulose Cristalina (C4 ^o) |
| 0 | 21 (3) | 71 (8) | 31 (3) |
| 5 | 23 (3) | 83 (10) | 46 (4) |
| 10 | 36 (5) | 81 (10) | 46 (4) |
| 30 | 37 (5) | 88 (10) | 51 (5) |
| 120 | 38 (5) | 65 (8) | 47 (4) |
| 240 | 40 (5) | 57 (7) | 45 (4) |

que pode estar associado à sobreposição de sinais com dinâmica de transferência de polarização distinta nos materiais lignocelulósicos reais em comparação com a amostra padrão de celulose utilizada para construção das curvas de calibração, ou ainda a mudanças na dinâmica de polarização do material com o tratamento químico.

3.3.3 Avaliação qualitativa da estrutura da lignina.

Como já discutido, há um crescimento no teor de lignina com o aumento do tempo de

tratamento ácido. Além desse aumento, também é possível observar nos espectros de RMN ¹³C CP/MAS das amostras quimicamente tratadas, como apresentado na Figura 15, um crescimento do pico em torno de 148 ppm associado aos carbonos aromáticos 3 e 4 de unidades fenólicas do tipo guaiacila (G3,4^f), na qual o carbono 3 está ligado a um metoxil e o carbono 4 a uma hidroxila. É importante observar que em unidades fenólicas tipo guaiacila, por não haver um metoxil ligado ao carbono 5, há maior ocorrência de ligações desse carbono com outros grupos no processo de polimerização da lignina.²⁸

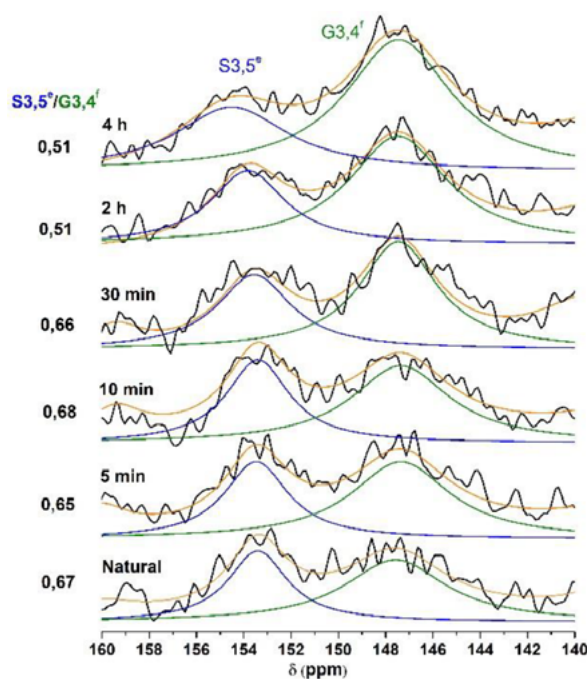


Figura 15. Espectros de RMN de ¹³C CPMAS obtidos para uma amostra de bagaço de cana submetida a diferentes tempos de tratamento ácido, com ampliação da região espectral associada aos carbonos aromáticos 3 e 5 de unidades siringilas eterificadas (S3,5^e) e carbonos 3 e 4 de unidades guaiacilas fenólicas (G3,4^f)

Como pode ser observado, o crescimento do pico G3,4^f é acompanhado por uma queda na intensidade do pico em torno de 153 ppm associado aos carbonos aromáticos 3 e 5 de unidades siringilas (S3,5^e), em que há uma ligação tipo éter entre o carbono 4 desta unidade com outros grupos. Assim, a queda na intensidade do pico S3,5^e, observada com o crescimento do tempo de tratamento, pode estar associada à quebra dessas ligações éter, o que provoca uma redução no deslocamento químico dos carbonos 3 e 5 de unidades siringilas para próximo ao pico de 148 ppm associado a unidades fenólicas, uma vez que, após a quebra da ligação éter, o carbono 4 passa a ligar-se novamente a uma hidroxila.^{28,29}

Dessa forma, a análise comparativa da razão S3,5^e/G3,4^f para as amostras tratadas indica que para longos tempos de tratamento, observa-se um considerável efeito de despolimerização da lignina, uma vez que a intensidade do pico G3,4^f tende a aumentar em relação ao pico S3,5^e. Assim, mesmo sabendo que o teor de lignina aumenta com o tempo de tratamento ácido, isto não significa que a estrutura da lignina permanece inalterada o que na verdade se observa é que quanto maior o tempo de tratamento menor será o grau de polimerização da lignina obtida no final do processo.

3.3.4 Avaliação do índice de cristalinidade das amostras quimicamente tratadas

A relação entre as áreas C4_o e C4_d também foi utilizado para estimar o IC das amostras quimicamente tratadas. A fim de realizar uma análise comparativa, o IC também foi determinado por meio de DRX. Na Figura 16 são apresentados os difratogramas de raios X obtidos para as diferentes amostras.

Como pode ser observado na Tabela 4, o índice de cristalinidade obtido por ambas as técnicas indica o aumento do percentual de estruturas com maior ordem cristalina, corroborando assim o resultado observado de que a celulose cristalina apresenta maior resistência ao ataque ácido empregado.²

É importante observar que, como já discutido na literatura, o IC_{DRX} obtido por meio da relação entre as alturas I₀₀₂ e I_{AM} tende a ser maior que os valores obtidos por RMN e também por outros métodos em que se faz a deconvolução dos difratogramas de raios X, pois a posição em que se mede a intensidade I_{AM} não está alinhada com o máximo associado à contribuição da celulose amorfa para o difratograma.^{23,30}

Por esse motivo, o valor de IC_{DRX} obtido por comparação entre as alturas não deve ser considerado de maneira absoluta, mas ao mesmo tempo, por ser um procedimento fácil de ser

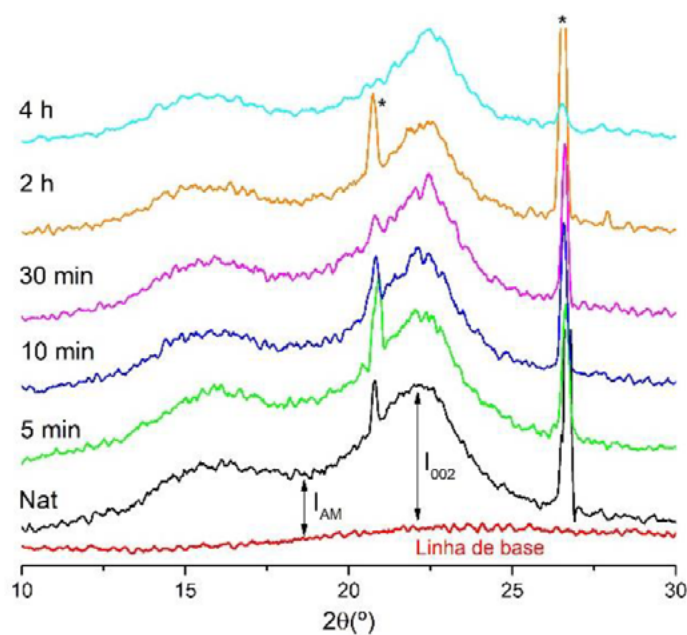


Figura 16. Difratogramas de raios X obtidos para bagaço de cana natural (Nat) e tratado quimicamente durante diferentes tempos de tratamento. Os picos marcados com asterisco são devidos à presença de sílica nas amostras

implementado, pode ser largamente empregado em análises comparativas entre diferentes amostras de natureza similar (como as obtidas por tratamentos químicos partindo de uma mesma matéria-prima, que é o caso das amostras discutidas neste trabalho). Comparando o cálculo de IC obtido por diferentes métodos, Park et al. indicaram que o uso de RMN permite a obtenção de resultados muito próximos aos obtidos por deconvolução dos difratogramas de raios X.³⁰

Em uma análise comparativa entre as Tabelas 3 e 4 é possível observar que os valores de IC_{RMN} e os teores de celulose cristalina estão muito próximos, mas é importante considerar que enquanto o IC_{RMN} indica o percentual de celulose cristalina dentre os carboidratos, o teor calculado por meio das curvas de calibração indica o percentual de celulose cristalina para todo o material de biomassa analisado.

Ainda comparando as Tabelas 3 e 4 é possível observar que o teor de celulose cristalina sofre uma ligeira queda para longos tempos de tratamento, indicando que a celulose cristalina também sofre degradação com o tratamento ácido. Todavia, o aumento do índice de cristalinidade indica que essa degradação é menor que para as estruturas dos carboidratos com baixa ordem estrutural.

3.3.5 Avaliação da microestrutura superficial.

Na Figura 17 são apresentadas imagens de MEV obtidas para as amostras de bagaço de cana natural e tratada quimicamente a 240 min. Como pode ser observado, a estrutura natural das fibras é desconstruída pelo ataque ácido, revelando a existência de diferentes estruturas morfológicas presentes nas fibras de bagaço de cana, sendo que algumas estruturas aparentam ser mais facilmente desconstruídas pela ação do ácido.

As imagens apresentadas na Figura 17 A e B mostram uma fibra natural do bagaço de cana

estudado com superfície compacta, sem a clara ocorrência de sobreposição de diversas camadas e sem a presença de cavidades semelhantes a poros, como é observado nas imagens C e D, onde são apresentadas fibras obtidas após o tratamento ácido por 240 minutos. Na imagem D, pode-se também observar a presença de uma estrutura com cavidades maiores que as observadas na imagem C, onde observam-se rupturas possivelmente decorrentes do tratamento empregado.

Sabe-se da literatura que a hemicelulose é formada por uma variedade de carboidratos, incluindo a glicose, que não se ligam entre si da mesma maneira que as moléculas de glicose se ligam para formar a celulose, mas que na verdade fazem uma conexão entre as microfibrilas de celulose e a estrutura polimérica e amorfa da lignina.³¹

Nesse sentido, a considerável hidrólise dos açúcares de hemicelulose e também a não tão intensa degradação da celulose em estruturas com menor ordem cristalina provocou a desconstrução da estrutura lignocelulósica. Como já observado na literatura, a extração da hemicelulose das fibras de bagaço de cana tem como efeito a remoção de camadas superficiais que recobrem as fibras, além de promover a separação das microfibrilas de celulose.^{27,32,33}

Assim, a observação de diferentes estruturas morfológicas após o tratamento químico indica que o tratamento ácido empregado teve maior efeito na digestão da superfície das fibras e provocou maior degradação das regiões com maior conteúdo de hemicelulose e celulose amorfa. Ao mesmo tempo, observa-se que o tratamento empregado não foi suficiente para provocar a completa desconstrução das fibras do bagaço, sendo necessário para isso o uso de diferentes tratamentos ácidos e básicos a fim de se atacar de forma mais eficiente os componentes lignocelulósicos.²⁷

Tabela 4. Índice de cristalinidade das amostras de bagaço de cana obtidos por RMN e DRX

| Tempo (min) | IC_{RMN} (%) | IC_{DRX} (%) |
|-------------|----------------|----------------|
| 0 | 28 | 57 |
| 5 | 36 | 55 |
| 10 | 37 | 62 |
| 30 | 38 | 61 |
| 120 | 45 | 64 |
| 240 | 46 | 72 |

4. Conclusões

A espectroscopia de RMN de ^{13}C no estado sólido com CP/MAS mostrou-se mais uma vez uma ferramenta importante para estudos de materiais lignocelulósicos, tanto em análises qualitativas como também de maneira promissora em análises quantitativas, visto que as curvas de calibração obtidas por regressão linear dos pontos experimentais apresentaram coeficiente de determinação entre 96 e 99 %, além de serem capazes de prever o teor de lignina e holocelulose da amostra de bagaço de cana em boa concordância com os teores obtidos pelo método Klason. Essa conformidade dos resultados indica que o método pode ser de fato útil para análise quantitativa de materiais lignocelulósicos, sendo necessária uma validação do método para determinação de holocelulose por meio da análise de outros materiais de biomassa, uma vez que essa validação já foi realizada para o teor de lignina.^{6,34}

É importante ressaltar que o desenvolvimento de um método de quantificação somente baseado em espectroscopia de RMN possui grandes vantagens em comparação com métodos

de análise química direta (como o método Klason), por ser a análise por RMN não destrutiva, relativamente rápida e simples e por não envolver a produção de resíduos químicos.

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

Com respeito à hemicelulose, os estudos realizados mostraram a rápida extração da mesma logo nos primeiros minutos de tratamento, não só pelo rápido desaparecimento do pico em torno de 21 ppm, mas também pelo rápido surgimento de sinais mais resolvidos característicos de celulose nas regiões dos carbonos C6, C2,3,5 e C4.

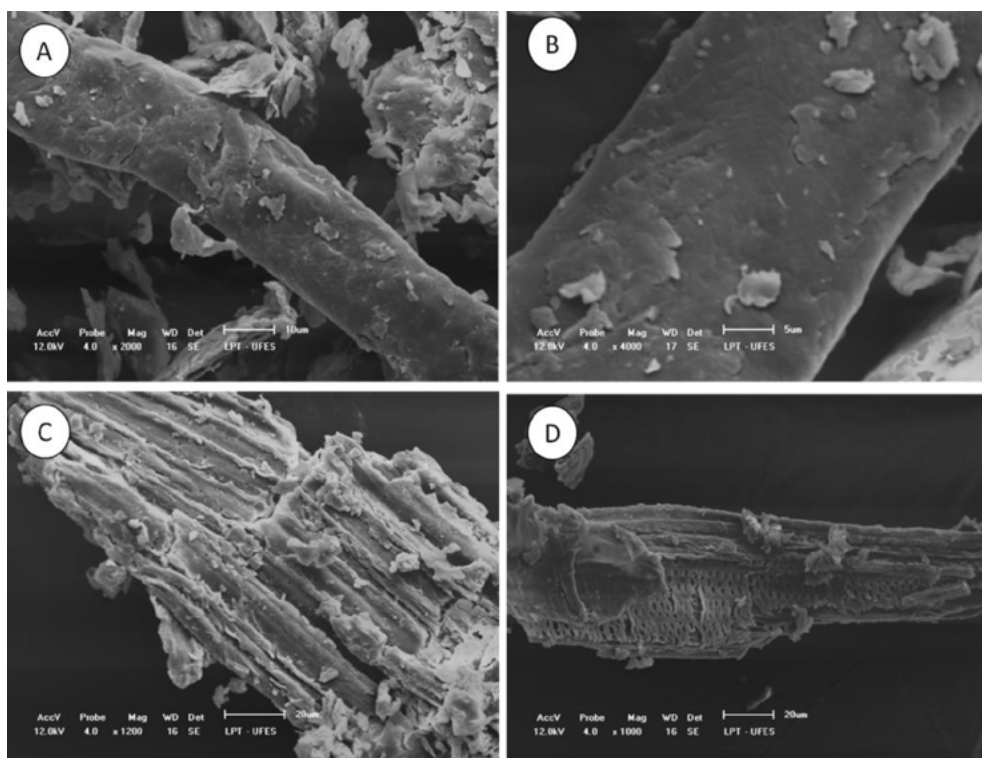


Figura 17. Imagens de MEV registradas para amostras de bagaço de cana natural (A e B) e tratada quimicamente a 240 minutos (C e D)

Esses resultados também indicaram a resistência da lignina ao tratamento realizado, de forma que quanto maior o tempo de tratamento, maior é a concentração de lignina presente no material.

As análises do IC tanto por RMN como por DRX corroboraram os estudos sobre o teor de celulose cristalina obtido por RMN e indicaram um aumento progressivo do percentual de celulose cristalina em relação aos carboidratos, enquanto que para longos tempos de tratamento a metodologia desenvolvida por RMN revelou uma pequena redução no teor de celulose cristalina em relação ao conteúdo total lignocelulósico.

A observação da microestrutura da superfície das fibras do bagaço indicou que o tratamento tem um efeito mais intenso na superfície das fibras. A partir das informações obtidas por RMN é possível inferir que as estruturas mais afetadas pelo tratamento ácido devem possuir uma maior quantidade de hemicelulose e celulose amorfa.

Agradecimentos

CNPq, CAPES, FAPES, CENPES/Petrobras, FINEP, NCQP/LabPetro, UFES.

Referências Bibliográficas

- ¹ Santos, F. A.; Queiróz, J. H. de; Colodette, J. L.; Fernandes, S. A.; Guimarães, V. A.; Rezende, S. T. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. *Química Nova* **2012**, *35*, 1004. [[CrossRef](#)]
- ² Foston, M. B.; Hubbell, C. A.; Ragauskas, A. J. Cellulose Isolation Methodology for NMR Analysis of Cellulose Ultrastructure. *Materials* **2011**, *4*, 1985. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ³ Ferreira, J. P. de S.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade de Aveiro, Portugal, 2009. [[Link](#)]
- ⁴ Alvez, R. E.; *Dissertação de Mestrado*, Univerdidade de São Paulo, Brasil, 2011. [[Link](#)]
- ⁵ Marabezi, K.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade de São Paulo, Brasil, 2009. [[Link](#)]
- ⁶ Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 7989: pasta celulósica e madeira: determinação de lignina insolúvel em ácido. Rio de Janeiro, 2010. [[Link](#)]
- ⁷ Larsson, P. T.; Hult, E.; Wickholm, K.; Pettersson, E.; Iversen, T. CP/MAS ¹³C NMR spectroscopy applied to structure and interaction studies on cellulose I. *Solid State Nuclear Magnetic Resonance* **1999**, *15*, 31. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁸ Wilson, M. A.; *NMR Techniques and Applications in Geochemistry and Soil Chemistry*, Oxford: New York, 1987.
- ⁹ Kolodziejski, W.; Frye, J. S.; Maciel, G. E. Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectrometry with cross polarization and magic-angle spinning for analysis of lodgepole pine wood. *Analytical Chemistry* **1982**, *54*, 1419. [[CrossRef](#)]
- ¹⁰ Berns, A. E.; Conte, P. Effect of ramp size and sample spinning speed on CPMAS ¹³C NMR spectra of soil organic matter. *Organic Geochemistry* **2011**, *42*, 926. [[CrossRef](#)]
- ¹¹ Smernik, R. J.; Oades, J. M. The use of spin counting for determining quantitation in solid state ¹³C NMR spectra of natural organic matter: 1. Model systems and the effects of paramagnetic impurities. *Geoderma* **2000**, *96*, 101. [[CrossRef](#)]
- ¹² Freitas, J. C. C.; *Tese de Doutorado*, Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas, Brasil, 2000. [[Link](#)]
- ¹³ MacKenzie, K. J. D.; Smith, M. E.; *Multinuclear solid-state NMR of inorganic materials*. In: Pergamon Materials Series, 6a. Ed.: Cahn, R. W. Pergamon: Amsterdam, 2002. [[Link](#)]
- ¹⁴ Freitas, J. C. C.; Cunha, A. G.; Emmerich, F. G. In *Chemistry and Physics of Carbon* Radovic, L. R., ed., Vol. 31, CRC Press: Boca Raton, 2012, cap 2. [[Link](#)]
- ¹⁵ Gil, V. M. S.; Geraldés, C. F. G. C.; *Ressonância magnética nuclear – fundamentos, métodos e aplicações*. Fundação Calouste Gulbenkian: Lisboa, 1987.
- ¹⁶ Cipriano, D. F.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal do Espírito Santo, Brasil, 2015. [[Link](#)]
- ¹⁷ Lima, M. A.; Lavorente, G. B.; Silva, H. K. P.; Bragatto, J.; Rezende, C. A.; Bernardinelli, O. D.; Azevedo, A. R.; Gomes, L. D.; McQueen-Mason, S. J.; Labate, C. A.; Polikarpov, I. 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* **2013**, *6*, 75. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ¹⁸ Limayam, A.; Ricke, S. Lignocellulosic biomass for bioethanol production: Current perspectives, potential issues and future prospects. *Progress in Energy and Combustion Science* **2012**, *38*, 449. [[CrossRef](#)]

- ¹⁹ Rezende, C. A.; Lima, M. A.; Maziero, P.; Azevedo, E. R.; Garcia, W.; Polikarpov, I. Chemical and morphological characterization of sugarcane bagasse submitted to a delignification process for enhanced enzymatic digestibility. *Biotechnology for Biofuels* **2011**, *4*, 54. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ²⁰ Technical Association of Pulp and Paper Industry (TAPPI). T 222 om-02: Acid-insoluble lignin in wood and pulp, 2006. [[Link](#)]
- ²¹ Duer, Melinda J. *Introduction to solid-state NMR spectroscopy*. Backwell: Oxford, 2004.
- ²² Park, S.; Baker, J. O.; Himmel, M. E.; Parilla, P. A.; Johnson, D. D. Cellulose crystallinity index: measurement techniques and their impact on interpreting cellulase performance. *Biotechnology for Biofuels* **2010**, *3*, 10. [[CrossRef](#)]
- ²³ Segal, L.; Creely, J. J.; Martin, Jr; Conrad, C. M. An empirical method for estimating the degree of crystallinity of Native Cellulose. *Textile Research Journal* **1959**, *29*, 10. [[CrossRef](#)]
- ²⁴ Ghaffar, S. H.; Fan, M. Structural analysis for lignin characteristics in biomass straw. *Biomass and Bioenergy* **2013**, *57*, 264. [[CrossRef](#)]
- ²⁵ Liitiä, T.; Maunu, S. L.; Hortling, B.; Tamminen, T.; Pekkala, O.; Varhimo, A. Cellulose crystallinity and ordering of hemicelluloses in pine and birch pulps as revealed by solid-state NMR spectroscopic methods. *Cellulose* **2003**, *10*, 307. [[CrossRef](#)]
- ²⁶ Haw, J. F.; Maciel, G. E.; Schoeder, H. A. Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectrometric study of wood and wood pulping with cross polarization and magic-angle spinning. *Analytical Chemistry* **1984**, *56*, 1323. [[CrossRef](#)]
- ²⁷ Chandel, A. D.; Antunes, F. A. F.; Anjos, V.; Bell, M. J. V.; Rodrigues, L. N.; Polikarpov, I.; Azevedo, E. R.; Bernardinelli, O. D., Rosa, C. A.; Pagnocca, F. C.; Silva, S. S. 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* **2014**, *7*, 63. [[CrossRef](#)]
- ²⁸ Wikberg, H.; Maunu, S.L.; Characterisation of thermally modified hard - and softwoods by ¹³C CP/MAS NMR. *Carbohydrate Polymers* **2004**, *58*, 461. [[CrossRef](#)]
- ²⁹ Le Brech, Y.; Delmotte, L.; Raya, J.; Nicolas, B.; Gadiou, R.; Dufour, A. High Resolution Solid State 2D NMR Analysis of Biomass and Biochar. *Analytical Chemistry* **2015**, *87*, 843. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ³⁰ 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* **2010**, *3*, 10. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ³¹ Albersheim, P.; Darvill, A.; Roberts, K.; Sederoff, R.; Staehelin, A.; *Plant Cell Walls*, Garland Science: New York, 2010.
- ³² Pereira, S. C.; Maehara, L.; Machado, C. M. M.; Farinas, C. S. Physical–chemical-morphological characterization of the whole sugarcane lignocellulosic biomass used for 2G ethanol production by spectroscopy and microscopy techniques. *Renewable Energy* **2016**, *87*, 607. [[CrossRef](#)]
- ³³ Zhao, H.; Kwak, J. H.; Z. C. Zhang, Z. C.; Brown, H. M.; B. W. Arey, B. W.; Holladay; J. E. Studying cellulose fiber structure by SEM, XRD, NMR and acid hydrolysis. *Carbohydrate Polymers* **2007**, *68*, 235. [[CrossRef](#)]
- ³⁴ Gao, X.; Laskar, D. D.; Zeng, J.; Helms, G. L., Chen, S. A ¹³C CP/MAS-Based Nondegradative Method for Lignin Content Analysis. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering* **2015**, *3*, 153. [[CrossRef](#)]