

Título em Português:	Uso da RMN de ¹³ C em estado sólido associada a estatística multivariada para estudo de degradação de matéria orgânica natural
Título em Inglês:	¹³ C Solid-state NMR associated to multivariate statistics to study the degradation of natural organic matter.
Autor:	João Gabriel da Silva Soares
Instituição:	Universidade de São Paulo
Unidade:	Instituto de Física de São Carlos
Orientador:	Eduardo Ribeiro de Azevêdo
Área de Pesquisa / SubÁrea:	Física da Matéria Condensada
Agência Financiadora:	USP - Programa Unificado de Bolsas

USO DA RMN DE ^{13}C EM ESTADO SÓLIDO ASSOCIADA A ESTATÍSTICA MULTIVARIADA PARA ESTUDO DE DEGRADAÇÃO DE MATERIA ORGÂNICA NATURAL

João Gabriel da Silva Soares

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Ribeiro de Azevêdo
Colaborador: Dr. Rodrigo Henrique dos Santos Garcia

Universidade de São Paulo
joaosilsoares@usp.br

Objetivos

Este trabalho apresenta uma investigação sobre o uso da RMN de ^{13}C em estado sólido associada à estatística multivariada para estudar a degradação de matéria orgânica natural.

A combinação de técnicas de RMN de estado sólido e estatística multivariada pode fornecer informações mais precisas e detalhadas sobre a degradação da matéria orgânica, permitindo a identificação de compostos específicos e o acompanhamento das mudanças em sua composição ao longo do tempo.

A proposta de modulação espectral por sequências de pulso de RMN e tratamento de espectros via MCR, já foi testada e reportada tanto para a separação de componentes espectrais em bagaço de cana-de-açúcar pré-tratados como para polímeros sintéticos.

Métodos e Procedimentos

A sensibilidade da RMN às mudanças nas chamadas interações de spin nuclear nos tempos de relaxação, torna a RMN uma técnica única no que diz respeito a capacidade de codificar no sinal respostas específicas a diferentes propriedades físico químicas, a ideia é induzir a variabilidade espectral utilizando uma sequência de pulsos que modula o sinal de cada grupo químico resolvido no espectro de RMN de ^{13}C por um fator que dependa de alguma propriedade específica de RMN, por exemplo, dos tempos de relaxação ou do acoplamento dipolar com os núcleos de ^1H .

No entanto, a obtenção de espectros de alta resolução em sólidos pode ser um desafio devido a interações anisotrópicas que causam alargamento das linhas. Para superar isso, são utilizadas três técnicas principais: Polarização Cruzada (CP), Desacoplamento Dipolar (DEC) e Rotação da Amostra em torno do Ângulo Mágico (MAS), sendo a Polarização Cruzada a técnica usada para melhorar a sensibilidade da RMN em sólidos envolvendo a transferência de polarização de spins de núcleos mais sensíveis (^1H) para núcleos menos sensíveis (^{13}C) o que permite a detecção de núcleos que, de outra forma, seriam difíceis de observar.

O acoplamento dipolar é uma interação entre spins nucleares que pode levar ao alargamento das linhas no espectro de RMN, logo o desacoplamento dipolar envolve a aplicação de uma sequência rápida de pulsos de rádio frequência para “desacoplar” estas interações, resultando em linhas mais estreitas no espectro.

Por fim, a Rotação da Amostra em torno do Ângulo Mágico é a técnica que envolve a rotação da amostra em um ângulo específico (aproximadamente 54.73°) em relação ao campo magnético. Isso média as interações anisotrópicas, resultando em linhas mais estreitas e espectros de alta resolução.

Para obter a separação espectral de acordo com a modulação induzida pela sequência de pulsos, usamos um procedimento matemático multivariado denominado resolução de curva multivariada (MCR), procedimento que permite a determinação de vários componentes coexistentes em um sistema químico, permitindo a extração dos espectros puros dos componentes (análise qualitativa), bem como dos perfis de concentração de cada

componente (análise quantitativa), desde que tenham variabilidade diferente em função das fontes de variação presentes na matriz de dados.

Para testar a viabilidade da técnica proposta como solução tomamos como prova de conceito os espectros obtidos em polímeros, além de realizar milhares de simulações para que assim sejam feitos os estudos em matéria orgânica natural, no caso em colônias de diferentes espécies de formigas.

Resultados

O primeiro resultado que evidencia a eficácia do método é justamente no polímero PEEK, e na figura 1 abaixo temos em 1a os espectros adquiridos para o PEEK utilizando a técnica de CPMAS-DipDeph com diferentes valores de t_1 . A diferença de decaimento de intensidade com t_1 para os diferentes grupos de linha é evidente. Aplicando o procedimento de análise por MCR a esse conjunto de espectro, obtêm-se que majoritariamente o espectro é constituído pelos dois componentes espectrais mostrados na figura 1b. Como pode ser observado os espectros dos dois componentes representam claramente os espectros dos carbonos protonados e não protonados do PEEK.

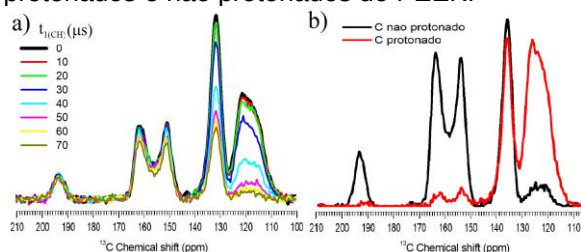


Figura 1: a) Espectros da amostra PEEK adquirido com a técnica de CPMAS-DipDeph por durações distintas $t_1(\text{CH})$ b) Componentes espectrais preditas pela análise de MCR aplicada ao conjunto de espectros de a).

A última e mais complexa aplicação foi em colônias de formigas divididas em 3 partes, topo, base e lixo em ordem decrescente, onde utilizando a sequência CPMAS na amostra liofilizada, realizando o MCR nela e usando a sequência de pulso DPRMAS na amostra umidificada em 50% podemos comparar topo, base e lixo de diferentes colônias podemos encontrar nelas diferentes degradações de grupos aromáticos, carboidratos, alifáticos e ainda separar essas espécies de formigas em micófitas com base no quanto de celulose foi degradada e ainda com base nas observações ao umidificar as colônias, podemos separar estas em Attini superiores (Acromyrmex e Atta

Sexdens) e Attini inferiores (Mycocepurus e Mycetophylax)

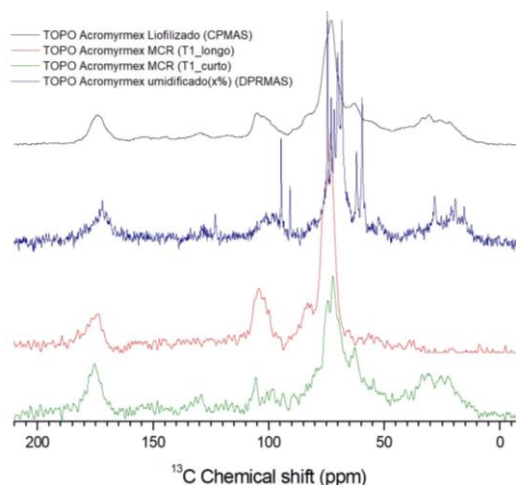


Figura 2: Espectros da amostra Acromyrmex (TOPO) liofilizada, umidificada e as componentes separadas pelo MCR

Conclusões

Podemos então concluir que o método é capaz não somente de separar sinais como quantificar seus componentes, classificar amostras e obter informações a respeito de sua organização, como no caso das colônias de formigas.

Agradecimentos

Agradeço à empresa Dow Chemical Company pelo financiamento da minha bolsa de iniciação científica, ao Instituto de Física de São Carlos e a Universidade de São Paulo pelos recursos fornecidos, aos pesquisadores André Rodrigues, Mariana de Oliveira Barco e Etelvino H. Novotny pelo auxílio e principalmente o pós doutorando Rodrigo Henrique dos Santos Garcia.

Referências

- [1] Etelvino H. Novotny, Rodrigo H.S. Garcia e Eduardo R. de Azevedo. "Pulse sequence induced variability combined with multivariate analysis as a potential tool for ^{13}C solid-state NMR signals separation, quantification, and classification". Em: Journal of Magnetic Resonance Open 14-15 (2023)
- [2] Dennis A. Torchia. "The measurement of proton-enhanced carbon-13 T1 values by a method which suppresses artifacts". Em: Journal of Magnetic Resonance (1969)

^{13}C Solid-State NMR associated with multivariate analysis to study degradation of natural organic matter.

João Gabriel da Silva Soares

Supervisor: Professor Dr. Eduardo Ribeiro de Azevêdo

Collaborator: Dr. Rodrigo Henrique dos Santos Garcia

University of São Paulo

joaosilsoares@usp.br

Objectives

This work presents an investigation into the use of solid-state ^{13}C NMR associated with multivariate statistics to study the degradation of natural organic matter. The combination of solid-state NMR techniques and multivariate statistics can provide more accurate and detailed information about the degradation of organic matter, allowing the identification of specific compounds and tracking changes in their composition over time.

The proposal for spectral modulation by NMR pulse sequences and spectrum treatment via MCR has already been tested and reported for both the separation of spectral components in pre-treated sugarcane bagasse and synthetic polymers.

Materials and Methods

NMR's sensitivity to changes in so-called nuclear spin interactions in relaxation times makes NMR a unique technique in terms of its ability to encode specific responses to different physicochemical properties in the signal. The idea is to induce spectral variability using a pulse sequence that modulates the signal from each chemical group resolved in the ^{13}C NMR spectrum by a factor that depends on some specific NMR property, for example, relaxation times or dipolar coupling with ^1H nuclei.

However, obtaining high-resolution spectra in solids can be a challenge due to anisotropic interactions that cause line broadening. To overcome this, three main techniques are used:

Cross Polarization (CP), Dipolar Decoupling (DEC), and Magic Angle Spinning (MAS), with Cross Polarization being the technique used to improve the sensitivity of NMR in solids involving the transfer of polarization from more sensitive nuclei (^1H) to less sensitive nuclei (^{13}C), which allows the detection of nuclei that would otherwise be difficult to observe.

Dipolar coupling is an interaction between nuclear spins that can lead to line broadening in the NMR spectrum, so dipolar decoupling involves the application of a rapid sequence of radio frequency pulses to "decouple" these interactions, resulting in narrower lines in the spectrum.

Finally, Magic Angle Spinning is a technique that involves rotating the sample at a specific angle (approximately 54.73 degrees) relative to the magnetic field. This averages out the anisotropic interactions, resulting in narrower lines and high-resolution spectra.

To achieve spectral separation according to the modulation induced by the pulse sequence, we use a multivariate mathematical procedure called Multivariate Curve Resolution (MCR). This procedure allows the determination of several coexisting components in a chemical system, enabling the extraction of pure spectra of the components (qualitative analysis), as well as the concentration profiles of each component (quantitative analysis), provided they have different variability depending on the sources of variation present in the data matrix.

To test the viability of the proposed technique as a solution, we took as proof of concept the

spectra obtained in polymers, in addition to performing thousands of simulations so that studies can be carried out on natural organic matter, in this case in colonies of different species of ants.

Results

The first result that demonstrates the effectiveness of the method is precisely in the PEEK polymer. In figure 1 below, we have in 1a the spectra acquired for PEEK using the CPMAS-DipDeph technique with different t_1 values. The difference in intensity decay with t_1 for the different line groups is evident. Applying the MCR analysis procedure to this set of spectra, it is obtained that the spectrum is mainly constituted by the two spectral components shown in figure 1b. As can be observed, the spectra of the two components clearly represent the spectra of the protonated and non-protonated carbons of PEEK.

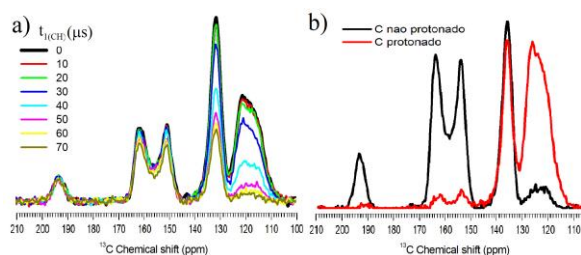


Figure 1: a) Spectra of the PEEK sample acquired with the CPMAS-DipDeph technique for distinct $t_1(\text{CH})$ durations b) Spectral components predicted by the MCR analysis applied to the set of spectra from a).

The last and most complex application was in ant colonies divided into 3 parts: top, base, and waste in descending order. By using the CPMAS sequence on the lyophilized sample, performing the MCR on it, and using the DPRMAS pulse sequence on the 50% humidified sample, we can compare the top, base, and waste of different colonies. We can find different degradations of aromatic groups, carbohydrates, aliphatics in them and even separate these ant species into mycophagous based on how much cellulose was degraded. Furthermore, based on observations when humidifying the colonies, we can separate these into higher Attini (Acromyrmex and Atta Sexdens) and lower Attini (Mycocepurus and Mycetophylax).

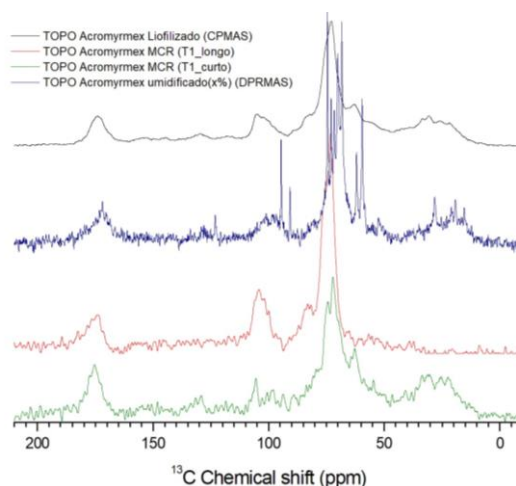


Figure 2: Spectra of the lyophilized Acromyrmex (TOP) sample, humidified, and the components separated by MCR.

Conclusions

We can conclude that the method is not only capable of separating signals but also quantifying their components, classifying samples, and obtaining information about their organization, as in the case of ant colonies. This makes it a powerful tool for studying complex systems in various fields.

Acknowledgements

I would like to thank Dow Chemical Company for funding my scientific initiation scholarship, the Institute of Physics of São Carlos and the University of São Paulo for the resources provided, researchers André Rodrigues, Mariana de Oliveira Barco and Etelvino H. Novotny for their assistance, and especially postdoctoral fellow Rodrigo Henrique dos Santos Garcia for all his support.

References

- [1] Etelvino H. Novotny, Rodrigo H.S. Garcia e Eduardo R. de Azevedo. "Pulse sequence induced variability combined with multivariate analysis as a potential tool for ^{13}C solid-state NMR signals separation, quantification, and classification". in: Journal of Magnetic Resonance Open 14-15 (2023)
- [2] Dennis A. Torchia. "The measurement of proton-enhanced carbon-13 T_1 values by a method which suppresses artifacts". in: Journal of Magnetic Resonance (1969)