

Nº 37, set/2000, p.1-5

USO DE RMN NO ESTADO ESTACIONÁRIO PARA AUMENTO DE SENSIBILIDADE DE ANÁLISES QUÍMICAS.

Rodrigo B. V. Azeredo^{1,2}
Luiz Alberto Colnago^{1,3}
Mario Engelsberg⁴

A espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) é uma das mais importantes técnicas analíticas, com importantes aplicações em agricultura como na medida do teor de óleo e umidade em sementes e grãos, umidade em madeira, rações, alimentos, determinação das estruturas dos defensivos agrícolas entre muitas outras aplicações. As aplicações de RMN mais conhecidas envolvem principalmente espectrômetros de alto campo que são muito sensíveis e usam principalmente as diferenças de deslocamentos químicos nas análises. Uma categoria de espectrômetros de RMN que é menos difundida, mas que está sendo gradualmente inserida nos laboratórios de pesquisa, desenvolvimento e controle de qualidade são os equipamentos de baixa resolução em baixo campo. Esses espectrômetros não se beneficiam do deslocamento químico devido ao baixo campo e baixa homogeneidade do ímã e por isso suas aplicações se restringem a medidas de componentes totais ou de componente parciais em amostras heterogêneas.

Devido ao baixo campo esses espectrômetros também são de baixa sensibilidade e são utilizados na análise de substâncias químicas com isótopos de alta abundância natural e grande constante magnetogírica, tais como o H^1 e F^{19} . Mesmo com esses isótopos a amostra tem que ser grande (até 150 ml), para que a razão sinal ruído seja suficiente para observar o sinal em curto espaço de tempo.

As principais vantagens da RMN de baixa resolução sobre os métodos convencionais de análise são: rapidez da análise, quase sempre sem necessidade de uso de produtos químicos ou de preparação da amostra, mantém a integridade da amostra, fácil execução, possibilidade de realizar análises em tecidos "in vivo" e os resultados da análise podem ser coletados, processados e armazenados diretamente em microcomputador.

¹Instituto de Química de São Carlos-USP

²Departamento de Química-UFF

³Embrapa Instrumentação Agropecuária, Cx Postal 741, CEP 13560-970, São Carlos-SP

⁴Departamento de Física, UFPe

CT/37, CNPDIA, set/2000, p.2

Apesar dos aspectos positivos, a baixa sensibilidade da espectroscopia de RMN em baixo campo, mesmo restrita a análise de isótopos de grande abundância natural, ainda é uma barreira que pode, em alguns casos, impossibilitar sua utilização. Assim para ampliar seu uso é necessário melhorar a razão sinal ruído, sem alongar muito o tempo de análise.

Uma metodologia proposta neste trabalho é o uso da RMN pulsada no estado estacionário (EE), trabalhando com tempo de repetição (T_r) bem abaixo do tempo de relaxação transversal (T_2), o que permite somar milhares de espectro por segundo. Com isso a razão sinal ruído (S/R) melhorada com a raiz quadrada do número de espectros (n) adicionados ($S/R = n^{1/2}$). Outra vantagem é que a RMN no estado estacionário pode ser facilmente aplicada em qualquer espectrômetro de RMN de baixa resolução e com um ganho de sensibilidade de até 50 vezes (Azeredo et al, 2000) quando comparada com os métodos convencionais conhecidos com FID (free induction decay) e/ou eco (Colnago et al, 1996).

As análises foram feitas em um espectrômetro baseado em um ímã de NiFeB, com "gap" de 20 mm, e um campo de 0,39 Tesla, equivalente a frequência de 14,400 MHz para ^1H . O probe foi contruído com ma bobina única com 10 mm de diâmetro e 10 mm de altura. O ímã apresentou um T_2^* de 0,5 ms. A parte eletrônica foi baseada no NMR Kit II, Tecmag, usando um sintetizador de frequência PTS 500, amplificador de potência 3205 AMT, um preamplificador Miteq AU1054. Usou-se uma largura de pulsos de 90 graus de 9 usec. Os dados foram digitalizados em um osciloscópio digital HP 54520A.

Na figura 1 estão os sinais de RMN de amostra de óleo vegetal com a variação do T_r de 500 a 0,3ms.

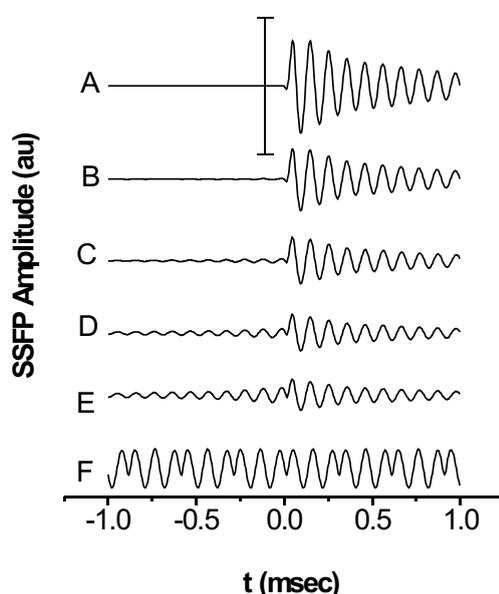


Figura 1 - espectros de ^1H de óleo vegetal obtidos para cada variação no espaçamento de um trem de pulsos de 90° : a) 5 s. b) 1 s. c) 0,1 s. d) 0,05 s. e) 0,0025 s. f) 0,3 ms. Parâmetros espectrais: pulsos de 90° de 10 μs , 32 médias.

CT/37, CNPDIA, set/2000, p.3

Com o $T_r = 500\text{ms}$ (espectro A) a intensidade do FID é máxima uma vez que é igual a $5T_1$, onde o tempo T_1 (tempo de relaxação longitudinal) é de $0,1\text{ s}$. Para $T_r = 108\text{ms}$ (espectro B) nota-se uma ligeira saturação do sinal do FID. Reduzindo-se o T_r para 29ms (espectro C) reduz-se ainda mais a intensidade do FID e começa a formação de um pequeno eco antecedendo o pulso de rf. Com o $T_r = 0,9\text{ ms}$ (espectro D) os sinais do FID/eco se sobrepõem ficando um sinal contínuo, com uma pequena depressão no centro do sinal entre os pulsos. Com $T_r = 0,3\text{ ms}$ as amplitudes do eco e do FID passam a se equivaler (espectro E), ficando um sinal contínuo, conhecido como estado estacionário (EE).

Como os sinais de EE são coletados na ordem de milisegundos, algumas centenas de espectros podem ser adquiridos por minutos, enquanto que com a técnica convencional (FID ou eco), o número de aquisições é dependente de $5T_1$ da amostra o que pode ser da ordem de até dezenas de segundos. Na figura 2 está um exemplo da melhoria da razão sinal ruído com a técnica EE se comparado com a técnica convencional de RMN (FID).

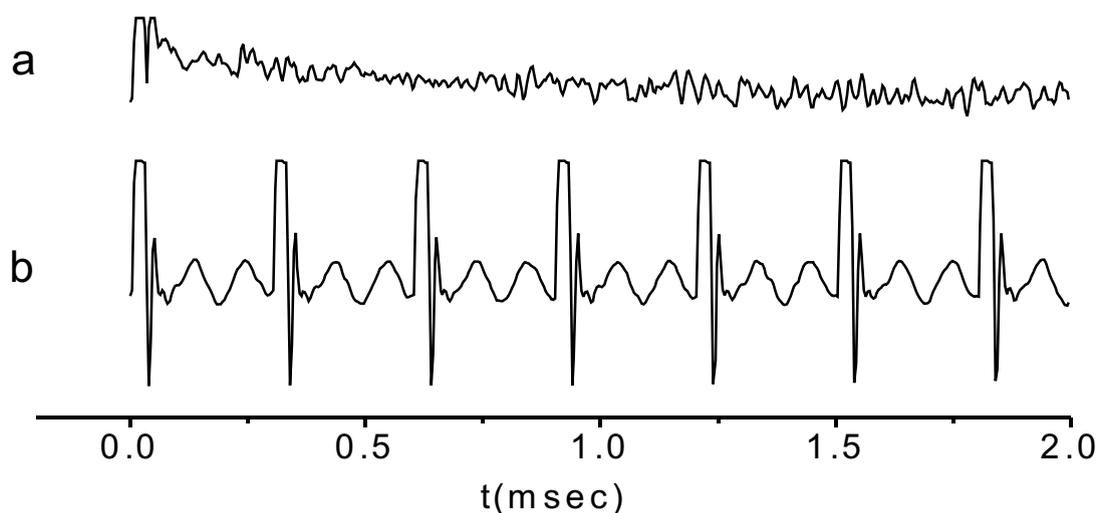


Figura 2. Sinais de RMN de ^1H NMR provenientes de $2,2\text{ mg}$ de óleo de soja. a) sinal do FID com dois scans e tempo de repetição $T_r = 5T_1 = 690\text{ ms}$. b) sinal de SSFP com $T_r = 0,3\text{ms}$, tempo de aquisição (T_a) = $2,1\text{ms}$, e 657 scans. O tempo total de aquisição foi de $1,38\text{s}$ em ambos espectros.

Como pode ser observado, na RMN convencional o sinal (a) é quase indistinguível do ruído de fundo, enquanto no EE (b) a intensidade do sinal é facilmente medida devido ao número superior de espectros acumulados (657 do EE contra 2 do FID) no mesmo tempo de análise.

Uma vez demonstrada as condições experimentais ótimas para alcançar o regime de EE, avaliou-se o emprego desta técnica em análises quantitativas. Portanto foi necessário estudar a linearidade da resposta do sinal de RMN no EE mediante a variação de concentração da amostra e dos tempos de relaxação.

No primeiro experimento foram utilizadas cinco amostras de concentração conhecida de óleo vegetal diluídas em tetracloreto de carbono e cada análise foi repetida três vezes (figura 3).

CT/37, CNPDIA, set/2000, p.4

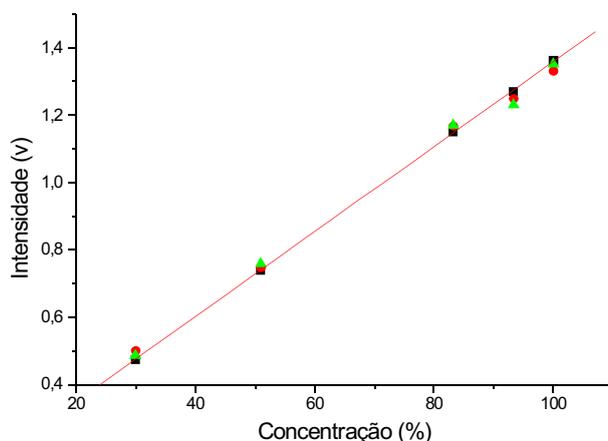


Figura 3 - Gráfico intensidade do sinal versus concentração de óleo empregando a técnica de EE. Parâmetros espectrais: pulso de 90° de 10 s; 512 repetições; tempo de repetição de 0,3ms; $R=0,998$.

A figura 3 mostra que a intensidade do sinal de RMN no EE responde linearmente com a variação de concentração, permitindo obter uma curva de calibração com um coeficiente de correlação $r=0,998$, refletindo uma pequena dispersão nas medidas realizadas. Esse resultado demonstra que mesmo quando há uma variação dos tempos de relaxação da amostra, não há uma influência marcante na linearidade de resposta do sinal de RMN no EE. A intensidade do sinal de RMN no EE não depende dos tempos de relaxação T_1 e T_2 , como no caso da RMN convencional, mas sim da razão $T_2/T_1 + T_2$ (equação 1).

Para exemplificar que com o EE pode-se separar os componentes de uma amostra com grande diferença de T_2 e T_1 , fez uma correlação entre o teor de óleo em sementes individuais de ervilha, que contem apenas 2% de óleo, com o sinal EE (figura 4).

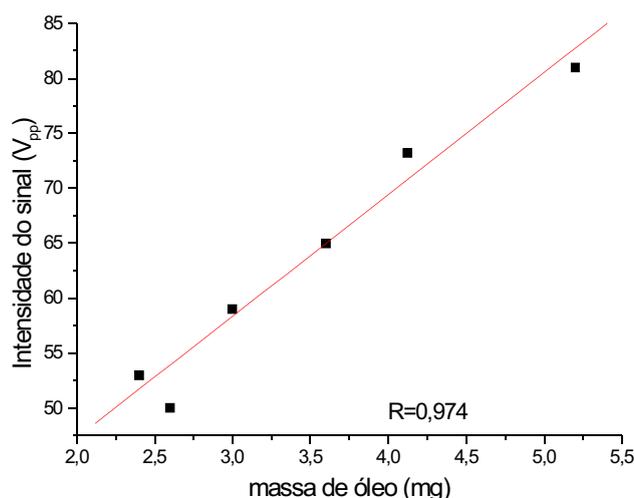


Figura 4 - Gráfico da intensidade do sinal de RMN de ^1H no EE versus a massa de óleo da semente de ervilha. Parâmetros espectrais: pulso de 90° de 10 s; 512 repetições; tempo de repetição de 0,5 ms.

CT/37, CNPDIA, set/2000, p.5

Como o T_2 dos componentes sólidos da semente (proteínas e carboidratos) é menor que $100 \mu\text{s}$ e o T_1 é da ordem de segundos, eles praticamente não contribuem para o sinal EE, como pode ser calculados pela equação 1. Assim, o sinal observado para a sementes secas, à 60°C durante 12 horas, é devido somente ao óleo, que tem T_1 e T_2 da mesma ordem. Os pequenos desvios dos pontos experimentais observados, $r=0,974$, podem ser atribuídos as variações no teor de óleo entre sementes da mesma espécie.

Com esses resultados fica demonstrada a vantagem de se usar a RMN no estado estacionário pois há um enorme ganho na razão sinal ruído, o que pode permitir uma redução do tamanho da amostra em até 50 vezes, quando comparada com a técnica de RMN convencional.

Referências Bibliográficas.

- COLNAGO, L.A.; MARTIN-NETO, L.; BISCEGLI, C.I.; NASCIMENTO, O.R.; BONAGAMBA, T.J.; PANEPUCCI, H.; VIEIRA, E.M.; SEIDEL, P.R.; SPOSITO, G.; OPELLA, S.J. Aplicações da ressonância magnética nuclear (RMN) e ressonância paramagnética eletrônica (EPR). In: CRESTANA, S.; CRUVINEL, P.E.; MASCARENHAS, S.; BISCEGLI, C.I.; MARTIN-NETO, L.; COLNAGO, L.A., ed. **Instrumentação agropecuária: contribuições no limiar do novo século**. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1996. Cap.1, p.15-50.
- AZEREDO, R.B. de V.; COLNAGO, L.A.; ENGELSBURG, M. Quantitative analysis using steady-state free precession nuclear magnetic resonance. *Analytical Chemistry*, v.72, p.2401-2405, 2000.