

Foto: Arquivo Embrapa Instrumentação



Desenvolvimento de um método de análise online da qualidade de produtos agro-alimentares com técnica de RMN-CPMG com pulso de refocalização de baixo ângulo

Fabiana Diuk de Andrade¹
Luiz Alberto Colnago²
Antonio Marchi Netto³

Introdução

A espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) em baixa resolução é empregada como um importante método de análise quantitativa de um ou mais componentes em amostras heterogêneas como sementes, alimentos, rochas, polímeros orgânicos, entre muitos outros materiais. Nesses experimentos a intensidade do sinal do decaimento livre da indução, FID, (do inglês, Free Induction Decay) ou do eco de spin é usada principalmente em análises quantitativas de um dos componentes de uma amostra heterogênea.

Os avanços dos métodos computacionais e quimiométricos permitiram a utilização dos espectros de RMN no domínio do tempo, em análises qualitativas e quantitativas de mais de um componente na mesma amostra. Para isso usa-se a seqüência de eco de spin conhecida por CPMG devido aos seus inventores, Carr-Purcell-Meiboom-Gill (MEIBOOM e GILL, 1966). A técnica CPMG tem sido estudada como um método de avaliação da qualidade de alimentos, petróleo, produtos agrícolas, etc. Essas análises são baseadas principalmente nas diferenças entre os tempos de relaxação transversal, T₂, dos vários componentes da amostra (MEIBOOM e GILL, 1966; NORTON et al., 2001; PRESTES et al., 2007; CORREA et al., 2009; RIBEIRO et al., 2010).

A seqüência CPMG consiste de um trem de pulsos de 180° na direção +y', precedido por um pulso de 90° na direção x' (Figura 1).

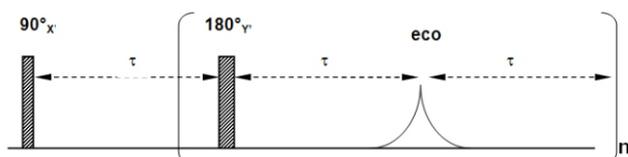


Figura 1. Seqüência de pulsos da técnica de CPMG, onde τ = tempo de espera entre os pulsos.

Utilizando-se a seqüência CPMG desenvolveu-se um sistema automático e rápido de RMN em baixa resolução para análises qualitativas (PRESTES et al., 2007). Neste trabalho demonstrou-se a aplicação da técnica CPMG para medida da qualidade de óleo em sementes intactas para uso na produção de biodiesel. O decaimento exponencial T₂ medido com a seqüência CPMG é inversamente proporcional à viscosidade do óleo nas sementes que por sua vez está diretamente relacionado aos teores e tipos de ácidos graxos e outras propriedades (NORTON et al., 2001; PRESTES et al., 2007). Para esse tipo de medida a semente deve ficar imóvel durante a análise por cerca de 1 segundo (método stop and flow), podendo assim medir a qualidade do óleo em mais de 1000 sementes por hora (PRESTES et al., 2007).

Apesar do grande potencial da técnica CPMG, tem-se encontrado alguns problemas quando aplicado online e por longo período. A aplicação dos pulsos de 180° causa uma sobrecarga no equipamento, principalmente no amplificador de potência e na sonda detectora, acarretando uma menor durabilidade nos componentes. Além disso, esse trem de pulsos contínuo pode levar a um aquecimento indesejável na semente. O aquecimento, além de reduzir o poder germinativo da mesma, também pode levar a valores de T₂ errôneos, uma vez que a viscosidade varia exponencialmente com a temperatura.

O mesmo problema é encontrado em Ressonância magnética por Imagem (RMI) baseada na seqüência de CPMG. O uso de pulsos de 180° em longos trens de ecos pode exceder a taxa de absorção específica, SAR (Specific absorption rate) devido à incidência de RF de alta potência (HENNIG, 1988). Para minimizar esse problema, muitos métodos rápidos de RMI como RARE (rapid acquisition with relaxation enhancement), FSE (fast spin-echo imaging) ou TSE (turbo spin-echo) (HENNIG, 1988)

¹Biologia, Doutoranda, Universidade São Paulo, São Carlos, SP, Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo.

Av. Trabalhador São-carlense 400, 13560-970, fabianadiuk@yahoo.com.br

²Farmácia, Dr., pesquisador, Embrapa Instrumentação, São Carlos- SP, colnago@cnpdia.embrapa.br

³Física, Mestrando, Universidade São Paulo, São Carlos, SP, Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo.

Av. Trabalhador São-carlense 400, 13560-970, nettomarchi@gmail.com

também usam a seqüência CPMG com pulso de refocalização de baixo ângulo.

Neste trabalho foi estudada a mesma abordagem para reduzir o problema de aquecimento em medidas qualitativas online utilizando a seqüência CPMG. Para isso, foi feito um estudo teórico-experimental com as Equações de Bloch (BLOCH, 1946) utilizando ângulos de refocalização menores, LRFA (low refocusing flip angles) que podem reduzir mais de 75% da potência incidida.

Materiais e métodos

As amostras estudadas com diferentes tempos de relaxação foram água deionizada, óleo de semente de soja e mamona. Para a validação da seqüência CPMG com LRFA foram utilizadas sementes e nozes comerciais de abóbora, algodão, amêndoa, amendoim, café, castanha do Brasil, castanha de caju, coco, gergelim, girassol, linhaça, macadâmia, mamona, melancia, moringa, noz, pistache, rabanete e soja. Também foram utilizadas sementes de espécies selvagens como nhandiroba, baru, bucha, macaúba, chapéu-de-Napoleão, pati, pequi, piaçava, pinhão-manso, niger e tucumã.

Os experimentos foram realizados a 22 °C no espectrômetro CAT-100 (Tecmag, Houston), com ímã de 2,1 T (85 MHz para ^1H) de um Tomógrafo/espectrômetro de RMN da Oxford (Oxford, UK). A homogeneidade do campo magnético (B_0), equivalente a meia largura de linha à meia altura, FWHM (*full width at half maximum*) de $\Delta\nu$ ($\Delta\nu = B_0/2\pi$) foi de 15 Hz (no centro do magneto) e 100 Hz (à 10 cm do centro do magneto).

Cada amostra foi acondicionada na sonda por aproximadamente 3 horas para a estabilização da temperatura. Em seguida foram realizadas 5 medidas consecutivas de cada seqüência.

Os sinais de RMN foram obtidos com a seqüência CPMG [$^{\text{90}}_x - \tau - (^{\text{90}}_y - \tau - \text{eco} - \tau)_n$] utilizando ângulos de refocalização menores, LRFA (low refocusing flip angles) de 180°, (CPMG), de 135°, (CPMG₁₃₅), de 90°, (CPMG₉₀) e de 45° (CPMG₄₅) e tempo de eco, τ , de 0,1, 0,4 e 2 ms. A largura dos pulsos de refocalização foram 16, 12, 8 e 4 s, respectivamente. Os valores de T_1 foram obtidos com a seqüência de Inversão-Recuperação (IR).

Resultados e discussões

Para demonstrar o efeito do baixo ângulo de refocalização (LRFA) no decaimento do sinal de CPMG foram analisadas amostras com diferentes valores de T_1 e T_2 e razão T_1/T_2 , em um magneto de 2,1 T, com homogeneidades de campo magnético equivalentes a 15 Hz e 100 Hz. As amostras analisadas foram: água deionizada com $T_1 = 2,86$ s, $T_2 = 2,28$ s e $T_1/T_2 \sim 1$; óleo de soja com $T_1 = 0,14$ s, $T_2 = 0,07$ s e $T_1/T_2 = 2$ e óleo de semente de mamona com $T_1 = 0,128$ s, $T_2 = 0,014$ s e $T_1/T_2 = 9$.

A Figura 2 apresenta os sinais experimentais e simulados de CPMG para a água deionizada obtida on-resonance com pulsos de refocalização de 180° (CPMG), 135° (CPMG₁₃₅), 90° (CPMG₉₀) e 45° (CPMG₄₅) em campo não-homogêneo, $\Delta\nu = 15$ Hz e 100 Hz, $\tau = 0,002$ s.

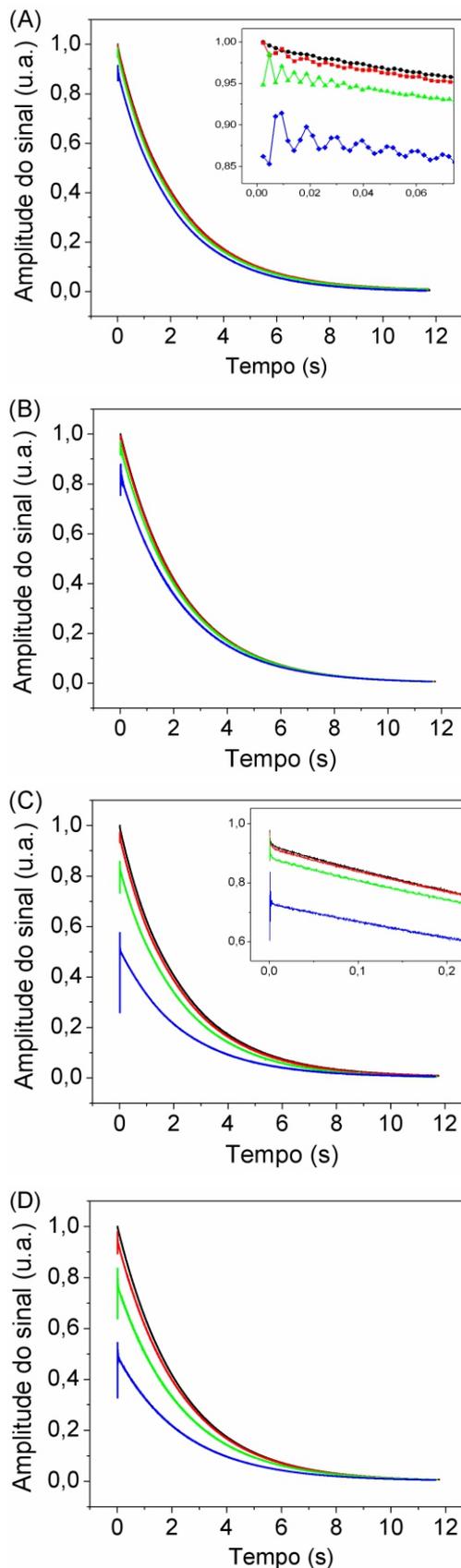


Figura 2. Sinais experimentais (esquerda) e simulados (direita) de água deionizada obtidos com CPMG (●), CPMG₁₃₅ (■), CPMG₉₀ (▲) e CPMG₄₅ (◆) com homogeneidade de campo magnético equivalente à $\Delta\nu = 15$ Hz (A e B) e 100 Hz (C e D), $\tau = 0,2$ ms. A inserção na Figura 2A apresenta as oscilações dos primeiros pulsos de refocalização. A inserção na Figura 2C apresenta os decaimentos de CPMG com $\tau = 0,1$ ms.

As Figuras 2A e 2B apresentam os decaimentos experimentais e simulados de CPMG para a amostra de água deionizada com diferentes ângulos de refocalização em campo magnético mais homogêneo, $\Delta\nu = 15$ Hz. Como observado nessas figuras, os sinais experimentais e simulados são similares para todos os ângulos estudados, demonstrando a robustez da seqüência CPMG.

A diferença de intensidade entre 180° e 45° é menos que 10%, o valor de T_2 (2,28 s e 2,29s) varia menos que 0,5%. A inserção na Figura 2A apresenta as oscilações para os primeiros pulsos de refocalização, os quais aumentam em tempo e amplitude com a redução do valor dos ângulos dos pulsos de refocalização (HENNIG, 1988).

Quando é utilizado campo magnético menos homogêneo $\Delta\nu = 100$ Hz, (Figuras 2C e 2D), o efeito é mais severo com LRFA. A amplitude dos sinais para 45°, 90° e 135° é aproximadamente 50%, 85% e 98% da amplitude de CPMG convencional, respectivamente. O valor de T_2 obtido com CPMG₄₅ aumenta menos de 2% que o obtido usando CPMG. A oscilação do sinal após os primeiros pulsos aumenta no tempo e em amplitude com LRFA em campo magnético menos homogêneo quando comparada à oscilação em campo mais homogêneo (Figuras 2A e 2B).

Em campo menos homogêneo (Figuras 2C e 2D) os spins perdem a coerência de fase mais rapidamente do que em mais homogêneo (Figuras 2A e 2B), resultando num efeito mais pronunciado. Isto também ocorre devido à seqüência CPMG com LRFA produzir ecos fora do plano transversal, o que causa a formação de ecos estimulados, que possui dependência de T_1 (HENNIG, 1988). Para reduzir o efeito da não-homogeneidade de campo no sinal de CPMG com LRFA é necessário utilizar valores pequenos de τ .

A inserção na Figura 2C apresenta os decaimentos de CPMG com $\tau = 0,1$ ms. As amplitudes dos sinais para 45° aumenta de 50% ($\tau = 2$ ms) para 75% ($\tau = 0,1$ ms), quando comparados a CPMG convencional. Por outro lado, a redução de τ para aumento da intensidade não é sempre desejada devido ao grande número de pulsos necessários para obter o decaimento de CPMG.

Para amostras de óleo de soja, os decaimentos de CPMG em $\Delta\nu = 15$ Hz e $\tau = 0,1$ s possuem amplitude e valores de T_2 similares para todos os LRFA, quando comparados com o CPMG convencional. Para $\Delta\nu = 15$ Hz e $\tau = 0,4$ ms, as amplitudes dos sinais obtidos por CPMG para 45°, 90° e 135° são 70%, 90% e 99% de CPMG convencional, respectivamente; e variação de aproximadamente 5% nos valores de T_2 (0,076 s e 0,081 s). Para $\Delta\nu = 100$ Hz e $\tau = 0,1$ ms e 0,4 ms, as amplitudes dos sinais obtidos por CPMG com ângulo de 45° são aproximadamente 50% e 30% de CPMG, respectivamente. Os valores de T_2 para ângulo de 45° aumentam aproximadamente 7% e 20% para $\tau = 0,1$ ms e 0,4 ms, respectivamente.

A Figura 3 apresenta os sinais experimentais obtidos por CPMG com pulsos de refocalização de 180°, 135°, 90° e 45° para o óleo de semente de mamona ($T_1/T_2 \sim 9$) para $\Delta\nu = 100$ Hz e $\tau = 0,1$ ms (Figura 3A) e 0,4 ms (Figura 3B).

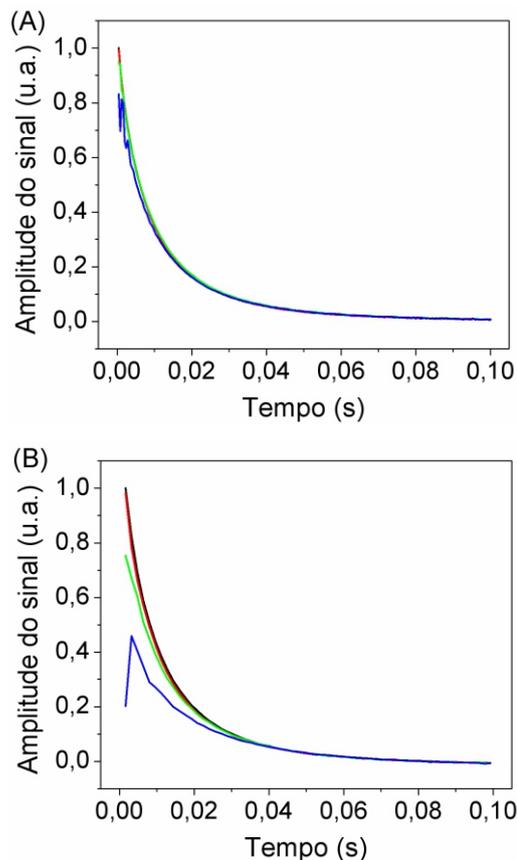


Figura 3. Sinais experimentais de óleo de semente de mamona obtidos CPMG (●), CPMG₁₃₅ (■), CPMG₉₀ (▲) e CPMG₄₅ (◆) em $\Delta\nu = 100$ Hz, $\tau = 0,1$ ms (A) e 0,4 ms (B).

O óleo de mamona é menos susceptível às oscilações do que o óleo de soja para CPMG com LRFA e o sinal obtido com pulso de 45° é idêntico ao obtido com $\tau = 15$ Hz e $\tau = 0,1$ ms (dados não mostrados). Para $\Delta\nu = 100$ Hz e $\tau = 0,1$ ms (Figura 3A), a intensidade do sinal com 45° é aproximadamente 80% e T_2 é similar em relação a CPMG com pulsos 180°. Para o óleo de mamona o efeito de LRFA é facilmente observável (Figura 3B) somente em campo magnético de menor homogeneidade ($\Delta\nu = 100$ Hz) e tempo de eco mais longo ($\tau = 0,4$ ms). Para pulsos de refocalização de 45° o valor de T_2 é aproximadamente 50% maior (0,021 s), refletindo a grande razão T_1/T_2 e a intensidade do sinal é aproximadamente 50% da obtida por CPMG convencional. Esta grande variação no valor de T_2 obtido por CPMG com pulso de 45° não é significativa para medidas qualitativas em oleaginosas devido à ampla variação nos valores de T_2 observados em sementes oleaginosas que podem ser maiores que 0,2 s (PRESTES et al., 2007).

Esses resultados demonstram que ângulos de refocalização de até 45° podem ser utilizados em campos magnéticos homogêneos ($\Delta\nu = 15$ Hz) para obter os valores de T_2 . No entanto, para campos de baixa homogeneidade a intensidade do sinal é reduzida e os valores de T_2 se tornam mais dependentes da razão T_1/T_2 para menores ângulos. Portanto, para utilizar a menor potência de RF é necessário considerar as condições de homogeneidade do campo magnético e a razão T_1/T_2 da amostra a ser analisada.

A Figura 4 apresenta a boa correlação ($r = 0,98$) entre os valores de T_2 medidos por CPMG convencional e CPMG₉₀ para 30 espécies de plantas oleaginosas.

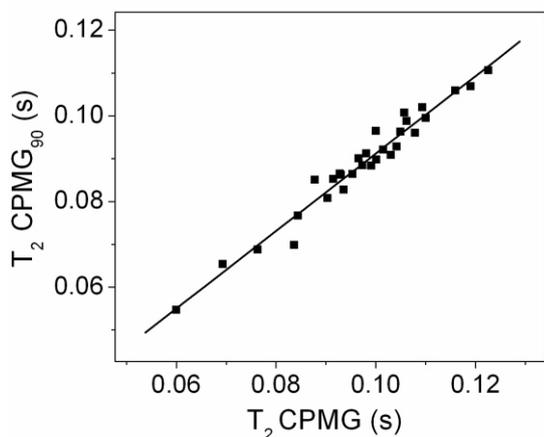


Figura 4. Correlação entre os valores de T_2 obtidos com CPMG e CPMG₉₀, utilizando 30 espécies de oleaginosas, $r = 0,98$.

Portanto, para sementes oleaginosas, as medidas de T_2 podem ser realizadas com pulsos de refocalização de 90° (CPMG₉₀) o qual requer somente 25% da potência de RF utilizada em CPMG convencional, com redução do problema de aquecimento na sonda e da potência incidida na amostra.

Para campos magnéticos homogêneos ($\Delta\nu \leq 15$ Hz) qualquer ângulo de refocalização pode ser utilizado para obter os valores de T_2 , e LRFA pode ser utilizado para reduzir a potência incidida. No entanto, a escolha dos menores ângulos de refocalização em campos magnéticos menos homogêneos, $\Delta\nu \geq 100$ Hz, deve considerar a redução da intensidade do sinal de CPMG e o aumento da constante de tempo, a qual se torna dependente da razão T_1/T_2 . Portanto, o uso de LRFA pode ser uma alternativa para reduzir a potência de RF em experimentos de CPMG online.

Referências

- BLOCH, F. Nuclear Induction. **Physical Review**, New York, v. 70, p. 460-474, 1946.
- CORRÊA, C. C.; FORATO, L. A.; COLNAGO, L. A. High-throughput non-destructive nuclear magnetic resonance method to measure intramuscular fat content in beef. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 393, p. 1357-1360, 2009.
- HENNIG, J. Multiecho imaging sequences with low refocusing flip angles. **Journal of Magnetic Resonance**, San Diego, v. 78, p. 397-407, 1988.
- MEIBOOM, S.; GILL, D. Modified spin-echo method for measuring nuclear relaxation times. **Review of Scientific Instruments**, Rochester, v. 29, p. 93-102, 1966.
- NORDON, A.; MCGILL, C. A.; LITTLEJOHN, D. Process NMR spectrometry. **Analyst**, London, v. 126, p. 260-272, 2001.
- PRESTES, R. A.; COLNAGO, L. A.; FORATO, L. A.; VIZZOTTO, L.; NOVOTNY, E. H.; CARRILHO E. A rapid and automated low resolution NMR method to select intact oilseeds with a modified fatty acid profile. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 596, p. 325-329, 2007.
- RIBEIRO, F. Z.; MARCONCINI, L. V.; TOLETO, I. B.; AZEREDO, R. B. V.; BARBOSA, L. L.; COLNAGO, L. A. Nuclear magnetic resonance water relaxation time changes in bananas during ripening: a new mechanism. **Journal of The Science of Food and Agriculture**, London, v. 90, p. 2052-2057, 2010.

Comunicado Técnico, 111

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:
Embrapa Instrumentação
Rua XV de Novembro, 1452 - Caixa Postal 741
CEP 13560-970 - São Carlos-SP
Fone: 16 2107 2800 - **Fax:** 16 2107 2902
e-mail: sac@cnpdia.embrapa.br
<http://www.cnpdia.embrapa.br>
1a. edição
1a. impressão 2010: tiragem 300

Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento



Comitê de Publicações

Presidente: João de Mendonça Naimé
Membros: Débora Marcondes Bastos Pereira Milori,
Sandra Protter Gouvea
Washington Luiz de Barros Melo
Valéria de Fátima Cardoso

Membro Suplente: Dr. Paulo S. P. Herrmann Junior

Expediente

Supervisor editorial: Dr. Victor Bertucci Neto
Normalização bibliográfica: Valéria de Fátima Cardoso
Tratamento das ilustrações: Valentim Monzane
Editoração eletrônica: Camila Fernanda Borges