
Novas Tecnologias

Capítulo 9

Análise da Qualidade de Frutas por Ressonância Magnética Nuclear

Lucimara Aparecida Forato
Luiz Alberto Colnago
Rubens Bernardes Filho

1. Introdução

A ressonância magnética nuclear (RMN) é uma das principais técnicas analíticas e vem sendo aplicada na análise de substâncias em solução, no estado sólido e até mesmo em imagens de seres humanos. As principais vantagens da RMN em relação aos métodos tradicionais são: técnica não invasiva, não destrutiva e não usa radiação ionizante como as técnicas raios X.

As aplicações da RMN podem ser divididas em aplicações espectroscópicas e de imagens. Nas aplicações espectroscópicas, a RMN vem sendo usada para determinação de estrutura e dinâmica molecular, concentração dos componentes em uma amostra heterogênea, de processo de difusão e fluxo e muitas outras aplicações. As aplicações de imagens por RMN (IRM) são usadas principalmente para a análise da distribuição espacial da água ou de outros componentes de alta mobilidade molecular, como os óleos e gorduras.

Na área de fruticultura, a RMN vem sendo usada para estudos fisiológicos, de injúrias mecânicas e por pragas e doenças, e também de atributos relacionados com o paladar, como sólidos solúveis ($^{\circ}$ Brix), textura entre outras aplicações (ANDAUR et al., 2004; BISCEGLI et al., 2000; RIBEIRO et al., 2010).

2. Fundamentos da RMN

A RMN é observada em núcleos de alguns isótopos que possuem momento angular intrínseco (L) ou spin ($I \neq 0$), como os ^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{17}O , entre outros (GIL; GERALDES, 1987). Quando esses isótopos são submetidos a um campo magnético estático denominado B_0 , eles se orientam num movimento de precessão em relação ao eixo B_0 (convencionado como eixo z).

O fenômeno de RMN pode ser descrito classicamente com os momentos magnéticos, precessionando em torno do campo magnético B_0 com velocidade angular igual a $\omega_0 = \gamma B_0$, onde γ = razão magnetogírica e ω_0 = velocidade angular de precessão (rad/s).

No modelo vetorial, amplamente utilizado em RMN, os momentos magnéticos individuais (μ) estão distribuídos aleatoriamente no plano xy , como ilustra a Figura 1a. Devido à diferença de energia entre os níveis, há sempre um excesso de população no nível relativo aos μ alinhados a favor de B_0 (α), na condição de equilíbrio térmico. Os μ alinhados contra B_0 (β) são os de maior energia. O vetor resultante do somatório dos vetores individuais μ em relação ao eixo $+z$ é chamado de magnetização resultante ou M_0 , a Figura 1b ilustra esse caso.

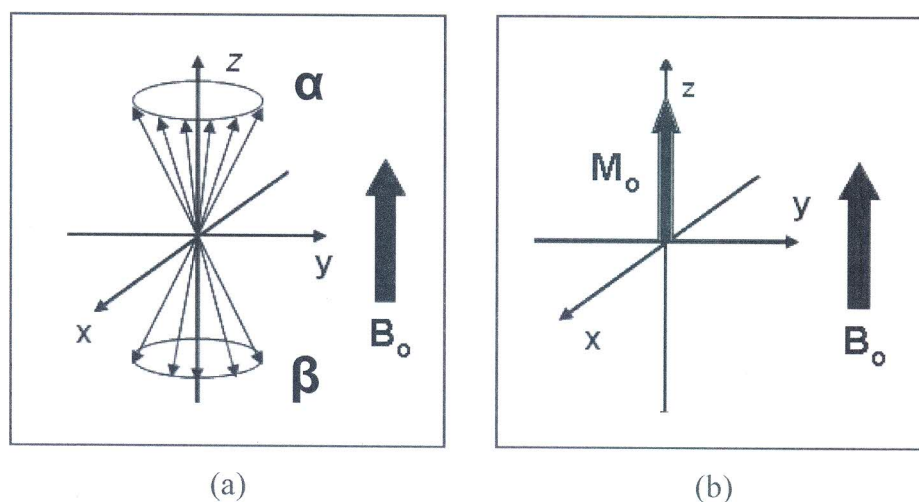


Figura 1: Representação do cone de precessão (a) e do vetor magnetização resultante (M_0) no estado de equilíbrio térmico (b).

Para observar os sinais de RMN, é necessário perturbar a condição de equilíbrio térmico. Tal perturbação é obtida quando um campo magnético oscilante, B_1 , na frequência de precessão é aplicado na amostra por meio de uma bobina. No modelo de coordenada girante, o campo B_1 gera um torque sobre a magnetização resultante (M_0) fazendo com que ela se desloque para o plano xy , conforme a Figura 2.

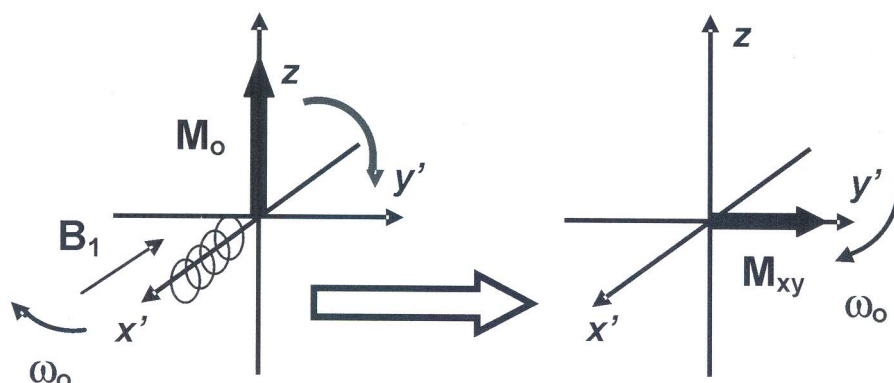


Figura 2: Efeito da aplicação de B_1 em M_0 no referencial rotativo.

O ângulo do deslocamento da magnetização (θ) depende de γ , da intensidade de B_1 e do tempo de duração do pulso (τ), onde $\theta = \gamma B_1 \tau$. Logo após o campo B_1 ser desligado, inicia-se o restabelecimento do equilíbrio térmico. Esse fenômeno é conhecido como relaxação. É, também, durante a relaxação que se faz a aquisição do sinal de RMN.

A Figura 3a mostra a rotação da magnetização no plano $x'y'$ (M_{xy}), que induz uma voltagem oscilante na bobina de recepção, cuja frequência é igual à frequência de precessão, (Figura 3b). A voltagem induzida gera um sinal analógico, denominado FID (Free Induction Decay).

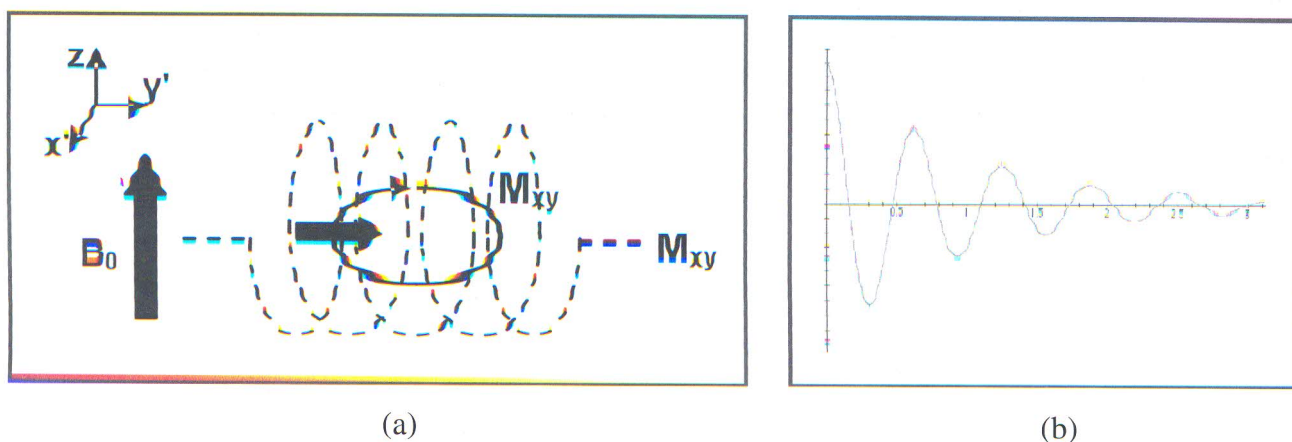


Figura 3: Rotação de M_{xy} na bobina de recepção (a) sinal induzido (FID) (b).

O FID é o sinal de RMN no domínio do tempo e corresponde à somatória de todas as frequências observáveis na amostra. A aplicação da Transformada de Fourier no FID resulta em um espectro no domínio da frequência, usualmente utilizado em RMN de alta resolução.

Após a perturbação do sistema, a magnetização retorna ao estado de equilíbrio térmico, onde $M_{xy} = 0$ e $M_z = M_0$. Esse processo é conhecido como relaxação longitudinal ou spin-rede (GIL; GERALDES, 1987), e é descrito por uma constante de tempo T_1 . Além disso, a coerência da magnetização pode desaparecer no plano xy , através da relaxação spin-spin ou transversal, com uma constante de tempo T_2 . Esses dois processos são muito usados para separação dos componentes de uma amostra heterogênea em experimentos de RMN. Também são usados para o contraste de imagens por RMN.

O mecanismo de relaxação responsável por tornar $M_z = M_0$ está intimamente relacionado com o restabelecimento da distribuição de população dos níveis de energia de spin nuclear, envolvendo transferência do excesso de energia potencial magnética do estado excitado para a vizinhança, denominada rede, sob a forma de energia cinética molecular (GIL; GERALDES, 1987).

Esta transferência de energia não é um fenômeno de emissão espontânea, e, sim, o resultado da existência de campos magnéticos flutuantes, que, oscilando com frequências apropriadas em torno da frequência de precessão, tornam a rede capaz de absorver esta energia. Esse processo de transferência é conhecido como relaxação spin-rede ou relaxação longitudinal e é responsável pela recuperação exponencial da magnetização ao longo do eixo z, de acordo com a equação:

$$M_z(t) = M_0 [1 - \exp(-t/T_1)] \quad (1)$$

onde T_1 = tempo de relaxação spin-rede.

O tempo de relaxação T_1 tem um efeito prático marcante. Se for longo, o tempo total de uma análise de RMN se estende muito, uma vez que cada sequência de pulsos deverá ser precedida por um tempo da ordem de $5T_1$, para que a magnetização recupere 99% de sua intensidade no equilíbrio térmico, evitando a saturação do sinal. O valor de T_1 depende principalmente da mobilidade da substância, do meio, da temperatura da amostra, entre outros fatores.

Ao contrário do que ocorre no processo de relaxação longitudinal, o retorno da magnetização à condição inicial de equilíbrio, $M_{xy} = 0$, independe da transferência de energia para o meio. Para que suas componentes no plano xy se anulem, basta que elas percam a coerência de fase, inicialmente criada por B_1 , e comecem a precessionar ao redor de B_0 de forma aleatória. Esta perda de coerência é atribuída a interações diretas entre os momentos magnéticos individuais, sem que haja modificação da energia total do sistema, causando um processo de relaxação conhecido como spin-spin ou relaxação transversal (GIL; GERALDES, 1987).

Na presença de um campo magnético estático ideal, $B_0 = 0$, a relaxação transversal é responsável pelo decaimento exponencial da intensidade da magnetização M, obedecendo à seguinte equação:

$$M_{xy}(t) = M_0 \exp(-t/T_2) \quad (2)$$

onde T_2 = tempo de relaxação spin-spin.

No entanto, a não homogeneidade de campo (ΔB_0) acelera o processo de perda de coerência e normalmente o sinal decai com o T_2 aparente ou T_2^* . De um modo geral, o T_2 é curto para substâncias rígidas, principalmente no estado sólido, e longo para moléculas com alta mobilidade, líquidas ou em solução.

2.1 Medida de T_1

O principal método para medida de T_1 é o método denominado de inversão-recuperação (IR) (Figura 4). Este método consiste na aplicação de um pulso de radiofrequência (rf) de 180° , o que conduz a magnetização ao eixo -z, seguido de um tempo τ e de um pulso de 90° , antes da aquisição do sinal de RMN. O valor de T_1 é, então, calculado a partir da intensidade do sinal de RMN em função do intervalo de tempo τ (Figura 5). O intervalo de tempo τ precisa ser suficientemente longo, maior que $5T_1$, para que o sinal não sature.

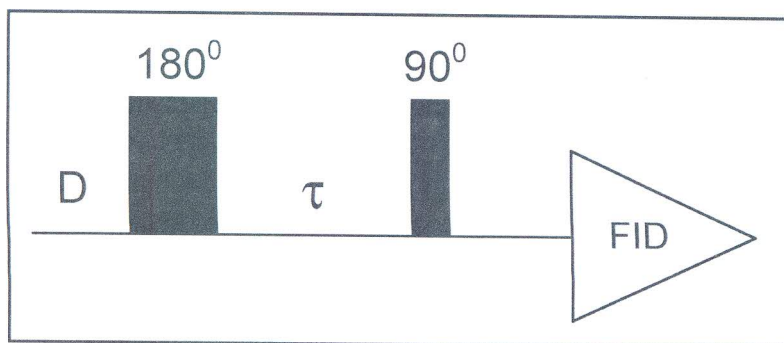


Figura 4: Representação da sequência inversão-recuperação.

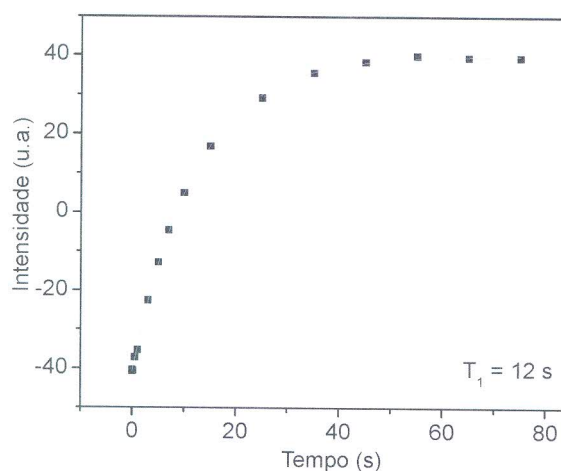


Figura 5: Variação do sinal de RMN usando a sequência de pulso IR.

2.2 Medida de T_2

O método mais usado para a medida de T_2 é conhecido como CPMG (Figura 6), que traz as iniciais de seus autores: Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CARR; PURCELL, 1954; MEIBOOM; GILL, 1958). As sequências de eco como a CPMG recuperam o sinal de RMN na forma de eco de spin, independentemente da não homogeneidade do campo. A sequência CPMG consiste em um pulso de rf de 90° , aplicado no eixo x' , seguido de um intervalo de tempo τ e de um trem de pulsos de 180° , aplicado no eixo y' . A intensidade do sinal de RMN da sequência CPMG (eco), obtida em função de τ , decai exponencialmente com uma constante de tempo T_2 (Figura 7).

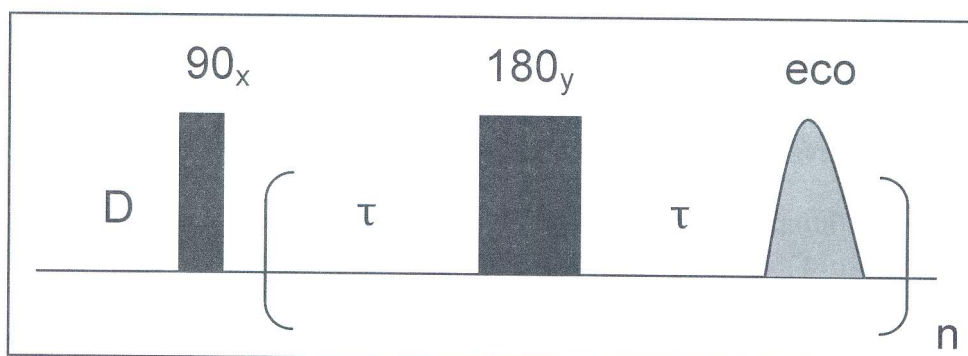


Figura 6: Representação da sequência de pulsos CPMG.

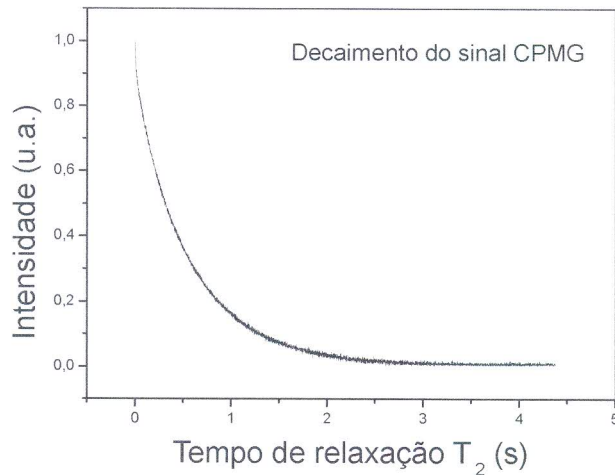


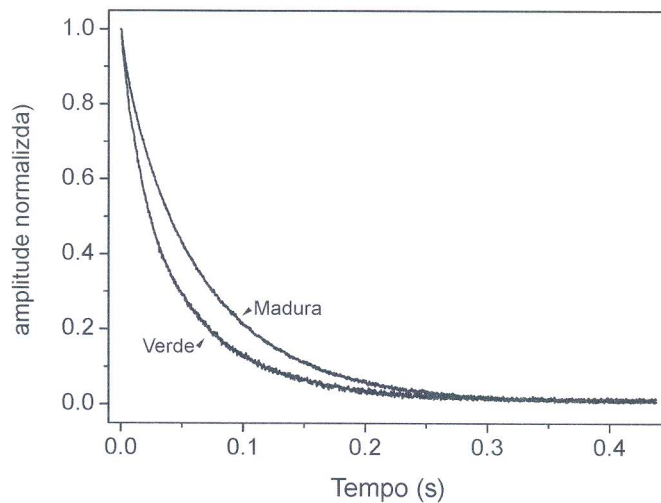
Figura 7: Decaimento exponencial do sinal CPMG.

3. Aplicações da RMN em frutas

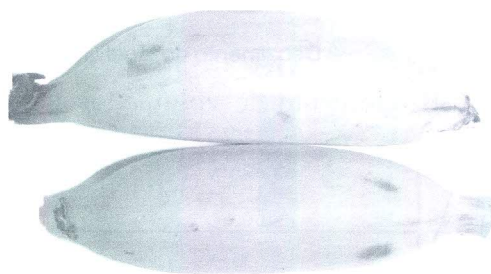
3.1 Aplicações da RMN no domínio do Tempo (RMN-DT)

A RMN no domínio do tempo também é conhecida como RMN em baixa resolução ou por RMN em baixo campo. Até a metade da década de noventa, a RMN no domínio do tempo (RMN-DT) era usada principalmente em medidas quantitativas, como medida do teor de óleo em sementes, umidade em alimentos e produtos químicos entre outras. Mais recentemente, com o uso de métodos quimiométricos (PRESTES et al., 2007) e de análise de relaxação multiexponencial (RIBEIRO et al., 2010), tornou-se possível analisar todo o sinal de RMN em baixa resolução (FID, decaimento CPMG, entre outros) e obter outras informações sobre as propriedades físico-químicas das amostras.

Na Figura 8, estão os sinais obtido com a técnica CPMG para uma banana em dois estádios de maturação (RIBEIRO et al., 2010).



(a)



(b)

Figura 8: (a) Sinal CPMG para as bananas amarela e verde (b).

Na banana esses sinais de RMN também são muito sensíveis a danos mecânicos, e o T_2 monoexponencial aumenta com o grau de injúria. Além da banana, tem-se usado a RMN-DT para determinar o conteúdo de açúcar e correlacionar com sólidos solúveis ($^{\circ}$ Brix) em frutas, como em uvas Itália. A grande vantagem desse método é que pode ser facilmente automatizado, com potencial para uso em unidades de beneficiamento de frutas.

3.2 Análise por Imagens por RMN (IRM)

A principal característica das análises por imagens por RMN (IRM) é a necessidade de uso de gradientes de campo para codificar as frequências de ressonância com distribuição espacial da água.

Para se realizar os experimentos de IRM, é necessário o uso de três bobinas de gradiente em posições x, y e z. A sequência de pulsos conhecida como spin-eco (SE) com pulsos de gradientes é muito utilizada na aquisição de imagens. Na Figura 9, está um diagrama da sequência eventos da SE para imagens. As linhas superiores têm os pulsos seletivos de rf e os pulsos de gradiente (GS) para selecionar o plano de análise. Este gradiente faz com que os spins comecem a se espalhar mesmo antes de alcançarem o plano transversal. Isso é corrigido com a aplicação de um segundo gradiente (GS), chamado gradiente de refocalização, invertido em relação ao primeiro. Nesta condição, os spins estão em máxima coerência de fase. Aplicam-se, então, os gradientes de codificação de fase (GP) e frequência (GR) que fazem a magnetização evoluir. Em seguida, o pulso de rf (pulso de inversão) inverte as componentes da magnetização. Finalmente, sob a presença do gradiente de leitura, é feita a aquisição do sinal. A sequência SE apresenta dois tempos que, basicamente, a caracterizam, que são os tempos entre a excitação e o centro do eco de spins, chamado de tempo ao eco (TE), e entre duas excitações consecutivas, chamado de tempo de repetição (TR). Esses tempos são importantes, principalmente, no que se refere ao contraste das imagens obtidas quando se utiliza essa sequência (PAIVA, 2004).

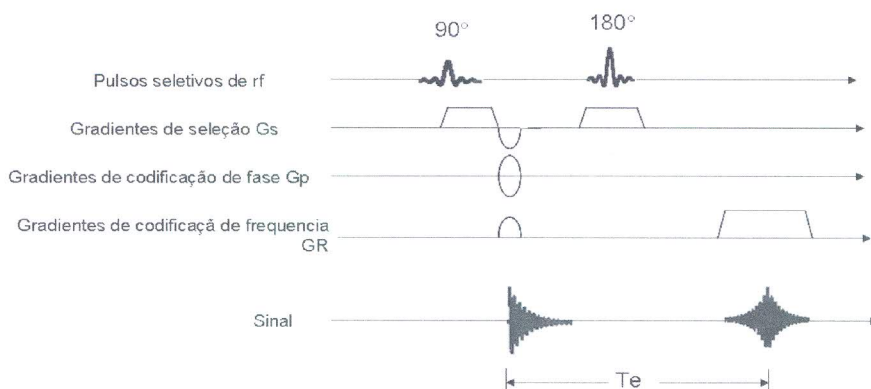


Figura 9: Representação da sequência de pulsos spin-eco (adaptado de PAIVA, 2004). Onde TE: tempo de eco, rf: pulso de rádio frequência, Gs: gradiente de seleção, GP: gradiente de fase e GR, gradiente de codificação de frequência.

A imagem obtida por RMN não tem o mesmo significado do que a de uma fotografia. Ela representa um mapa das intensidades dos sinais de RMN. A imagem é obtida segundo as propriedades da RMN do material em cada posição. Cada voxel (elemento de volume) no objeto contém uma vasta gama de substâncias. Cada substância dá alguma intensidade de sinal resultante, dependendo da natureza da sequência de pulsos e da variação dos parâmetros de tempo. As imagens obtidas por RMN são mapas bidimensionais das intensidades dos volumes discretos dentro da amostra. Os elementos dos mapas são chamados pixels, e a intensidade de cada pixel é influenciada pela densidade de spins, pelo tempo de relaxação spin-rede, T_1 , e tempo de relaxação spin-spin, T_2 , pelo movimento molecular, efeitos de suscetibilidade e diferenças nos deslocamentos químicos. Os efeitos desses parâmetros na imagem podem ser suprimidos ou realçados num experimento específico, pela seleção de parâmetros realizada pelo operador, tais como o tempo de repetição TR e o tempo de eco TE. Assim, esses parâmetros podem ser usados para contrastar as imagens por densidade de prótons (DP) e por T_1 ou T_2 .

As imagens podem ser obtidas com contraste em T_2 pelo aumento do tempo de eco (TE) e fazendo com que TR seja maior do que $5T_1$. Neste caso, o tempo de eco deve ser da ordem de T_2 , fazendo com que regiões com T_2 mais longos apresentem ecos mais intensos do que aquelas com T_2 mais curtos. Assim, as regiões com T_2 mais longos serão mais brilhantes, pois apresentam ecos mais intensos. Por outro lado, para se obter imagens ponderadas em T_1 , deve-se utilizar o tempo de eco o mais curto possível e diminuir o tempo de repetição (TR). Assim, é possível medir as diferenças de T_1 na amostra, pois regiões com T_1 longos não poderão retornar totalmente à magnetização, visto que o TR é curto. Além disso, elimina-se a influência de T_2 , uma vez que usamos um TE curto. Desta forma as regiões, com T_1 curto serão mais brilhantes e apresentarão amplitudes de ecos superiores às de regiões com T_1 longos.

Além da ponderação em T_1 e T_2 , é muito comum se utilizar a ponderação em densidade de prótons (PD). Neste tipo de imagem, quanto maior for a densidade de núcleos de hidrogênios local maior será o brilho da imagem. Para se obter tal tipo de imagem, deve-se utilizar um TR longo o suficiente para permitir o retorno da magnetização à condição de equilíbrio. Assim, minimizamos a influência de T_1 e, para eliminar a de T_2 , usamos um tempo de eco curto (menor do que T_2) (ARAÚJO, 2002; HILLS, 1998).

Na Figura 10a, é apresentada a imagem obtida para uma pera. Com a técnica de spin eco ponderada em PD e 10b ponderada em T_1 ($T_e = 20$ ms e $TR = 0,7$ s), pode-se ver que praticamente não há diferenças entre as duas imagens, indicando que não foi possível se obter contraste em T_1 . Já na Figura 10c, imagem ponderada em T_2 ($T_e = 100$ ms e $TR = 2,0$ s), o padrão de contraste é completamente diferente, onde se vê predominância de regiões de menos brilho, com poucas regiões mais brilhantes, sendo estas últimas atribuídas a T_2 mais longos.

Assim, nesta breve descrição, apresentaram-se duas das principais técnicas de RMN que podem ser usadas para a avaliação da qualidade interna de frutas: a RMN no domínio do tempo, que tem potencial para uso em unidades de beneficiamento de frutas e hortaliças; e a IRM, que tem maior uso em pesquisas de laboratório devido ao longo tempo de medida e alto custo dos equipamentos.

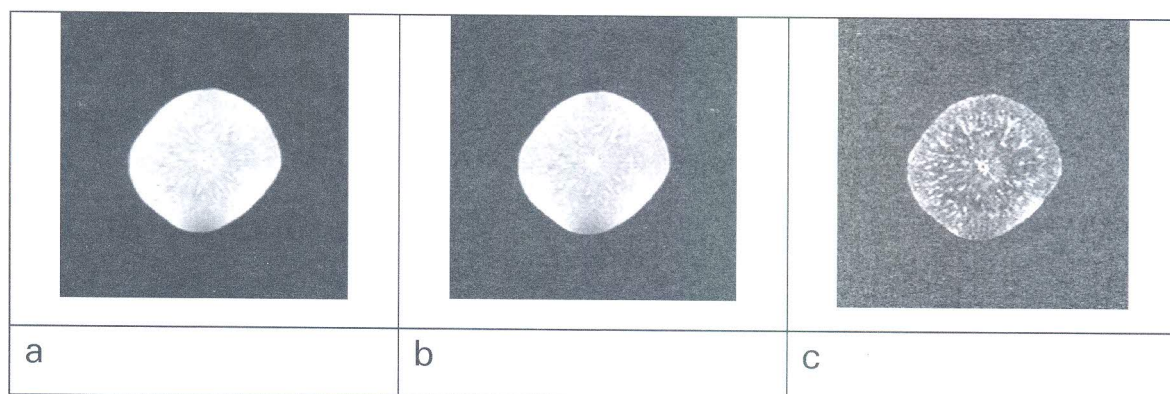


Figura 10: IRM transversais de peras com imagens ponderadas por PD (a); T_1 (b) e T_2 (c).

Referências

- ANDAUR, J. E.; GUESALAGA, A. R.; AGOSIN, E. E.; GUARINI, M. W.; IRARRÁZAVAL, P. Magnetic Resonance Imaging for Nondestructive Analysis of Wine Grapes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 52, p. 165-170, 2004.
- ARAÚJO, D. B. **Sobre neuroimagens funcionais por magnetocefalografia e ressonância magnética: novos métodos e aplicações**. 2002. 172 f. Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2002.
- BISCEGLI, C. I.; FRANCO, R. W. A.; TANNUS, A.; NASCIMENTO, A. S.; COLNAGO, L. A. **Uso da Espectroscopia e Tomografia de Ressonância Magnética para Monitorar o Amadurecimento e Fatores de Qualidade em Manga e Mamão**. São Carlos, SP: Embrapa Instrumentação Agropecuária, 2000. 6 p. (Embrapa Instrumentação Agropecuária. Comunicado técnico; 35).
- CARR, H. Y.; PURCELL, E. M. Effects of diffusion on free precession in nuclear magnetic resonance experiments. **Physical Review**, [S. l.], v. 94, p. 630-638, 1954.
- GIL, V. M. S.; GERALDES, C. F. G. C. **Ressonância Magnética Nuclear: fundamentos, métodos e aplicações**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1987.
- HILLS, B. **Magnetic Resonance Imaging In Food Science**. New York: John Willey & Sons, 1998.
- MEIBOOM, S.; GILL, D. Modified spin-echo method for measuring nuclear relaxation times. **Review of Scientific Instruments**, New York, v. 29, p. 688-691, 1958.
- PAIVA, F. F. **Metodologias de Imagem de NMR que utiliza um único pulso adiabático de inversão**. 2004. 120 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo, São Carlos, SP, 2004.
- 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, Z. F.; MARCONCINI, L. V.; TOLEDO, 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.