

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

FABIANA DIUK DE ANDRADE

Desenvolvimento de sequências de pulso de eco de spin
de baixa potência para RMN *on-line*

São Carlos

2011

FABIANA DIUK DE ANDRADE

Desenvolvimento de sequências de pulso de eco de spin de
baixa potência para RMN *online*

Tese apresentada ao Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutorado em Ciências (Química Analítica).

Orientador: Dr. Luiz Alberto Colnago

São Carlos

2011

Este exemplar foi revisado e alterado em relação à versão original,
sob a exclusiva responsabilidade do autor.

São Carlos, 20/06/2011

Fabiana Diuk de Andrade

Dedicatória

Aos meus pais Antonio e Maria Edite e aos meus irmãos Kerley, Tiago e Flaviana pelo apoio incondicional em todos os momentos da minha vida.

Ao Allan pelo amor, paciência e companheirismo incondicional durante a realização deste trabalho.

Agradecimento especial

Ao Prof. Dr. Luiz Alberto Colnago pela orientação, confiança e incentivo no desenvolvimento deste trabalho.

Agradecimentos

A Deus.

A toda minha família.

Ao Dr. Luiz Alberto Colnago pela orientação e amizade.

À Dra. Rosilene Aparecida Prestes pela colaboração neste trabalho.

Aos amigos do grupo de RMN da Embrapa Instrumentação: André, Eduarda, Gabriela, Giovane, Luiz Fernando, Lucinéia, Luiza, Maiara, Matheus, Netto, Paulo, Poliana, Roberta.

Aos amigos que fiz em São Carlos em especial à Maria Juliana, Pâmella, Sheena, Cátia, Carol, Fayene, Juliana, Tassiane, Priscila.

À Embrapa Instrumentação Agropecuária pela infra-estrutura e por todas as facilidades oferecidas pelos seus funcionários.

Ao Instituto de Química de São Carlos – USP, por todo o suporte acadêmico.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, pelo suporte financeiro, através do processo 07/54981-1.

A todos que contribuíram de forma direta ou indireta para a realização deste trabalho.

“A coisa mais indispensável a um homem é reconhecer o uso que deve fazer do seu próprio conhecimento.”

Platão

RESUMO

A Ressonância Magnética Nuclear em baixa resolução (RMN-BR) vem sendo aplicada no controle e certificação de qualidade na indústria. Para acelerar e automatizar as análises tem sido proposto o uso de RMN *online*, com carregamento de amostras por uma esteira. Apesar do grande potencial, as metodologias utilizadas podem provocar o aquecimento da amostra, causando erros nas medidas, além de reduzir a vida útil do equipamento. Assim, nesse trabalho de doutorado foram desenvolvidas sequências de eco de spin para medidas de RMN-BR *online* utilizando baixa potência de RF (radiofrequência), baseadas nas técnicas CP, Carr-Purcell, e CPMG, Carr-Purcell-Meiboom-Gill, utilizando baixos ângulos de refocalização, LRFA (*Low Refocusing Flip Angle*). Observou-se que LRFA de 45° (CPMG₄₅) pode fornecer valores de tempo de relaxação transversal (T_2) com erros inferiores a 5% em campos magnéticos (B_0) com homogeneidade equivalente a largura de linha de $\Delta\nu \leq 15$ Hz. Em B_0 menos homogêneos ($\Delta\nu \geq 100$ Hz), a escolha dos LRFA deve considerar a redução do sinal e o aumento de T_2 , que se torna dependente do tempo de relaxação longitudinal (T_1). CP₉₀ produz ecos entre os pulsos de refocalização que decaem para valores mínimos dependente de T_2^* (constante de tempo do Decaimento Livre da Indução). O sinal obtido por CP₉₀ aumenta de valores mínimos para o regime de estado estacionário (EE) com constante de tempo $T^* = 2T_1T_2/(T_1+T_2)$ e amplitude $M_{CP90} = M_0T_2/(T_1+T_2)$, a mesma constante e a mesma amplitude observada para o sinal de Precessão Livre em Onda Contínua (CWFP - *Continuous Wave Free Precession*), por isso foi denominada CP-CWFP. A principal vantagem de CP-CWFP ocorre para amostras com $T_1 \sim T_2$. CP-CWFP apresenta um decaimento abrupto da amplitude do sinal antes de aumentar e alcançar o EE. Essa diferença na amplitude torna o ajuste de T^* menos dependente da razão sinal/ruído, sendo mais eficiente que CWFP para medidas de T_1 e T_2 em B_0 baixos, onde T_1 e T_2 tendem a ter valores similares. No método de alternância de fase (AF) em CPMG_{90AF} ($y^2/-y^2$) e CP_{90AF} (x^2-x^2) os sinais entraram num EE, nesse caso CPMG_{90AF} e CP_{90AF} tiveram comportamentos similares ao CP-CWFP, sendo mais uma alternativa para obtenção de T_1 e T_2 . Para CPMG, a redução do ângulo de refocalização para 90° equivale a uma redução de 75% da potência incidida na amostra. CP-CWFP pode ser uma técnica mais robusta para análises em espectrômetros de RMN de bancada em controle de qualidade industrial, com $B_0 < 0,5$ T (20 MHz) e em ferramentas de RMN utilizadas em poços de petróleo com $B_0 \sim 0,05$ T (2 MHz). As análises por métodos estatísticos demonstraram que CPMG e CPMG₉₀, CWFP e CP-CWFP apresentam alta correlação entre si, demonstrando que uma técnica pode substituir a outra nas análises *online* de sementes oleaginosas.

ABSTRACT

Low Resolution Nuclear Magnetic Resonance (LR-NMR) has been applied in quality control and certification in industry. To speed up the analysis the *online* NMR has been proposed. Despite LR-NMR *online* potential, some problems related to equipment overload occurs. It is due to methodologies used that can cause an increase in sample temperature and consequently errors in measurements as well reduction on equipment durability. Thus, Carr-Purcell, CP and Meiboom-Gill, CPMG using low refocusing flip angles (LRFA) were developed. It was observed that LRFA as low as 45° (CPMG₄₅) can provide transverse relaxation time values (T_2) with errors below 5% for homogeneous field ($\Delta\nu \leq 15\text{Hz}$). For a less homogeneous magnetic field ($\Delta\nu \geq 100\text{ Hz}$) the choice of the LRFA has to take into account the reduction in the intensity of the CPMG signal and the increase in the time constant of the CPMG decay that also becomes dependent on longitudinal relaxation time (T_1). The Carr-Purcell (CP) pulse sequence, with LRFA, produces echoes midway between refocusing pulses that decay to a minimum value dependent on T_2^* (Free Induction Decay time constant - FID). When $\tau > T_2^*$, the signal increased to reach a Steady-State Free Precession regime (SSFP) after the minimum value and was composed of FID signal after each pulse and an echo, before the next pulse. CP₉₀ signal increased from the minimum value to the steady-state regime with a time constant (T^*) = $2T_1T_2/(T_1+T_2)$, identical to the time constant observed Continuous Wave Free Precession (CWFP). The Steady-State amplitude obtained with CP₉₀ (M_{CP90}) = $M_0T_2/(T_1+T_2)$ was identical to CWFP. Therefore, this sequence was named CP-CWFP because it is a CP sequence that produces results similar to the CWFP. However, CP-CWFP is a better sequence than CWFP for measuring the longitudinal and transverse relaxation times in single scan, when the sample exhibits $T_1 \sim T_2$. When phase alternation is applied in CPMG_{90AF} ($y'/-y'$) e CP_{90AF} ($x'-x'$) the signal reaches a Steady-State. CPMG_{90AF} and CP_{90AF} showed similar behavior to CP-CWFP, so one more alternative method to measure T_1 and T_2 . Therefore, the T_2 measurements can be performed with 90° refocusing pulses (CPMG₉₀), which use only 25% of the RF power used in conventional CPMG. This reduces the heating problem in the probe and reduces the power deposition in the samples. The CP-CWFP sequence can be a useful method in low-resolution NMR and can be widely used in the agriculture, food and petrochemical industries because those samples tend to have similar relaxation times in low magnetic fields.

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1. Configuração da sonda de RMN proposta por McIvor (1969) incorporando a região de pré-magnetização: 1, entrada da amostra em fluxo; 2, saída da amostra em fluxo; 3, conexão da sonda de RF; 4, proteção metálica; 5, serpentina de polarização; 6, bobina de RF; 7, célula de compartimento da amostra; 8 e 9, partes do pólo do magneto ¹⁰ 5
- Figura 2. Montagem experimental descrita por Grover e Singer para medidas eco de spin em fluxo ¹¹ 6
- Figura 3. Sistema para acoplamento de RMN-AR em fluxo com o aparelho de HPLC, incorporando a região de pré-magnetização. Nesse esquema a amostra entra por um tubo espiral de quartzo de 15 mm que faz com que a amostra se mantenha por mais tempo no interior no magneto possibilitando sua polarização antes de entrar na região de detecção da sonda ¹⁰ 8
- Figura 4. Dispositivo para carregamento da amostra para medida de umidade por RMN ¹⁵ 9
- Figura 5. Sensor de RMN online com sistema de esteira para análises qualitativas de amostras intactas ¹⁵ 10
- Figura 6. Protótipo de um sensor de RMN online de baixo custo baseado em um eletromagneto com resfriamento a ar e um magneto permanente pré-polarizador ⁴ 11
- Figura 7. Sinal CWFP resultante da combinação entre as componentes FID e eco, como uma dependência do ângulo de offset ²¹ 12
- Figura 8. Magnitude da amplitude do sinal de CWFP normalizada como uma função do ângulo de defasagem, ψ , para vários ângulos de excitação α : (\blacktriangledown) 45°, (\blacktriangle) 80°, (\blacksquare) 90° e (\bullet) 100°. A) Experimental e B) sinais simulados com os valores de T_1 e T_2 correspondentes a uma solução 0,02 mol L⁻¹ CuSO₄.5H₂O em água ²² 13
- Figura 9. Sinal CWFP em função do fluxo para valores de $\psi = 5,75\pi$ (\blacktriangledown) e $\psi = 5\pi$ (\bullet) ²² 14
- Figura 10. Esquema de um sistema RMN online, onde d = distância necessária para a magnetização da amostra, V = velocidade linear e D = espaço entre as amostras ²⁴ 15
- Figura 11. Sinal de RMN online obtido pela técnica CWPF de amostras de sementes oleaginosas ²⁴ 15
- Figura 12. Representação do sinal CWFP obtido para a amostra de ácido fosfórico ($T_1 = 190$ ms e $T_2 = 140$ ms) ²⁵ 16
- Figura 13. Curva de correlação do conteúdo de gordura intramuscular em carne bovina e a razão M_s/M_0 obtido por CWFP, $r = 0,9$ ²⁶ 17
- Figura 14. Curvas de decaimento dos sinais de RMN para as sementes de mamona (CAS), macadâmia (MAC), soja (SOY) e linhaça (LIN) obtidos com a sequência CPMG ²⁷ 18

Figura 15. Curvas de correlação relativas às propriedades do biodiesel, calculadas por cromatografia gasosa e preditas pelo método CPMG, a) curva de calibração da viscosidade cinemática e b) curva de calibração do número de cetano ²⁷	19
Figura 16. Decaimento do FID representando o decaimento natural T_2 e o decaimento efetivo T_2^*	20
Figura 17. Sequência de pulsos da técnica de eco de Hahn, onde τ = tempo de espera entre os pulsos.	20
Figura 18. Representação vetorial do eco de Hahn para descrever o eco formado por dois pulsos de 90° ²⁹	21
Figura 19. Amplitude do sinal adquirida pela sequência $90^\circ_\tau_{180^\circ}$. O eco com linhas pontilhadas esta no modo fase, com deslocamento de 180 graus em relação ao FID e o eco com linha cheia é no modo magnitude.	22
Figura 20. Sequência de pulsos da técnica CP (Carr-Purcell) com trem de pulsos de 180° ³⁰	22
Figura 21. Representação vetorial da sequência de pulsos da técnica CP ³⁰	23
Figura 22. Amplitude do sinal dos ecos obtidos com a sequência CP ³⁰	24
Figura 23. Sequência de pulsos da técnica de CPMG, onde τ = tempo de espera entre os pulsos ³¹	24
Figura 24. Representação vetorial da sequência de pulsos da técnica de CPMG ³¹	25
Figura 25. Amplitude do sinal dos ecos obtidos com a sequência CPMG ³¹	26
Figura 26. Magneto do Tomógrafo/espectrômetro de 2,1 T e CAT-100 da Tecmag.	29
Figura 27. Diagrama mostrando o espectrômetro CAT-100 (Tecmag) operando num imã de 2,1 T (frequência de 85 MHz para o ^1H).	29
Figura 28. Circuito LC de uma sonda de RF utilizada em experimentos de RMN.	30
Figura 29. A) Espectrômetro Spin Lock SLK-100 com magneto de 0,23T de 9 MHz para o ^1H ; B) porta amostras.	31
Figura 30. Esteira mecânica de poliacetal, formada por 105 gomos de 65 mm atravessando o bore de 30 cm de diâmetro do magneto de 2,1 T.	32
Figura 31. Circuito de capacitores e bobina tipo Helmholtz utilizados para aquisição experimental.	32
Figura 32. Visão interna da bobina, esteira e guia montado. b) Guia de PVC suportado por duas placas de acrílico nas dimensões do tomógrafo.	33
Figura 33. Tela do software de programação do sistema de movimentação das amostras.	34

Figura 34. Distribuição Lorentziana de frequências, com FWHM: A) $\Delta\nu = 15$ Hz e B) 100 Hz.	38
Figura 35. Sinais experimentais (esquerda) e simulados (direita) de água deionizada obtidos com CPMG (●), CPMG ₁₃₅ (■), CPMG ₉₀ (▲) e CPMG ₄₅ (◆) com homogeneidade de campo magnético equivalente à $\Delta\nu = 15$ Hz (A e B) e 100 Hz (C e D), $\tau = 2$ ms. A inserção na Figura 35A apresenta as oscilações dos primeiros pulsos de refocalização. A inserção na Figura 35C apresenta os decaimentos de CPMG com $\tau = 0,1$ ms.....	41
Figura 36. Espectro de potência de um pulso 180° (linha preta) e de um pulso de 90° (linha vermelha) reduzido por T_p	42
Figura 37. Espectro de potência de um pulso 180° (linha preta) e de um pulso de 90° (linha vermelha) reduzido por B_1	43
Figura 38. Sinais experimentais de óleo de soja obtidos com CPMG (●), CPMG ₁₃₅ (■), CPMG ₉₀ (▲) e CPMG ₄₅ (◆) em $\Delta\nu = 15$ Hz (A e B) e 100 Hz (C e D), $\tau = 0,1$ ms (esquerda) e 0,4 ms (direita).....	44
Figura 39. Sinais experimentais de óleo de semente de mamona obtidos CPMG (●), CPMG ₁₃₅ (■), CPMG ₉₀ (▲) e CPMG ₄₅ (◆) em $\Delta\nu = 100$ Hz, $\tau = 0,1$ ms (A) e 0,4 ms (B).....	45
Figura 40. Sinal real de semente de amendoim obtido com a sequência CP utilizando pulsos de refocalização 90° e $\tau > T_2^*$, desde o primeiro eco até o regime estacionário. As setas indicam três regiões do sinal CP ₉₀ expandidas na Figura 41.....	46
Figura 41. Sinal real de semente de amendoim obtido com a sequência CP ₉₀ : A) de zero a 0,016 s, B) entre 0,016 e 0,048 e C) entre 0,640 e 0,660 s.....	47
Figura 42. Sinal real de semente de amendoim obtido com a sequência CP utilizando pulsos de refocalização 45° e $\tau > T_2^*$ de zero a 0,016 s.	49
Figura 43. Magnitude dos sinais de óleo de soja obtidos por CWFP (A) e CP-CWFP (B) em 85 MHz ¹ H e $\Delta\nu = 25$ Hz.	50
Figura 44. Sinais de amostra de água obtidos por CWFP e CP-CWFP em 85 MHz ¹ H e $\Delta\nu = 25$ Hz.	51
Figura 45. Sinais de amostra de óleo de soja obtidos por CWFP e CP-CWFP em 9 MHz ¹ H e $\Delta\nu = 250$ Hz (A) e em 85 MHz ¹ H e $\Delta\nu = 25$ Hz (B).	52
Figura 46. Sinais de amostra de semente de mamona obtidos por CWFP e CP-CWFP em 9 MHz ¹ H e $\Delta\nu = 250$ Hz (A) e em 85 MHz ¹ H e $\Delta\nu = 25$ Hz (B).....	52
Figura 47. Correlação entre os valores de T_1 e T_2 medidos com os métodos padrão IR e CPMG, respectivamente e os valores calculados através do sinal CP-CWFP para as amostras de acetona, água deionizada, DMSO, óleo de soja e semente de mamona.	53

Figura 48. Sinais reais de uma solução de cloreto de manganês (3%): A) obtido pela sequência CP com alternância de fase (x' e $-x'$) e B) obtido pela sequência CPMG com alternância de fase (y' e $-y'$).	55
Figura 49. Sinais reais de uma solução de cloreto de manganês (3%) com defasamento de offset (ψ) ímpar: A) obtido pela sequência CP com alternância de fase (x' e $-x'$) e B) obtido pela sequência CPMG com alternância de fase (y' e $-y'$).	55
Figura 50. A) Sinal real de uma solução de cloreto de manganês (3%) obtido pela sequência CP ₉₀ com alternância de fase (x' e $-x'$) e B) Sinal imaginário obtido pela sequência CPMG ₉₀ com alternância de fase (y' e $-y'$).	56
Figura 51. Sinais reais e imaginários de uma solução de cloreto de manganês (3%) obtido pela sequência CP ₉₀ com alternância de fase (x' e $-x'$) e $\tau > T_2^*$	57
Figura 52. Sinais reais e imaginários de uma solução de cloreto de manganês (3%) obtido pela sequência CPMG ₉₀ com alternância de fase (y' e $-y'$) e $\tau > T_2^*$	58
Figura 53. Sinais reais de uma solução de cloreto de manganês (3%) com defasamento de offset (ψ) ímpar A) obtido pela sequência CP ₉₀ com alternância de fase (x' e $-x'$) e B) obtido pela sequência CPMG ₉₀ com alternância de fase (y' e $-y'$).	59
Figura 54. Sinais dos óleos das 31 sementes oleaginosas obtidos com as sequências CPMG e CPMG ₉₀ com o método online stop and flow.	60
Figura 55. Sinais dos óleos de macaúba, mamona e melancia obtidos com as sequências CPMG e CPMG ₉₀ com o método online stop and flow.	60
Figura 56. Correlação entre os valores de T_2 obtidos com CPMG e CPMG ₉₀ , utilizando 30 espécies de oleaginosas, $r = 0,98$	61
Figura 57. Gráfico dos escores obtidos com a análise por PCA dos dados obtidos por CPMG.	62
Figura 58. Gráfico dos escores obtidos com a análise por PCA dos dados obtidos por CPMG ₉₀	63
Figura 59. Curvas de correlação entre os valores de T_2 das 31 amostras obtidos por ajuste mono exponencial e o componente principal 1 (PC ₁) do PCA, A) dados obtidos pela técnica CPMG e B) dados obtidos pela técnica CPMG ₉₀	64
Figura 60. Curva de correlação entre os valores de PC ₁ do PCA dos sinais obtidos pela técnica CPMG e CPMG ₉₀	64
Figura 61. Sinais dos óleos das 31 sementes oleaginosas obtidos com as sequências CWFP e CP-CWFP com o método online stop and flow.	65
Figura 62. Sinais dos óleos de macaúba, mamona e melancia obtidos com as sequências CWFP e CP-CWFP com o método online stop and flow.	66

Figura 63. Curva de correlação entre os valores das constantes T^* dos dados obtidos por CWFP e CP-CWFP.	67
Figura 64. Curva de correlação entre às razões M_z/M_0 e T_1/T_2 dos dados obtidos por CWFP e CP-CWFP.	67
Figura 65. Curvas de correlação dos valores de T_2 ajustados mono exponencialmente, A) entre CP-CWFP e CPMG e B) entre CP-CWFP e CWFP.	68
Figura 66. Gráfico dos escores obtidos com a análise por PCA dos dados obtidos por CWFP.	69
Figura 67. Curva de correlação entre a razão T_1/T_2 e valores de PC_1 do PCA dos sinais obtidos pela técnica CWFP.	69
Figura 68. Curvas de correlação entre os tempos de relaxação calculados, obtidos por ajuste mono exponencial do sinal de CWFP e o componente principal 1 (PC_1) do PCA, A) tempo de relaxação T_2 e B) tempo de relaxação T_1	70
Figura 69. Curvas de correlação entre os tempos de relaxação calculados, obtidos por ajuste mono exponencial do sinal de CWFP e o componente principal 2 (PC_2) do PCA, A) tempo de relaxação T_2 e B) tempo de relaxação T_1	71
Figura 70. Gráfico dos escores obtidos com a análise e por PCA dos dados obtidos por CP-CWFP.	72
Figura 71. Curva de correlação entre a razão T_1/T_2 e valores de PC_1 do PCA dos sinais obtidos pela técnica CP-CWFP.	72
Figura 72. Curvas de correlação entre os tempos de relaxação calculados, obtidos por ajuste mono exponencial do sinal de CP-CWFP e o componente principal 1 (CP_1) do PCA, A) tempo de relaxação T_2 e B) tempo de relaxação T_1	73
Figura 73. Curvas de correlação entre os tempos de relaxação calculados, obtidos por ajuste mono exponencial do sinal de CP-CWFP e o componente principal 2 (CP_2) do PCA, A) tempo de relaxação T_2 e B) tempo de relaxação T_1	73

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Tempos de relaxação T_1 e T_2 de água, óleo de soja e semente de mamona obtidos com as sequências IR e CPMG em 85 e 9 MHz ^1H	51
--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AE – auto-escalado

AF – alternância de fase

AR - alta resolução

BR – baixa resolução

CP – Carr-Purcell

CP₉₀ – CP com ângulos de refocalização de 90°

CP-CWFP – Carr-Purcell - *Continuous Wave Free Precession*

CPMG – Carr-Purcell-Meiboom-Gill

CPMG₁₃₅ – CPMG com ângulos de refocalização de 135°

CPMG₄₅ – CPMG com ângulos de refocalização de 45°

CPMG₉₀ – CPMG com ângulos de refocalização de 90°

CP-SSFP – Carr-Purcell - *Steady State Free Precession*

CWFP – *Continuous Wave Free Precession* (Precessão Livre em Onda Contínua)

DMSO – dimetilsulfóxido

EE – estado estacionário

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

EQE – estado *quasi*-estacionário

EUA – Estados Unidos da América

FID – *Free Induction Decay* (Decaimento Livre da Indução)

FWHM - *Full Width at Half Maximum* (largura de linha à meia altura)

GE – *General Electric*

HPLC – *High Performance Liquid Chromatography*

IQSC – Instituto de Química de São Carlos

IR – Inversão-Recuperação

LRFA – *Low Refocusing Flip Angle* (baixo ângulo de refocalização)

PC – *Principal Components* – Componentes Principais

PCA – *Principal Component Analysis* – Análise de Componentes Principais

RF – radiofrequência

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

SSFP – *Steady State Free Precession* (Precessão Livre do Estado Estacionário)

USP – Universidade de São Paulo

LISTA DE SÍMBOLOS

- α – ângulo de excitação
- γ – razão magnetogírica
- Δf – banda espectral
- $\Delta \nu$ – variação de frequência
- $\Delta \omega$ – variação de frequência de Larmor e com a do sistema de coordenadas girantes
- θ – ângulo de refocalização
- μ – viscosidade cinemática
- ν_0 – frequência de ressonância
- ν – frequência linear de isocromatas
- τ – intervalo de tempo entre os ecos
- ϕ – ângulo de precessão no sistema de coordenadas girantes
- ψ – ângulo de precessão de offset
- ω – frequência angular do sistema de coordenadas girantes
- ω_0 – frequência de Larmor
- ΔB_0 – variação da homogeneidade do campo magnético
- B_0 – campo magnético
- B_1 – campo magnético oscilante gerado pela RF (radiofrequência)
- D – tempo de espera para o retorno da magnetização ao equilíbrio térmico
- G – gradiente de campo magnético
- M – magnetização
- M_0 – amplitude do sinal no equilíbrio térmico
- M_{EE} , M_{SS} e M_S – amplitude do sinal no estado estacionário (*steady-state*)
- M_x – magnetização da componente x' ou real
- M_y – magnetização da componente y' ou imaginária
- M_z – magnetização longitudinal
- P – potência
- Q – fator de qualidade da sonda
- r – coeficiente de correlação linear
- T^* – constante de tempo de decaimento do estado *quasi*-estacionário
- T_1 – tempo de relaxação longitudinal
- T_2 – tempo de relaxação transversal

T_2^* – constante de tempo de Decaimento Livre da Indução

T_p – intervalo de tempo de pulso

V – volume da bobina detectora

v – velocidade

x' – eixo x no sistema de coordenadas girantes

y' – eixo y no sistema de coordenadas girantes

z – eixo z no sistema de coordenadas girantes e de direção do fluxo magnético

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LISTA DE SÍMBOLOS

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 DEFINIÇÕES DAS CATEGORIAS DE ANÁLISES QUÍMICAS UTILIZADAS EM CONTROLE DE PROCESSOS	3
1.2 ANÁLISES EM FLUXO POR RMN	4
1.3 ANÁLISES <i>ONLINE</i> DESENVOLVIDAS NA EMBRAPA INSTRUMENTAÇÃO E IQSC/USP	11
1.4 TÉCNICAS DE ECO DE SPIN	20
2. OBJETIVOS.....	27
3. METODOLOGIA	28
3.1 EQUIPAMENTOS UTILIZADOS	28
3.1.1 <i>Espectrômetro de 85 MHz para ¹H</i>	29
3.1.2 <i>Espectrômetro de 9 MHz para ¹H</i>	31
3.1.3 <i>Sistema de análises online</i>	31
3.2 TÉCNICAS DE RMN UTILIZADAS	34
3.3 SIMULAÇÃO DOS SINAIS TEÓRICOS	35
3.4 ANÁLISE POR MÉTODOS ESTATÍSTICOS MULTIVARIADOS	38
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
4.1 INFLUÊNCIA DE LRFA EM CPMG	39
4.2 INFLUÊNCIA DE LRFA NA SEQUÊNCIA CP.....	46
4.2.1 <i>Comparação entre CP-CWFP e CWFP</i>	49
4.3 INFLUÊNCIA DA ALTERNÂNCIA DE FASE NAS SEQUÊNCIAS CP E CPMG COM $\Psi = 2N\pi$. 54	
4.3.1 <i>Influência de $\psi = (2n+1)\pi$ em CP e CPMG com alternância de fase</i>	55
4.4 INFLUÊNCIA DA ALTERNÂNCIA DE FASE NAS SEQUÊNCIAS CP ₉₀ E CPMG ₉₀ COM $\psi = 0$ 56	
4.4.1 <i>Influência de $\psi = (2n+1)\pi$ em CP₉₀ e CPMG₉₀ com alternância de fase</i>	58
4.5 ANÁLISES <i>ONLINE</i>	59
4.5.1 <i>Análise online com as sequências CPMG₉₀ e CPMG</i>	59
4.5.2 <i>Análise online com as sequências CWFP e CP-CWFP</i>	65
CONCLUSÕES.....	74
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75

1. INTRODUÇÃO

A Ressonância Magnética Nuclear (RMN) é amplamente empregada como uma ferramenta analítica abrangendo investigações que vão desde análises em nível molecular até o diagnóstico médico por imagens. As aplicações da RMN podem ser divididas em espectroscópicas e tomográficas (imagens). Nas análises espectroscópicas são utilizados parâmetros espectrais como intensidade ou área do sinal, diferenças de deslocamento químico, tempos de relaxação, entre outros; e nas tomográficas a distribuição espacial de um ou mais analitos. Nas análises químicas a RMN é mais utilizada sob a forma de espectroscopia, sendo subdividida em espectroscopia em alta resolução em solução ou estado sólido e espectroscopia em baixa resolução.

A RMN em alta resolução (RMN-AR) é amplamente empregada na determinação da estrutura de moléculas orgânicas, de biopolímeros como proteínas e ácidos nucleicos, de polímeros e materiais compósitos, entre outras aplicações ¹. Nessas aplicações, a RMN é normalmente utilizada para análise de amostras que permanecem dentro da sonda do aparelho durante todo o tempo de análise. Mais recentemente, a RMN-AR também passou a ser empregada nas análises em fluxo, principalmente acoplada à cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*) ².

A RMN em baixa resolução (RMN-BR) tem menos aplicações em análises químicas do que a RMN-AR. Entretanto, vem sendo cada vez mais utilizada para análises quantitativas e qualitativas com grande aplicabilidade para o controle e certificação de qualidade no setor industrial, principalmente no modo *offline* ¹.

Há algum tempo a RMN-BR também começou a ser estudada como um método rápido para análises de amostras em fluxo, envolvendo principalmente análises de amostras heterogêneas, com o maior componente no estado líquido, como sangue, petróleo; e/ou sólidos como sementes, frutas e carnes. A ideia básica desse desenvolvimento é o uso da RMN como um sensor industrial capaz de analisar, selecionar ou classificar não destrutivamente milhares de amostra por hora. Assim, o controle de processos *online* pode melhorar a produtividade e a qualidade na indústria ³.

Para a automatização das análises são necessárias adaptações mais específicas nos equipamentos de RMN e otimização de muitos parâmetros para a exploração do sistema

Introdução

online na indústria. Hills e Wright ⁴ fizeram uma avaliação dos principais problemas do uso da RMN como um sensor industrial, que necessita analisar amostras em uma esteira com velocidade média de 2 m/s. Alguns dos problemas observados incluem:

1. Os equipamentos de RMN são de alto custo, baseados em magnetos supercondutores de alta resolução, gradientes de campo, amplificadores de potência e diversos sistemas de controle.
2. Os magnetos utilizados devem possuir alta homogeneidade de campo, condição muito sensível ao ambiente industrial com variação de temperatura, maquinário próximo e ruídos eletrônicos.
3. As esteiras industriais operam em velocidades médias de 2 m/s, velocidade muito rápida para os experimentos de RMN, necessitando reduzir seu movimento à poucos decímetros por milissegundo.
4. As amostras precisam estar alinhadas ao campo magnético para a observação da RMN (da ordem de $5T_1$), condição incompatível para a velocidade média das esteiras industriais, que equivale a ter um sistema de pré-polarização de até dezenas de metros.
5. Para operar os equipamentos de RMN, é necessário pessoal especializado e suporte técnico ⁴.

Esses pesquisadores concluíram que essas limitações são válidas, mas são baseadas nos protocolos experimentais de RMN-AR. No entanto muitas dessas deficiências não são observadas ou são minimizadas quando se utiliza aparelhos RMN-BR. Normalmente os espectrômetros de RMN-BR têm menor custo de aquisição e manutenção, é pouco sensível ao maquinário e outras estruturas do ambiente industrial e também não precisam de operador com alto grau de especialização. Assim, os espectrômetros de RMN-BR vêm sendo os mais estudados para aplicações em processos industriais ⁴.

Esses sensores de RMN precisam fornecer medidas em tempo real, ser suficientemente robustos para resistirem às variáveis do ambiente industrial, possuir confiabilidade, baixo custo de operação e apropriada relação custo/benefício que torne sua implementação tecnológica economicamente atrativa aos industriários ³. Antes de apresentar a revisão bibliográfica das aplicações da RMN em fluxo, será feita uma descrição das categorias de análises químicas utilizadas no controle de qualidade industrial.

1.1 Definições das categorias de análises químicas utilizadas em controle de processos

De acordo com Bonastre et al. (2005), as análises químicas utilizadas em controle de processos podem ser classificadas em: *offline*, *atline*, *online* e *inline*. As análises *offline* e *atline* são caracterizadas pela necessidade de remover a amostra da linha de processo e transportá-la para o instrumento de medida⁵.

Em processos de análises *offline*, a amostra é analisada em uma instalação centralizada com instrumentação sofisticada e possivelmente automatizada. As vantagens dessa abordagem incluem a economia e a eficiência no tempo de uso dos instrumentos, a disponibilidade do quadro de especialistas para consultoria, desenvolvimento de métodos e manutenção. As desvantagens incluem a demora entre a submissão da amostra e o relatório de resultados, os custos adicionais administrativos e a competição entre os usuários pelos recursos⁵.

Estas desvantagens conduzem para o processo de análise *atline*, no qual o instrumento é instalado próximo da linha de processo. As vantagens do processo *atline* incluem rapidez no processamento da amostra, controle estrito da análise pelo responsável pela análise (e, portanto, próxima da análise em tempo-real), o emprego de um instrumento mais simples com menor custo e manutenção e maior facilidade de uso. No entanto, a instrumentação necessita ser mais robusta com monitoramento genérico dos parâmetros⁵.

Um passo a diante é a abordagem *online*, onde é utilizado um sistema de amostragem automatizado para extração da amostra, condicionando-a e apresentando-a a um instrumento analítico para a medida. É possível subdividir o processo *online* em duas categorias: métodos intermitentes, que requerem a injeção de uma porção da amostra para o instrumento e; métodos contínuos, que permitem que as amostras fluam continuamente através do instrumento. Em geral, a amostra é colocada automaticamente no analisador situado próximo ao processo⁵.

Embora as análises *online* tenham vantagens sobre os processos *offline* e *atline*, ela requer uma interface confiável e pode necessitar de condicionamento da amostra. A maior desvantagem das análises *online* é a necessidade de construir uma linha analítica separada, que direcione as amostras para o instrumento em uma temperatura e pressão adequada⁵.

Finalmente, a quarta abordagem proposta por Bonastre et al. (2005) é a análise *inline*. Nesse caso a análise é feita *in situ*, diretamente no processo. Suas principais características são: analisador situado dentro do processo ou de um reator, monitoramento

contínuo, com sensor simples propenso a interferência química da matriz do processo e baixo custo, porém com demanda tecnológica ⁵.

Essas são definições generalizadas de categorias de análise em controle de processos industriais. Em RMN a maioria dos autores classifica as aplicações em fluxo, como *online*, quando a amostra é transportada por meio de uma esteira (materiais sólidos, heterogêneos ou líquidos em embalagens, etc.) e em tubulações, principalmente para líquidos.

1.2 Análises em fluxo por RMN

O fluxo é o escoamento de substâncias que se encontram em qualquer estado (sólido, líquido ou gasoso) e pode ser laminar ou turbulento, compressível ou incompressível, contínuo ou intermitente (*stop and flow*) ⁶. Existe também o fluxo denominado *plug flow* (fluxo em pistão) onde a amostra se move como um bloco, como por exemplo, uma amostra sólida transportada por uma esteira. No caso de líquido, isso ocorre quando a amostra é transportada homogeneamente com a ajuda de um pistão ¹.

A primeira análise em fluxo por RMN foi feita por Suryan em 1951 ⁷, poucos anos após a descoberta da RMN em 1946. Nesse trabalho foi utilizado um espectrômetro de RMN em onda contínua baseado em um eletromagneto de 25 MHz para ¹H. Para a medida em fluxo a amostra foi colocada em um tubo e seu escoamento foi obtido sob a força da gravidade. Ele observou dois efeitos significativos no sinal de RMN: primeiro, um aumento temporário da intensidade do sinal seguido de um rápido decréscimo. Então ele observou um sinal relativamente maior quando o fluxo do líquido se tornava estável. Assim notou que a magnitude desses efeitos é condicionada por vários fatores: o tempo de relaxação T₁ do líquido, o tempo gasto no campo magnético, tanto fora quanto no interior da bobina de radiofrequência (RF) e a velocidade do fluxo. Ele observou um aumento do sinal em até 20 vezes com o fluxo, quando comparado com as amostras estáticas. Ele também observou que esse aumento era dependente da velocidade do fluxo ⁷.

Singer demonstrou em 1959 a aplicação da RMN pulsada *in vivo* no estudo da velocidade do fluxo sanguíneo em calda de ratos ⁸. Um dos procedimentos foi medir o tempo de relaxação T₁ dos prótons da água no sangue e a mudança nesse tempo com a interrupção do fluxo sanguíneo com um torniquete. Uma vez que o fluxo resulta em menos saturação, a

Introdução

curva de absorção com fluxo de sangue apresentou maior amplitude. O trabalho de Singer foi precursor para a aplicação da RMN em fluxo sanguíneo, na medicina ⁸.

Em 1962, Ladner e Stacey utilizaram a RMN em fluxo contínuo para analisar a umidade de carvão ⁹. O fluxo, sob a força da gravidade, foi controlado a 100g por hora. Utilizaram um aparelho de onda contínua de 16 MHz para ¹H. Com os espectros de hidrogênio conseguiram distinguir entre os sinais derivados dos hidrogênios do material sólido (carvão) e dos hidrogênios presentes na água associada a esse material. Mediram a variação de umidade de 0 a 14% e precisão de $\pm 1\%$. Essa pode ser considerada a primeira aplicação da RMN em fluxo no controle de processo industriais.

Após essas aplicações iniciais, outros trabalhos foram aperfeiçoando a instrumentação e as metodologias utilizadas para medidas em fluxo. Um desses exemplos pode ser visto no trabalho de McIvor (1969) que usou um aparelho comercial de RMN em onda contínua, Perkin Elmer modelo R10, com campo magnético B_0 de 1,4 T ¹⁰ (Figura 1).

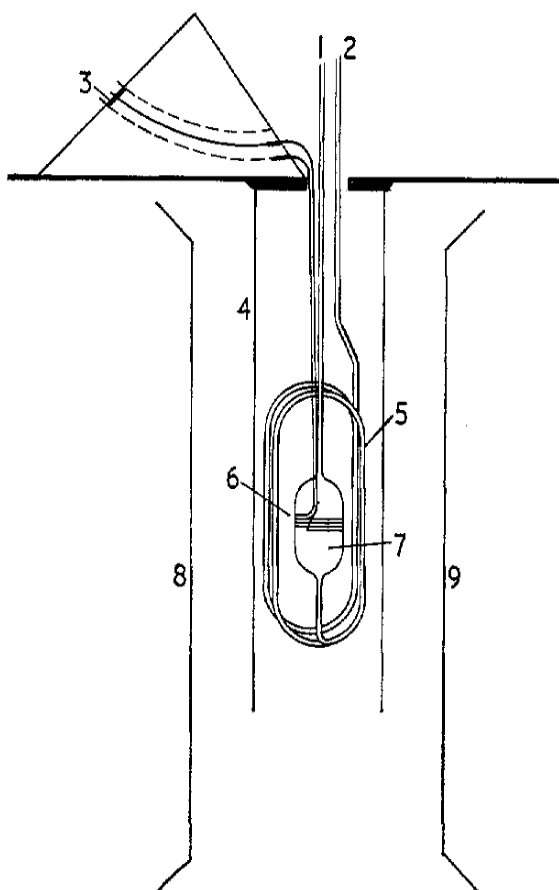


Figura 1. Configuração da sonda de RMN proposta por McIvor (1969) incorporando a região de pré-magnetização: 1, entrada da amostra em fluxo; 2, saída da amostra em fluxo; 3, conexão da sonda de RF; 4, proteção metálica; 5, serpentina de polarização; 6, bobina de RF; 7, célula de compartimento da amostra; 8 e 9, partes do pólo do magneto ¹⁰.

Introdução

Ele fez análises em fluxo em alta resolução (largura de linha de 2 a 3 Hz) que permitiu a quantificação dos componentes de uma mistura de solventes com pequenas diferenças de deslocamento químico. Ele analisou amostras tanto com hidrogênio a 60 MHz quanto de flúor a 59,47 MHz. Para fazer as medidas em fluxo dos solventes ele incorporou uma serpentina de pré-magnetização na estrutura da sonda, permitindo que a amostra circulasse no interior do magneto antes de entrar na bobina de RF (Figura 1) ¹⁰. Esse maior percurso da amostra no interior do magneto servia para garantir que a amostra fosse totalmente polarizada. Essa configuração promoveu um aumento na razão sinal/ruído e maior precisão nas análises quantitativas. Essa mesma ideia foi usada posteriormente para acoplamento de RMN com HPLC.

Grover e Singer desenvolveram em 1971 as primeiras aplicações de RMN em fluxo em medicina ¹¹. Eles realizaram medidas da velocidade do fluxo sanguíneo no interior do dedo humano, com a sequência de pulsos eco de spin. Com a amplitude do eco em função do tempo de eco foi possível determinar a distribuição da velocidade do fluxo sob as condições utilizadas no experimento ¹¹. O esquema experimental utilizado está na Figura 2.

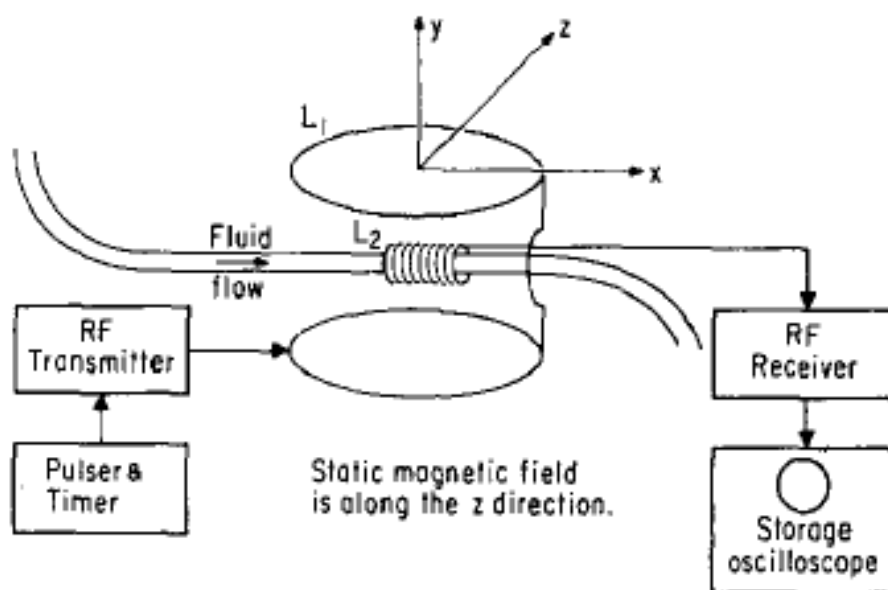


Figura 2. Montagem experimental descrita por Grover e Singer para medidas eco de spin em fluxo ¹¹.

Neste trabalho, Grover e Singer assumiram as seguintes simplificações:

1. A bobina transmissora com um campo de RF uniforme sobre o volume a ser analisado (B_1 super-homogêneo).

2. O campo magnético contínuo pode ser representado por um gradiente linear G , paralelo à direção do fluxo, pelo menos na região de análise.
3. A velocidade de fluxo de interesse muito maior que a velocidade de difusão do líquido em questão, logo o espaço percorrido por um grupo de isocromatas entre dois ecos tem valor dado pela Equação 1:

$$\vec{z}(2\tau) = \vec{z}(0) + 2v\tau\vec{z} \quad (1)$$

onde v é a frequência do grupo de isocromatas e

z é a direção do fluxo e a difusão pode ser desprezada.

4. O líquido permaneceu no campo contínuo por um tempo muito maior que T_1 (para um sinal ótimo, maior que $5T_1$), alcançando a magnetização de equilíbrio térmico.
5. $2v\tau$ muito menor que as dimensões da bobina receptora, de modo a haver um incremento na fase de cada grupo de isocromatas, 2τ após o primeiro pulso de $\phi = \gamma Gv\tau^2$, existindo da ordem de três mil grupos de isocromatas com fases diferentes sobre a bobina receptora ¹¹.

Em 1971 foi publicado por Sudmeier e Pesek o primeiro estudo por RMN utilizando o método *stop and flow* ¹². No método *stop and flow* a amostra em fluxo fica estática no interior da sonda somente durante a análise. A configuração do sistema consistiu de seringas pneumáticas de 5 mL montadas em um invólucro de alumínio, permitindo a adição e a retirada de soluções, sem retirar o tubo de amostra da sonda. Neste trabalho os autores monitoraram largura de linha de ³⁵Cl por RMN-AR em onda contínua em função do tempo após a mistura de Hg e soro albumina bovina com vários agentes quelantes ¹².

Em 1978, Watanabe e Niki, desenvolveram o primeiro trabalho acoplando RMN-AR em fluxo com a técnica de HPLC ². Utilizaram um espectrômetro pulsado de 60 MHz para o ¹H e o método *stop and flow*. Mais tarde, como o aumento da sensibilidade da RMN utilizando magnetos supercondutores de alto campo, muitos autores propuseram a realização das análises com os eluentes cromatográficos em fluxo contínuo ³. Foram desenvolvidos dispositivos especiais para a interface da RMN com a cromatografia para possibilitar a polarização da amostra, conforme a configuração de McIvor ¹⁰ (Figura 3). Hoje já é comum ter sistemas de RMN – HPLC em laboratório de pesquisa. No entanto, esse tema não será detalhado neste estudo, pois se trata de aplicações em RMN-AR.

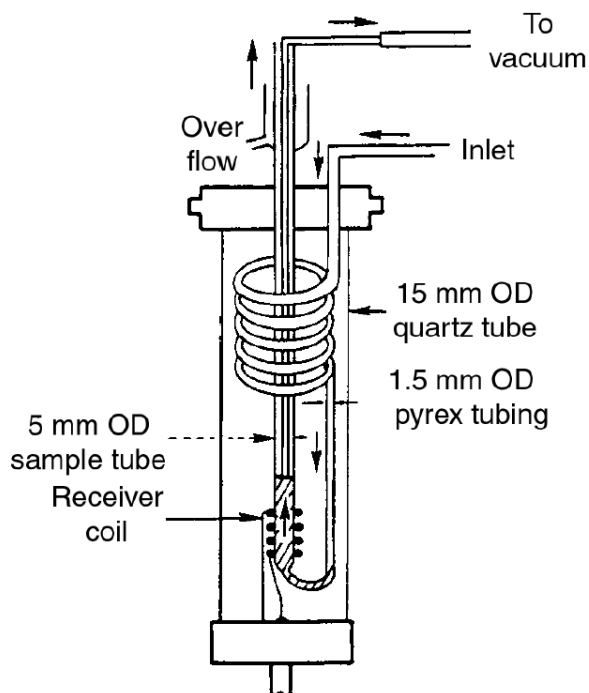


Figura 3. Sistema para acoplamento de RMN-AR em fluxo com o aparelho de HPLC, incorporando a região de pré-magnetização. Nesse esquema a amostra entra por um tubo espiral de quartzo de 15 mm que faz com que a amostra se mantenha por mais tempo no interior no magneto possibilitando sua polarização antes de entrar na região de detecção da sonda ¹⁰.

Pearson et al. (1987) descreveu um método *online* para análise de umidade em trigo fresco temperado ¹³. Seus sensores de RMN, inicialmente construídos para medidas *online* de umidade em óxido de alumínio, foram adaptados com um dispositivo apropriado para amostra de farinha. Este método é rápido e insensível à densidade de empacotamento da amostra, mas é somente apropriado para baixo conteúdo de umidade devido à não homogeneidade do campo magnético. Medidas utilizando a sequência CPMG foram sugeridas para resolver esse problema. No mesmo ano, Renou et al. demonstraram que técnicas pulsadas de RMN-BR em baixo campo permitem determinações simultâneas de etanol e açúcar em uma fermentação alcoólica média em um tempo curto (3,5 min.) ¹⁴.

Nicholls e De Los Santos desenvolveram em 1991 um sensor de umidade para indústria de moagem úmida de milho ¹⁵. Na configuração do sistema, o sensor de 11 MHz ¹H foi suspenso sob uma cavidade em uma calha de transporte (Figura 4). Esse sistema foi desenvolvido como uma solução para monitorar o processo de secagem. Um estudo feito pelo governo americano observou que os processos de secagem na indústria consumiam aproximadamente 8% de toda energia industrial utilizada nos EUA ¹⁵.

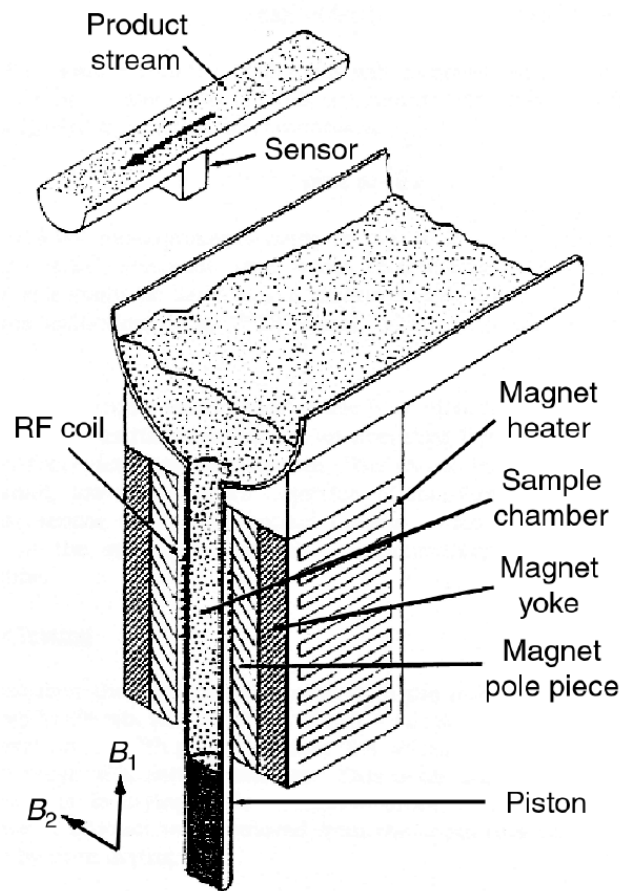


Figura 4. Dispositivo para carregamento da amostra para medida de umidade por RMN ¹⁵.

O sensor de RMN é preenchido com a amostra quando ocorre o deslocamento para baixo de um pistão que fecha a abertura do sistema de transporte. No fim da medida, o pistão é conduzido novamente ao tubo de amostra, retornando o produto medido para a linha de processo. Nesse trabalho o autor utilizou medidas de T_1 e T_2 para correlacionar com a variação de umidade ¹⁵.

Chen et al. em 1993 estabeleceram um protocolo experimental apropriado de um sensor de RMN *online* para avaliação da maturidade de abacates intactos ¹⁶. A intensidade da imagem do sinal, a razão dos sinais de ressonância do óleo e da água dos espectros de RMN unidimensionais e os tempos de relaxação T_1 e T_2 da água na fruta foram correlacionados com sua maturidade. As imagens foram adquiridas com um espectrômetro General Electric (GE) modelo CSI-2 de 85 MHz para o ^1H .

Em 1997 Zion et al. desenvolveram um sensor de RMN *online* para análises qualitativas utilizando um espectrômetro GE modelo CSI-2 de 85 MHz para o ^1H ¹⁷. A configuração do sistema consistiu de um ímã com uma bobina de superfície de 20 mm de diâmetro e uma bobina de imagem de 150 mm de diâmetro acoplado com um sistema de

esteira. A esteira se movia em velocidades de 0 a 250 mm/s. A Figura 5 apresenta a configuração do sistema.

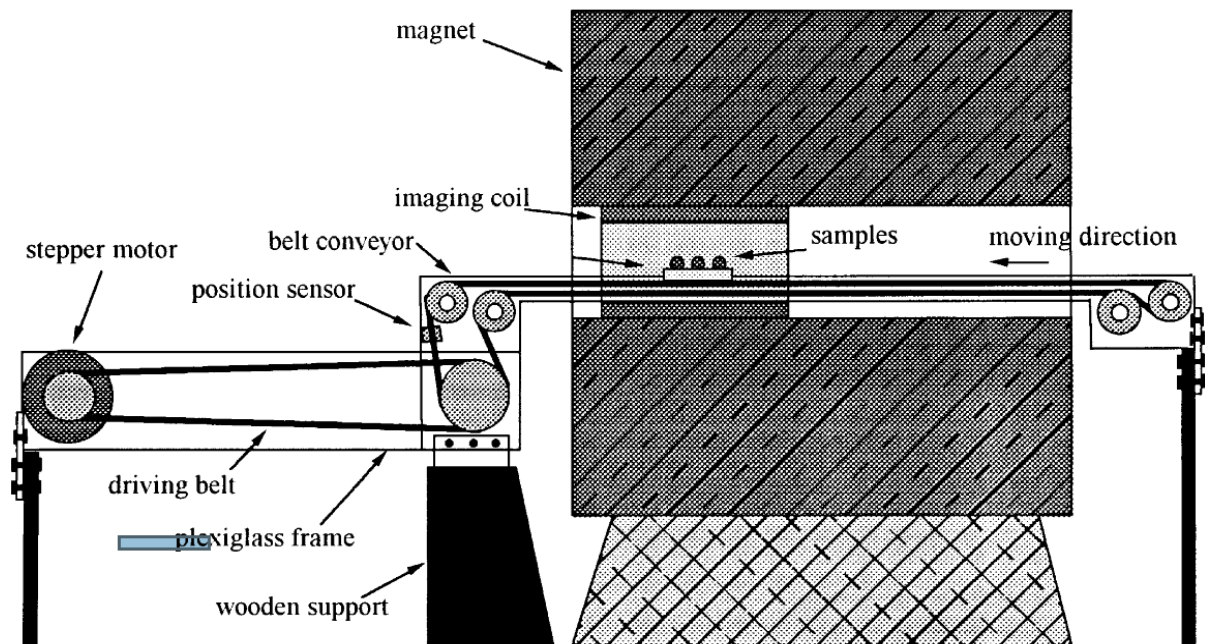


Figura 5. Sensor de RMN *online* com sistema de esteira para análises qualitativas de amostras intactas ¹⁵.

Foram obtidas projeções unidimensionais do perfil de azeitonas se movendo por meio de uma esteira dentro do ímã, possibilitando a distinção entre azeitonas com e sem caroço. Os erros de classificação para esse experimento foram 4,3, 4,7, 2,3 e 4,0% para as velocidades da esteira de 0,5, 15 e 25 cm/s, respectivamente ¹⁵.

Hills e Wriqth (2006) exploraram as implicações da relatividade dinâmica em RMN e demonstraram que a translação da amostra pode ser utilizada para adquirir os sinais de RMN sem a necessidade do pulso de excitação ou gradiente de campo ⁴.

O protótipo é baseado na inserção de um campo de RF contínuo de B_1 transversal ao campo magnético estático, B_0 , conforme mostrado na Figura 6 ⁴. O movimento da amostra nesse volume de RF localizado é utilizado para excitar e criar o sinal de RMN.

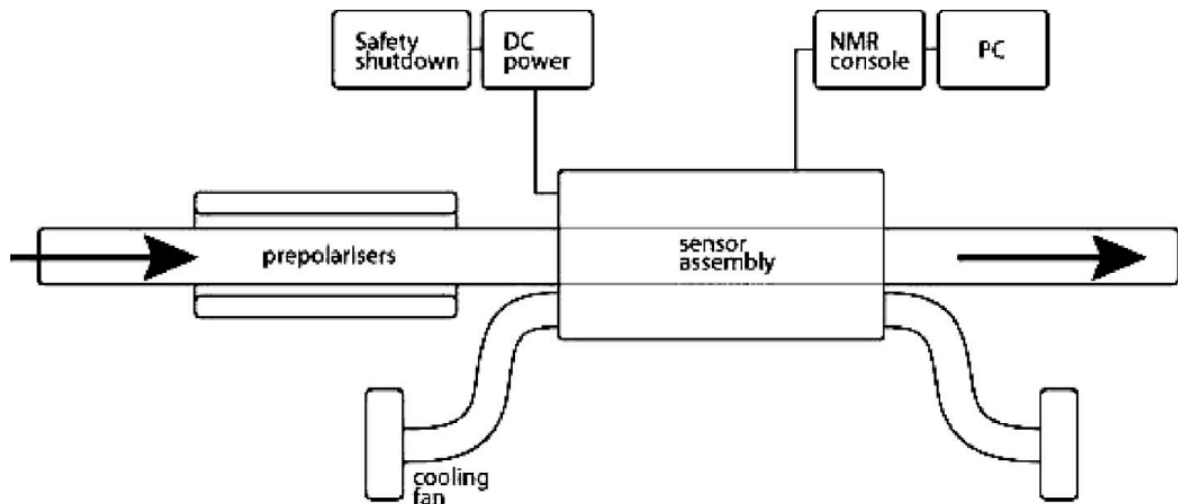


Figura 6. Protótipo de um sensor de RMN *online* de baixo custo baseado em um eletromagneto com resfriamento a ar e um magneto permanente pré-polarizador ⁴.

Nos últimos anos têm aumentado os esforços para o desenvolvimento da RMN *online* de baixo custo para análises em fluxo contínuo em esteiras industriais. Por isso muitos estudos vêm abordando a utilização de equipamentos de RMN de baixo campo (~ 60 MHz) em baixa resolução, baseados em tecnologia de magnetos permanentes com muitas aplicações em processos *online* e *atline* ¹.

Muitos autores relataram diversos fatores de qualidade em vários tipos de frutas e vegetais que podem ser explorados por RMN *online*, tais como, amadurecimento, injúrias, escurecimento, infecções, quantidade de açúcar, entre outros ^{18,19,20}.

1.3 Análises *online* desenvolvidas na Embrapa Instrumentação e IQSC/USP

Os primeiros trabalhos sobre RMN em fluxo ocorreram no final da década 90, quando foi observado que o sinal de RMN utilizando a Precessão Livre em Onda Contínua (CWFP, do inglês *Continuous Wave Free Precession*) era muito sensível ao fluxo ^{21,22}.

Nesse trabalho foram realizados experimentos com o escoamento laminar de água em um espectrômetro de RMN de 7,5 MHz ¹H. A sequência CWFP consiste de um trem de pulsos 90° de mesma fase e intensidade, separado por um tempo $\tau < T_2^* \ll T_1$ e T_2 . Nesta condição um sinal contínuo é obtido, que não decai com o tempo e cuja amplitude não depende de T_1 , mas da razão T_1/T_2 , de acordo com a Equação 2 ^{21,22}.

$$M_{EE} = \frac{M_0 T_2}{(T_1 + T_2)} \quad (2)$$

onde M_{EE} é a intensidade do sinal no estado estacionário e M_0 é a intensidade do sinal no equilíbrio térmico

O sinal CWFP é uma combinação de duas componentes, FID (M^+) e eco (M^-) que, dependendo do ângulo de defasagem, pode apresentar uma interferência construtiva ou destrutiva das componentes entre si. Quando se trabalha com ângulo de defasagem de offset múltiplo ímpar de π , $\psi = (2n+1)\pi$, onde n é um número inteiro, o sinal obtido é máximo devido a uma interferência construtiva, uma vez que M^- e M^+ estão em fase. Já quando o ângulo é múltiplo par, ocorre uma interferência destrutiva que resulta em sinal nulo, pois M^- , relativo ao eco está deslocado em 180° em relação a M^+ , sinal do FID ²¹ (Figura 7).

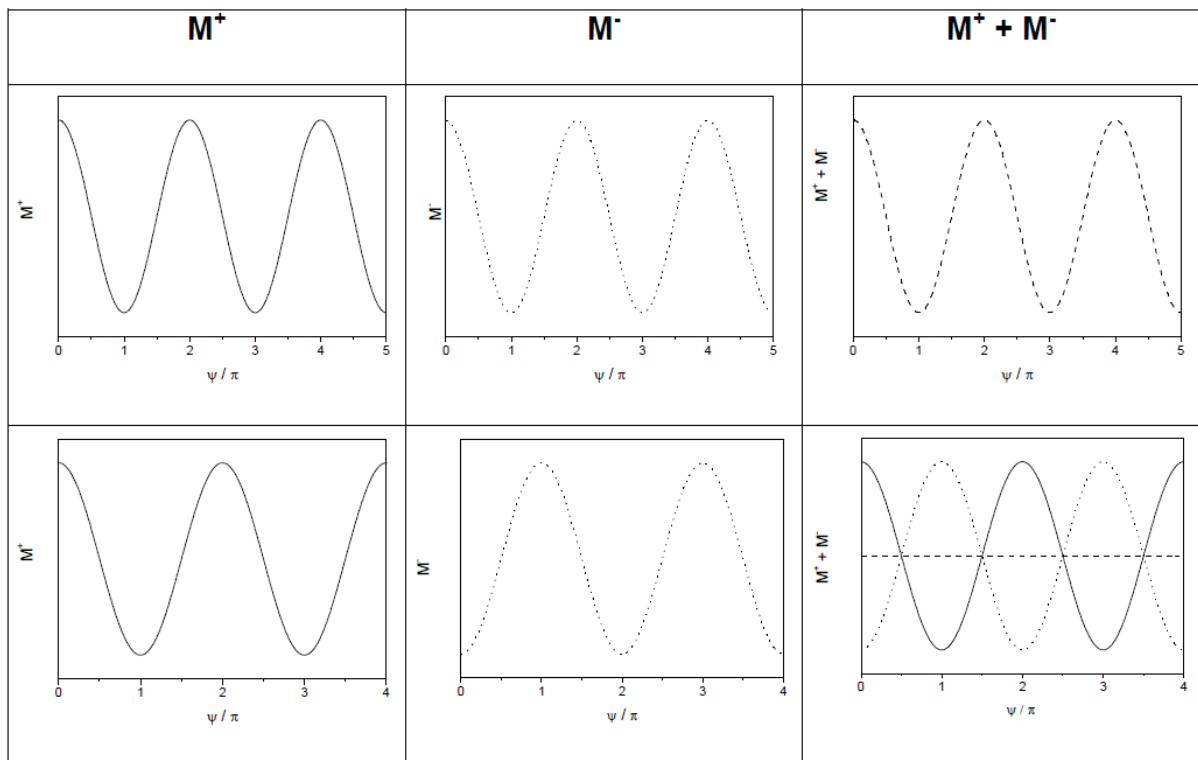


Figura 7. Sinal CWFP resultante da combinação entre as componentes FID e eco, como uma dependência do ângulo de offset ²¹.

A interferência entre M^+ e M^- , a qual modula a amplitude do sinal CWFP, pode ser representada na Figura 7. Para um ângulo de defasagem de 5π (Figura 7 parte superior) o sinal é máximo; e para 4π (Figura 7 parte inferior) o sinal resultante da interação entre os dois sinais com mesma amplitude, mas com fases opostas, é mínimo. Dessa forma, o valor da frequência de defasagem e o intervalo de tempo T_p devem ser otimizados como uma função

desse comportamento, o qual pode ser verificado pela determinação do perfil de excitação da sequência de pulsos ²².

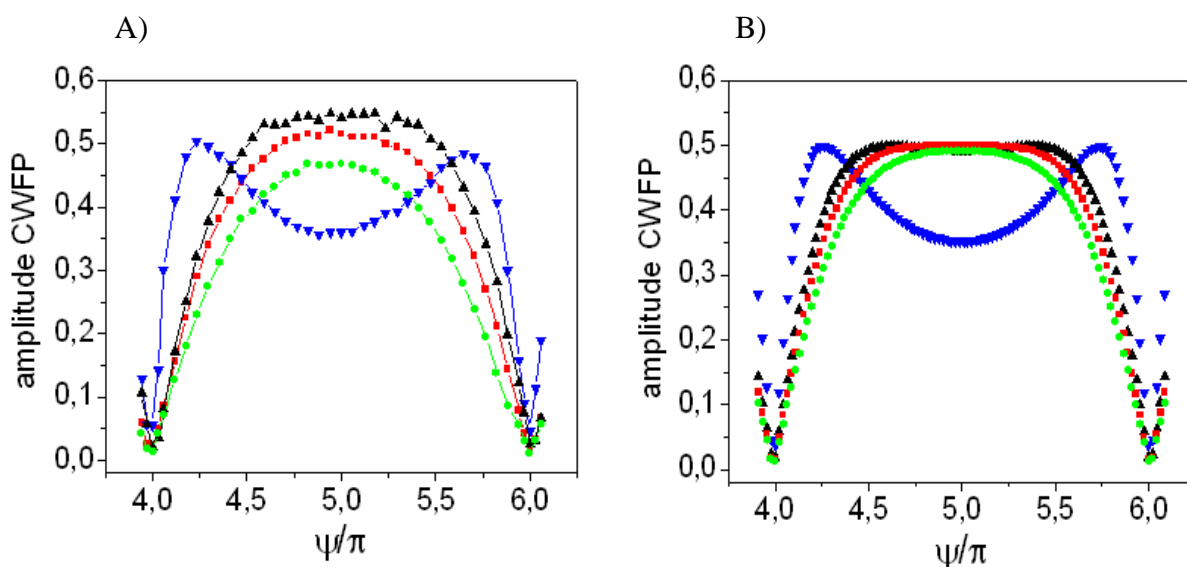


Figura 8. Magnitude da amplitude do sinal de CWFP normalizada como uma função do ângulo de defasagem, ψ , para vários ângulos de excitação α : (\blacktriangledown) 45° , (\blacktriangle) 80° , (\blacksquare) 90° e (\bullet) 100° . A) Experimental e B) sinais simulados com os valores de T_1 e T_2 correspondentes a uma solução $0,02 \text{ mol L}^{-1} \text{ CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ em água ²².

O perfil do sinal CWFP de amostra estáticas pode ser obtido experimentalmente pela variação da frequência de offset ou ângulo de defasagem, ψ , e pode ser calculado pelas equações de Bloch.

O sinal CWFP para uma amostra em fluxo, também sofre um defasagem dada por $\phi = \gamma G v \tau^2$. Essa defasagem seria equivalente a uma defasagem do sinal estático, com a variação do ψ na Figura 8. Assim, a amplitude do seu sinal CWFP para uma amostra em fluxo depende da velocidade e sentido do fluxo, ψ inicial, dos tempos de relaxação e do ângulo de refocalização. Por exemplo, essa dependência pode ser calculada usando as equações de Bloch ²².

Na Figura 9 é apresentado um gráfico da variação da intensidade do sinal CWFP para várias velocidades de fluxo de água (com T_1 e $T_2 \sim 2,8\text{s}$), $\alpha = 90^\circ$ em relação a diferentes frequências de precessão ψ inicial e gradiente de campo de $0,09 \text{ gauss/cm}$ e $\tau = 0,3 \text{ ms}$ ²².

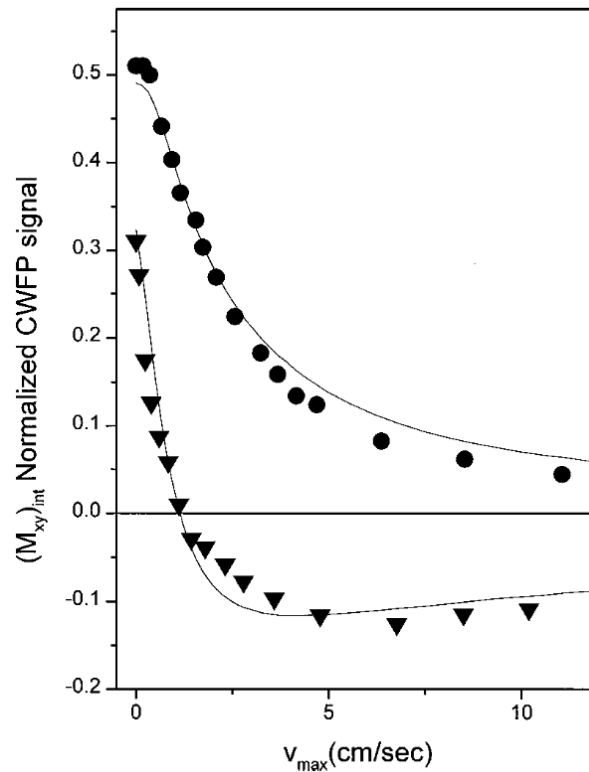


Figura 9. Sinal CWFP em função do fluxo para valores de $\psi = 5,75\pi$ (\blacktriangledown) e $\psi = 5\pi$ (\bullet)²².

Nesta Figura pode ser observado que o sinal CWFP possui uma grande sensibilidade ao fluxo mesmo na presença de um pequeno gradiente de campo magnético. O sinal CWFP para um ψ inicial igual a 5π decai monotonicamente até valor mínimo. Para uma pequena diferença de ψ inicial, por exemplo, $5,75\pi$, o sinal CWFP apresenta uma variação bem diferente da anterior. E decai muito mais rapidamente, passa por um valor nulo e apresenta uma inversão de fase.

Colnago et al. (2007) utilizaram a técnica de CWFP para medidas quantitativas em fluxo do teor de óleo em sementes²⁴. Neste experimento as amostras passaram continuamente em uma esteira, onde foram submetidas à um trem de pulsos de 90° . Na Figura 10 é apresentado o diagrama do sistema *online* para medida do teor de óleo de sementes pela técnica CWFP²⁴.

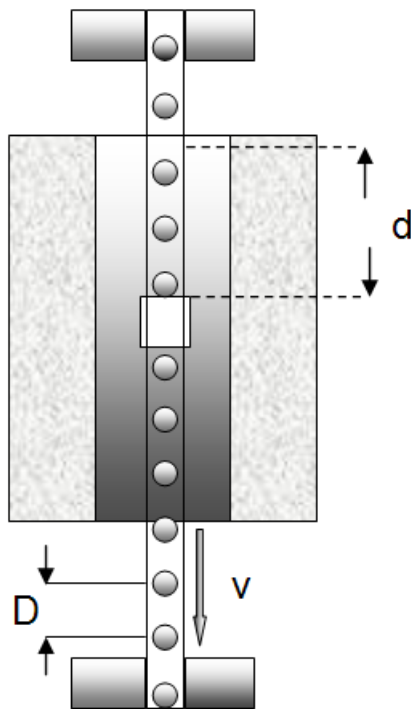


Figura 10. Esquema de um sistema RMN *online*, onde d = distância necessária para a magnetização da amostra, V = velocidade linear e D = espaço entre as amostras ²⁴.

A Figura 11 apresenta um sinal de RMN obtido num tempo total de 14 s pela técnica CWFP, referente à quantidade de óleo de 99 amostras de sementes. Essa técnica viabiliza a determinação do teor de óleo em mais de 20 mil sementes intactas por hora e está sendo utilizada na avaliação do teor de óleo em sementes, na seleção de material genético para produção de biodiesel ²⁴.

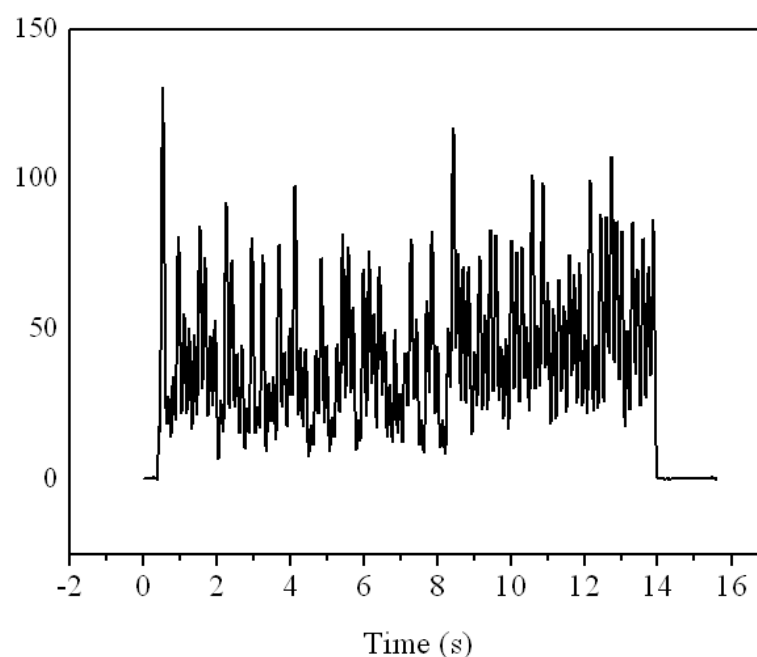


Figura 11. Sinal de RMN *online* obtido pela técnica CWPF de amostras de sementes oleaginosas ²⁴.

Além das análises quantitativas, o sinal CWFP pode ser utilizado para análises qualitativas ²⁵. Para isso é necessário usar o sinal CWFP desde o primeiro pulso. O sinal gerado por um trem de pulsos de 90° como um tempo $\tau \ll T_2^*$ a partir do equilíbrio térmico passa por dois estados transientes (Figura 12) antes de atingir o estado estacionário.

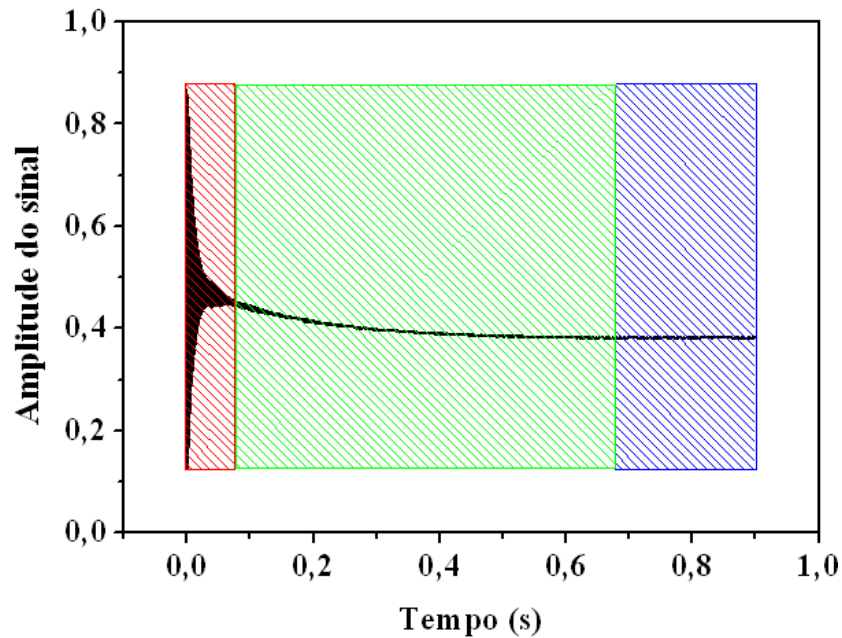


Figura 12. Representação do sinal CWFP obtido para a amostra de ácido fosfórico ($T_1 = 190$ ms e $T_2 = 140$ ms) ²⁵.

Na Figura 12, o primeiro estado transiente ocorre de 0 a 0,15 ms e é caracterizado por uma alternância de amplitude do sinal entre valores máximos e mínimos e pela constante de tempo denominada T_2^* . Este estado é seguido por um estado *quasi*-estacionário, o qual ocorre de 0,15 a 500 ms, onde essas alternâncias desaparecem controladas pelas constantes T_1 e T_2 . O estado estacionário CWFP é alcançado após 500 ms, cuja intensidade é igual a razão dos tempos e relaxação (Equação 3) ²⁵.

A passagem do estado *quasi*-estacionário para o estacionário CWFP apresenta um decaimento exponencial com constante de tempo dada pela Equação 3.

$$T^*_{(\alpha=\pi/2)} = \frac{2T_1T_2}{(T_1+T_2)} \quad (3)$$

Combinando as equações 2 e 3, podem-se determinar os valores de T_1 e T_2 em um único experimento ²⁵.

$$T_1 = \frac{\frac{T^*(\alpha=\pi/2)}{2}}{\frac{M_{SS}}{M_0}} \quad (4)$$

e

$$T_2 = \frac{\frac{T^*(\alpha=\pi/2)}{2}}{1 - \frac{M_{SS}}{M_0}} \quad (5)$$

Corrêa et al. em 2009 utilizaram a dependência dos tempos de relaxação T_1 e T_2 do sinal CWFP para determinação do teor de gordura intramuscular de carne bovina no modo *stop and flow* ²⁶. Neste trabalho demonstram que o sinal obtido com a sequência CWFP possui maior correlação (0,9) com o teor de gordura, do que o obtido com a sequência CPMG (0,25), que depende somente de T_2 . Na Figura 13 pode se observada a curva de correlação entre a porcentagem de gordura intramuscular e a razão M_S/M_0 obtida pelo sinal CWFP.

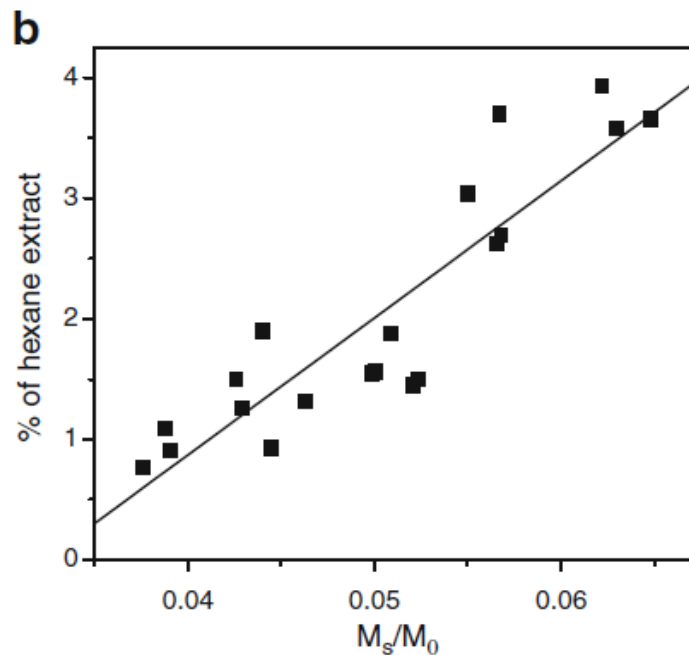


Figura 13. Curva de correlação do conteúdo de gordura intramuscular em carne bovina e a razão M_S/M_0 obtido por CWFP, $r = 0,9$ ²⁶.

Apesar da técnica CPMG não possuir uma alta correlação com o teor de gordura intramuscular em carne bovina, ela tem alta correlação com a qualidade do óleo em sementes. Em 2007, Prestes et al. utilizaram sequência CPMG para o desenvolvimento de um sistema automático e rápido de RMN em baixa resolução para análises qualitativas ²⁷. Neste trabalho a técnica CPMG foi aplicada para medida da qualidade de óleo em sementes intactas para uso

na produção de biodiesel. O decaimento exponencial T_2 medido com a sequência CPMG é inversamente proporcional à viscosidade do óleo nas sementes que por sua vez está diretamente relacionado aos teores e tipos de ácidos graxos entre outras propriedades²⁷.

Na Figura 14 podem ser visualizados os decaimentos do sinal CPMG para as sementes de linhaça, soja, macadâmia e mamona. O sinal da semente de linhaça (LIN) apresenta o decaimento mais longo, por ser rica em ácido linolênico (> 50%), um ácido graxo com 18 carbonos e três insaturações (C18:3) e o biodiesel produzido tem viscosidade cinemática (μ) $3,6 \text{ mm}^2 \text{ s}^{-1}$. O sinal da semente de soja (SOY) tem decaimento mais curto que o da linhaça e mais longo que o da macadâmia. A soja tem cerca de 50% de ácido linoleico (C18:2) e a macadâmia cerca de 70% de ácido oleico (C18:1) e produzem biodiesel com $\mu = 4,1$ e $4,4 \text{ mm}^2 \text{ s}^{-1}$ respectivamente. A mamona possui um óleo muito mais viscoso que as outras três sementes, uma vez que contém mais de 80% de ácido ricinoleico, um ácido graxo C18:1, mas com uma hidroxila no C12. Essa hidroxila permite ligações de hidrogênio intramoleculares, responsável pela alta viscosidade ($12,8 \text{ mm}^2 \text{ s}^{-1}$) do biodiesel produzido com o óleo da mamona^{27,28}.

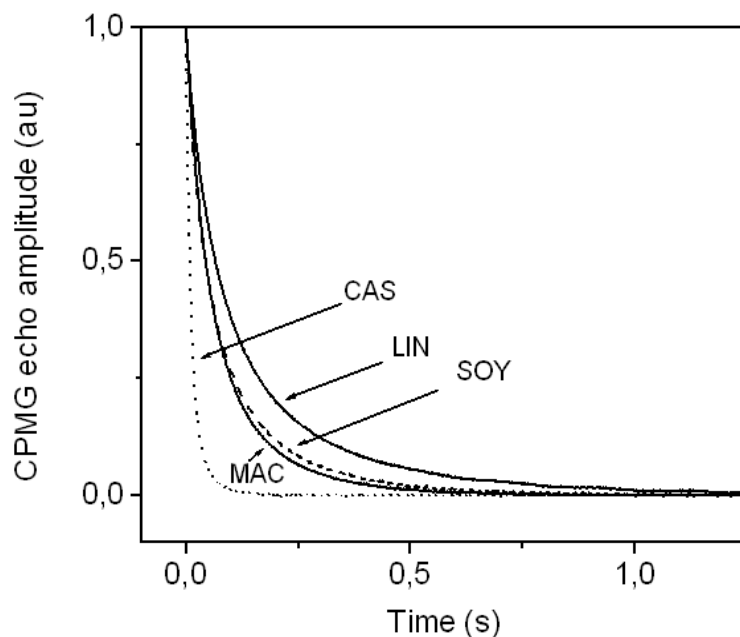


Figura 14. Curvas de decaimento dos sinais de RMN para as sementes de mamona (CAS), macadâmia (MAC), soja (SOY) e linhaça (LIN) obtidos com a sequência CPMG²⁷.

Como as propriedades do biodiesel, tais como viscosidade, número de cetano e índice de iodo são dependentes do tipo e da concentração dos ácidos graxos presentes no óleo, foi desenvolvida a aplicação da técnica CPMG para a medida desses parâmetros diretamente nas sementes. Nas Figuras 15 A e B são apresentadas as curvas de calibração para a viscosidade (coeficiente de correlação $r = 0,94$) e número de cetano ($r = 0,92$) calculados pela

técnica CPMG diretamente em sementes como soja, pinhão-manso, amendoim, girassol entre outras²⁷.

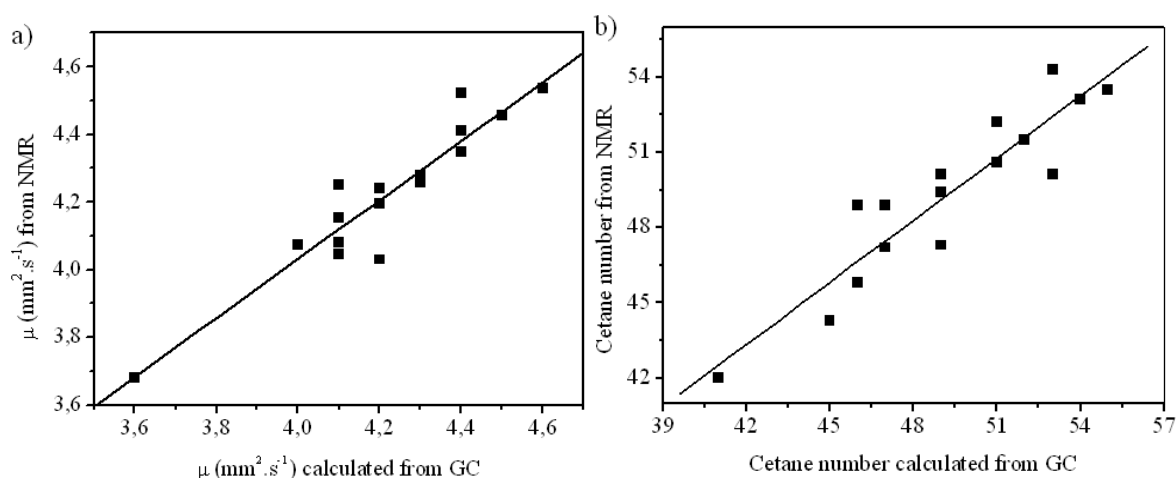


Figura 15. Curvas de correlação relativas às propriedades do biodiesel, calculadas por cromatografia gasosa e previstas pelo método CPMG, a) curva de calibração da viscosidade cinemática e b) curva de calibração do número de cetano²⁷.

Para esse tipo de medida a semente deve ficar imóvel somente durante a análise (*stop and flow*), podendo mesmo assim medir a qualidade do óleo em mais de 1000 sementes por hora.

Apesar do grande potencial das técnicas de RMN-BR para medidas em fluxo, tem-se encontrado alguns problemas para suas aplicações. Um desses problemas está relacionado com a sobrecarga do equipamento, principalmente do amplificador de potência e da sonda detectora, devido ao longo tempo de medidas *online* necessária nos processos industriais. Isso pode levar a uma sobrecarga (aquecimento) do equipamento e, conseqüentemente, reduzir sua vida útil. Além disso, um trem de pulsos praticamente contínuo, necessário nas técnicas de RMN-BR pode levar a um aquecimento indesejável na semente. O aquecimento, além de reduzir o poder germinativo da mesma, também pode levar a valores de T_2 errôneos, uma vez que a viscosidade varia exponencialmente com a temperatura. Assim, o principal objetivo desse trabalho de doutorado foi o desenvolvimento de seqüências de pulso de baixa potência utilizando baixos ângulos de refocalização (LRFA, do inglês *Low Refocusing Flip Angles*) para RMN *online*.

Como os métodos a serem estudados são baseados nas técnicas de ecos de spin, será feita uma breve descrição das principais seqüências de pulsos utilizadas.

1.4 Técnicas de Eco de Spin

Um dos problemas para se medir o tempo de relaxação transversal T_2 com a técnica de pulso é que a constante de Decaimento Livre da Indução (FID) é dependente da não homogeneidade de campo B_0 (Figura 16). Nesta Figura pode ser observado que após a excitação da amostra com um pulso de 90° , o sinal do FID (linha cheia) tem uma constante de tempo efetivo T_2^* que é bem menor que a constante de tempo T_2 da amostra (linha pontilhada). Essa constante de tempo efetivo T_2^* é dada por.

$$\frac{1}{T_2^*} = \frac{1}{T_2} + \gamma \Delta B_0 \quad (6)$$

onde γ é a constante magnetogírica e ΔB_0 a não-homogeneidade de campo.

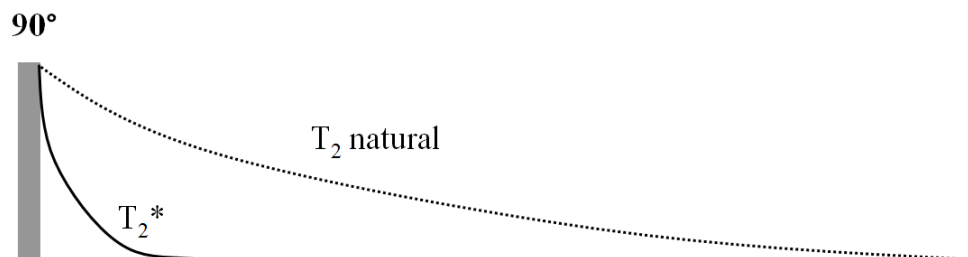


Figura 16. Decaimento do FID representando o decaimento natural T_2 e o decaimento efetivo T_2^* .

Para suprimir esse efeito da não homogeneidade de campo B_0 nas medidas de T_2 pelo método pulsado, Hahn propôs a técnica de eco de spin em 1950²⁹ (Figura 17).

A sequência proposta por Hahn é composta por dois pulsos de 90° (Figura 17), separados por um tempo τ e gera um eco de spin a 2τ do primeiro pulso, com intensidade independente da não homogeneidade de campo, representada pela magnitude do eco. Essa sequência é válida quando $T_2^* < \tau \ll T_1$ e T_2 ²⁹.

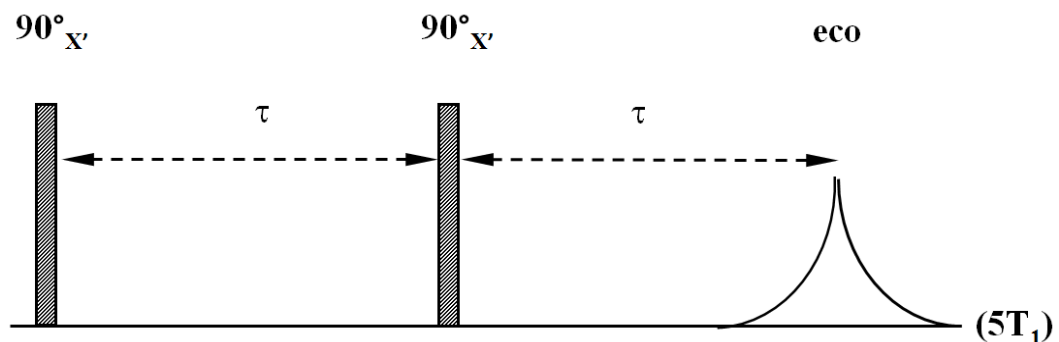


Figura 17. Sequência de pulsos da técnica de eco de Hahn, onde τ = tempo de espera entre os pulsos.

Introdução

Uma descrição vetorial do efeito dos dois pulsos de 90° pode ser entendida na Figura 18. Em (A) temos a magnetização no equilíbrio térmico em $\tau = 0$. Após o primeiro pulso a magnetização se desloca em 90° para o plano $x'y'$ (B). Durante um intervalo de tempo τ , a magnetização se defasa $\Delta\omega\tau$ no plano $x'y'$ (C). Ao final do intervalo de tempo τ um segundo pulso de 90° é aplicado deslocando os momentos magnéticos do plano $x'y'$ para o plano $x'z$ (D). Ao longo do novo intervalo τ , os momentos magnéticos precessionam $\Delta\omega\tau$ ao redor do eixo z , refocalizando-se em 2τ (E). Como se pode ver, a magnetização descreve a forma de um oito “8”, denominado em inglês como “8 Ball”²⁹.

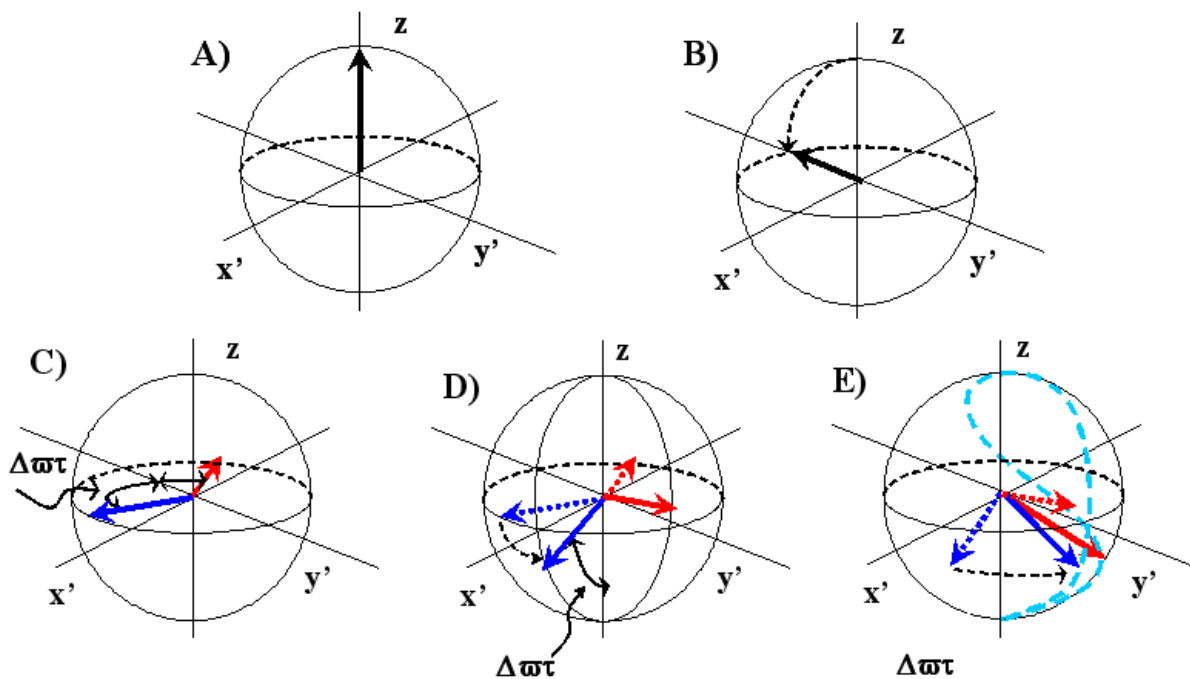


Figura 18. Representação vetorial do eco de Hahn para descrever o eco formado por dois pulsos de 90° ²⁹.

A técnica de Hahn praticamente não teve grande aplicação prática, pois logo Carr e Purcell³⁰ substituíram o segundo pulso de 90° por um pulso de 180° (Figura 19), gerando o dobro da intensidade do sinal de eco. Esse método foi denominado o método A de CP.

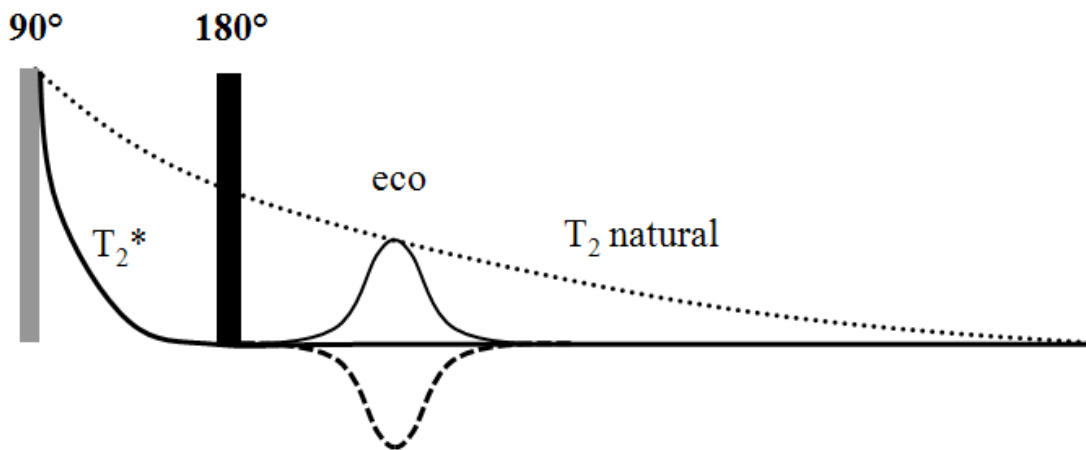


Figura 19. Amplitude do sinal adquirida pela sequência $90^\circ\text{-}\tau\text{-}180^\circ$. O eco com linhas pontilhadas está no modo fase, com deslocamento de 180 graus em relação ao FID e o eco com linha cheia é no modo magnitude.

Na Figura 19 pode ser visualizada a intensidade do eco em relação ao T_2 , adquirida pela técnica de eco de spin com a sequência $90^\circ\text{-}\tau\text{-}180^\circ$. Após o pulso de 90° , o sinal decai com constante de tempo T_2^* (linha cheia) e o segundo pulso gera um eco cuja intensidade é proporcional à relaxação transversal T_2 da amostra (linha pontilhada). Uma descrição vetorial dessa sequência será dada no método B³⁰.

Para a medida de T_2 com essa técnica é necessário fazer a aquisição da intensidade do sinal para vários valores de τ . Porém, em cada aquisição é necessário esperar um tempo de pelo menos cinco vezes T_1 ($D \geq 5T_1$) para o retorno do sistema ao equilíbrio térmico, tornando o tempo total de aquisição muito longo. Além disso, a intensidade dos sinais de eco de spin ($90^\circ\text{-}\tau\text{-}90^\circ$ ou $90^\circ\text{-}\tau\text{-}180^\circ$) tem dependência da difusão, o que pode inviabilizar as medidas de T_2 de substâncias líquidas ou em solução, em campos magnéticos não homogêneos³⁰.

Para acelerar a medida de T_2 e eliminar o problema de difusão, Carr e Purcell³⁰ também propuseram a sequência CP, Método B onde é aplicado um trem de pulsos de 180° , após o primeiro pulso de 90° (Figura 20).

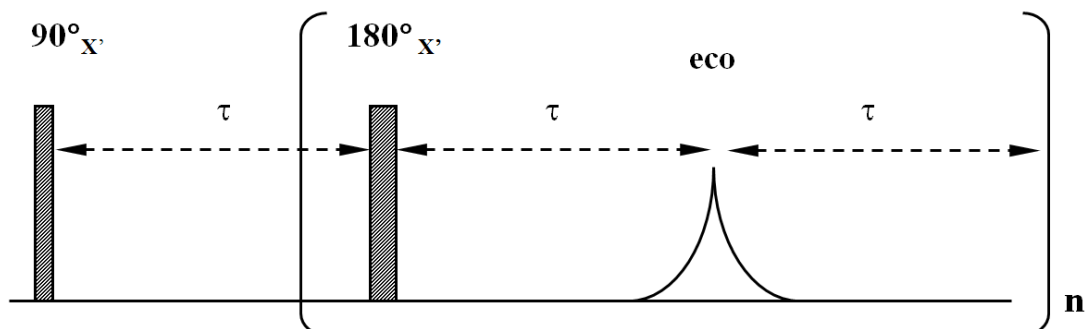


Figura 20. Sequência de pulsos da técnica CP (Carr-Purcell) com trem de pulsos de 180° ³⁰.

O modelo vetorial dessa sequência pode ser visualizado na Figura 21, onde é aplicado um pulso de 90° segundo x' no instante zero (A), o qual desloca a magnetização para $x'y'$ (B). Ao longo do tempo τ , os vetores representativos dos spins começam a separar-se (C), uma vez que uns spins experimentam campos magnéticos diferentes. Então, outro pulso de 180° é aplicado no mesmo eixo, provocando a rotação em 180° em todos os vetores (D). Ao final de 2τ a partir do pulso de 90° , todos os vetores recuperam a coerência das magnetizações (E), apresentando o sinal do eco (F), os vetores continuam a precessionar (F) e dando seguimento ao ciclo de pulsos³⁰.

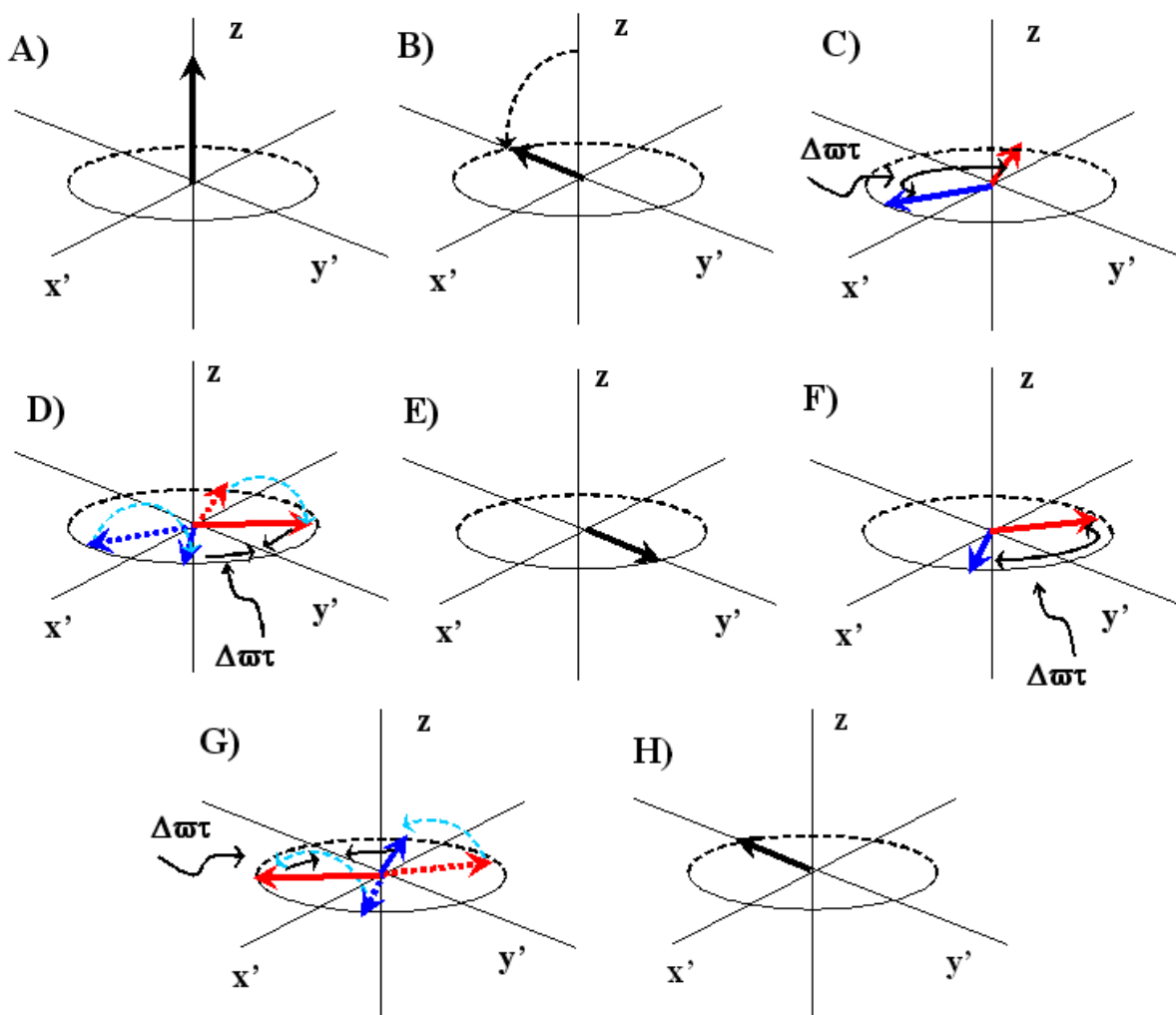


Figura 21. Representação vetorial da sequência de pulsos da técnica CP³⁰.

Essa nova sequência permite que todo o decaimento do sinal de RMN seja adquirido sem a interferência da não homogeneidade de B_0 (Figura 22). Esse método também permitiu o uso de pequenos valores de τ eliminando consideravelmente o efeito de difusão da amostra, na intensidade do eco. Ainda, o método CP permite economizar tempo, principalmente em experimentos onde o T_1 da amostra é muito longo, pois uma só sequência permite obter uma

série de n ecos, ao passo que o método de Hahn e de CP método A, requerem n seqüências com um longo tempo de espera ($D \geq 5T_1$).

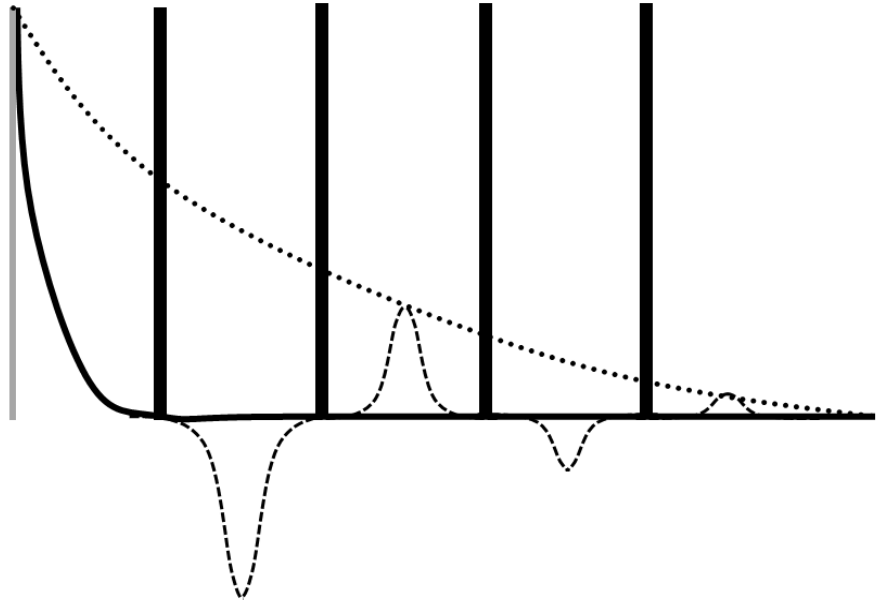


Figura 22. Amplitude do sinal dos ecos obtidos com a seqüência CP ³⁰.

Posteriormente, Meiboom e Gill verificaram que a seqüência CP, método B é muito sensível aos erros de calibração dos pulsos de 180° ³¹. Para minimizar esse problema modificaram a seqüência CP aplicando os pulsos de 180° na direção $+y'$, isto é, com uma diferença de fase de 90° em relação ao pulso de 90° inicial (Figura 23) ³¹. Essa nova seqüência aperfeiçoou o método de Carr-Purcell e originando o método chamado CPMG ³¹.

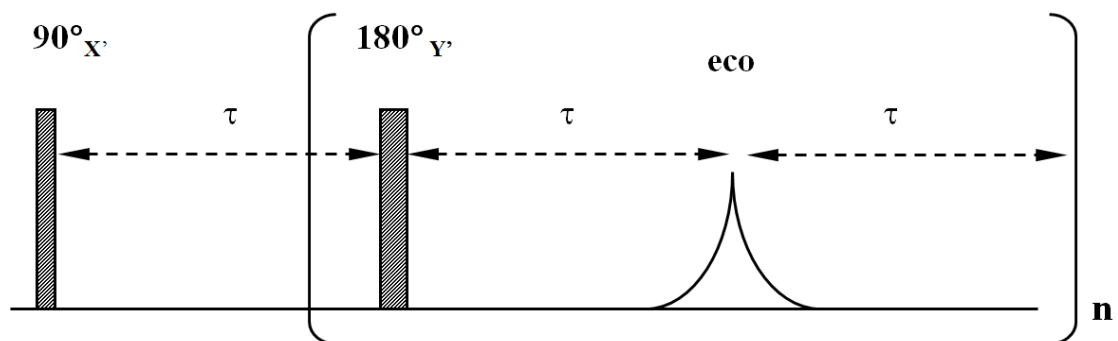


Figura 23. Seqüência de pulsos da técnica de CPMG, onde τ = tempo de espera entre os pulsos ³¹.

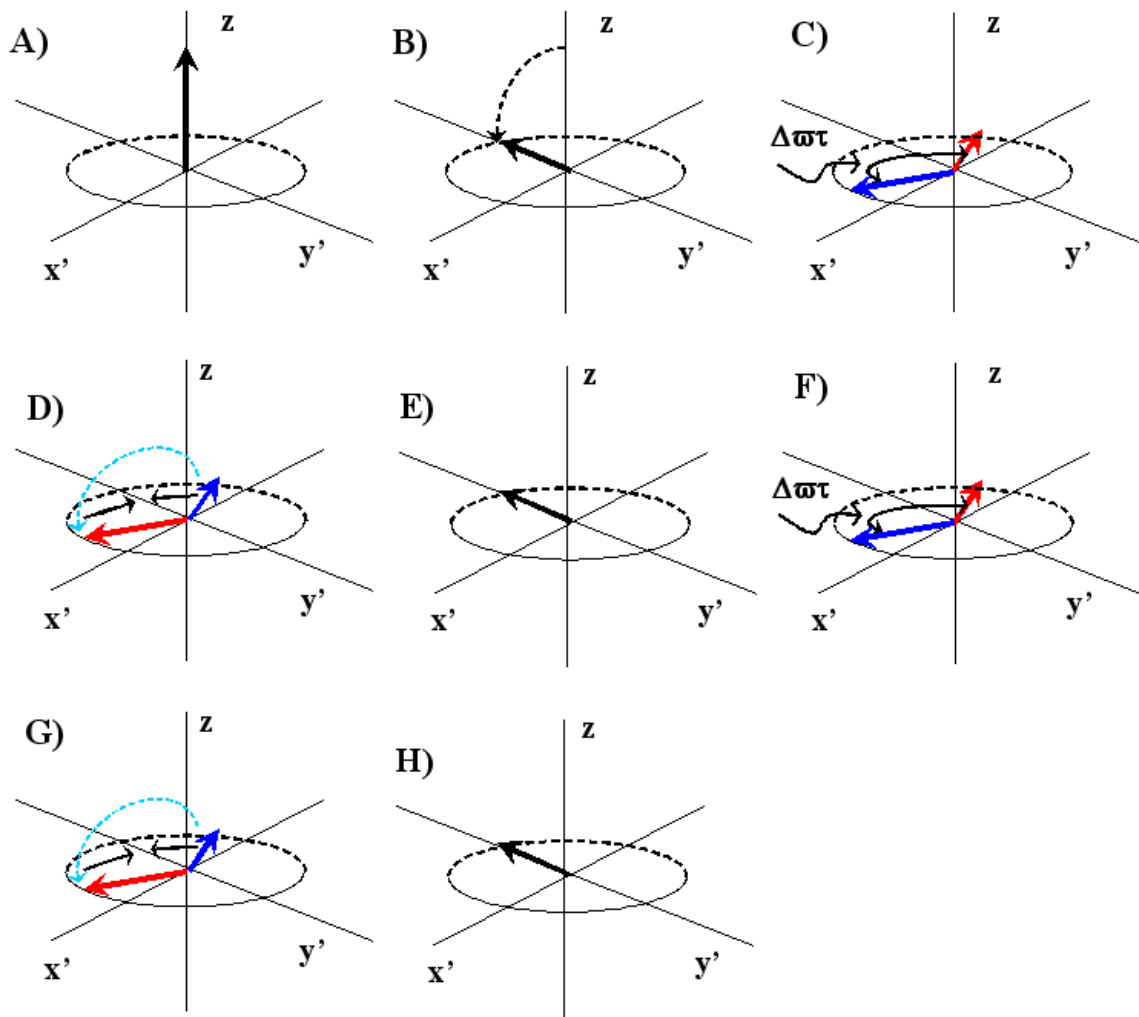


Figura 24. Representação vetorial da sequência de pulsos da técnica de CPMG ³¹.

A Figura 24 demonstra a técnica de CPMG, onde um pulso de 90° é aplicado em x' no instante zero (A), causando a rotação dos spins para o plano $x'y'$ (B). Ao longo do tempo τ , os spins se separam (C), então um pulso de 180° é aplicado em y' (D), ocorrendo a refocalização para o tempo 2τ no eixo y' (E). Após o defasamento seguinte (F), o segundo pulso de 180° , aplicado em y' , inverte as componentes no plano $x'y'$ (G) onde ocorre a refocalização para $\tau = 4\tau$ (H) ³¹.

Essa mudança de fase nos pulsos de refocalização permitiu com que todos os ecos tivessem uma mesma fase, o que não ocorria com o método CP (Figura 25) ³¹.

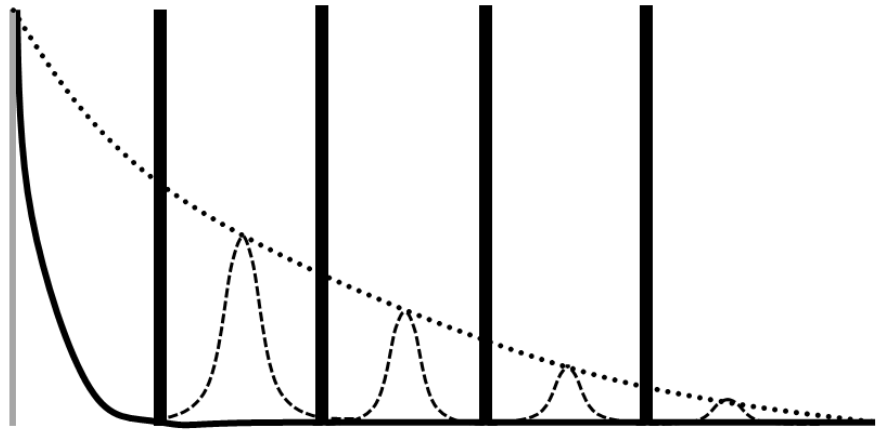


Figura 25. Amplitude do sinal dos ecos obtidos com a sequência CPMG ³¹.

A técnica CPMG tem sido estudada como um método de avaliação da qualidade de alimentos, petróleo, produtos agrícolas, etc ^[1,27,32]. Assim, um estudo para medidas com as técnicas de spin eco de baixa potencia pode ser uma solução para o problema instrumental e de aquecimento das amostras em medidas *online*.

2. OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo principal o desenvolvimento e a aplicação de sequências de pulso de eco de spin propostas por Carr-Purcell método B, CP e Meiboom e Gill, CPMG de baixa potência de radiação para medidas *online*, utilizando RMN em baixa resolução. Também foram objetivos do trabalho avaliar teoricamente, através das equações de Bloch e experimentalmente, as sequências de eco de spin com pulsos de refocalização de baixo ângulo e conseqüentemente de baixa potência, em amostras com diferentes valores de T_1 e T_2 e aplicar esses métodos na análise *online* da qualidade do óleo de sementes oleaginosas.

3. METODOLOGIA

As análises por RMN em baixo campo foram realizadas em dois conjuntos de amostras. O primeiro conjunto reuniu amostras com diferentes tempos de relaxação T_1 e T_2 . Foram elas: acetona, água deionizada, solução de cloreto de manganês (3%), dimetilsulfóxido (DMSO), óleo de semente de soja e sementes de mamona. Essas amostras foram utilizadas para verificar a resposta que cada uma fornecia em função dos seus tempos de relaxação para cada sequência utilizada.

O segundo conjunto foi utilizado para a realização das análises *online* na esteira automatizada e validação das sequências propostas. Esse conjunto foi formado por 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 *Fevillea trilobata* (nhandiroba), *Dipteryx alata* (baru), *Luffa cylindrica* (bucha), *Acrocomia aculeata* (macaúba), *Thevetia peruviana* (chapéu de Napoleão), *Syagrus botryophora* (pati), *Caryocar brasiliense* (pequi), *Attalea funifera* (piaçava), *Jatropha curcas* (pinhão-mansão), *Guizotia abyssinica* (niger) e *Astrocaryum aculeatum* (tucumã).

As análises foram realizadas em triplicata na temperatura interna de cada equipamento utilizado ($22 \pm 1^\circ\text{C}$ e $25 \pm 1^\circ\text{C}$).

3.1 Equipamentos utilizados

Os experimentos utilizando as amostras com diferentes tempos de relaxação foram realizados em dois espectrômetros com diferentes frequências de ressonância: 85 MHz para ^1H e 9 MHz para ^1H .

3.1.1 Espectrômetro de 85 MHz para ^1H

O espectrômetro é um módulo baseado em um transmissor/receptor CAT-100 da Tecmag (Tecmag, Houston), com um ímã de 2,1 T (85 MHz para ^1H) de um Tomógrafo/espectrômetro de RMN Oxford (Oxford, UK) com uma abertura (*bore*) de 30 cm (Figura 26).



Figura 26. Magneto do Tomógrafo/espectrômetro de 2,1 T e CAT-100 da Tecmag.

O equipamento opera em conjunto com o amplificador de potência 2035 AMT, pré-amplificador Miteq AU 1448, conforme diagrama eletrônico descrito na Figura 27.

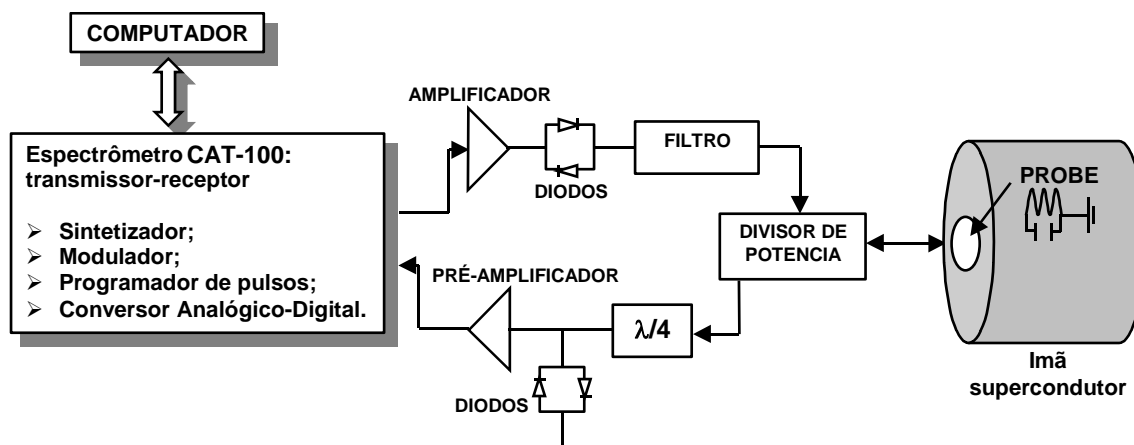


Figura 27. Diagrama mostrando o espectrômetro CAT-100 (Tecmag) operando num ímã de 2,1 T (frequência de 85 MHz para o ^1H).

Metodologia

A sonda consiste de um circuito do tipo LC (indutor-capacitor), composto de dois capacitores variáveis e uma bobina indutora (Figura 28). A bobina foi construída num formato solenoidal a partir de um fio de cobre. As espiras da bobina indutora foram moldadas em uma resina epóxi de forma a conferir rigidez à mesma, evitando oscilações mecânicas e deformações.

No circuito LC utilizado, um dos capacitores é ligado em série (C_s) com a bobina indutora (L), enquanto que o outro é ligado em paralelo (C_p). Nesta configuração o circuito LC opera tanto como transmissor, quanto como receptor.

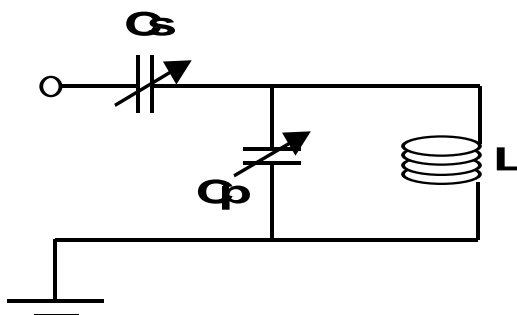


Figura 28. Circuito LC de uma sonda de RF utilizada em experimentos de RMN.

O circuito LC é então sintonizado na impedância em 50 Ohms, através da manipulação das capacitâncias de C_s e C_p , obtendo assim uma absorção de reflexão satisfatória. Além disso, o processo de sintonia evita que aquela radiação refletida, ou seja, não absorvida pela amostra, seja suficientemente grande para que algum componente eletrônico constituinte do espectrômetro seja danificado.

Utilizou-se a homogeneidade do campo magnético (ΔB_0), equivalente a largura de linha à meia altura, FWHM (*Full Width at Half Maximum*) de $\Delta\nu$ ($\Delta\nu = \gamma\Delta B_0/2\pi$) foi de 15 Hz (no centro do magneto) e 100 Hz (a 10 cm do centro do magneto).

A programação da sequência de pulsos no espectrômetro CAT-100 é feita através de um modo gráfico, utilizando um programa chamado NTNMR que trabalha em ambiente Windows.

3.1.2 Espectrômetro de 9 MHz para ^1H

O espectrômetro SLK-100 Spin Lock, modelo SL.IM.01 é composto por um magneto de 0,23T de 9 MHz para o ^1H com um *bore* de 4 cm (Figura 29A), circundado pela sonda com a bobina de RF onde é inserido o porta-amostra (Figura 29B).

A)

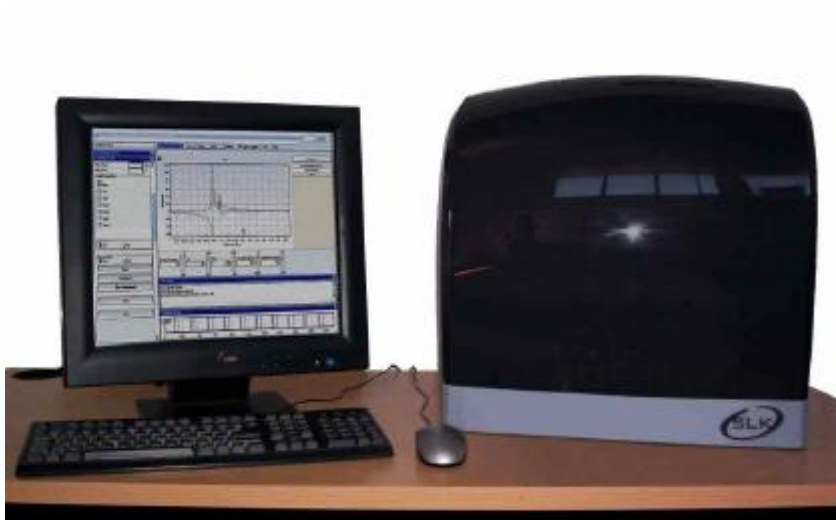


Figura 29. A) Espectrômetro Spin Lock SLK-100 com magneto de 0,23T de 9 MHz para o ^1H ; B) porta amostras.

A programação da sequência de pulsos no espectrômetro Spin Lock - SLK-100 é feita através de um programa chamado Condor-IDE, que trabalha em ambiente Windows.

A homogeneidade do campo magnético (ΔB_0) FWHM de Δv obtido no centro do equipamento foi de 250 Hz.

3.1.3 Sistema de análises online

Para a determinação rápida e automatizada da qualidade de óleo em sementes intactas por RMN de baixa resolução, foi desenvolvido um sistema de fluxo, baseado em uma esteira mecânica de poliacetal, formada por 105 gomos de 65 mm, o qual comporta o mesmo número de portas-amostras. A esteira foi desenvolvida para atravessar o *bore* de 30 cm de diâmetro do tomógrafo de RMN *Oxford*. (Figura 30).



Figura 30. Esteira mecânica de poliacetal, formada por 105 gomos de 65 mm atravessando o *bore* de 30 cm de diâmetro do magneto de 2,1 T.

Para a aquisição dos dados de RMN para as análises *online* foram utilizadas bobinas do tipo Helmholtz na forma de sela (Figura 31), onde espirais paralelas guiam corrente no mesmo sentido, gerando um campo magnético homogêneo em torno do seu centro de simetria.

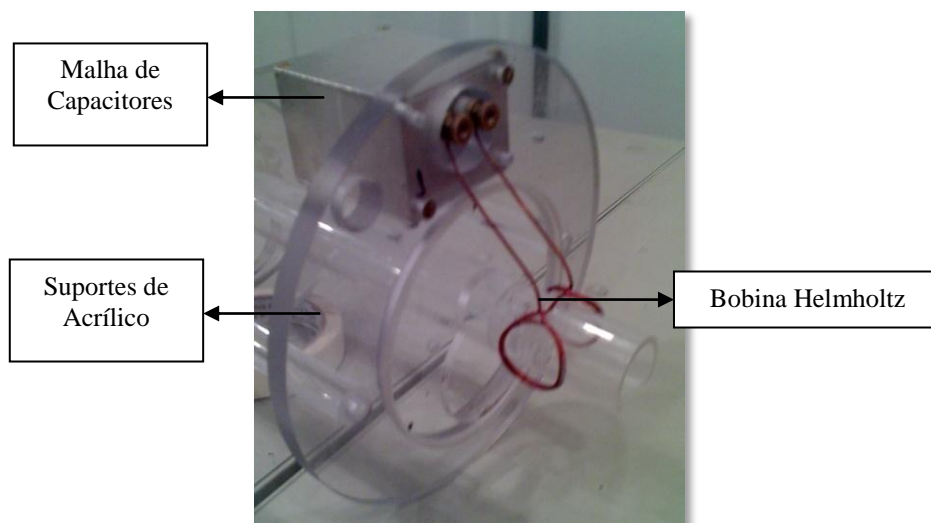


Figura 31. Circuito de capacitores e bobina tipo Helmholtz utilizados para aquisição experimental.

Metodologia

Além da sonda, sistemas para atenuação das vibrações mecânicas tiveram que ser construídos, como suporte para a bobina (Figura 32A), um guia feito de cano de PVC (Figura 32B).

A)



B)



Figura 32. Visão interna da bobina, esteira e guia montado. b) Guia de PVC suportado por duas placas de acrílico nas dimensões do tomógrafo.

Como a amostra deve ficar pelo menos $5T_1$ dentro do campo magnético para ser polarizada, sendo T_1 aproximadamente 500 ms (típico de óleos) e a distância viajada pelas amostras antes de atingir a bobina é de aproximadamente 60 cm, a velocidade limite onde haverá completa magnetização será conforme a Equação 7:

$$v_{max} = \frac{60 \text{ cm}}{5.0,5 \text{ s}} = 24 \text{ cm/s} \quad (7)$$

A esteira é impulsionada por um motor de passo (com *drive* e fonte de alimentação da marca *Parker*TM, de corrente contínua) e controlada pelo software *NMR Automation* (Figura 33), também desenvolvido pelo grupo, em linguagem *Visual Basic*®.



Figura 33. Tela do software de programação do sistema de movimentação das amostras.

O controle das aquisições foi realizado no modo descontinuo conhecido como *stop and flow*. Nesse caso as medidas foram guiadas pelo espectrômetro CAT-100, onde uma distância de separação inserida pelo software *NMR Automation* foi percorrida automaticamente após cada aquisição.

3.2 Técnicas de RMN utilizadas

Os sinais de RMN foram obtidos com as seguintes sequências de pulsos:

- CPMG [$90^\circ_x - \tau/2 - (\theta_y - \tau)_n$]

Para essa sequência foram utilizados ângulos de refocalização menores, LRFA θ de 180° (CPMG), 135° (CPMG₁₃₅), 90° (CPMG₉₀) e 45° (CPMG₄₅). Os parâmetros utilizados foram: largura dos pulsos de refocalização de 16, 12, 8 e 4 μ s, respectivamente. Para a amostra de água deionizada foram utilizados tempo de eco (τ) de 0,1 e 2 ms com número de ecos de 15000 e 2500. Para o óleo de soja, τ de 0,1 e 0,4 ms e 1000 e 400 ecos. E para as sementes de mamona foram utilizados 0,1 e 0,4 ms com 250 e 70 ecos.

- CP [$90^\circ_{x'} - \tau/2 - (\theta_{x'} - \tau)_n$]

Para essa sequência foram utilizados θ de 180° (CP) e 90° (CP₉₀) com largura de pulsos de 28 e 14 μ s, respectivamente; τ de 0,3 e 3 ms e 500 ecos para todas as amostras utilizadas.

- CWFP [$90^\circ_{x'} - \tau)_n$] e CP-CWFP [$90^\circ_{x'} - \tau/2 - (90_{x'} - \tau)_n$]

Para essas sequências foi utilizado largura de pulso de 90° de 8 μ s e τ de 0,3 ms para todas as amostras utilizadas. Foi deslocada a frequência de ressonância em 3π . Esse procedimento é necessário para a ocorrência da precessão ao redor do eixo z, onde ocorre a formação de um ângulo ψ formado entre a projeção de M+ no plano $x'y'$ e o eixo y' , onde $\psi = (\omega - \omega_0)\tau$.

- Inversão-recuperação (IR) [$180_{x'} - (\tau - 90_{x'})_n$]

Para essa sequência foi utilizada largura de pulso de 16 e 8 μ s, para 180° e 90° . Os valores de τ foram variados em função de T_1 de cada amostra utilizada.

Ainda foram realizadas análises com CPMG, CPMG₉₀, CP e CP₉₀ como método de alternância de fase. Esse método consiste na aplicação dos pulsos de refocalização ora no eixo positivo, ora no eixo negativo. Assim para CPMG os pulsos foram aplicados em y' e $-y'$ e para CP em x e $-x$. Para todas as sequências foram adquiridos 16 promediações de sinal com um tempo de espera de $5T_1$

3.3 Simulação dos sinais teóricos

Para a obtenção dos sinais teóricos foram desenvolvidos algoritmos utilizando as equações de Bloch^{33,34} e uma abordagem matricial em linguagem C de programação. Para os cálculos dos sinais de RMN na sequência CPMG, foi considerada a magnetização total normalizada M_0 , após o primeiro pulso RF, no plano transversal, dada pelo vetor (Equação 8).

$$M_1 = \begin{bmatrix} 0 \\ M_0 \\ 0 \end{bmatrix} \quad (8)$$

Uma vez que a magnetização está no eixo y' , o sistema sofre o efeito de relaxação durante o tempo de eco τ , no referencial de coordenadas girantes com variação de frequência $\Delta\omega$ em relação ao sistema. Isto é representada pela multiplicação da matriz de defasamento de offset e a matriz de relaxação pelo vetor magnetização (Equação 9).

$$\mathbf{M}_2 = \begin{bmatrix} \cos(\Delta\omega\tau) & -\sin(\Delta\omega\tau) & 0 \\ \sin(\Delta\omega\tau) & \cos(\Delta\omega\tau) & 0 \\ 0 & 0 & 1 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} e^{-\frac{\tau}{T_2}} & 0 & 0 \\ 0 & e^{-\frac{\tau}{T_2}} & 0 \\ 0 & 0 & e^{-\frac{\tau}{T_1}} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} M_1x \\ M_1y \\ M_1z \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} 0 \\ 0 \\ M_0 \end{bmatrix} M_0 \left(1 - e^{-\frac{\tau}{T_1}}\right) \quad (9)$$

O termo adicionado na Equação 9 corresponde à componente longitudinal, uma vez que o sistema também tende a voltar ao equilíbrio térmico.

Então, um pulso de refocalização θ é aplicado no eixo y' (Equação 10), fazendo com que as isocromatas invertam de posição no plano $x'y'$. Após isso, novamente o sistema sofrerá a relaxação durante o mesmo tempo τ . O pulso de refocalização θ é repetido n vezes, até a obtenção do decaimento do sinal CPMG.

$$\mathbf{M}_3 = \begin{bmatrix} \cos(\theta) & 0 & \sin(\theta) \\ 0 & 1 & 0 \\ -\sin(\theta) & 0 & \cos(\theta) \end{bmatrix} \begin{bmatrix} M_2x \\ M_2y \\ M_2z \end{bmatrix} \quad (10)$$

Para as sequências estudadas, foram utilizados os ângulos θ de 180° , 135° , 90° e 45° para CPMG, CPMG₁₃₅, CPMG₉₀ e CPMG₄₅, respectivamente.

A amplitude do eco $\left(|M_{xy}| = \sqrt{M_x^2 + M_y^2}\right)$, dada para cada ciclo de sequência

de pulso, depende do estado inicial $\mathbf{M}(t) = \begin{bmatrix} M_x(t) \\ M_y(t) \\ M_z(t) \end{bmatrix}$ conforme Equação 11.

$$\begin{aligned}
|M_{xy}(t + 2\tau)| = & \left(\left(\cos(\Delta\omega\tau) e^{-\frac{\tau}{T_2}} \left(\cos(\theta) \left(\cos(\Delta\omega\tau) e^{-\frac{\tau}{T_2}} M_x(t) + \right. \right. \right. \right. \\
& \left. \left. \left. \sin(\Delta\omega\tau) e^{-\frac{\tau}{T_2}} M_z(t) \right) + \right. \right. \\
& \left. \left. \sin(\theta) \left(-e^{-\frac{\tau}{T_1}} M_y(t) + \sqrt{M_x^2(t) + M_y^2(t) + M_z^2(t)} \left(1 - e^{-\frac{\tau}{T_1}} \right) \right) \right) \right) + \\
& \left. \left. \left. \sin(\Delta\omega\tau) e^{-\frac{\tau}{T_2}} \left(-\sin(\Delta\omega\tau) e^{-\frac{\tau}{T_2}} M_x(t) + \cos(\Delta\omega\tau) e^{-\frac{\tau}{T_2}} M_z(t) \right) \right) \right)^2 + \\
& \left(-\sin(\Delta\omega\tau) e^{-\frac{\tau}{T_2}} \left(\cos(\theta) \left(\cos(\Delta\omega\tau) e^{-\frac{\tau}{T_2}} M_x(t) + \sin(\Delta\omega\tau) e^{-\frac{\tau}{T_2}} M_z(t) \right) + \right. \right. \\
& \left. \left. \sin(\theta) \left(-e^{-\frac{\tau}{T_1}} M_y(t) + \sqrt{M_x^2(t) + M_y^2(t) + M_z^2(t)} \left(1 - e^{-\frac{\tau}{T_1}} \right) \right) \right) \right) + \\
& \left. \left. \left. \cos(\Delta\omega\tau) e^{-\frac{\tau}{T_2}} \left(-\sin(\Delta\omega\tau) e^{-\frac{\tau}{T_2}} M_x(t) + \cos(\Delta\omega\tau) e^{-\frac{\tau}{T_2}} M_z(t) \right) \right) \right)^2 \right)^{\frac{1}{2}} \quad (11)
\end{aligned}$$

Quando θ é igual a 180° , como em CPMG convencional, a intensidade do eco depende somente de τ , M_0 e T_2 (Equação 12).

$$eco = e^{-\frac{2\tau}{T_2}} M_0 \quad (12)$$

Para as simulações foram utilizados valores de T_2 e T_1 obtidos experimentalmente e a não-homogeneidade de B_0 equivalente à $\Delta\omega = 2\pi\nu$, assumindo uma distribuição Lorentziana, equivalente à FWHM de $\Delta\nu = 15$ Hz e 100 Hz, conforme Figura 34 A e B.

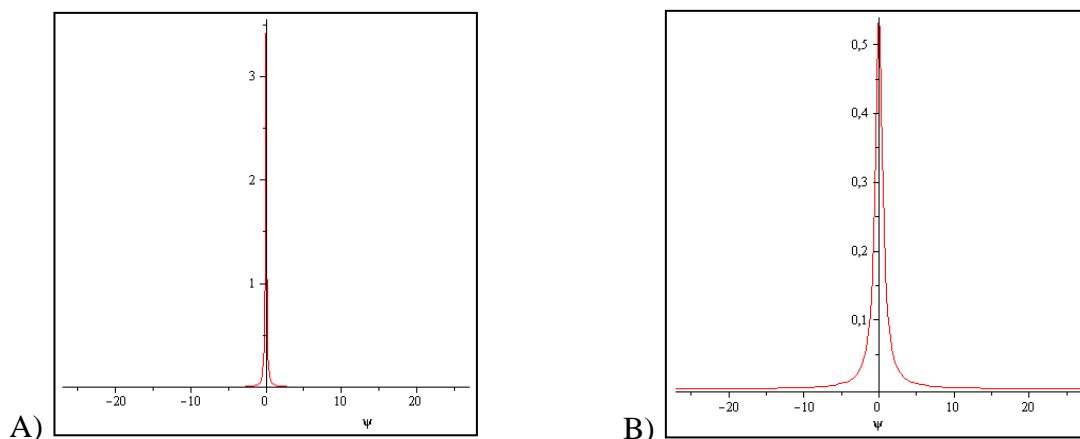


Figura 34. Distribuição Lorentziana de frequências, com FWHM: A) $\Delta\nu = 15$ Hz e B) 100 Hz.

3.4 Análise por métodos estatísticos multivariados

Os sinais das 31 amostras de oleaginosas obtidos por CPMG, CPMG₉₀, CWFP e CP-CWFP foram analisados pelo método quimiométrico de Análise de Componentes Principais (PCA – *Principal Component Analysis*) utilizando o programa Pirouette, versão 3,11 (Infometrix).

Os métodos quimiométricos possuem pouca ou nenhuma interferência do operador e podem analisar todas as informações espectrais simultaneamente. Nesse trabalho foi empregado o método PCA, uma ferramenta estatística que é empregada para visualização de similaridades ou diferenças de um conjunto de dados e também na redução de dados das amostras. Este método condensa as informações mais relevantes nos primeiros componentes principais (PC – *Principal Component*), desta maneira, reduz a quantidade de informações dos dados utilizando apenas os primeiros PCs e não todo o conjunto de dados, através de combinações lineares estabelecidas entre os dados³⁵.

Antes de aplicar a PCA foi efetuado um pré-processamento do tipo Auto-escalado (AE). No AE, inicialmente se calcula a média de cada conjunto de dados e transferem-se todos os valores para uma nova escala, onde a média se iguala a zero, e depois os dados são novamente normalizados, dividindo-os pela variância do mesmo conjunto de dados. Dessa forma, não se prioriza variáveis que possuam maior magnitude, as quais não se distinguem necessariamente os dados, dispondo as variáveis com um mesmo peso³⁵.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Um dos problemas que tem se observado quando se usa a RMN-BR para análise *online* é o aquecimento indesejável da amostra ou do equipamento devido ao longo trem de pulsos utilizado. Para reduzir esse efeito estudou-se neste trabalho o uso de sequências de pulso de eco de spin desenvolvidas por Carr-Purcell (CP), método B³⁰ e Meiboom-Gill (CPMG)³¹ utilizando pulsos de baixo ângulo de refocalização, (LRFA, *Low Refocusing Flip Angles*), ou seja, menores do que 180°. Esses estudos foram realizados em amostras com distintos valores de tempo de relaxação e em diferentes condições de homogeneidade de campo magnético (B_0). As medidas realizadas com sequências CPMG utilizando LRFA foram comparadas com as medidas realizadas com CPMG convencional. Para CP foi feita uma abordagem diferente, comparando-a como as sequências SSFP ou CWFP, uma vez que o sinal obtido apresentou um comportamento similar a essas técnicas. Ainda, foram realizadas análises utilizando esses mesmos métodos com alternância de fase dos pulsos de refocalização e com diferente frequência de *offset* (fora de ressonância).

Finalizando o estudo, foram aplicadas as sequências de baixa potência em análises *online* utilizando sementes oleaginosas intactas, onde os experimentos foram realizados no sistema de esteira automática para validação das técnicas. Os resultados obtidos foram avaliados com métodos estatísticos uni e multivariados.

4.1 Influência de LRFA em CPMG

A primeira sequência de pulsos estudada com LRFA foi CPMG, uma vez que é a principal técnica usada na análise qualitativa em espectrômetro de baixa resolução. A sequência CPMG consiste de pulsos de refocalização (θ) de 180° com um deslocamento de fase de 90° em relação à fase de excitação (Figura 23). Essa mudança de fase torna a sequência CPMG muito robusta e a intensidade do sinal, como apresentada na Equação 12, é dependente somente de T_2 , τ e M_0 . Negligenciando o efeito da difusão e de fluxo, a sequência

Resultados e Discussão

CPMG refocaliza toda a magnetização no plano transversal com decaimento dependente de T_2 , mesmo na presença de campo magnético não-homogêneo (Figuras 24 e 25)³¹.

Para demonstrar o efeito de LRFA no decaimento do sinal de CPMG em espectrômetros de baixa resolução 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 diferentes. 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 35 apresenta os sinais experimentais e simulados (Equação 11) de CPMG para a água deionizada obtida em ressonância com pulsos de refocalização de 180° (CPMG), 135° (CPMG₁₃₅), 90° (CPMG₉₀) e 45° (CPMG₄₅) em campo não-homogêneo equivalente a larguras de linha de $\Delta\nu = 15$ Hz e 100 Hz e, $\tau = 0,002$ s.

As Figuras 35A e B 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 sequência CPMG. A diferença de intensidade entre 180° e 45° é menos que 10%, e o valor de T_2 entre esses ângulos variou menos que 0,5%, de 2,28 s a 2,29 s, respectivamente. A inserção na Figura 35A apresenta as oscilações para os primeiros pulsos de refocalização, as quais aumentam em tempo e amplitude com a redução do valor dos ângulos dos pulsos de refocalização^{36,37}.

Quando foi utilizado campo magnético menos homogêneo ($\Delta\nu = 100$ Hz) (Figura 35C e D), o efeito foi mais severo para LRFA. A amplitude dos sinais para 45° , 90° e 135° foi aproximadamente 50%, 85% e 98% da amplitude de CPMG convencional, respectivamente. O valor de T_2 obtido por CPMG₄₅ aumentou menos de 2% que o obtido usando CPMG. A oscilação do sinal após os primeiros pulsos aumentou em tempo e amplitude com LRFA em campo magnético menos homogêneo quando comparada à oscilação em campo mais homogêneo (Figuras 35A e B).

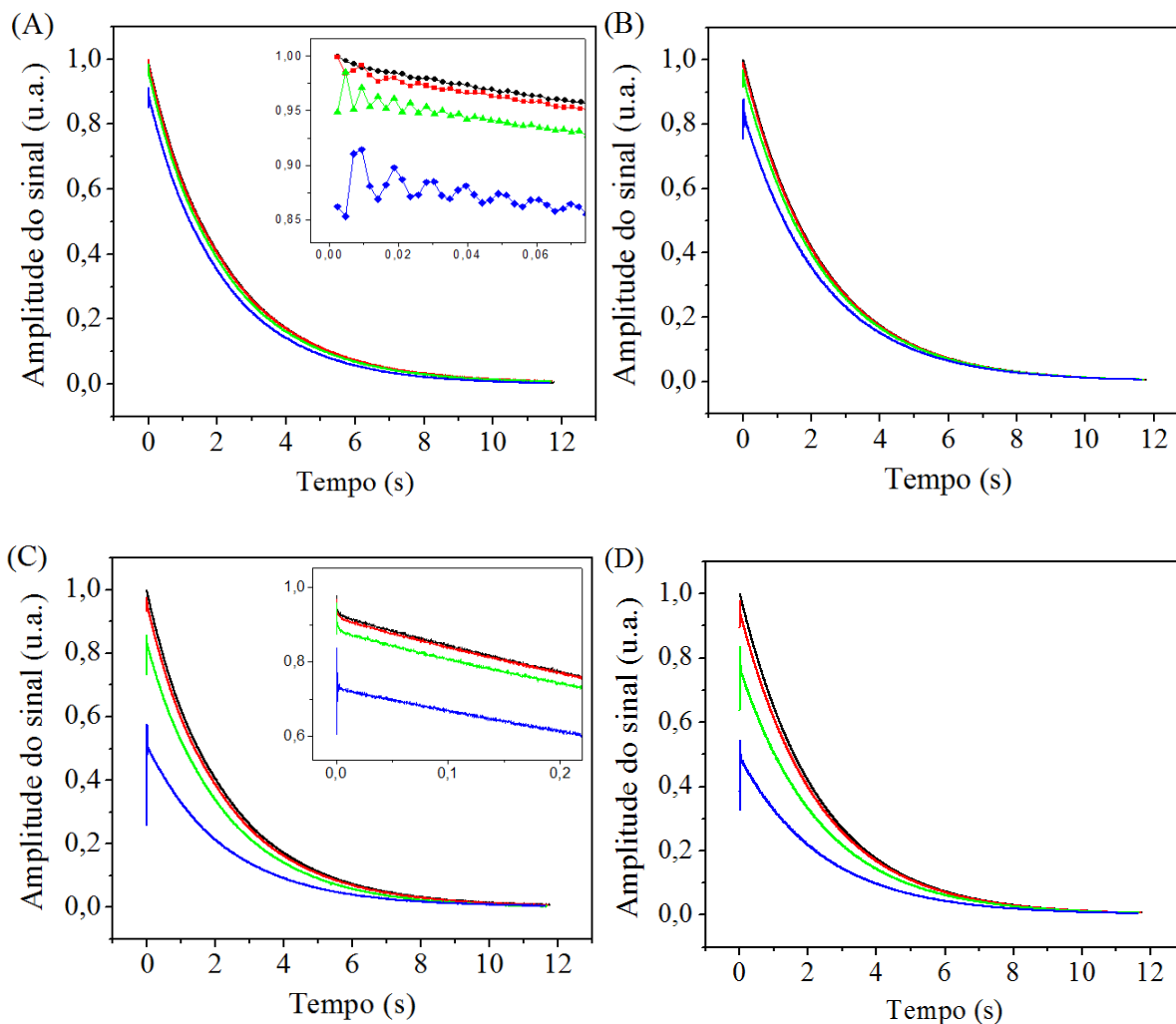


Figura 35. Sinais experimentais (esquerda) e simulados (direita) de água deionizada obtidos com CPMG (●), CPMG₁₃₅ (■), CPMG₉₀ (▲) e CPMG₄₅ (◆) com homogeneidade de campo magnético equivalente à $\Delta\nu = 15$ Hz (A e B) e 100 Hz (C e D), $\tau = 2$ ms. A inserção na Figura 35A apresenta as oscilações dos primeiros pulsos de refocalização. A inserção na Figura 35C apresenta os decaimentos de CPMG com $\tau = 0,1$ ms.

Em campo menos homogêneo (Figuras 35C e D) os spins perdem a coerência de fase mais rapidamente do que em mais homogêneo²⁹ (Figuras 35A e B), resultando num efeito mais pronunciado na amplitude e nas oscilações do sinal. Isto também ocorreu devido à sequência CPMG com LRFA produzir ecos fora do plano transversal, o que causa a formação de ecos estimulados, que possui dependência de T_1 ³⁶. Os ecos estimulados são formados pelas componentes de magnetização que estavam precessionando fora do plano transversal, longitudinalmente, e retornaram para o plano após o pulso de refocalização³⁶. Como resultado, o sinal decai não somente por T_2 , mas também por T_1 . Para amostras com $T_1 \sim T_2$, como a água deionizada, T_1 não possui um efeito significativo no decaimento porque somente poucos ecos estimulados estão presentes³⁶⁻³⁸.

Para reduzir o efeito da não-homogeneidade de campo no sinal de CPMG com LRFA (Figuras 35C e D), foi necessário utilizar valores pequenos de τ . A inserção na Figura 35C 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. Utilizando $\tau = 0,1$ ms são necessários aproximadamente 55 mil pulsos para obter um decaimento igual a $5T_2$ para a amostra de água, e menos de 2.750 pulsos quando $\tau = 2$ ms. Devido à rápida taxa de repetição, a potência incidida para $\tau = 0,1$ ms é 20 vezes maior que para 2 ms utilizando-se pulsos de refocalização de 180° . No entanto, com a redução, por exemplo, para pulso de 90° , essa potência incidida seria reduzida pela metade, mas com uma banda espectral duas vezes maior do que a com pulsos de 180° (Figura 36). Isso ocorre porque a banda espectral inversamente proporcional a largura do pulso^{39,40} (Equação 13).

$$T_p \ll \frac{1}{4\Delta f} \quad (13)$$

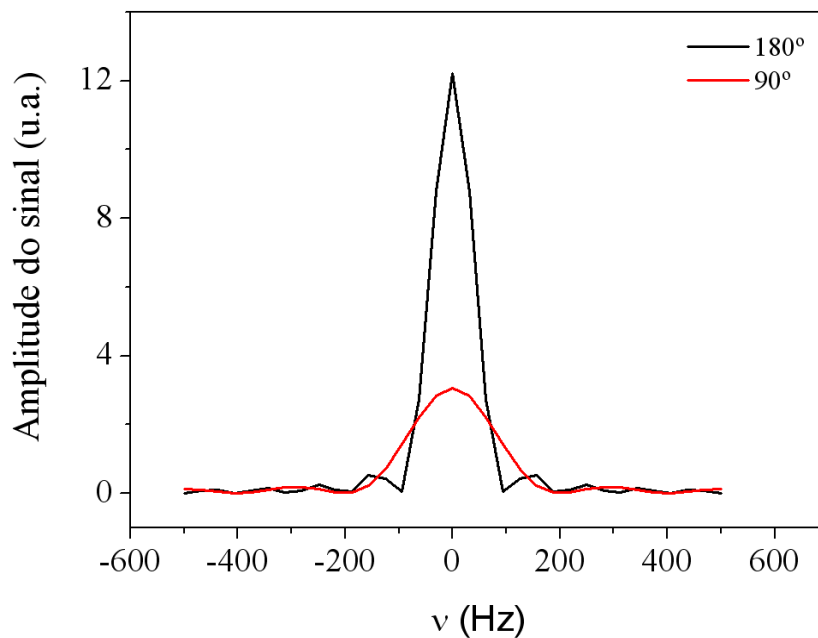


Figura 36. Espectro de potência de um pulso 180° (linha preta) e de um pulso de 90° (linha vermelha) reduzido por T_p .

Resultados e Discussão

Com isso, uma maneira mais eficiente de reduzir a potência aplicada consiste em utilizar a largura dos pulsos de 90° com a mesma duração dos pulsos 180° da técnica CPMG convencional. Para isso reduz se pela metade a intensidade de B_1 , que depende da potência (P) do pulso de RF em Watts (W), do fator de qualidade da sonda (Q) em $\Omega \text{ Hz}^{-1} \text{ H}^{-1}$, da frequência de ressonância (ν_0) em MHz e do volume da bobina detectora (V) em cm^3 , de acordo com a Equação 14^{39,40}.

$$B_1 \cong 3 \left(\frac{PQ}{\nu_0 V} \right)^{\frac{1}{2}} \quad (14)$$

Como Q, ν_0 e V são constantes para uma mesma sonda/espectrômetro, o B_1 depende apenas da raiz quadrada da potência, ou seja, $B_1 \sim P^{1/2}$ ^{39,40}. Assim, a redução de B_1 pela metade para os pulsos de 90° , equivale a uma redução de 4 vezes da potência incidida na amostra, sem alterar a largura da banda espectral (Figura 37).

Como a redução de B_1 é proporcional à raiz quadrada da potência aplicada (Equação 14)^{39,40} a redução da potência por pulso seria de 1,77, 4, e 16 vezes para os pulsos de 135° , 90° e 45° , respectivamente, quando comparando como a mesma largura de pulso de 180° . Assim, a escolha para menores LRFA ou menores τ depende da potência gerada por todos os trens de pulsos.

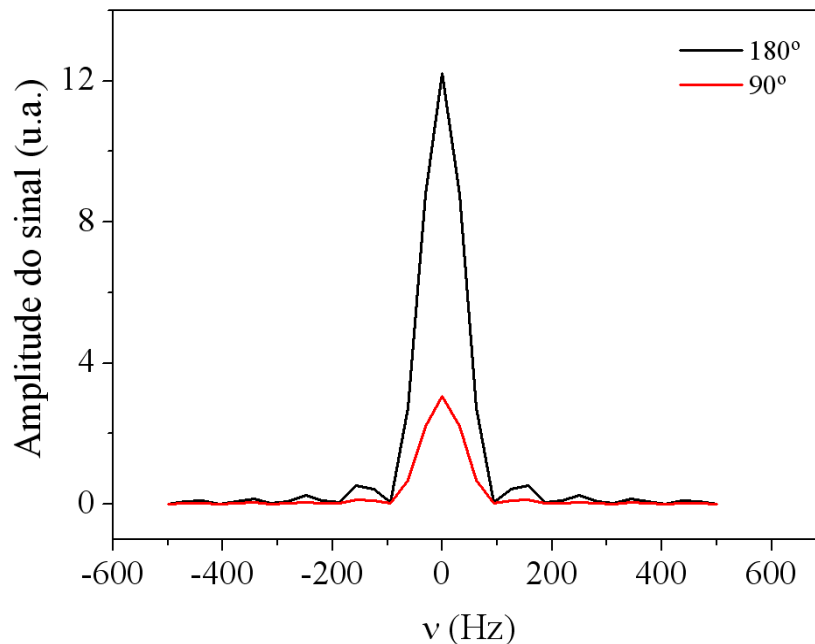


Figura 37. Espectro de potência de um pulso 180° (linha preta) e de um pulso de 90° (linha vermelha) reduzido por B_1 .

Resultados e Discussão

Para as amostras mais viscosas, com T_2 mais curto, os problemas de oscilações são minimizados. A Figura 38 apresenta os sinais experimentais de CPMG obtidos com pulsos de refocalização de 180° , 135° , 90° e 45° para o óleo de soja em diferentes homogeneidades ($\Delta\nu = 15$ Hz e 100 Hz), $\tau = 0,1$ ms and 0,4 ms.

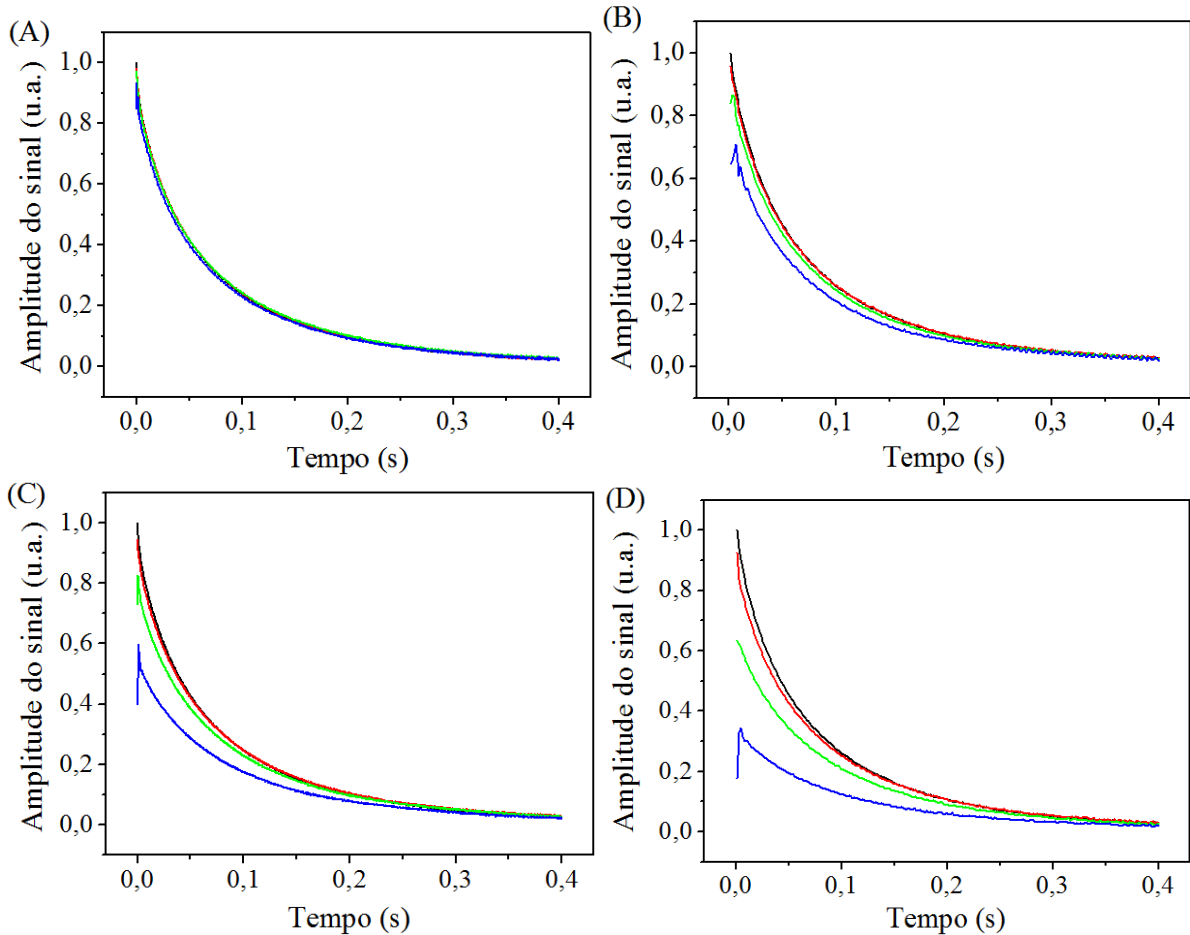


Figura 38. Sinais experimentais de óleo de soja obtidos com CPMG (●), CPMG $_{135}$ (■), CPMG $_{90}$ (▲) e CPMG $_{45}$ (◆) em $\Delta\nu = 15$ Hz (A e B) e 100 Hz (C e D), $\tau = 0,1$ ms (esquerda) e 0,4 ms (direita).

Estes valores são normalmente utilizados para medidas de sementes oleaginosas com T_2 de aproximadamente 0,15 s. Para $\tau = 0,1$ ms e 0,4 ms são necessários 4 mil e 1 mil pulsos de refocalização, respectivamente, para obter o decaimento com $5T_2$. Os decaimentos de CPMG em $\Delta\nu = 15$ Hz e $\tau = 0,1$ s (Figura 38A) possuem amplitude e valores de T_2 para todos LRFA, tão menor quanto 45° similares aos de CPMG convencional. Para $\Delta\nu = 15$ Hz e $\tau = 0,4$ ms (Figura 38B), as amplitudes dos sinais obtidos por CPMG para 45° , 90° e 135° foram 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 (Figura 38C e D), as amplitudes dos sinais obtidos por CPMG com ângulo de 45° foram aproximadamente 50% e 30% de CPMG,

Resultados e Discussão

respectivamente. Os valores de T_2 para ângulo de 45° aumentou aproximadamente 7% e 20% para $\tau = 0,1$ ms e $0,4$ ms, respectivamente.

A Figura 39 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 39A) e $0,4$ ms (Figura 39B).

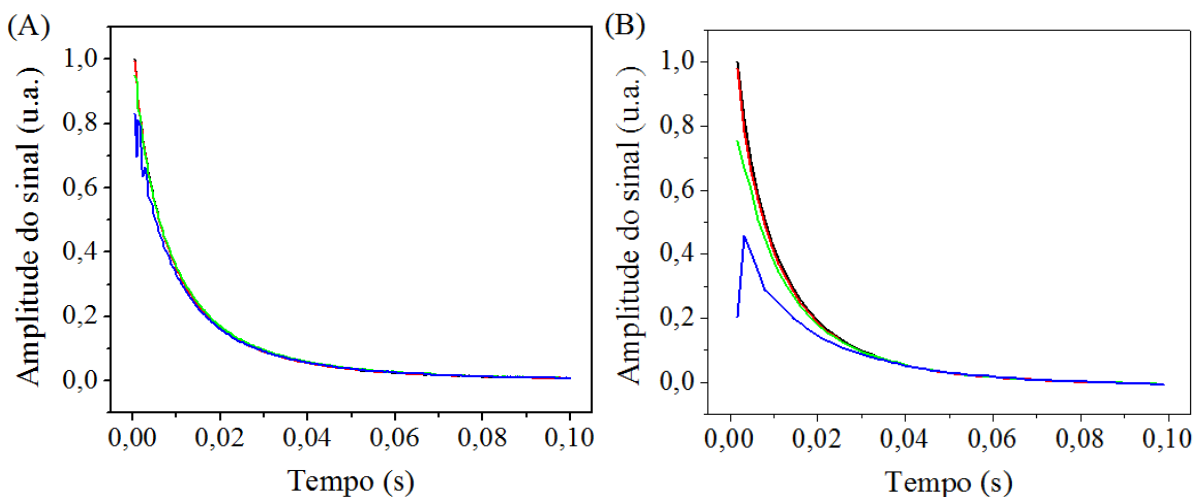


Figura 39. Sinais experimentais de óleo de semente de mamona obtidos CPMG (●), CPMG₁₃₅ (■), CPMG₉₀ (▲) e CPMG₄₅ (◆) em $\Delta\nu = 100$ Hz, $\tau = 0,1$ ms (A) e $0,4$ ms (B).

O óleo de mamona foi ainda menos susceptível que o óleo de soja para CPMG com LRFA e o sinal obtido com pulso de 45° foi idêntico ao obtido com 180° em $\Delta\nu = 15$ Hz e $\tau = 0,1$ ms (dados não mostrados). Para $\Delta\nu = 100$ Hz e $\tau = 0,1$ ms (Figura 39A), a intensidade do sinal com 45° foi aproximadamente 80% e T_2 foi similar em relação a CPMG com pulsos 180° . Para o óleo de mamona o efeito de LRFA foi grande somente em campo magnético de menor homogeneidade ($\Delta\nu = 100$ Hz) e tempo de eco mais longo ($\tau = 0,4$ ms) (Figura 39B). Para pulsos de refocalização de 45° o valor de T_2 foi aproximadamente 50% maior (0,021 s), refletindo a grande razão T_1/T_2 e a intensidade do sinal foi aproximadamente 50% da obtida por CPMG convencional. Esta grande variação no valor de T_2 obtido por CPMG com pulso de 45° não foi significativa para medidas qualitativas em oleaginosas devido à ampla variação nos valores de T_2 observados em sementes oleaginosas que podem ser maiores que $0,2$ s²⁷.

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 foi 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.

Os resultados desse trabalho foram publicados na Revista Talanta em Janeiro de 2011 ⁴¹.

4.2 Influência de LRFA na sequência CP

Na sequência CP, ao contrário de CPMG, a aplicação do trem de pulsos de refocalização ocorre na mesma fase de excitação. Quando são utilizados pulsos de refocalização de 180° ou próximo desse ângulo, o sinal obtido por CP apresenta um decaimento muito rápido para valores mínimos e se mantém nessa amplitude. Essa característica da sequência implica em grande dificuldade para a obtenção do decaimento de T_2 . Isso ocorre devido ao acúmulo no erro de calibração do pulso de refocalização ³¹.

No entanto, quando foi utilizando LRFA, por exemplo, 90° e $\tau > T_2^*$ (Figura 40), a amplitude do sinal real de CP decaiu rapidamente para valores mínimos (seta A) e então aumentou (seta B) até alcançar uma amplitude máxima, atingindo um estado estacionário (seta C). As setas apresentam 3 regiões importantes no sinal obtido por CP com LRFA de 90° (CP_{90}), expandidas na Figura 41. As setas A, B e C indicam o fim e a expansão do sinal nas Figuras 41A, B e C, correspondentes ao sinal de 0 a 0,016 s, de 0,016 a 0,048 s e de 0,640 a 0,660 s, respectivamente.

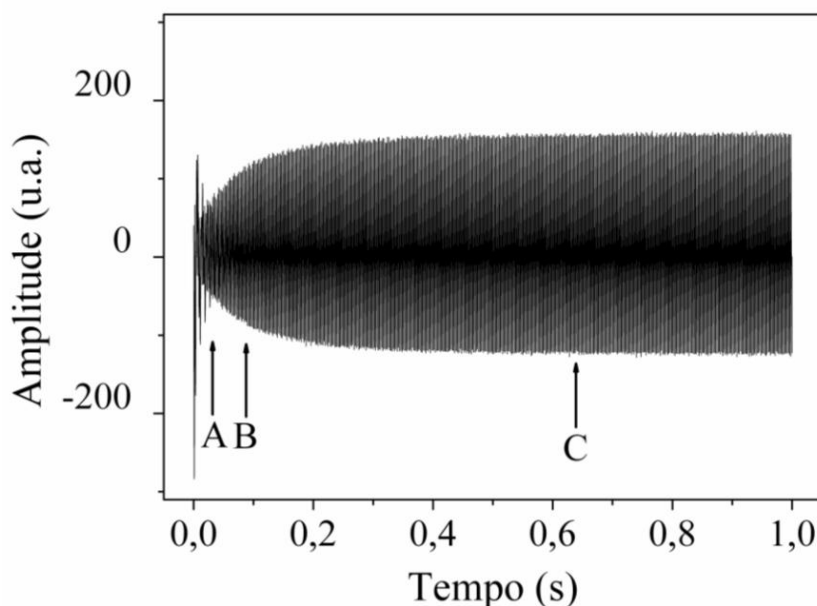


Figura 40. Sinal real de semente de amendoim obtido com a sequência CP utilizando pulsos de refocalização 90° e $\tau > T_2^*$, desde o primeiro eco até o regime estacionário. As setas indicam três regiões do sinal CP_{90} expandidas na Figura 41.

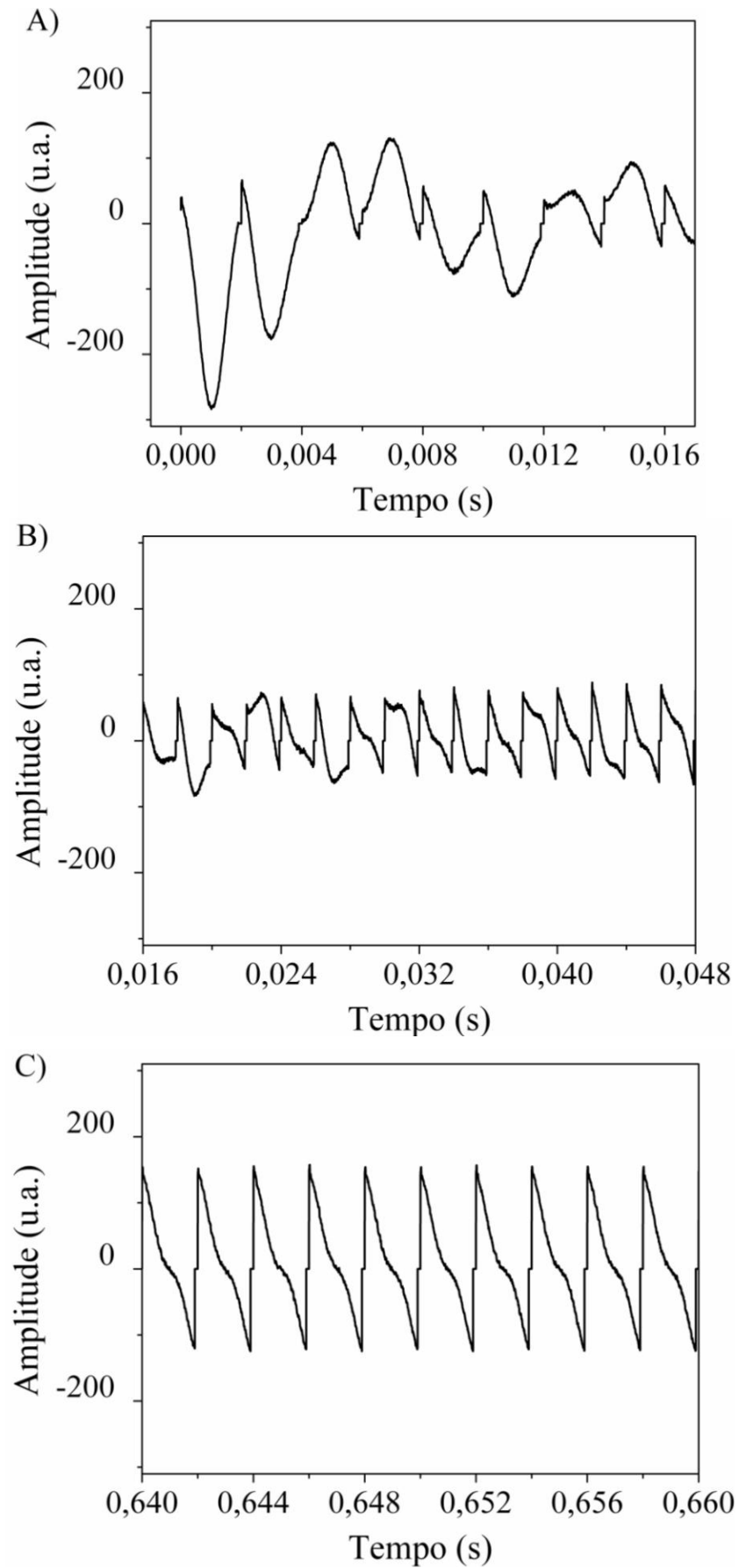


Figura 41. Sinal real de semente de amendoim obtido com a sequência CP_{90} : A) de zero a 0,016 s, B) entre 0,016 e 0,048 e C) entre 0,640 e 0,660 s.

A Figura 41A apresenta o sinal real dos primeiros oito ecos da sequência CP₉₀. O primeiro eco foi maior que o segundo como esperado, porém de mesma fase. Essa condição não é observada quando são utilizados pulsos de refocalização de 180°. Em CP convencional, cada eco é defasado em 180° em relação ao anterior. Os terceiro e quarto ecos apresentaram amplitude similar e são defasados em 180° do primeiro e do segundo eco.

Esse mesmo padrão de defasagem em 180° ocorreu a cada dois ecos até o oitavo eco. Contudo, a amplitude dos ecos pares foi maior que a dos ímpares. A presença de ecos ímpares e pares com a mesma fase ocorre porque é necessário utilizar dois pulsos de 90° para inverter a magnetização.

Após o oitavo pulso (Figura 41B), o sinal obtido por CP₉₀ não apresentou mais ecos, tornando-se um sinal complexo até aproximadamente 0,048 s. Somente no fim da Figura 40B, o sinal começou a ter um padrão periódico, consistindo de um sinal positivo que decaiu a zero entre os pulsos de refocalização e se torna negativo alcançando o valor mínimo antes do próximo pulso. Estes sinais aumentaram e se tornaram mais estáveis à medida que alcançaram sua amplitude máxima em aproximadamente 0,6 s (Figura 40, seta C e Figura 41C).

O sinal na Figura 41C apresentou um sinal típico da sequência SSFP, composto por um FID após cada pulso e um eco antes do próximo pulso⁴². Isto significa que o sinal complexo na Figura 41B está relacionado à transição dos ecos, produzidos no início, para a formação periódica de FID e eco que formam o sinal SSFP no fim da sequência CP₉₀.

Essa mesma característica também pode ser observada com outros valores LRFA. Para pulsos de 45° foram necessários 4 pulsos para inverter a fase, conforme apresentado na Figura 42. Nesse caso foi observado no início do sinal a formação de 4 ecos negativos, seguidos de 4 ecos positivos, passando por um estado de transição e formando o mesmo padrão observado em CP₉₀.

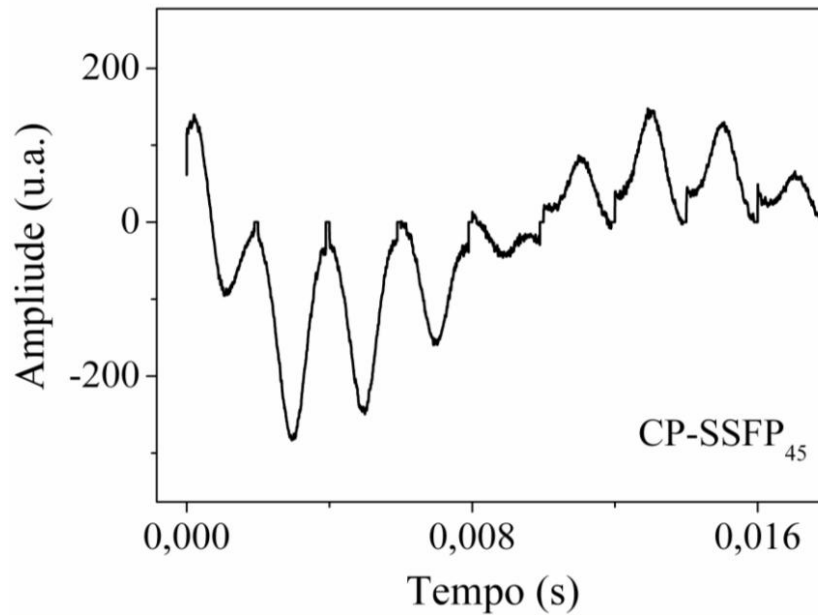


Figura 42. Sinal real de semente de amendoim obtido com a sequência CP utilizando pulsos de refocalização 45° e $\tau > T_2^*$ de zero a 0,016 s.

Portanto, a sequência CP com LRFA é composta por sinais de eco de spin e SSFP, por isso foi denominada CP-SSFP. Conseqüentemente, a sequência pode ter aplicações similares a SSFP⁴² como a maioria dos sinais produzidos pela sequência CP-SSFP nesta condição. Com isso, foram estudadas as mesmas aplicações utilizando uma condição especial de SSFP, conhecida como CWFP^{25,26}, denominada então CP-CWFP. O próximo item apresenta o estudo comparativo entre CP-CWFP e CWFP.

4.2.1 Comparação entre CP-CWFP e CWFP

O regime CWFP é obtido quando é aplicado um trem de pulsos de mesma fase e amplitude, separados por um tempo $\tau \ll T_2^* < T_1$ e T_2 da amostra. Usando um ângulo de precessão, $\psi = (2n+1)\pi$, onde n é um número inteiro e $\tau < 1/2T_2^*$, o sinal CWFP apresenta a partir do equilíbrio térmico dois estados transientes (Figura 12) antes de alcançar um estado estacionário constante (EE)^{25,26}.

O primeiro regime transiente é caracterizado por uma alternância na amplitude do sinal entre pulsos ímpares e pares^{22,25,26}. A alternância do sinal gerado pelos pulsos apresenta um decaimento para uma amplitude intermediária, governada pela constante de tempo T_2^* . O

Resultados e Discussão

o sinal gerado pelos pulsos pares inicia com valor mínimo e aumenta para o mesmo valor da amplitude intermediária do sinal observado pelos pulsos ímpares.

Quando as amplitudes dos sinais gerados pelos pulsos ímpares e pares se igualam, ele alcança o estado *quasi*-estacionário (EQE). Após esse tempo o sinal apresenta um decaimento mais lento, com dependência de T_1 e T_2 e alcançam o EE após aproximadamente $\tau = 5T^*$.

O decaimento exponencial do EQE é dado por T^* (Equação 3) e a amplitude do sinal no estado estacionário, por M_{EE} (Equação 2)²⁵. Para o óleo de soja (Figura 43A) T^* foi de 0,28 s e a amplitude normalizada de M_{EE} foi 0,4.

A magnitude do sinal CP-CWFP para a mesma amostra (Figura 43B) apresentou algumas diferenças e similaridades com o sinal obtido por CWFP. A principal diferença foi o decaimento do sinal para valores mínimos após a alternância de amplitude entre pulsos ímpares e pares. Após esse decaimento abrupto a amplitude do sinal começou a aumentar e alcançou um EE.

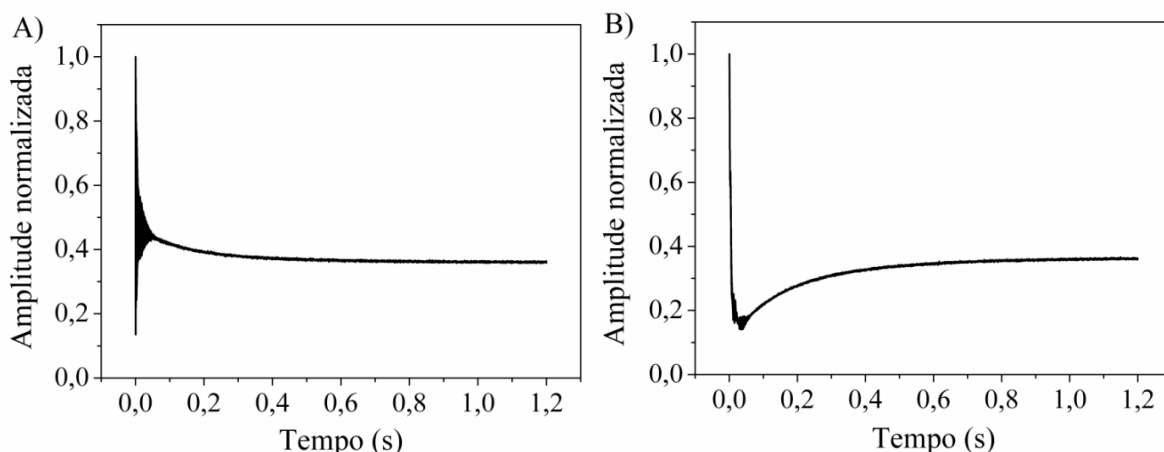


Figura 43. Magnitude dos sinais de óleo de soja obtidos por CWFP (A) e CP-CWFP (B) em 85 MHz ^1H e $\Delta\nu = 25$ Hz.

Embora, apresentem essas diferenças eles compartilham algumas propriedades idênticas. Os sinais, do EQE em CWFP e amplitude mínima em CP-CWFP, alcançaram o EE com a mesma constante de tempo T^* e apresentaram a mesma amplitude no EE M_{EE} (Figura 41). Portanto, a sequência CP-CWFP pode ter as mesmas aplicações de CWFP, tais como medir T_1 e T_2 em um único experimento (equações 4 e 5).

Um estudo comparativo entre as sequências CWFP e CP-CWFP foi realizado utilizando amostras com $T_1/T_2 \sim 1$ (água), $T_1/T_2 \sim 2$ (óleo de soja) e $T_1/T_2 \sim 10$ (semente de mamona). Para esse estudo foram utilizados campos magnéticos de 0,23 T (9 MHz para o ^1H) e 2,1 T (85 MHz para o ^1H), com baixa resolução (250 Hz) e média resolução (25 Hz),

Resultados e Discussão

respectivamente. Os valores de T_1 e T_2 obtidos pelas técnicas convencionais Inversão-recuperação (IR) e CPMG estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1. Tempos de relaxação T_1 e T_2 de água, óleo de soja e semente de mamona obtidos com as seqüências IR e CPMG em 85 e 9 MHz ^1H .

Amostra	ν (MHz ^1H)	T_1	T_2	T_1/T_2
Água	85	$2,96 \pm 0,05$	$2,45 \pm 0,01$	1,21
	9	$2,73 \pm 0,01$	$2,20 \pm 0,01$	1,24
Óleo de soja	85	$0,28 \pm 0,01$	$0,14 \pm 0,01$	2,00
	9	$0,12 \pm 0,01$	$0,11 \pm 0,01$	1,09
Semente de mamona	85	$0,16 \pm 0,01$	$0,015 \pm 0,001$	10,67
	9	$0,029 \pm 0,001$	$0,014 \pm 0,001$	2,07

A Figura 44 ilustra a grande vantagem de CP-CWFP sobre CWFP para medidas dos tempos de relaxação para amostras com $T_1 \sim T_2$. Esta Figura apresenta os sinais obtidos em 85 MHz, para uma amostra de água, os quais são idênticos aos obtidos em 9 MHz (não apresentado). Quando $T_1 \sim T_2$ a diferença na amplitude do EQE em CWFP foi mínima, Portanto, é necessário se ter uma alta razão sinal/ruído para um bom ajuste de T^* . Por outro lado, a diferença na amplitude do EQE em CP-CWFP foi máxima, aumentando de um valor mínimo para a máxima amplitude do sinal no estado estacionário, equivalente a $0,5 M_0$. Portanto, esta grande diferença na amplitude torna o ajuste de T^* menos dependente da razão sinal/ruído.

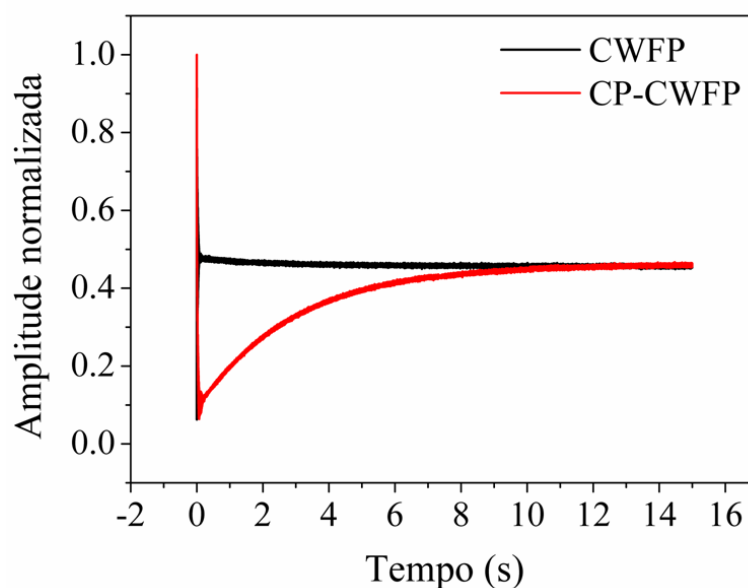


Figura 44. Sinais de amostra de água obtidos por CWFP e CP-CWFP em 85 MHz ^1H e $\Delta\nu = 25$ Hz.

Resultados e Discussão

Um resultado similar ao observado para a amostra de água, Figura 44, foi obtido para uma amostra de óleo de soja em 9 MHz (Figura 45A), que possui $T_1 \sim T_2$ nesta condição. No entanto, a mesma amostra em 85 MHz possui um $T_1 \sim 2T_2$ e neste caso, o sinal CP-CWFP e CWFP tem uma variação de amplitude similar durante o decaimento do EQE (Figura 45B) e, portanto tem a mesma eficiência para medidas dos tempos de relaxação.

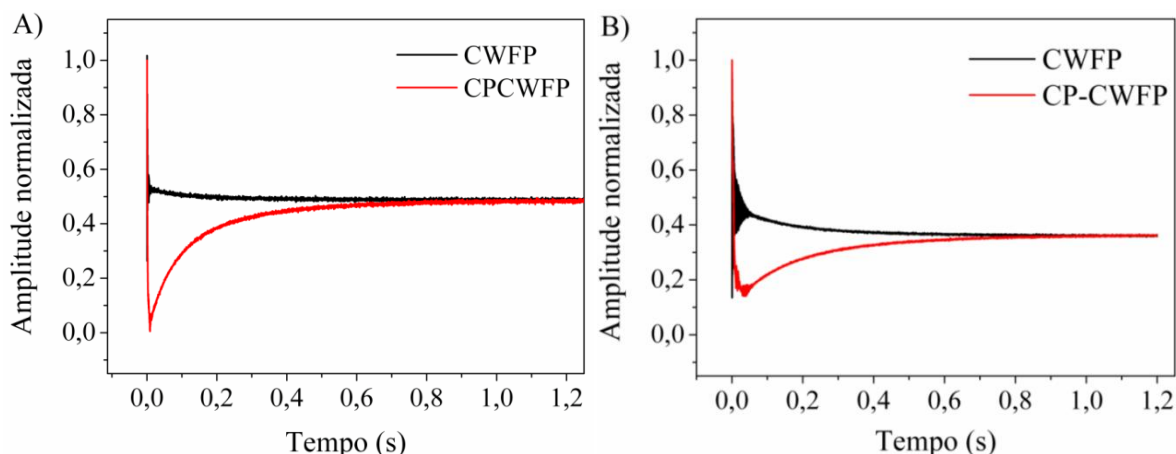


Figura 45. Sinais de amostra de óleo de soja obtidos por CWFP e CP-CWFP em 9 MHz ^1H e $\Delta\nu = 250$ Hz (A) e em 85 MHz ^1H e $\Delta\nu = 25$ Hz (B).

Assim como o óleo de soja em 85 MHz (Figura 45B), o sinal da semente de mamona obtido em 9 MHz apresentou $T_1 \sim 2T_2$ (Figura 46A). Nesse caso ambas as sequências também apresentaram variação similar na amplitude do decaimento do EQE, podendo ser utilizadas para o cálculo de T^* e então de T_1 e T_2 . Contudo, quando essa mesma amostra foi analisada em 85 MHz, ela apresentou $T_1 \sim 11T_2$ (Figura 46B), e o sinal CWFP apresentou uma maior variação que CP-CWFP na amplitude do decaimento do EQE, e, portanto, CWFP é a melhor opção para a análise nesta condição.

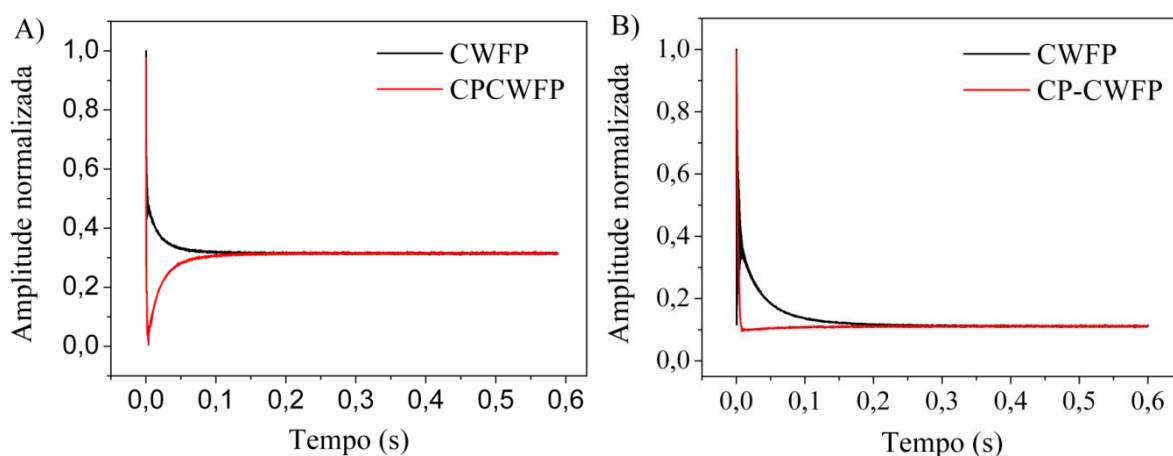


Figura 46. Sinais de amostra de semente de mamona obtidos por CWFP e CP-CWFP em 9 MHz ^1H e $\Delta\nu = 250$ Hz (A) e em 85 MHz ^1H e $\Delta\nu = 25$ Hz (B).

Resultados e Discussão

Deste modo, a sequência CP-CWFP é mais eficiente do que a CWFP para medida dos tempos de relaxação em espectrômetros com baixos campos magnéticos, uma vez que nessa condição T_1 e T_2 tendem a ter valores similares. Portanto, a sequência CP-CWFP pode ser uma técnica mais robusta para análises em espectrômetros de RMN de bancada, normalmente utilizados em controle de qualidade de processos industriais, que usam $B_0 < 0,5$ T (20 MHz) e em ferramentas de RMN utilizadas em poços de petróleo que usam $B_0 \sim 0,05$ T (2 MHz).

A Figura 47 apresenta a relação entre T_1 e T_2 obtidos com as técnicas padrão (IR e CPMG) e sequência CP-CWFP para as amostras de acetona, água deionizada, dimetilsulfóxido (DMSO), óleo de soja e semente de mamona em 9 e 85 MHz. Para essas amostras obteve-se um alto coeficiente de correlação, 0,992, indicando a boa precisão do método CP-CWFP para medida simultânea dos tempos de relaxação.

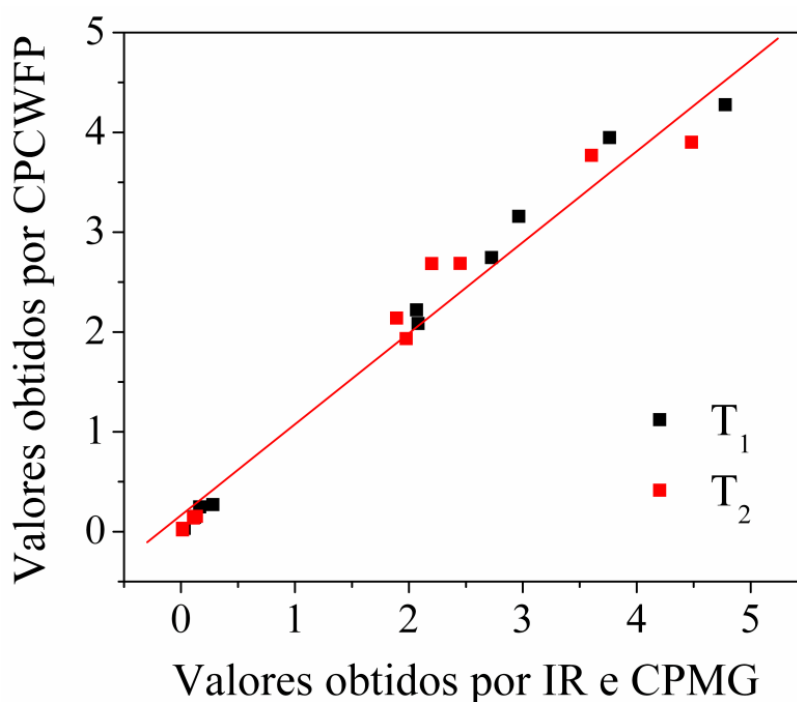


Figura 47. Correlação entre os valores de T_1 e T_2 medidos com os métodos padrão IR e CPMG, respectivamente e os valores calculados através do sinal CP-CWFP para as amostras de acetona, água deionizada, DMSO, óleo de soja e semente de mamona.

Os estudos realizados com as sequências CPMG e CP utilizando LRFA demonstraram a viabilidade da aplicação do método de baixa potência em análises *online*. No entanto, como já relatado anteriormente, Meiboom e Gill observaram que a sequência CP sofre o efeito do erro de calibração de pulso. Esse efeito faz com que o sinal decaia para valores mínimos muito mais rápido que o decaimento de T_2 da amostra³¹.

Esse problema foi evitado utilizando o método de alternância de fase ⁴³. Assim, as sequências CPMG e CP com e sem LRFA também foram estudadas usando alternância de fase entre os pulsos de refocalização e seu efeito em diferentes ângulos de precessão

4.3 Influência da alternância de fase nas sequências CP e CPMG com $\Psi = 2n\pi$.

O método de alternância de fase, quando aplicado à sequência CP consiste do pulso de excitação e do primeiro pulso de refocalização em mesma fase e os pulsos seguintes com alternância de fase de 180° entre eles, por exemplo: $90^\circ_{x'} - \tau - (180^\circ_{x'} - 2\tau - 180^\circ_{-x'} - 2\tau)_n$. Já para o CPMG há uma diferença de fase de 90° entre o pulso de excitação e o primeiro pulso de refocalização e alternância de fase de 180° entre os pulsos seguintes. Por exemplo: $90^\circ_{x'} - \tau - (180^\circ_{y'} - 2\tau - 180^\circ_{-y'} - 2\tau)_n$.

Na Figura 48 A e B podem ser observados os sinais reais de uma solução de cloreto de manganês (3%) obtidos com as sequências CP e CPMG com alternância de fase e em ressonância, com $\psi = 0$.

Pode-se perceber que o método de alternância de fase fez com que as sequências CP e CPMG apresentassem comportamentos contrários entre si em relação às sequências normais. Ou seja, a sequência CP com alternância de fase teve um efeito contrário ao que ocorre na sequência CP normal (Figura 48A). O primeiro pulso aplicado em x' rotaciona a magnetização que estava no plano $x'y'$ para o hemisfério sul e eixo $-y'$. E após o próximo pulso que ocorrerá em $-x'$, a magnetização retornará para o plano $x'y'$. Assim todos os ecos pares não sofrem efeito do erro de calibração e possui decaimento dependente de T_2 . Ainda, esse efeito não se torna cumulativo, pois a cada dois pulsos, a magnetização retorna ao plano $x'y'$.

O sinal CP com alternância de fase na Figura 48A apresenta os ecos ímpares e pares que são negativos e positivos, respectivamente. Considerando apenas os ecos pares para o ajuste exponencial obteve-se um decaimento de 0,169 s e um erro de 2,4% em relação ao decaimento de T_2 obtido por CPMG. Enquanto que os ecos ímpares apresentaram um ajuste 0,170 s e um erro de 3%. Assim, o método CP com alternância de fase pode ser um método alternativo para obtenção de T_2 ⁴⁴.

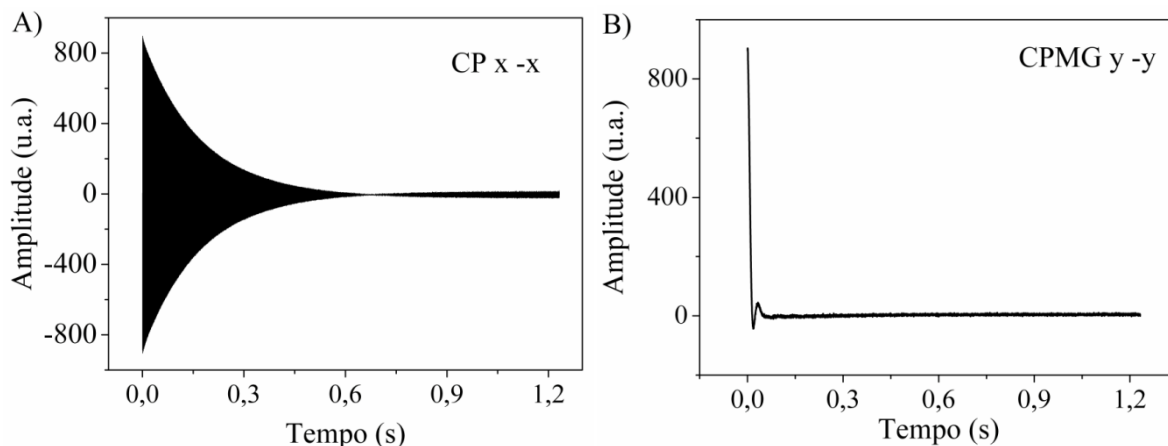


Figura 48. Sinais reais de uma solução de cloreto de manganês (3%): A) obtido pela sequência CP com alternância de fase (x' e $-x'$) e B) obtido pela sequência CPMG com alternância de fase (y' e $-y'$).

Já sinal obtido com CPMG com alternância de fase (Figura 48B) apresentou um decaimento muito rápido, similar ao observado quando se utiliza a sequência CP com pulsos de 180° para um ângulo de offset par. O efeito resultante é um decaimento com constante de tempo de 0,0156 s (Figura 48B), similar ao obtido por CP (0,0160 s) (dado não mostrado).

4.3.1 Influência de $\psi = (2n+1)\pi$ em CP e CPMG com alternância de fase

Ao se aplicar um $\psi = (2n+1)\pi$ nas sequências CP e CPMG com alternância de fase (Figura 49A e B) os sinais atingiram o EE.

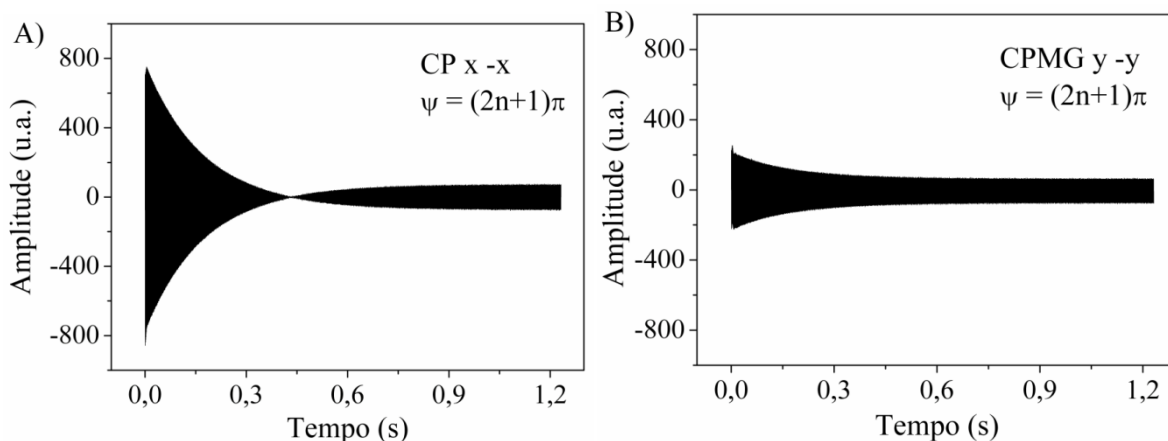


Figura 49. Sinais reais de uma solução de cloreto de manganês (3%) com defasamento de offset (ψ) ímpar: A) obtido pela sequência CP com alternância de fase (x' e $-x'$) e B) obtido pela sequência CPMG com alternância de fase (y' e $-y'$).

No caso da sequência CP com alternância de fase e ψ ímpar obteve-se valores de T_2 igual a 0,174 s e 0,176 para os ecos pares e ímpares, que corresponde a um erro de 5,5 % e 6,7 %, respectivamente, em relação ao valor obtido por CPMG.

Já para sequência CPMG com alternância de fase, o sinal apresentou uma menor amplitude. Os ecos pares tiveram um decaimento de 0,177 s equivalente a um erro de 7,3%. No entanto, os ecos ímpares tiveram um decaimento de 0,165 s, portanto o mesmo valor obtido por CPMG, ou seja pode ser usado para medir T_2 (Figura 48B). Também foram analisadas essas mesmas sequências com LRFA.

4.4 Influência da alternância de fase nas sequências CP_{90} e $CPMG_{90}$ com $\psi = 0$

Quando se utilizou alternância de fase em CP_{90} e $CPMG_{90}$ e $\psi = 0$, os sinais entraram num estado estacionário (Figuras 50A e B). O sinal real da sequência CP_{90} com alternância de fase e $\psi = 0$ apresentou um decaimento até zero para então aumentar e atingir o EE (Figura 50A). Já a amplitude do sinal imaginário (não mostrado) ficou sempre próxima de zero.

Para o caso da sequência $CPMG_{90}$ com alternância de fase e $\psi = 0$ o sinal real decaiu com T_2^* . Enquanto que o sinal imaginário, (Figura 50B) apresentou um comportamento similar ao obtido por CP_{90} com $\psi = (2n+1)\pi$ denominado CP-CWFP (Figura 40). O sinal decaiu rapidamente para valores mínimos e então aumenta até alcançar uma amplitude máxima no EE.

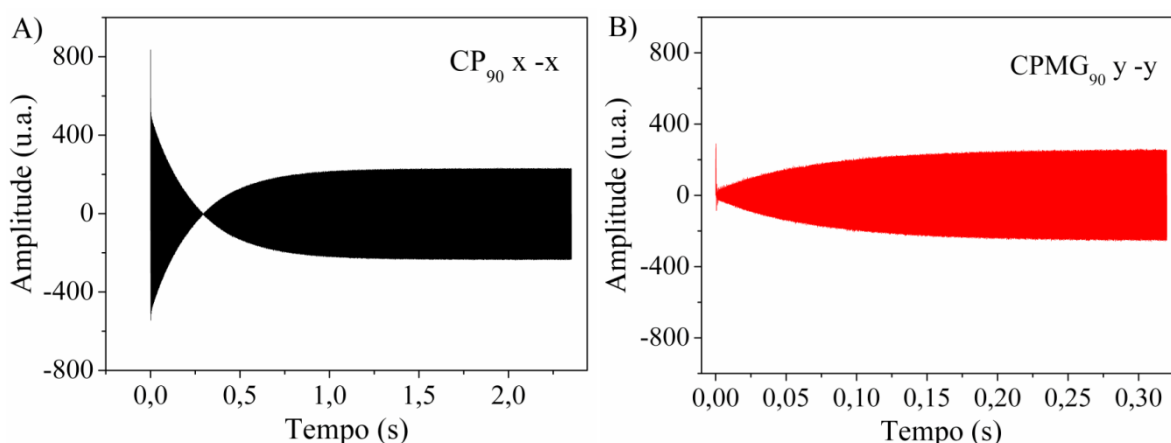


Figura 50. A) Sinal real de uma solução de cloreto de manganês (3%) obtido pela sequência CP_{90} com alternância de fase (x' e $-x'$) e B) Sinal imaginário obtido pela sequência $CPMG_{90}$ com alternância de fase (y' e $-y'$).

Resultados e Discussão

Na Figura 51 e 52 pode ser observado detalhadamente a formação dos componentes dos sinais reais (linha preta) e imaginários (linha vermelha) do CP_{90} e do $CPMG_{90}$ com alternância de fase e $\psi = 0$, utilizando τ de 2,1 ms para comparação com o sinal obtido por CP-SSFP (Figura 41).

No início do sinal real obtido por CP_{90} com alternância de fase e $\psi = 0$ (Figura 51A) são formados ecos negativos e positivos consecutivamente, ao contrário do que ocorre para CP-SSFP (Figura 41A), onde são formados dois ecos negativos e dois positivos. Essa alternância de ecos está relacionada às alternâncias dos pulsos de refocalização. Quando o pulso é aplicado em x o eco é formado no hemisfério do eixo $-y'$ e o próximo pulso em $-x'$ direciona a formação do eco para o hemisfério de y' . Esses ecos passam por um valor mínimo similar ao observado com CP-SSFP (Figura 41B) e depois formam um sinal do tipo SSFP, com formação de FID e eco (Figura 51B).

Diferentemente do SSFP e CP-SSFP (Figura 41C) o sinal obtido com CP_{90} com alternância de fase produz FID e eco com mesma fase (Figura 51B). Essa propriedade pode ser usada para suprimir os sinais do FID ou eco, somando-se ou subtraindo os sinais CP_{90} com alternância de fase com o CP_{90} sem alternância de fase. Essa propriedade poderá ser de grande importância para uso de SSFP em experimento de RMN em alta resolução, onde a supressão da componente eco é necessária para eliminar as anomalias de fase e amplitude do sinal ⁴⁵.

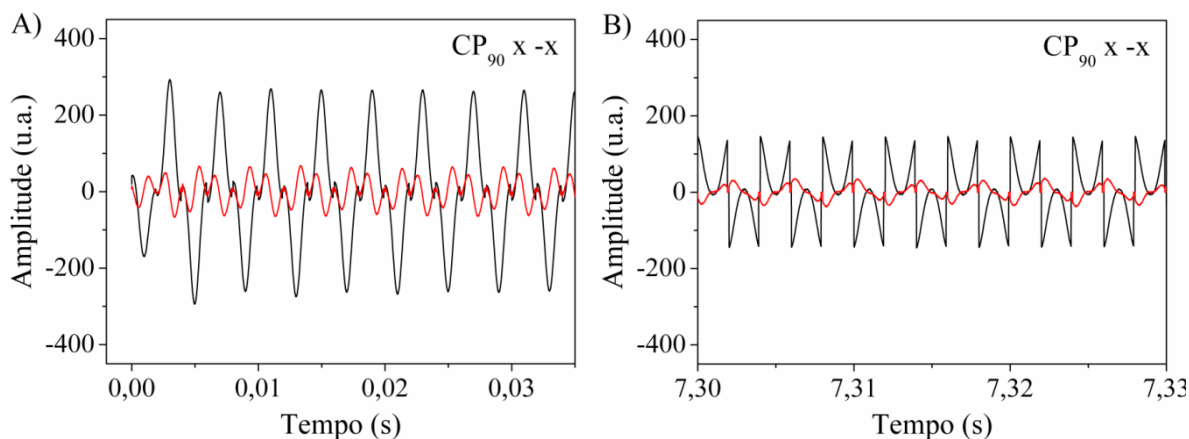


Figura 51. Sinais reais e imaginários de uma solução de cloreto de manganês (3%) obtido pela sequência CP_{90} com alternância de fase (x' e $-x'$) e $\tau > T_2^*$.

No caso do sinal $CPMG_{90}$ com alternância de fase e $\psi = 0$ não ocorreu a formação de ecos no centro dos primeiros pulsos de refocalização do sinal real (linha preta- Figura 52A). Os ecos foram observados apenas no sinal imaginário (Figura 52A- linha vermelha). Nesta Figura pode-se ver que o sinal real decai (linha preta) para zero assim como observado para CP-SSFP (Figura 41B).

Resultados e Discussão

O sinal imaginário (linha vermelha) decai rapidamente para um valor mínimo com dependência de T_2^* (Figuras 50B e 52B) e depois aumenta e alcança o estado estacionário com formação de FID e eco em mesma fase, semelhante ao sinal real do CP_{90} com AF (Figura 51B).

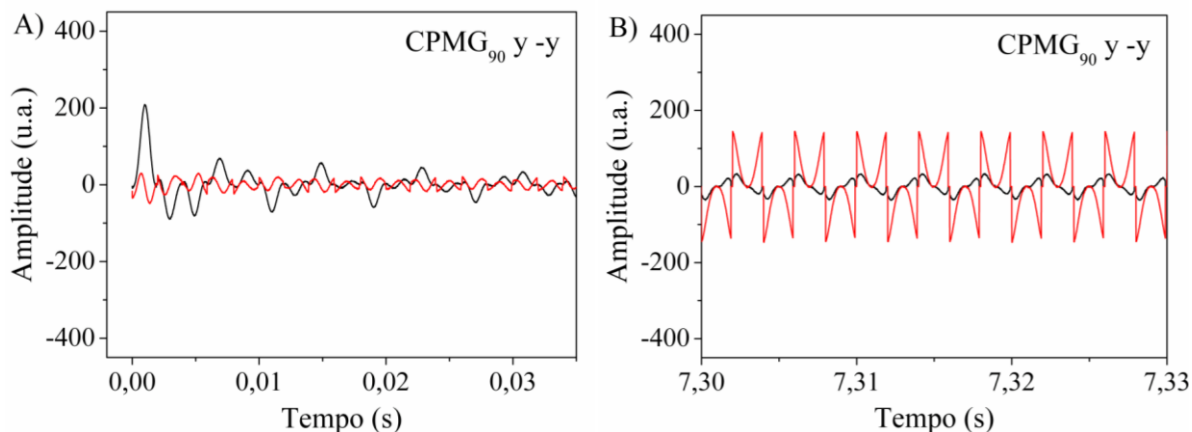


Figura 52. Sinais reais e imaginários de uma solução de cloreto de manganês (3%) obtido pela sequência $CPMG_{90}$ com alternância de fase (y' e $-y'$) e $\tau > T_2^*$.

A formação FID/eco se alterna positiva e negativamente devido os pulsos de refocalização serem alternados em x' e $-x'$ para CP_{90} e y' e $-y'$ para $CPMG_{90}$ (Figuras 51B e 52B). Contudo, considerando a magnitude das componentes, o sinal obtido por essas sequências se torna igual ao obtido por CP-SSFP (Figura 41C).

O ajuste do decaimento dos ecos pares do sinal CP_{90} com alternância de fase apresenta uma diferença de 4,2% para T^* obtido com CP-CWFP. $CPMG_{90}$ com alternância de fase forneceram uma constante de tempo de 0,269 s, igual ao valor obtido de T^* por CP-CWFP. Assim, com essas sequências também é possível obter os valores de T_1 e T_2 .

4.4.1 Influência de $\psi = (2n+1)\pi$ em CP_{90} e $CPMG_{90}$ com alternância de fase

Os estudos com CP_{90} com alternância de fase e $CPMG_{90}$ com alternância de fase não apresentaram novas propriedades. Quando se usou o CP_{90} com alternância de fase com $\psi = (2n+1)\pi$, o sinal real apresentou um decaimento para os ecos pares com constante de tempo de 0,233 s e de 0,228 s com os ecos ímpares (Figura 53A), portanto, com um erro de 13,4% e 15,2% em relação ao valor de T^* . Quando se usou o $CPMG_{90}$ com alternância de fase o sinal decaiu com T_2^* como pode ser observado na Figura 52A, similar ao CPMG com alternância

Resultados e Discussão

de fase (Figura 53B). Assim essas duas opções não têm vantagens sobre as que foram apresentadas anteriormente.

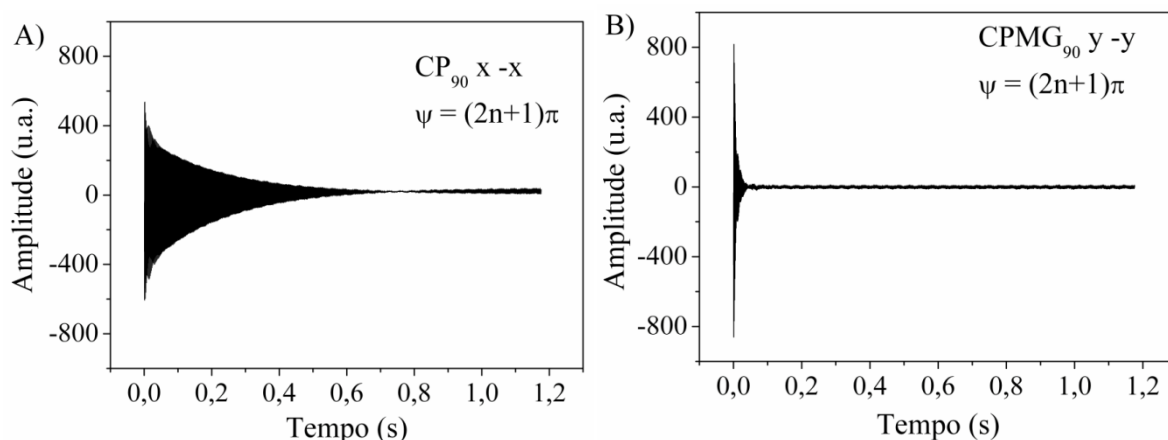


Figura 53. Sinais reais de uma solução de cloreto de manganês (3%) com defasamento de offset (ψ) ímpar A) obtido pela sequência CP₉₀ com alternância de fase (x' e $-x'$) e B) obtido pela sequência CPMG₉₀ com alternância de fase (y' e $-y'$).

4.5 Análises online

Após esses estudos teórico/experimental utilizando as amostras estáticas, foi utilizadas algumas dessas sequências para análises *online* de sementes oleaginosas intactas.

4.5.1 Análise online com as sequências CPMG₉₀ e CPMG

Na Figura 54 pode ser observado os sinais das 31 amostras de sementes de espécies de plantas oleaginosas obtidos com as sequências CPMG₉₀ e CPMG no sistema *online*. Essa Figura demonstra que os sinais obtidos por CPMG₉₀ foram idênticos, ao obtidos por CPMG. Na Figura 55 é apresentada uma expansão do sinal entre 5,05 e 6,65 minutos, onde estão os sinais da macaúba, mamona e melancia. Nessa Figura pode ser observado que o decaimento do óleo da macaúba e da melancia é bem mais longo do que o da mamona, com T₂ iguais a 0,100 s, 0,119 s e 0,030 s, respectivamente. (Figura 55).

Os tempos de relaxação do óleo da mamona são muito discrepantes da maioria das amostras, por isso optou-se por excluí-la da maioria das análises. Apenas os decaimentos foram utilizados para ilustração. Essas amostras foram analisadas em menos de 8 minutos

Resultados e Discussão

como método *stop and flow*, sendo que para cada amostra foram realizados 4 promediações. Se for realizada apenas uma medida, é possível analisar cerca de 1000 amostras por hora.

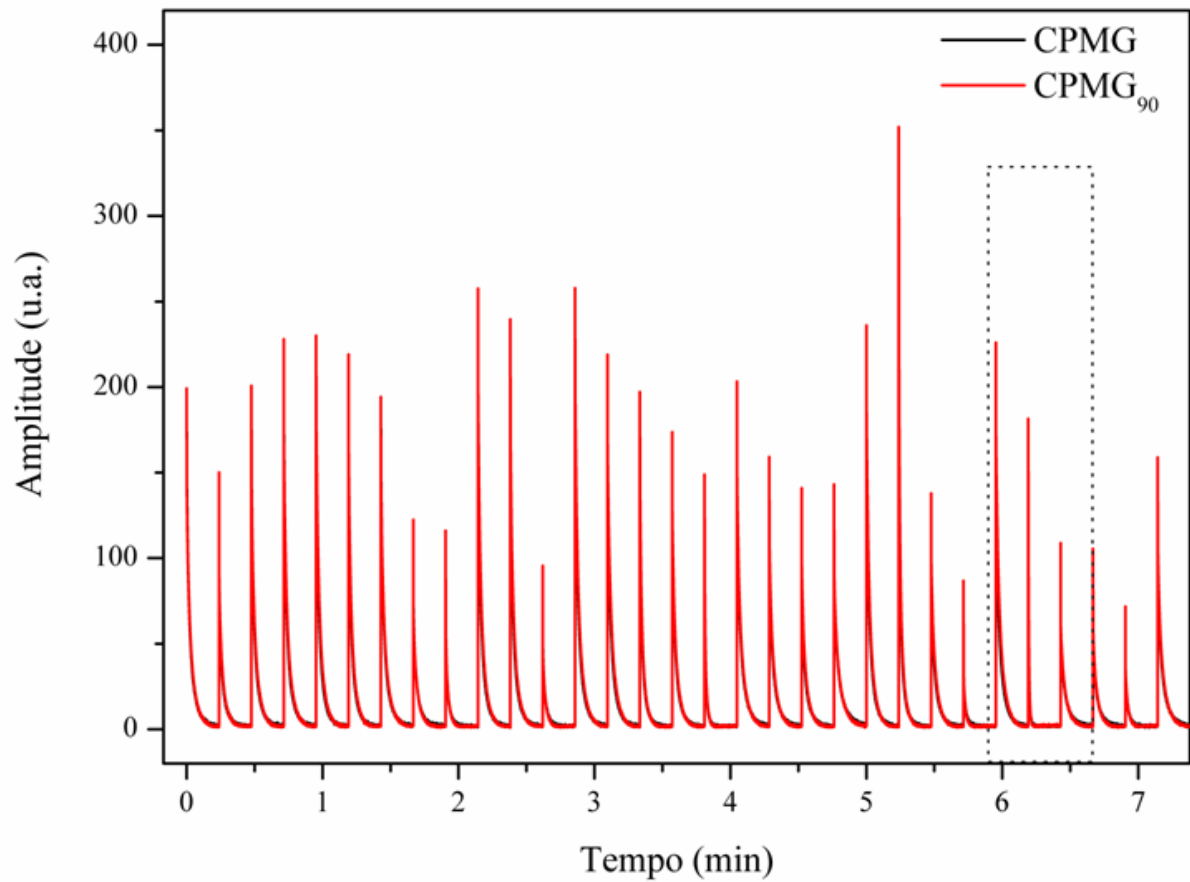


Figura 54. Sinais dos óleos das 31 sementes oleaginosas obtidos com as seqüências CPMG e CPMG₉₀ com o método *online stop and flow*.

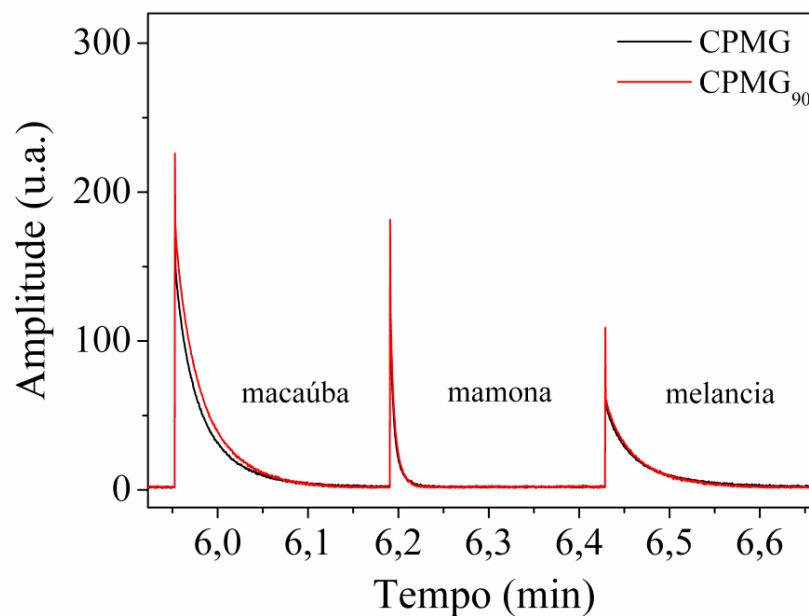


Figura 55. Sinais dos óleos de macaúba, mamona e melancia obtidos com as seqüências CPMG e CPMG₉₀ com o método *online stop and flow*.

Resultados e Discussão

A Figura 56 apresenta a correlação entre os valores de T_2 medidos por CPMG e CPMG₉₀ para as mesmas amostras. É possível perceber que os valores de T_2 obtidos com as duas técnicas apresentaram uma boa correlação ($r = 0,98$). Esses dados também foram analisados com métodos estatísticos multivariados.

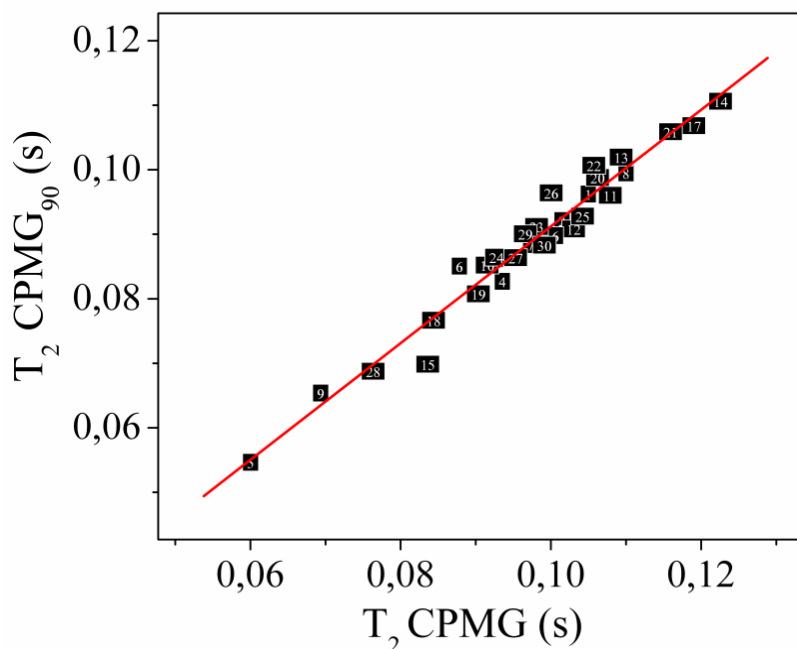


Figura 56. Correlação entre os valores de T_2 obtidos com CPMG e CPMG₉₀, utilizando 30 espécies de oleaginosas, $r = 0,98$.

4.5.1.1 Análises de CPMG e CPMG₉₀ por métodos estatísticos multivariados

Na Figura 57 pode ser observado um gráfico de PCA dos dados do sinal de CPMG com pré-processamento auto-escalado, utilizando 3 componentes principais (PC) que representaram 95,21% da variância acumulativa, sendo que PC₁ e PC₂ representaram 91,18% e 2,91%, respectivamente.

No lado esquerdo dessa Figura, com valores de PC₁ menores que -40 estão a nhandiroba (5) e o café (9) que possuem o menor valor de T_2 (Figura 56) e tem aproximadamente 40% ácidos graxos saturados⁴⁶ e são os materiais mais viscosos deste grupo de sementes. Entre -17 e -40 estão as sementes de macadâmia (15) e a moringa (18) que são ricas em ácido oléico^{47,48,49}, o baru (6) que apresenta 46% de ácido oléico e 31% de linoléico⁵⁰ e o rabanete (28) que apresenta 20% desse ácido graxo e 30% de ácido erúico (20:1)⁴⁶. A viscosidade intrínseca do óleo dessas sementes é aproximadamente, 4,37, 4,70 e

Resultados e Discussão

5,03, respectivamente. Portanto essa propriedade pode ser responsável pelo agrupamento das sementes.

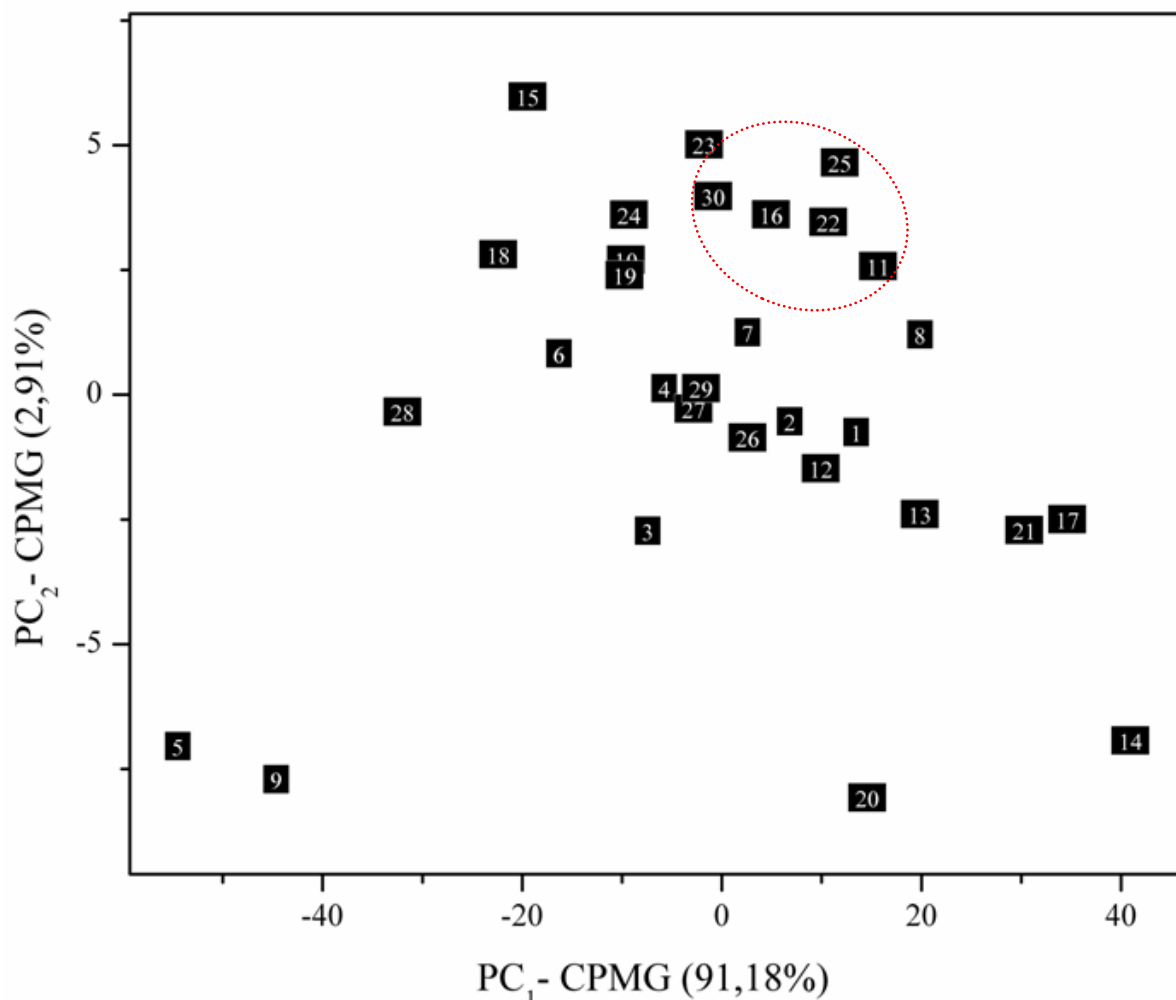


Figura 57. Gráfico dos escores obtidos com a análise por PCA dos dados obtidos por CPMG.

Já no outro extremo de PC_1 estão as sementes de linhaça (14), noz (21) e a melancia (17) ⁵¹⁻⁵³ possuem mais de 70% de ácidos graxos poliinsaturados, sendo, portanto as sementes com os óleos menos viscosos. Isso justifica seu agrupamento no extremo direito do gráfico. Foi possível visualizar que as palmáceas, tucumã (30), piaçava (25) ⁵⁵, pati (22) ⁵⁶, macaúba (16) ⁵⁷ e coco (11) ⁵⁸ tiveram uma tendência de agrupamento na parte superior do gráfico (linha vermelha pontilhada). Isso pode ter ocorrido devido ao conteúdo muito semelhante dos ácidos graxos, com aproximadamente 45% de ácido Láurico.

Os dados obtidos por CPMG₉₀ também foram analisados com PCA. A Figura 58 apresenta o gráfico de PCA auto-escalado, utilizando 3 PC que representaram 94,78% da variância acumulativa, onde PC_1 e PC_2 representaram 90,13% e 3,54% dos dados, respectivamente.

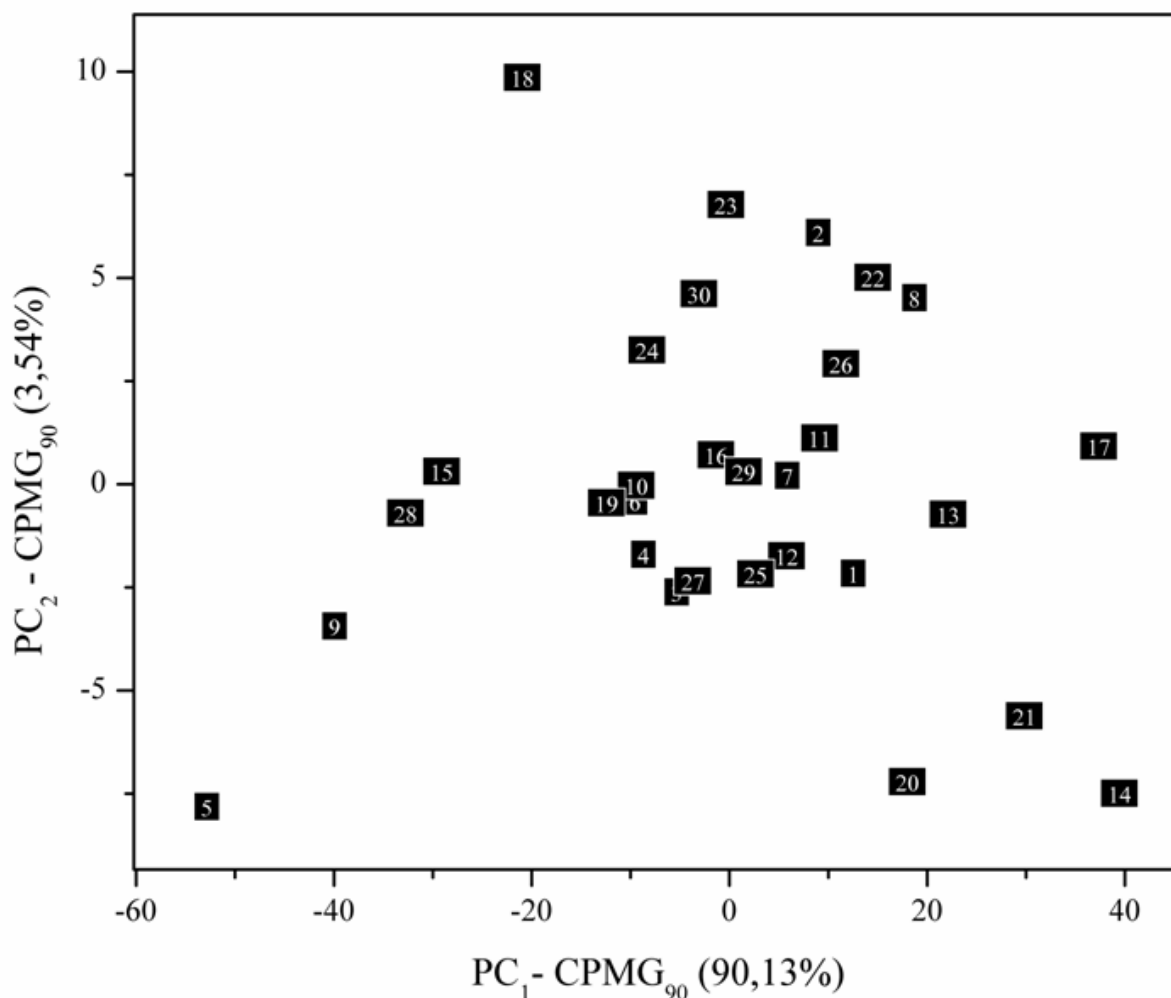


Figura 58. Gráfico dos escores obtidos com a análise por PCA dos dados obtidos por CPMG₉₀.

A distribuição dos dados obtidos por CPMG₉₀ no gráfico do PCA foi similar à distribuição dos dados obtidos por CPMG. Ocorreram algumas diferenças na distribuição do grupo intermediário, que podem ser devido a pequenas oscilações da temperatura da amostra, ocorridas durante o manuseio, mas a relação com os valores de PC₁ se manteve, com as sementes que possuem óleos mais viscosos no lado esquerdo e as com óleos menos viscosos no lado direito do gráfico de PCA.

Para uma melhor análise da relação entre os dados de PCA e a viscosidade foi feita uma correlação entre os valores de T₂ e os valores das PC₁ dos dados obtidos tanto com a técnica CPMG quanto por CPMG₉₀, respectivamente (Figura 59A e B).

Na Figura 59A, com os dados de CPMG foi possível observar que existe uma correlação maior que 0,99 entre os dados de T₂ e o PC₁. Assim como os dados de CPMG₉₀ na Figura 59B, que também demonstraram uma correlação de 0,99 entre os dados de T₂ e o PC₁.

Resultados e Discussão

Esses resultados afirmam que a disposição das sementes de PC₁ em cada gráfico de PCA ocorre em função dos valores de T₂ e, portanto da viscosidade do óleo.

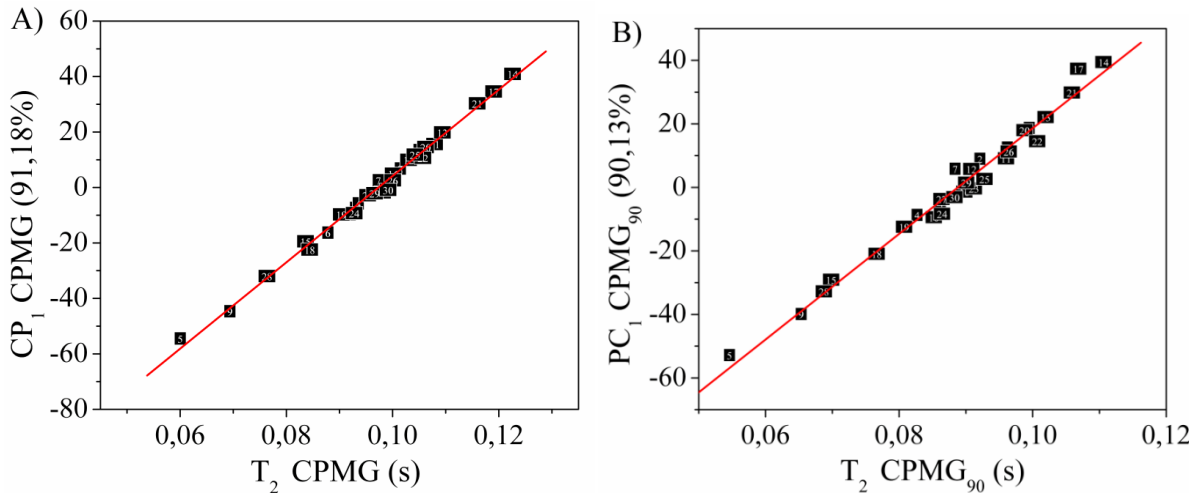


Figura 59. Curvas de correlação entre os valores de T₂ das 31 amostras obtidos por ajuste mono exponencial e o componente principal 1 (PC₁) do PCA, A) dados obtidos pela técnica CPMG e B) dados obtidos pela técnica CPMG₉₀.

Comparando-se os PC₁ obtidos para CPMG e CPMG₉₀, na Figura 60 é possível observar que esses componentes apresentaram uma correlação de 0,98, demonstrando que existe grande similaridade entre os dados fornecidos pelas PCAs.

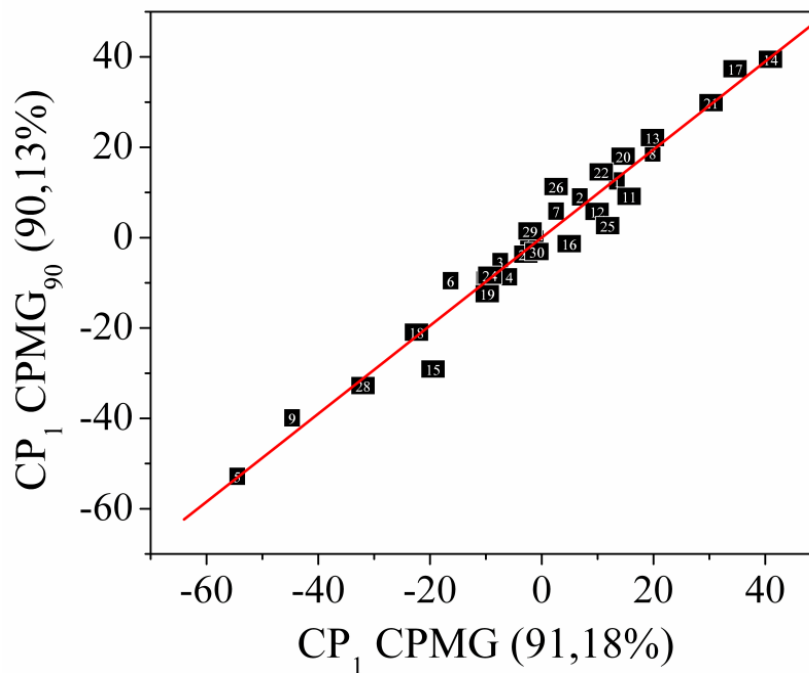


Figura 60. Curva de correlação entre os valores de PC₁ do PCA dos sinais obtidos pela técnica CPMG e CPMG₉₀.

Portanto, considerando as correlações entre os valores de T₂ entre si e com os valores das PC₁ das PCAs foi possível afirmar que para sementes oleaginosas, as medidas de T₂

podem ser realizadas com pulsos de refocalização de 90° (CPMG₉₀) o qual requer somente 25% da potência de RF utilizada em CPMG convencional. Isto reduz o problema de aquecimento na sonda e também reduz a potência incidida na amostra.

4.5.2 Análise online com as seqüências CWFP e CP-CWFP

Na Figura 61 podem ser observados os sinais das 31 amostras de espécies de plantas oleaginosas obtidos por CWFP e CP-CWFP no sistema *online*. As amplitudes do M_0 e do estado estacionário (M_{EE}) dos sinais obtidos por CWFP foram idênticos, ao obtidos por CP-CWFP.

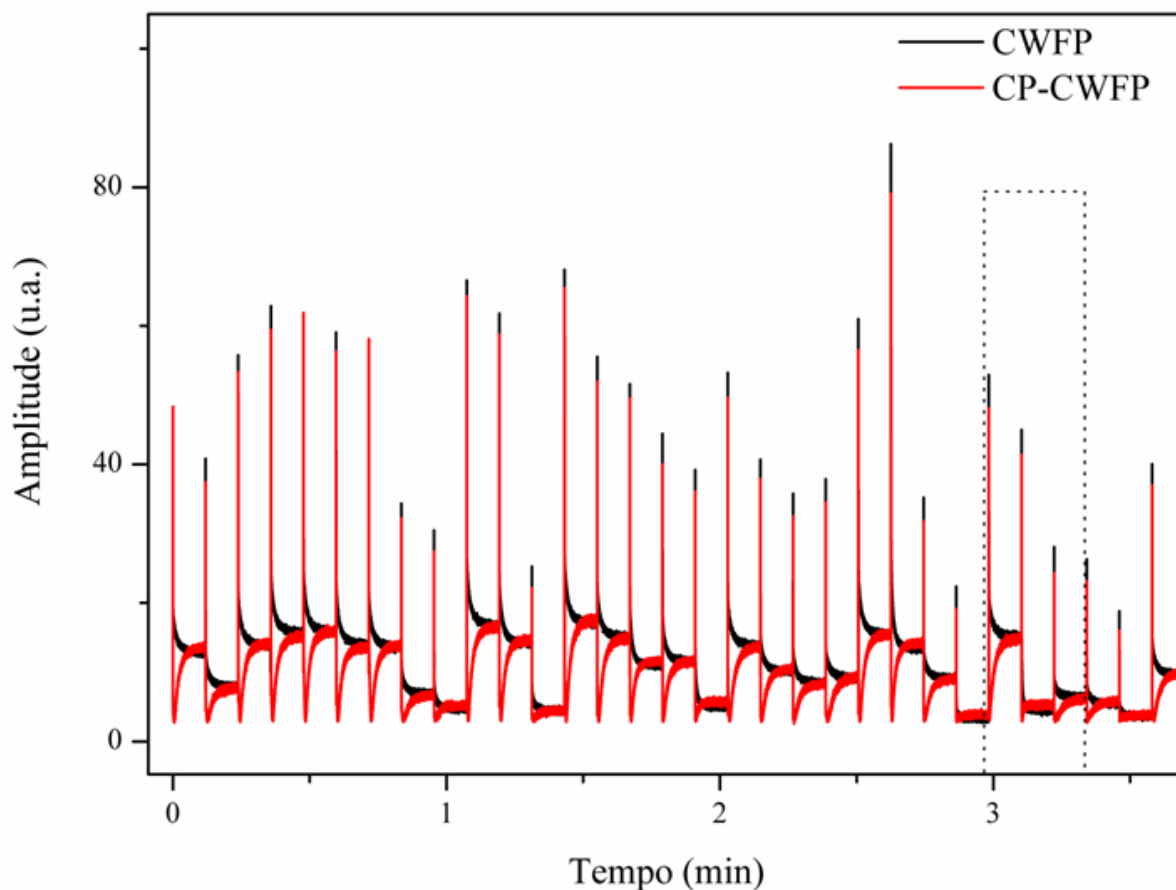


Figura 61. Sinais dos óleos das 31 sementes oleaginosas obtidos com as seqüências CWFP e CP-CWFP com o método *online stop and flow*.

Na Figura 62 é apresentada uma expansão do sinal entre 2,55 e 3,35 minutos, onde estão os sinais de óleo da macaúba, mamona e melancia. Nessa Figura pode ser observado que

o sinal do óleo da mamona decaiu mais rápido e apresentou a menor amplitude no EE (0,11). Isso ocorreu porque em $2,1 T$ o valor de T_1 da amostra desse óleo é cerca de $11T_2$.

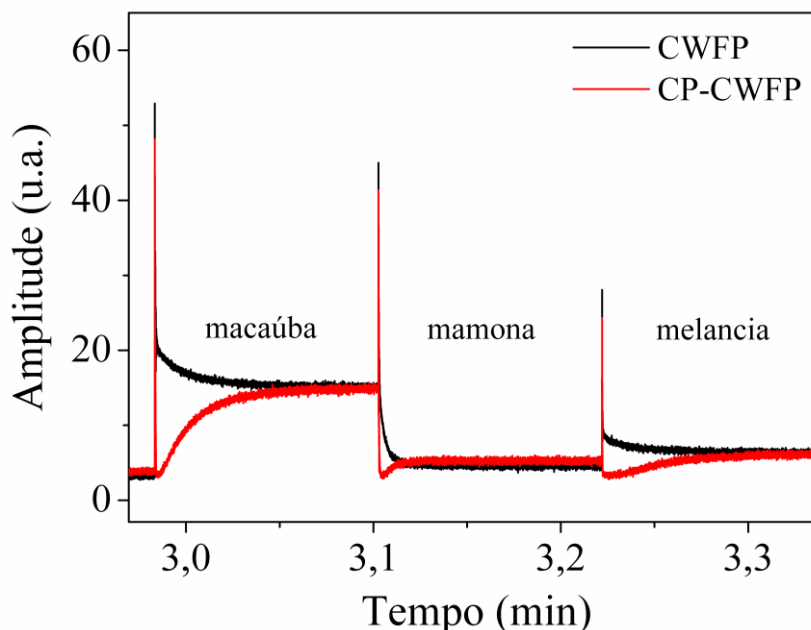


Figura 62. Sinais dos óleos de macaúba, mamona e melancia obtidos com as sequências CWFP e CP-CWFP com o método *online stop and flow*.

A melancia apresentou baixa amplitude devido à quantidade de óleo da semente em relação à macaúba, que apresentou uma maior amplitude do EE (0,30). No entanto o sinal obtido para o óleo da semente de melancia possui uma amplitude relativa para o sinal normalizado (0,31) similar a obtida para a macaúba. Assim como para os dados de CPMG e CPMG₉₀, optou-se por excluir a mamona da maioria das análises, utilizando apenas os decaimentos para ilustração.

Os sinais das amostras foram adquiridos em menos de 4 minutos como método *stop and flow*, sendo que para cada amostra foram realizados 4 promediações. Se realizado apenas uma medida, é possível analisar quase 2000 amostras por hora.

Na Figura 63 pode ser observada a correlação entre as constantes de tempo do EQE T^* , obtido por ajuste monoexponencial dos sinais CWFP e CP-CWFP das 31 amostras.

A correlação entre os valores de T^* obtidos pelas duas técnicas foi de 0,86. Esses resultados demonstram que T^* obtido por CP-CWFP possui a mesma dependência dos tempos de relaxação que CWFP (Equação 3).

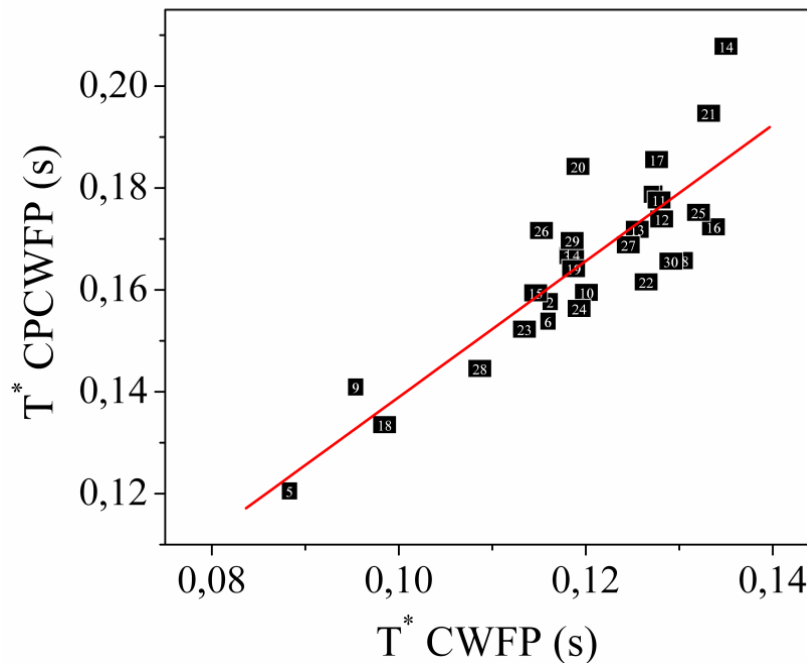


Figura 63. Curva de correlação entre os valores das constantes T^* dos dados obtidos por CWFP e CP-CWFP.

A Figura 64A apresenta a comparação da razão M_{EE}/M_0 de CWFP e de CP-CWFP. A Figura 64B apresenta a comparação entre a razão T_1/T_2 calculados através das Equações 4 e 5 utilizando os valores de T^* e M_{EE}/M_0 obtidos com as seqüências CWFP e CP-CWFP.

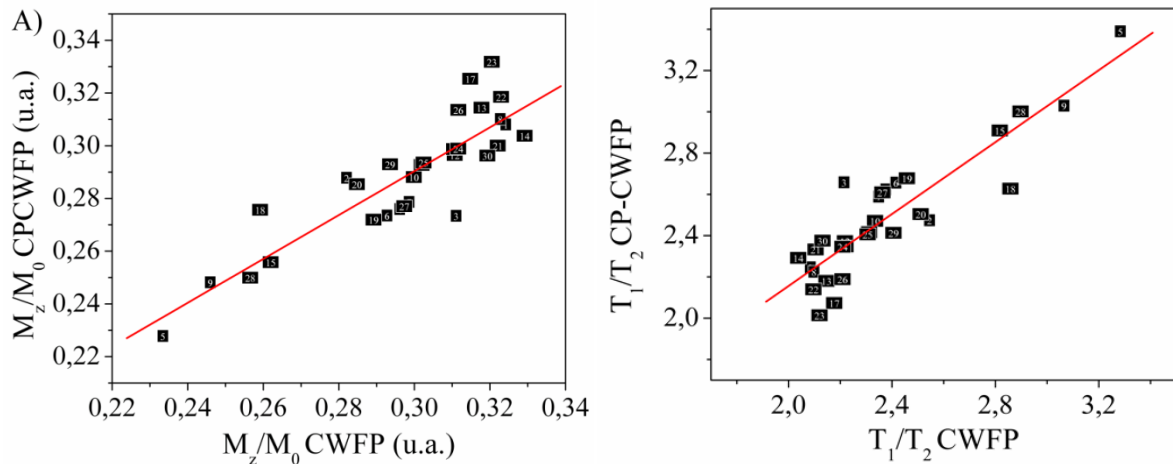


Figura 64. Curva de correlação entre às razões M_z/M_0 e T_1/T_2 dos dados obtidos por CWFP e CP-CWFP.

A correlação entre os dados obtidos com as duas seqüências foi de 0,88 para a razão M_{EE}/M_0 e 0,90 para a razão T_1/T_2 . Uma das vantagens apresentadas da técnica CP-CWFP é a variação de intensidade do EQE para EE muito maior que a observada no CWFP. Isso é muito relevante quando as amostras têm valor similar de T_1 e T_2 como é o caso das sementes

Resultados e Discussão

oleaginosas que apresentam altos teores de ácidos graxos poliinsaturados medidos em campos magnéticos muito baixos.

Na Figura 65 A e B pode-se visualizar que os valores de T_2 obtidos por CPMG apresentaram uma correlação com os valores de T_2 calculados de CWFP e CP-CWFP de 0,90 e 0,94, respectivamente.

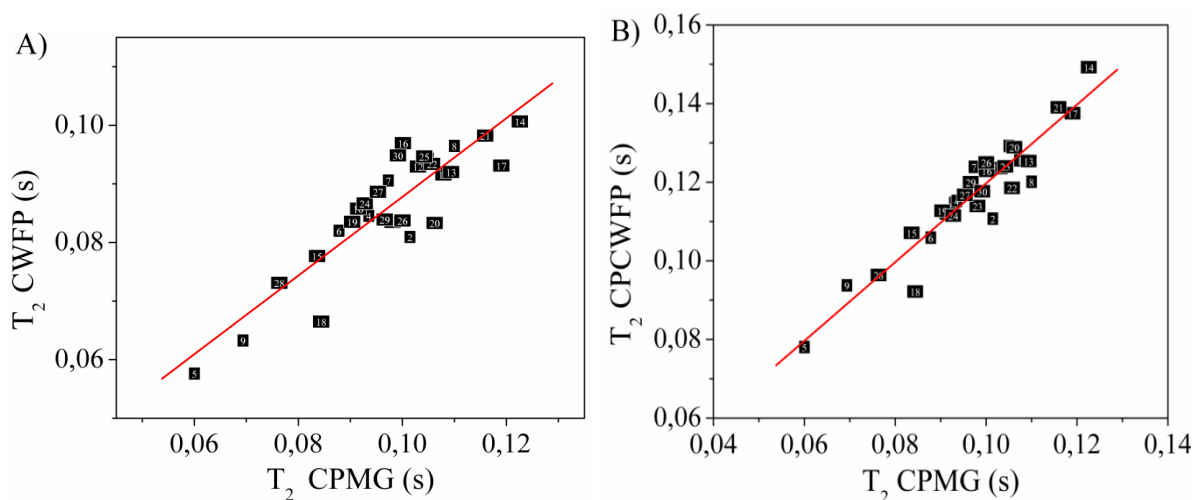


Figura 65. Curvas de correlação dos valores de T_2 ajustados mono exponencialmente, A) entre CP-CWFP e CPMG e B) entre CP-CWFP e CWFP.

Esses resultados comparativos indicam que os dados fornecidos pela sequência CP-CWFP podem ser utilizados em análises qualitativas para a obtenção de T_1 e T_2 .

4.5.2.1 Análises de CP-CWFP e CWFP por métodos multivariados

A Figura 66 apresenta um gráfico de PCA auto-escalado, utilizando 3 PCs que representaram 99,42% da variância acumulativa, sendo que PC_1 e PC_2 representaram 95,01% e 3,70% dos dados, respectivamente.

A disposição dos dados no gráfico de PCA parece não ter relação somente com a viscosidade dos óleos das sementes como observado para as sequências CPMG e CPMG₉₀, apesar de os primeiros grupos compostos pela nhandiroba (5) e café (9), moringa (18), rabanete (28) e macadâmia (15), ao lado esquerdo do gráfico, ser muito similares com os grupos encontrados nessas sequências. Isso ocorre porque CWFP e CP-CWFP além de ter relação com T_2 também depende de T_1 .

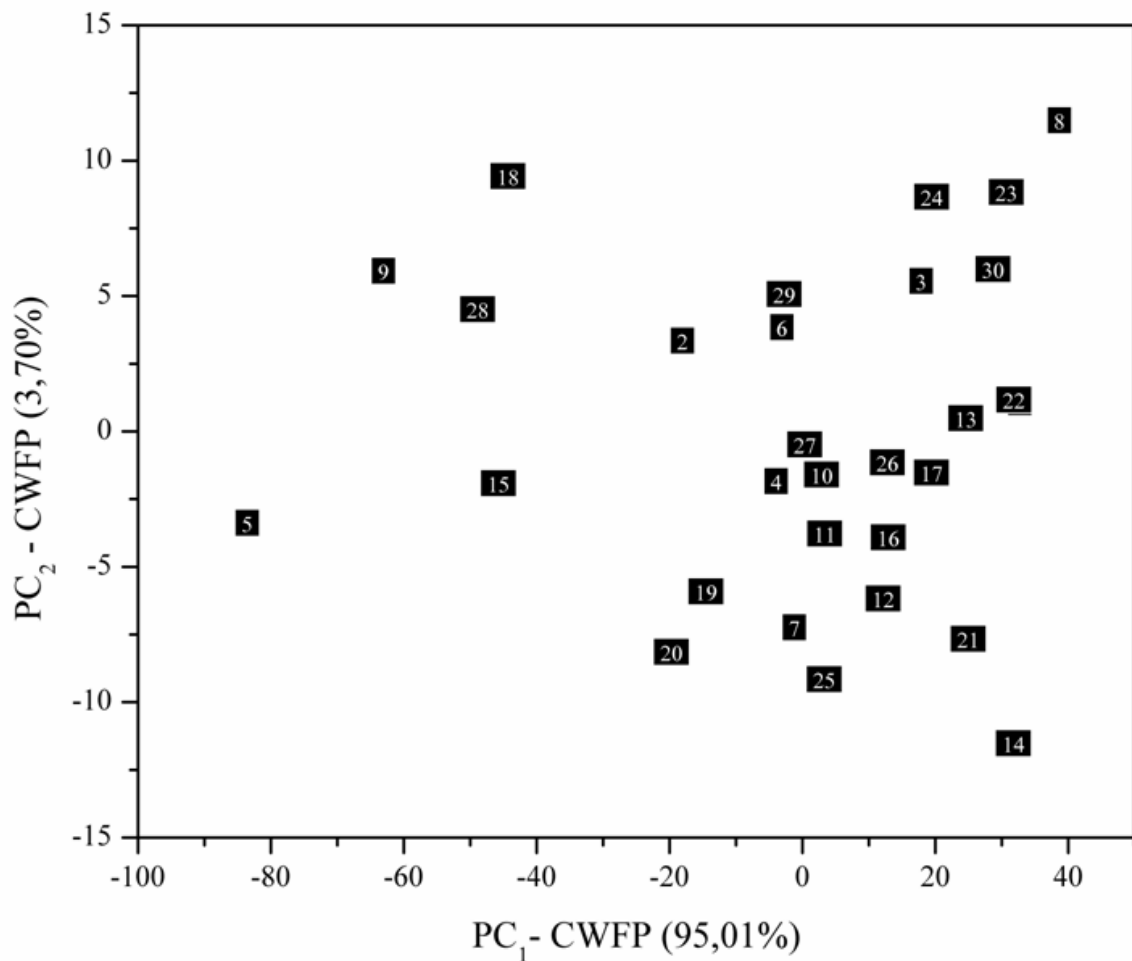


Figura 66. Gráfico dos escores obtidos com a análise por PCA dos dados obtidos por CWFP.

Na Figura 67 é apresentada uma correlação entre o PC₁ obtido pela PCA e a razão T_1/T_2 obtido pelos cálculos com as Equações 4 e 5 para os dados de CWFP.

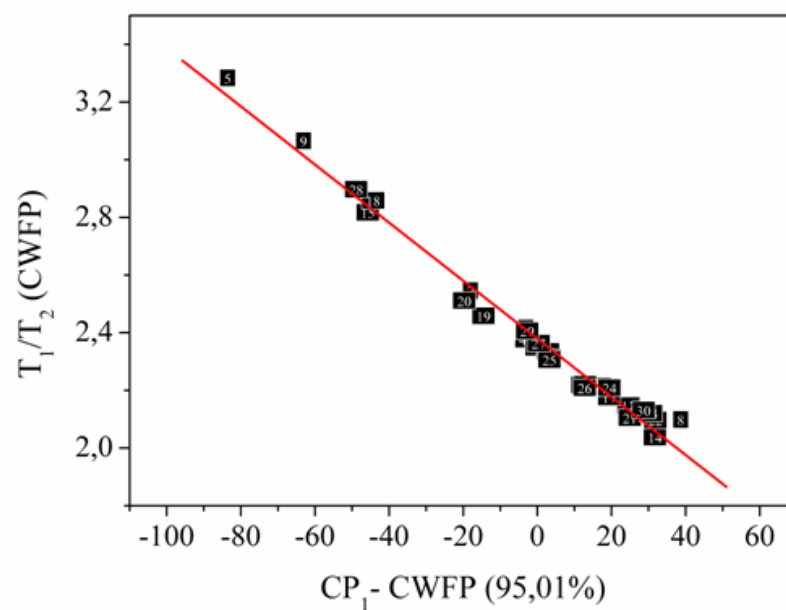


Figura 67. Curva de correlação entre a razão T_1/T_2 e valores de PC₁ do PCA dos sinais obtidos pela técnica CWFP.

Resultados e Discussão

Essa Figura ilustra que existe uma boa correlação (0,99) entre o PC_1 que possui 95% da variação dos dados e a razão T_1/T_2 de CWFP. Esse resultado justifica a distribuição dos dados no gráfico de PCA, ou seja, além de T_2 existe também a influência de T_1 .

O valor de T_2 das amostras de nhandiroba (5) e café (9) foi de 0,058 e 0,063 s, respectivamente; enquanto o T_1 foi 0,189 e 0,194 s, portanto T_1 foi 3 vezes maior para essas amostras. A mamona apresentou T_1/T_2 de 7,5 nessas análises, já a maioria das outras amostras de oleaginosas a razão T_1/T_2 foi aproximadamente 2.

A Figura 68A, evidencia que PC_1 possui influência T_2 ($r = 0,90$), uma vez que a correlação com T_1 é praticamente nula (Figura 68B).

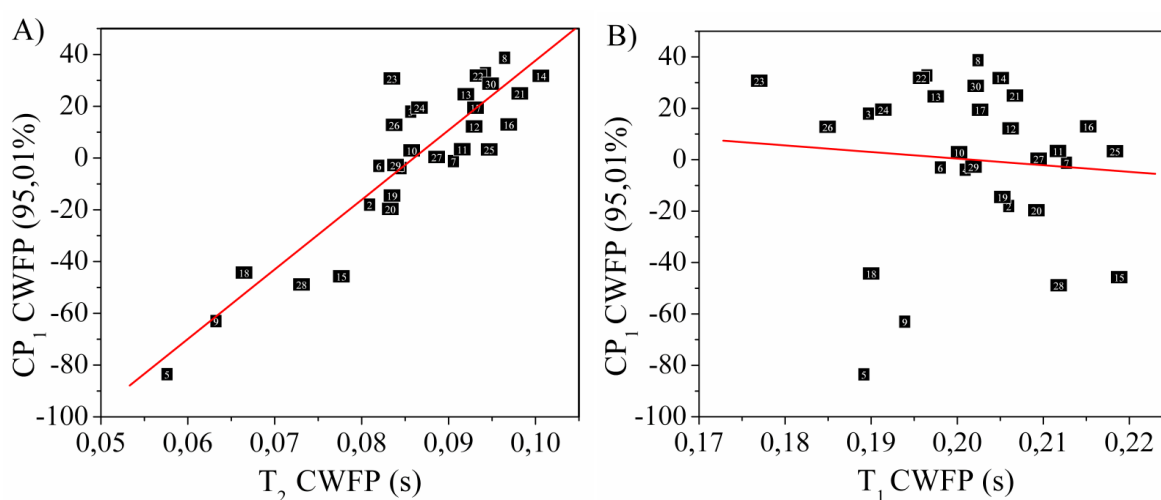


Figura 68. Curvas de correlação entre os tempos de relaxação calculados, obtidos por ajuste mono exponencial do sinal de CWFP e o componente principal 1 (PC_1) do PCA, A) tempo de relaxação T_2 e B) tempo de relaxação T_1 .

A Figura 69A e B, evidência que PC_2 possui uma correlação de 0,32 com T_2 e 0,55 com T_1 . Portanto, existe a influência de ambos os tempos de relaxação na disposição dos dados obtidos por CWFP no gráfico de PCA.

Isso explica as diferenças ocorridas entre os gráficos de PCA de CPMG e CWFP. Assim quanto mais viscosa for a amostra analisada, maior será a diferença entre T_1 e T_2 e, portanto, entre CWFP e CPMG.

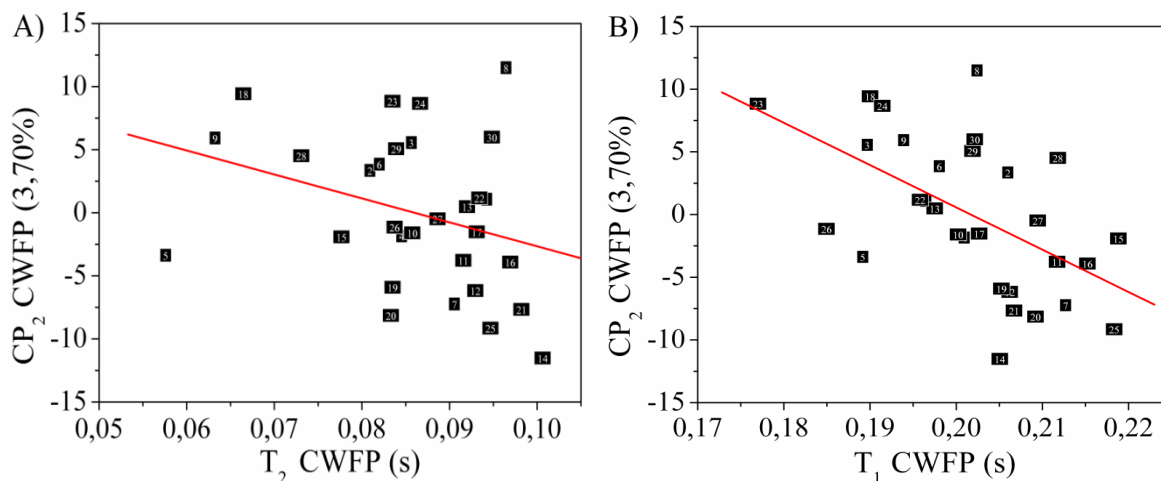


Figura 69. Curvas de correlação entre os tempos de relaxação calculados, obtidos por ajuste mono exponencial do sinal de CWFP e o componente principal 2 (PC₂) do PCA, A) tempo de relaxação T₂ e B) tempo de relaxação T₁.

Os dados obtidos por CP-CWFP também foram analisados por PCA. A Figura 70 apresenta um gráfico de PCA auto-escalado, utilizando 3 PCs que representaram 99,20% da variância acumulativa, sendo que PC₁ e PC₂ representaram 85,54% e 12,71% dos dados, respectivamente.

A disposição dos dados no gráfico de PCA apresentou um tanto diferente da disposição obtida com os dados de CWFP, uma vez que existem diferenças entre os sinais. Mesmo assim, as amostras de nhandiroba (5), café (9) e rabanete (28) se mantiveram ao lado esquerdo do gráfico, como dispostos em todos os gráficos de PCA apresentados. Também o valor da PC₂ foi alto, ou seja, 12,71% em comparação com os outros valores de PC₂, 2,91%, 3,54% e 3,70% para os dados de CPMG, CPMG₉₀ e CWFP, respectivamente.

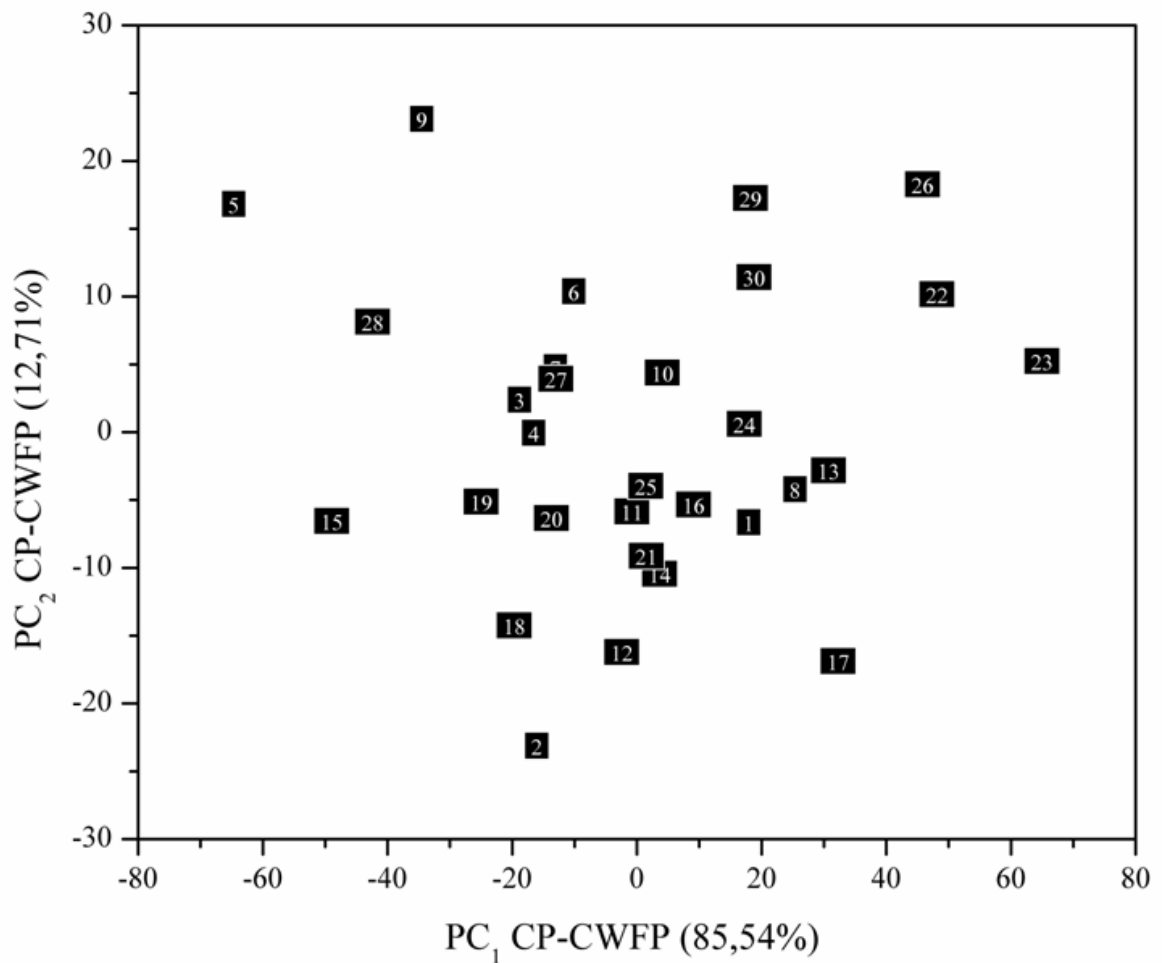


Figura 70. Gráfico dos escores obtidos com a análise e por PCA dos dados obtidos por CP-CWFP.

Na Figura 71 é apresentada uma correlação entre o PC₁ obtido pela PCA e a razão T_1/T_2 obtido pelos cálculos com as Equações 4 e 5 para os dados de CP-CWFP.

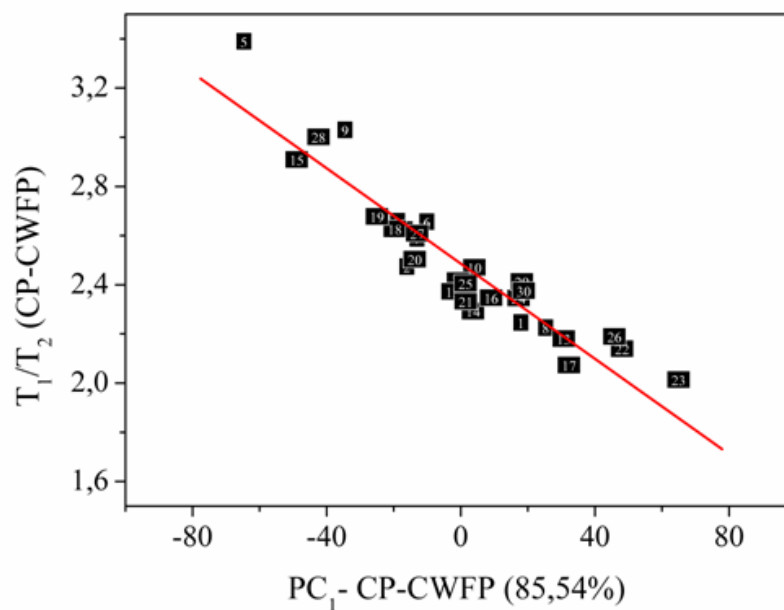


Figura 71. Curva de correlação entre a razão T_1/T_2 e valores de PC₁ do PCA dos sinais obtidos pela técnica CP-CWFP.

Resultados e Discussão

Essa Figura ilustra que existe uma correlação 0,93 entre o PC_1 que possui 85,5% da variação dos dados e a razão T_1/T_2 de CP-CWFP. Esse resultado é similar ao encontrado para CWFP. Assim a distribuição dos dados no gráfico de PCA também é influenciada por T_2 e T_1 .

Seguindo a mesma linha de análise de CWFP, foram correlacionados os valores de PC_1 e PC_2 com T_2 e T_1 (Figura 72A e B).

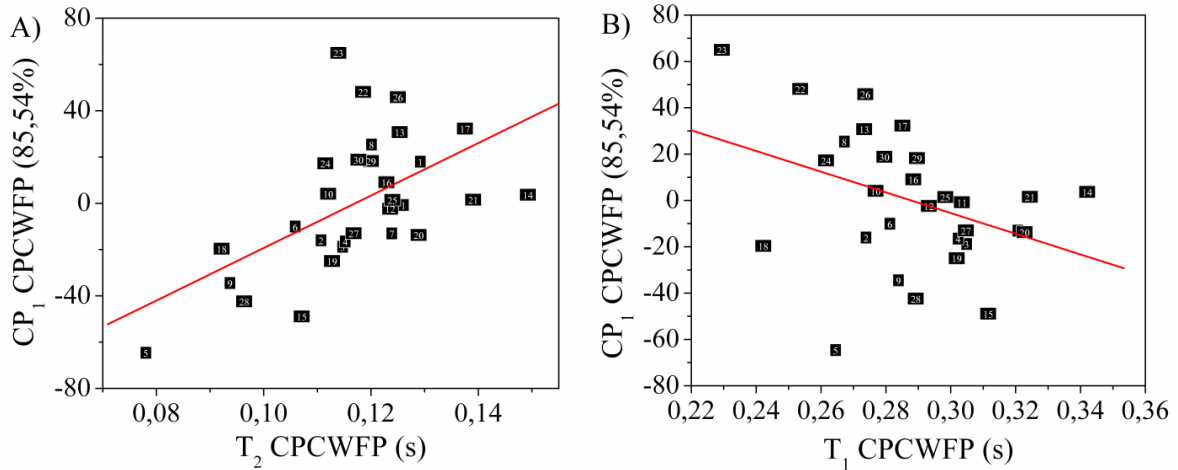


Figura 72. Curvas de correlação entre os tempos de relaxação calculados, obtidos por ajuste mono exponencial do sinal de CP-CWFP e o componente principal 1 (CP_1) do PCA, A) tempo de relaxação T_2 e B) tempo de relaxação T_1 .

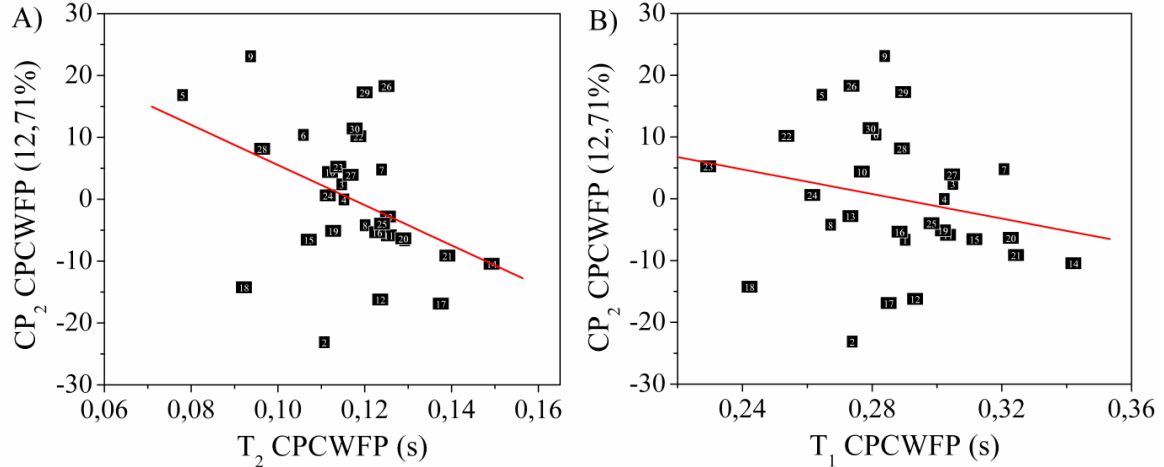


Figura 73. Curvas de correlação entre os tempos de relaxação calculados, obtidos por ajuste mono exponencial do sinal de CP-CWFP e o componente principal 2 (CP_2) do PCA, A) tempo de relaxação T_2 e B) tempo de relaxação T_1 .

Nesses dados é possível observar que existe uma baixa correlação de PC_1 com T_2 (0,56), se comparado com os dados de CWFP. Analisando CP_2 com os tempos de relaxação (Figura 73A e B), podemos observar que também houve maior correlação de CP_2 com T_2 do que com T_1 , ao contrário do observado nos dados obtidos por CWFP (Figuras 69A e B). Isso mais uma vez explica as diferenças ocorridas entre os gráficos de PCA de CP-CWFP e CWFP.

CONCLUSÕES

O estudo da sequência de pulsos CPMG utilizando LRFA permitiu concluir que em B_0 homogêneos ($\Delta\nu \leq 15$ Hz) qualquer ângulo de refocalização pode ser utilizado para a obtenção dos valores de T_2 . No entanto, a escolha dos menores ângulos de refocalização em B_0 menos homogêneos ($\Delta\nu \leq 100$ 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 .

Considerando a sequência CP, foi observado que o uso de LRFA produziu sinais de eco de spin pelos primeiros pulsos, os quais se tornaram sinais SSFP, compostos por um sinal FID logo após aplicação do pulso, seguido de um eco antes do próximo pulso. Os sinais obtidos por CP_{90} utilizando $\tau < T_2^*$ e frequência de defasamento de offset (ψ) em números ímpares de π , o sinal apresentou muitas similaridades com CWFP, possibilitando a determinação simultânea de T_1 e T_2 em um único experimento. Nessa condição, CP_{90} foi denominada CP-CWFP, com a grande vantagem sobre CWFP para amostras com $T_1 \sim T_2$. CP-CWFP apresenta uma variação de amplitude do EQE máxima, tornando o ajuste de T^* menos sensível, enquanto que CWFP apresenta uma variação mínima nesse estado tornando muito dependente da razão sinal/ruído.

Quando aplicado o método de alternância de fase em CPMG ($y'/-y'$) e CP ($x'-x'$) os sinais apresentam comportamentos similares a CP e CPMG, respectivamente. Enquanto que os sinais obtidos por $CPMG_{90}$ e CP_{90} com alternância de fase entram num EE. Nesse caso $CPMG_{90}$ e CP_{90} tiveram comportamentos similares à CP-CWFP, sendo mais uma alternativa para obtenção de T_1 e T_2 .

Portanto, o uso de LRFA pode ser uma alternativa para reduzir a potência de RF em análises qualitativas *online* utilizando $CPMG_{90}$ com uma redução de 75% da potência incidida na amostra. A sequência CP-CWFP pode ser uma técnica mais robusta para análises em espectrômetros de RMN de bancada, normalmente utilizados em controle de qualidade de processos industriais, com $B_0 < 0,5$ T (20 MHz) e em ferramentas de RMN utilizadas em poços de petróleo com $B_0 \sim 0,05$ T (2 MHz). Os resultados das análises por métodos estatísticos demonstraram que o desenvolvimento dessas sequências de baixa potência é mais um passo a favor da implementação do sistema *online* na indústria.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 NORDON, A.; MCGILL, C. A.; LITTLEJOHN, D. Process NMR spectrometry. **The Analyst**, v. 126, p. 260-272, 2001.
- 2 WATANABE, N.; NIKI, E. Direct-coupling of FT-NMR to high performance liquid chromatography. **Proceedings of Japan Academy**, v. 54B, p. 194-199, 1978.
- 3 TELLIER, C.; MARIETTE, F. *Online* applications in food science. **Annual Reports on NMR Spectroscopy**, v. 31, p. 105-122, 1995.
- 4 HILLS, B. P.; WRIGHT, K. M. Motional relativity and industrial NMR sensors. **Journal of Magnetic Resonance**, v. 178, p. 193-205, 2006.
- 5 BONASTRE, A.; ORS, R.; CAPELLA, J. V.; FABRA, M. J.; PERIS, M. *Inline* chemical analysis of wastewater: present and future trends. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 24, p. 128-137, 2005.
- 6 FOX, R. W.; MCDONALD, A. T. **Introdução à mecânica dos fluidos**. 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 1995. 662 p.
- 7 SURYAN, G. Nuclear Resonance in flowing liquids. **Proceedings of the Indian Academy of Sciences**, v. 33A, p. 107-111, 1951.
- 8 SINGER, J. R. Blood flow rates by nuclear magnetic resonance measurements. **Science**, v. 130, p. 1652-1653, 1959.
- 9 LADNER, W. R.; STACEY, A. E. Measurement of moisture in a moving coal feed. **Britanic Journal of Applied Physics**, v. 13, p. 136, 1961.
- 10 MCIVOR, M. C. A flow probe for nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Journal of Scientific Instruments (Journal of Physics E)**, v. 2, p. 292-293, 1969.
- 11 GROVER, T.; SINGER, J. R. NMR spin-echo flow measurements. **Journal of Applied Physics**, v. 42, p. 938-940, 1971.
- 12 SUDMEIER, J. L.; PESEK, J. J. Fast kinetics by stopped-flow chlorine-35 nuclear magnetic resonance. Reactions of mercury (II)-bovine serum albumin with various ligands. **Inorganic Chemistry**, v. 10, p. 860-863, 1971.
- 13 PEARSON, R. M.; REAM, L. R.; JOB, C.; ADAMS, J. The use of small NMR spectrometers for *online* process control. **Cereal Foods World**, v. 32, p. 822-826, 1987.
- 14 RENO, J. P.; BRIGUET, A.; GATELLIER, P.; KOPP, J. Determination of fat and water ratios in meat products by high resolution NMR at 19.6 MHz. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 22, p. 169-172, 1987.

Referências Bibliográficas

- 15 NICHOLLS, C. I.; DE LOS SANTOS, A. Hydrogen transient nuclear magnetic resonance for industrial moisture sensing. **Drying Technology**, v. 9, p. 849-873, 1991.
- 16 CHEN, P.; MCCARTHY, M. J.; KAUTEN, R.; SARIG, Y.; HAN, S. Maturity evaluation of avocados by NMR methods. **Journal Agricultural Engineering Research**, v. 55, p. 177-187, 1993.
- 17 ZION, B.; KIM, S. M.; MCCARTHY, M. J.; CHEN, P. Detection of pits in olives under motion by nuclear magnetic resonance. **Journal of Science of Food Agriculture**, v. 75, p. 496-502, 1997.
- 18 CLARK, C. J.; HILLS, B. P. Quality assessment of horticultural products by NMR. **Annual Reports on NMR Spectroscopy**, v. 50, p. 75-120, 2003.
- 19 TU, S. S.; CHOI, Y. J.; MCCARTHY, M. J.; MCCARTHY, K. L. Tomato quality evaluation by peak force and NMR spin-spin relaxation time. **Postharvest Biology and Technology**, v. 44, p. 157-164, 2007.
- 20 HERNÁNDEZ-SÁNCHEZ, N.; HILLS, B. P.; BARREIRO, P.; MARIGHETO, N. An NMR study on internal browning in pears. **Postharvest Biology and Technology**, v. 44, p. 260-270, 2007.
- 21 AZEREDO, R. B. V. **Espectroscopia de RMN CWFP**. 2004. 85f. Tese (Doutorado em Físico-Química) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2004.
- 22 AZEREDO, R. B. V.; ENGELSBERG, M.; COLNAGO, L. A. Flow sensitivity and coherence in steady-state free spin precession. **Physical Review E**, v. 64, p. 16309-16313, 2001.
- 23 AZEREDO, R. B. V.; COLNAGO, L. A.; SOUSA, A. A.; ENGELSBERG, M. Continuous wave free precession: a practical analytical tool for low resolution NMR measurements. **Analytica Chimica Acta**, v. 478, p. 313-320, 2003.
- 24 COLNAGO, L. A.; ENGELSBERG, M.; SOUZA, A. A.; BARBOSA, L. L. High-throughput, non-destructive determination of oil content in intact seeds by continuous wave-free precession NMR. **Analytical Chemistry**, v. 79, p. 1271-1274, 2007.
- 25 VENÂNCIO, T.; ENGELSBERG, M.; AZEREDO, R. B. V.; ALEM, N. E. R.; COLNAGO, L.A. Fast and simultaneous measurement of longitudinal and transverse NMR relaxation times in a single continuous wave free precession experiment. **Journal of Magnetic Resonance**, v. 173, p. 34-39, 2005.
- 26 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**, v. 393, p. 1357-1360, 2009.
- 27 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**, v. 596, p. 325-329, 2007.

Referências Bibliográficas

- 28 KNOTHE, G. Kinematic viscosity of biodiesel fuel components and related compounds. Influence of compound structure and comparison to petrodiesel fuel components. **Fuel**, v. 84, p. 1059–1065, 2005.
- 29 HAHN, E. L. Spin echoes. **Physical Review**, v. 80, p. 580-594, 1950.
- 30 CARR, H. Y.; PURCELL, E. M. Effects of diffusion on free precession in nuclear magnetic resonance experiments. **Physical Review**, v. 94, p. 630-638, 1954.
- 31 MEIBOOM, S.; GILL, D. Modified spin-echo method for measuring nuclear relaxation times. **The Review of Scientific Instruments**, v. 29, p. 93-102, 1958.
- 32 GOELMAN, G.; PRAMMER, M. G. The CPMG pulse sequence in strong magnetic field gradients with applications to oil-well logging. **Journal of Magnetic Resonance, Series A**, v. 113, p. 11-18, 1966.
- 33 BLOCH, F. Nuclear induction. **Physical Review**, v. 70, p. 460-474, 1946.
- 34 MANSFIELD, P.; MORRIS, P. G. **NMR imaging in biomedicine**. New York: Academic Press, 1982. 354 p.
- 35 FERREIRA, M. M. C.; ANTUNES, A. M. MELGO, M. S.; VOLPE, P. L. O. Quimiometria I: calibração multivariada, um tutorial. **Química Nova**, v. 22, p. 724-731, 1999.
- 36 HENNIG, J. Multiecho imaging sequences with low refocusing flip angles. **Journal of Magnetic Resonance**, v. 78, p. 397-407, 1988.
- 37 ALSOP, D. C. The sensitivity of low flip angle RARE imaging. **Magnetic Resonance in Medicine**, v. 37, p. 176-184, 1997.
- 38 WILLIAMS, C. F. M. The influence of stimulated echoes on contrast in fast spin-echo imaging. **Magnetic Resonance Imaging**, v. 14, p. 419-428, 1996.
- 39 FUKUSHIMA, E.; ROEDER, S. B. W. **Experimental pulse NMR: a nuts and bolts approach**. Reading: Addison-Wesley, 1981. 539 p.
- 40 FARRAR, T.; BECKER, E. D. **Pulse and Fourier transform NMR: introduction to theory and methods**. New York: Academic Press, 1971. 115 p.
- 41 ANDRADE, F.D.; NETTO, A. M.; COLNAGO, L. A. Qualitative analysis by *online* nuclear magnetic resonance using Carr-Purcell-Meiboom-Gill sequence with low refocusing flip angles. **Talanta**, v. 84, p. 84-88, 2011.
- 42 CARR, H. Y. Steady-state free precession in nuclear magnetic resonance. **Physical Review**, v. 112, p. 1693-1701, 1958.
- 43 FREEMAN, R.; WITTEKOEK, S. Selective determination of relaxation times in high resolution NMR. **Journal of Magnetic Resonance**, v. 1, p. 238-276, 1969.
- 44 BĂLIBANU, F.; HAILU, K.; EYMAEL, R.; DEMCO, D. E., BLÜMICH, B. Nuclear magnetic resonance in inhomogeneous magnetic fields. **Journal of Magnetic Resonance**, v. 145, p. 246-258, 2000.

Referências Bibliográficas

- 45 SANTOS, P. M.; SOUZA, A. A.; COLNAGO, L. A. Fast acquisition of ^{13}C NMR spectra using the Steady-State Free Precession Sequence. **Applied Magnetic Resonance**, v. 40, p. 331-338, 2011.
- 46 MATTSON, F.H.; VOLPENHEIN, R. A. The specific distribution of fatty acids in the glycerides of vegetable fats. **Journal of the Biological Chemistry**, v. 16, p. 1891-1894, 1961.
- 47 KAIJER, A. DUTTA, P.; SAVAGE, G. Oxidative stability and lipid composition of macadamia nuts grows in New Zealand. **Food Chemistry**, v. 71, p. 67-70, 2000.
- 48 KALAYASIRI, P.; JEYASHOKE, N.; KRISNANGKURA, K. Survey of seed oils for use as diesel fuels. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 73, p. 471-474, 1996.
- 49 ANWAR, M.; BHANGER, M. Analytical characterization of *Moringa oleifera* seed oil grown in temperature regions of Pakistan. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 6558-6563, 2003.
- 50 TAKEMOTO, E.; OKADA, I. A.; GARBELOTTI, M. L.; TAVARES, M. AUED-PIMENTEL, S. Chemical composition of seeds and oil of baru (*Dipteryx alata* Vog.) native from Pirenópolis, State of Goiás, Brazil. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 60, p. 113-117, 2001.
- 51 KAMAL-ELDIN, A.; ANDERSSON, R. A multivariate study of the correlation between tocopherol content and fatty acid composition in vegetable oils. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 74, p. 375-380, 1997.
- 52 GAMBHIR, P. N. C-136 NMR-spectroscopy of intact oilseeds – a rapid method for measurement fatty-acid composition. **Proceedings of the Indian Academy of Sciences – Chemical Science**, v.106, p. 1583-1594, 1994.
- 53 TSAMOURIS, G.; HATZIANTONIOU, S.; DEMETZOS, C. Lipid analysis of Greek walnut oil (*Juglans regia* L.). **Zeitschrift fuer Naturforschung**, v. 57, p. 51-56, 2002.
- 54 EL-ADAWY, T. A.; TAHA, K. M. Characteristics and composition of watermelon, pumpkin and paprika seed oil and flours. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 1253-1259, 2001.
- 55 COLLIN, G. The kernel-fats of some members of the palmae: *Acrocomia sclerocarpa* mart. (gru-gru palm), *Manicaria saccifera* gaertn., *Astrocaryum Tucuma* mart., *Maximiliana caribaea* griseb., *Attalea excelsa* mart. (pallia palm), and *Coco nucifera* linn. (coconut). **Biochemical Journal**, v. 27, p. 1366-1372, 1933.
- 56 BORA, P. S. MOREIRA, R. V. R. Catolé palm (*Syagrus oleracea* mart.) fruits: fatty and amino acids composition. **Grasas y Aceites**, v. 54, p. 145-150, 2003.
- 57 HIANE, P. A.; FILHO, M. M. R.; RAMOS, M. I. L.; MACEDO, M. L. R. Bocaiúva, *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd., pulp and kernel oils: characterization and fatty acid composition. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 8, p. 256-259, 2005.
- 58 ALLEN, C. A. W, WATTS, K. C.; ACKMAN, R. G.; PEGG, M. J. Predicting the viscosity of biodiesel fuels from their fatty acid ester composition. **Fuel**, v. 78, p. 1319-1326, 1999.