UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

*Avaliação da qualidade de frutas por Ressonância Magnética Nuclear
em baixa resolução*

Fayene Zeferino Ribeiro

Dissertação apresentada ao
Instituto de Química de São
Carlos, como um dos
requisitos para a obtenção do
título de Mestre em Ciências
(Química Analítica)

Orientador: Dr. Luiz Alberto Colnago

São Carlos – SP
2008

Aos meus pais, meus irmãos e
meu namorado Carlinhos.

AGRADECIMENTOS

À Deus que me deu força.

Ao meu orientador pela oportunidade, paciência e pelo conhecimento obtido.

À Dr. Lucinéia pela amizade, pelo conhecimento, por tudo. Lu te adoro.

Aos meus pais queridos, sem eles não seria possível o desenvolvimento desse trabalho. Pai, Mãe vocês são a razão da minha vida, obrigada por tudo.

Ao meu namorado Carlos pelo incentivo, pela paciência, pelo carinho. Eu te amo muito.

Aos meus dois irmãos Fábio e Mateus, mesmo longe estavam me apoiando e ajudando, amo vocês dois.

Ao Sr. Carlos, a Sra. Adelaide e a Maria, vocês são especiais para mim, me ajudaram muito nessa parte da minha vida, obrigada.

Ao pessoal da Embrapa e da USP.

Ao grupo de RMN.

RESUMO

Avaliou-se o uso da Ressonância Magnética Nuclear (RMN) em baixa resolução na análise da qualidade interna de frutas intactas, como 'banana ouro' e 'uva Itália', que são frutas climatéricas, isto é, continuam amadurecendo após a colheita, e não-climatéricas, respectivamente. As análises das bananas foram realizadas com a sequência de pulsos CPMG (Carr-Purcell-Meibom-Gill), que gera um sinal dependente do tempo de relaxação transversal (T_2).

Demonstrou-se que a banana apresenta a água distribuída em três ambientes, vacúolo, citoplasma e parede celular, que tem T_2 de 0,5, 0,1 e 0,01s respectivamente. Esses sinais têm intensidade relativa de 0,8; 0,15 e 0,05 respectivamente. Observou-se que os T_2 de todos esses componentes aumentam com o amadurecimento de banana. Estudou-se também o efeito de compressão e congelamento nas bananas ouro e observou-se que a intensidade do T_2 mais longo decresce em ambos os casos.

As análises das uvas foram realizadas com as sequências de pulsos CPMG, Inversão-Recuperação (IR), que mede o tempo de relaxação longitudinal (T_1) e com a sequência de pulsos de precessão livre de onda contínua (CWFP), que gera um sinal que depende tanto de T_1 quanto de T_2 . Como a uva não amadurece após a colheita essas análises foram usados para avaliar a correlação com os parâmetros de qualidade interna como brix, pH, firmeza e umidade. Os dados de RMN das uvas foram analisados com métodos quimiométricos como análises de componentes principais e regressão por mínimos quadrados parciais e demonstraram que tem alta correlação com brix e umidade e pouca ou nenhuma correlação com pH e firmeza.

Abstract

The internal quality of fresh gold banana and grape was analyzed by Low resolution NMR. The banana analysis had been performed with CPMG (Carr-Purcell-Meibom-Gill) pulse sequence, that generates a decaying signal, dependent of the transverse relaxation time (T_2). The results show that water in banana is distributed in three environments, vacuole, cytoplasm and cellular wall, with T_2 of 0,5, 0.1 and 0,01s respectively. The relative intensity of signals are 0,8; 0,15 and 0,05, respectively. The T_2 increases with banana ripeness. The effect of compression and freezing in the bananas was also studied by CPMG. The results show that the intensity of the longest T_2 decreases in both the cases.

The grapes had been analyzed with the pulse sequences CPMG, Inversion-Recovery (IR), which measures the longitudinal relaxation time (T_1) and continuous wave free precession (CWFP), that depends on T_1 and T_2 . As the grape does not ripen after harvesting these analyses had been used to evaluate the correlation with the internal quality parameters such as brix, pH, firmness and moisture. The NMR data had been analyzed with chemometric methods such as principal component analysis (PCA) and partial least square regression (PLS) and show high correlation with brix and moisture and almost no correlation with pH and firmness.

Lista de Figuras

Figura 1.1: Separação dos níveis de energia de um núcleo com spin $\frac{1}{2}$ na presença de B_0	4
Figura 1.2: Representação da diferença de energia entre as orientações α ($\frac{1}{2}$) e β ($-\frac{1}{2}$).....	5
Figura 1.3: Representação do movimento de precessão em relação ao campo magnético B_0	5
Figura 1.4: Diagrama da transição entre os níveis α e β , induzido pela incidência da rádio frequência.....	6
Figura 1.5: Representação do cone de precessão (a) e do vetor magnetização resultante (M_0) no estado de equilíbrio térmico (b).....	8
Figura 1.6: Efeito da aplicação de B_1 em M_0 no referencial rotativo.....	8
Figura 1.7: Rotação de M_{xy} na bobina de recepção (a) sinal induzido (FID) (b).....	9
Figura 1.8: Representação durante o retorno da magnetização para o eixo z.....	10
Figura 1.9: Recuperação da magnetização M_z/M_0 em relação ao tempo t/T_1	11
Figura 1.10: Representação esquemática da seqüência inversão recuperação.....	12
Figura 1.11: Representação vetorial da seqüência de pulsos IR.....	12
Figura 1.12: Modelo vetorial representando o processo de perda de coerência de fase no plano $x'y'$	12
Figura 1.13: Representação esquemática da seqüência de pulsos CPMG.....	14
Figura 1.14: Representação vetorial do efeito da seqüência de pulsos de CPMG sobre o sinal de RMN.....	15
Figura 1.15: Decaimento exponencial do sinal CPMG.....	15

Figura 1.16: Sinais de RMN- H^1 de uma amostra de 2,2mg de óleo de girassol: a) experimento FID adquirido com $T_p = 5T_1 = 690ms$, b) experimento de CWFP com T_p de 0,3ms. Para ambos os casos o tempo total de análise foi de 1,38s.....	18
Figura 1.17: Desenho esquemático de um sistema on line para medidas de CWFP.....	18
Figura 1.18: Amplitude do sinal CWFP para 96 amostras de semente de macadâmia com massas de óleo variando de 0,1 a 0,7 gramas, os 96 picos foram obtidos em 14 segundos (a). Massa de óleo em função do sinal CWFP da figura (b) o coeficiente de regressão linear foi de $r^2 = 0,95$	19
Figura 1.19: Representação do sinal de CWFP para uma amostra de ácido fosfórico com $T_1 = 190ms$ e $T_2 = 140ms$	20
Figura 1.20: Imagem tomográfica de manga com infestação (a), imagem tomográfica de espaços vazios ocasionados por distúrbios fisiológicos (b).....	22
Figura 1.21: Imagem tomográfica de injúrias mecânicas de goiaba. À esquerda é o controle do primeiro ao sexto dia, central sofreu impacto e à direita foi comprimida.....	23
Figura 1.22: Mudanças ocorridas no amadurecimento das frutas.....	26
Figura 1.23: Representação gráfica das composições de uma fruta durante seu desenvolvimento e amadurecimento.....	27
Figura 3.1: Representação da matriz de dados de RMN para análise de PCA.....	37
Figura 3.2: Matriz de dados de RMN e a dos parâmetros físico-químicos para a análise de PLS.....	38
Figura 4.1: Curvas de decaimento exponencial obtido com a técnica de CPMG para a amostra de banana (linha cheia) e os ajustes monoexponencial (A), biexponencial (B) e triexponencial (C) (linha vermelha).....	41

Figura 4.2: Esquema de uma célula vegetal explicando os diversos tempos de relaxação encontrados. (1) vacúolo, (2) citoplasma, (3) parede celular ^[28]	43
Figura 4.3: Espectro de relaxação transversal (relaxometria de T_2) do sinal da figura 4.1, utilizando a ILT.....	44
Figura 4.4: Curvas de decaimento exponencial obtidas com a técnica de CPMG para uma amostra de banana amarela no 1 ^o , 5 ^o e 8 ^o dias após a colheita.....	45
Figura 4.5: Aspecto externo de bananas ouro utilizado nas medidas. A superior foi considerada banana amarela e a inferior banana verde.....	45
Figura 4.6: Espectro de relaxação (relaxometria) para uma banana amarela em função do tempo de maturação.....	46
Figura 4.7: Correlação entre o T_2 e os tempo de maturação para uma banana amarela (A) e média de 3 amostras. A curva preta é o ajuste linear e a vermelha o sigmoidal.....	47
Figura 4.8: Variação da intensidade dos três sinais de relaxometria das médias de três bananas amarelas em função do tempo de maturação, (▲) água no vacúolo, (●) água no citoplasma(■) água na parede celular.....	48
Figura 4.9: Correlação entre o T_2 e os tempos de maturação para uma banana verde (a) e média de 3 amostras (b). A curva preta é o ajuste linear e a vermelha o sigmoidal.....	48
Figura 4.10: Variação da intensidade dos três sinais de relaxometria das médias de três bananas verdes em função do tempo de maturação, (▲) água no vacúolo, (●) água no citoplasma(□) água na parede celular.....	49
Figura 4.11: Uma ilustração do que pode ser a ligação da molécula de água com os carboidratos, amido e açúcar.....	50

Figura 4.12: Espectros de relaxometria T_2 de uma banana em função do tempo de amassamento.....	51
Figura 4.13: Espectros de relaxometria T_2 de média de seis bananas em função do tempo de amassamento.....	51
Figura 4.14: Espectros de relaxometria T_2 de uma banana em função do tempo de amassamento.....	52
Figura 4.15: Variação da intensidade dos três sinais de relaxometria das médias de três bananas verdes em função do tempo de maturação, (▲) água no vacúolo, (●) água no citoplasma(□) água na parede celular.....	53
Figura 4.16: Espectros dos tempos de relaxação versus intensidade para cinco amostras de bananas congeladas caracterizadas como B1, B2, B3, B4 e B5.....	54
Figura 4.17: Média dos espectros obtidos das amostras intactas (a) e das amostras congeladas (b).....	55
Figura 4.18: Espectro de relaxometria dos dados de CPMG (ILT) de uma das uvas armazenadas à 28°C durante 7 dias.....	57
Figura 4.19: Correlação dos valores de brix versus tempo de relaxação T_2 em segundos para 21 uvas.....	59
Figura 4.20: Correlação dos valores de firmeza (kgf/cm^2) versus tempo de relaxação T_2 pra 21 uvas.....	60
Figura 4.21: Correlação dos valores de brix versus tempo de relaxação T_2 pra 21 uvas.....	61
Figura 4.22: Correlação dos valores de firmeza (kgf/cm^2) versus tempo de relaxação T_1 em segundos para 21 uvas.....	61

Figura 4.23: Correlação entre os dados da razão M_z/M_0 versus brix para 21 uvas. As duas linhas foram colocadas apenas para visualizar melhor a separação entre os valores acima e abaixo de brix 10.....	62
Figura 4.24: Correlação entre os dados da razão M_z/M_0 versus firmeza para 21 uvas.....	63
Figura 4.25: Correlação entre os dados de brix com o tempo de relaxação T_2 em segundos para 45 uvas, cacho 1 (■), cacho 2 (○), cacho 3 (▲), cacho 4 (◆), cacho 5 (□).....	64
Figura 4.26: Correlação entre os dados de firmeza (kgf/cm^2) com o tempo de relaxação T_2 em segundos para 45 uvas, cacho 1(■), cacho 2 (○), cacho 3 (▲), cacho 4 (◆), cacho 5 (□).....	65
Figura 4.27: Correlação entre os dados de umidade, em porcentagem de massa de água, e o tempo de relaxação T_2 em segundos para 45 uvas, cacho 1 (■), cacho 2 (○), cacho 3 (▲), cacho 4 (◆), cacho 5 (□).....	66
Figura 4.28: Correlação entre os dados de pH com o tempo de relaxação T_2 em segundos para 45 uvas, cacho 1 (■), cacho 2 (○), cacho 3 (▲), cacho 4 (◆), cacho 5 (□).....	66
Figura 4.29: Correlação entre os dados de brix (a), firmeza (b), umidade (c) e pH (d) com o tempo de relaxação T_1 em segundos para 15 uvas.....	67
Figura 4.30: Correlação entre os dados da razão M_z/M_0 versus brix (a), umidade (b), pH (c) e firmeza (d).....	68
Figura 4.31: Gráfico dos escores dos dados de CPMG para todas as amostras de uvas, identificadas por cacho.....	71

Figura 4.32: Gráfico de escores dos dados de CPMG para todas as amostras de uvas, identificadas por brix abaixo de 12 ($\exists$), de 12 a 16 (o) e acima de 16 (8)cacho.....	71
Figura 4.33: Gráfico dos escores dos dados de CWFP para todas as amostras de uvas, identificadas por cacho.....	72
Figura 4.34: Gráfico de escores dos dados de CPMG para todas as amostras de uvas, identificadas por brix abaixo de 12 ($\exists$), de 12 a 16 (o) e acima de 16 (8)cacho.....	73
Figura 4.35: Gráfico dos escores. PC1 versus PC2 das amostras de uvas obtidas pelos métodos convencionais, centrado na média (a) autoescalado (b).....	74
Figura 4.36: Correlação entre os valores de CPMG e os parâmetros físico-químicos, (a) brix, (b) pH, (c) firmeza, (d) umidade.....	76
Figura 4.37: Correlação entre os valores de CPMG e os parâmetros físico-químicos, (a) brix, (b) pH, (c) firmeza, (d) umidade.....	77

Lista de Tabelas

Tabela 4.1: Valores de T_2 e intensidades dos ajustes monoexponencial, biexponencial, e triexponencial ($T_{2,1}$; $T_{2,2}$; $T_{2,3}$) com suas respectivas intensidades (I_1 ; I_2 ; I_3) para banana colhida ouro.....	41
Tabela 4.2: Valores de brix, firmeza, umidade e pH das amostras de uvas de cinco cachos diferentes.....	58
Tabela 4.3: Coeficientes de correlações dos sinais de CPMG e CWFP previstos com PLS e os respectivos parâmetros físico-químicos das uvas.....	75

Lista de Abreviaturas e Siglas

CPMG - Carr-Purcell-Meibom-Gill

CWFP - Continuous Wave Free Precession

FID - Free Induction Decay

HCA – Análise de Agrupamento Hierárquicos

ILT – Transformada Inversa de Laplace

IR – Inversão- Recuperação

MRI – Imagem por Ressonância Magnética

PCA – Análises de Componentes Principais

PLS - Regressão por Mínimos Quadrados Parciais

r.f. – radiofrequência

RMN - Ressonância Magnética Nuclear

SVD – Decomposição de valor Singular

TF – Transformada de Fourier

TORMN – Tomografia por RMN

Lista de Símbolos

I - número quântico de spin

h - constante de Planck ($6,626 \times 10^{-34}$ J.s)

μ - momento magnético nuclear

γ - constante magnetogírica

p - momento angular de spin

ΔE - diferença de energia

n - números inteiros e positivos

ν - frequência da radiação aplicada (Hz).

B_0 - campo magnético estático

θ - ângulo entre μ e B_0

N_α - população no nível de menor energia

N_β - população no nível de maior energia

k - constante de Boltzmann ($1,3806 \times 10^{-23}$ J.K⁻¹)

T - temperatura (K).

α - estado de menor energia

β - estado de maior energia

M_0 - magnetização resultante

B_1 - campo magnético oscilante

ω_0 - frequência angular

t_p = tempo de duração do pulso de r.f.

M_{xy} - magnetização projetada no plano xy do sistema de referencial rotativo

M_z - magnetização no estado estacionário

T_1 - constante de tempo de relaxação longitudinal

T_2 - constante de tempo de relaxação transversal

τ – intervalo entre os pulsos

T_r – tempo de repetição

ΔB_0 - não homogeneidade do campo magnético

T_2^* - constante de tempo de relaxação sob efeito da não homogeneidade

$\Delta_{v1/2}$ – largura do sinal à meia altura

D - tempo de repetição da seqüência

S/R – razão sinal/ruído

T_p – tempo do pulso

ψ - ângulo de offset ou defasagem

a.t. – tempo de aquisição

F – firmeza

P – peso da ponta de prova

A – área aplanada

c – fator de calibração

d – diâmetro da ponta de prova circular (0,472cm)

Índice

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Fundamentos da Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear	3
1.1.1. Relaxação Longitudinal	10
1.1.2. Relaxação Transversal	12
1.1.3. Ressonância Magnética Nuclear em baixa resolução	16
1.1.4. Aplicação de RMN em frutas	21
1.2. Amadurecimento de frutas	26
2.OBJETIVOS	29
3.MATERIAS E MÉTODOS	30
3.1 Amostras	30
3.2 Métodos de análises de frutas	31
3.2.1 Medida de Brix	31
3.2.2 Medida de Firmeza	32
3.2.3 Medida de pH	32
3.2.4 Medida de umidade	33
3.3 Análise por RMN	33
3.3.1 Aquisição dos tempos de relaxação longitudinal (T_1) utilizando o método de Inversão Recuperação	34
3.3.2 Aquisição dos tempos de relaxação longitudinal (T_2) utilizando o método de CPMG	34
3.3.3 Aquisição simultânea de T_1 e T_2 utilizando o método de CWFP	35
3.4 Programas usados para as realizações dos ajustes monexponencial, biexponencial, triexponencial e para a Transformada Inversa de Laplace (ILT)	35
3.5 Análise quimiométrica	36
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
4.1. Análise dos dados de CPMG por métodos multiexponenciais	40
4.2. Análise da qualidade de banana por RMN	44
4.2.1 Análise do amadurecimento de banana ouro	44

4.2.2	Análise do efeito da injúria mecânica no T_2 de bananas ouro.....	50
4.2.3	Análise do efeito congelamento no T_2 de bananas ouro.....	53
4.2.4	Análise da qualidade de uva Itália por RMN.....	56
4.3	Análises Quimiométricas.....	69
4.3.1	Análise dos dados de CPMG por PCA.....	70
4.3.2	Análise dos dados de CWFP por PCA.....	72
4.3.3	Análise dos dados de físico-químicos por PCA.....	73
4.3.4	Regressão por mínimos quadrados parciais (PLS).....	74
5.	CONCLUSÕES.....	78
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	80

1. INTRODUÇÃO

A espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) é uma técnica que se fundamenta no registro da interação da rádio-freqüência com núcleos atômicos colocados sob a influência de um campo magnético^[1]. A ressonância magnética nuclear permite a observação de núcleos atômicos que possuam momento magnético nuclear ou spin $\neq 0$, como os núcleos de ^1H , ^{13}C , ^{19}F , ^{31}P , entre outros^[6].

Os parâmetros espectrais da RMN como o deslocamento químico, a constante de acoplamento spin-spin, o efeito Overhauser nuclear (NOE), os tempos de relaxação e de troca química, entre outros, fazem com que a RMN seja uma técnica com aplicações bastante variadas. A RMN é usada na determinação estrutural de compostos orgânicos e inorgânicos, na quantificação e medida de difusividade da água em sistemas heterogêneos como alimentos e outros sistemas biológicos, na geração de imagens tomográficas de maneira não destrutiva, não invasiva na medicina entre outras aplicações^[2,3,4,5,9,36].

As aplicações da RMN podem ser divididas em tomográficas e espectroscópicas. Nas aplicações tomográficas normalmente são obtidas informações da distribuição espacial da água em tecidos biológicos, desde em seres humanos até alimentos.

As aplicações espectroscópicas podem ser subdivididas em aplicações em alta e baixa resolução. A maioria dos experimentos de RMN de alta resolução usa espectrômetros de campo magnético alto (B_0 de 5 a 20 Teslas, equivalentes a frequência de ressonância de 200 a 900 MHz para o núcleo de ^1H), baseados em ímãs supercondutores^[6,13]. O sinal de RMN obtido com a técnica pulsada, o decaimento livre induzido, (FID, do inglês Free Induction Decay) é processado com a Transformada de Fourier (TF) que gera um espectro no domínio da frequência de onde se obtém os valores dos deslocamentos químico, acoplamento spin-spin e outros parâmetros espectrais^[6,13].

Os equipamentos de baixa resolução normalmente operam com campos magnéticos inferiores a 2 Teslas (80 MHz para o núcleo de ^1H). Esses espectrômetros, quando baseados em ímãs permanente de pequeno porte, são também denominados espectrômetros de baixo campo ou espectrômetros de bancada^[9]. Nestes tipos de aparelhos, o deslocamento químico praticamente não é observado e as medidas são baseadas principalmente nas diferenças de tempo de relaxação longitudinal, T_1 , e transversal, T_2 , dos vários componentes das amostras^[8,9,31]. Assim, os sinais de RMN em baixa resolução são normalmente analisados no domínio do tempo, na forma de FID ou eco de spin. Um dos problemas da RMN em baixa resolução em baixo campo é a pequena sensibilidade do método, podendo ser empregado somente em amostras com volumes grandes e usando isótopos com abundância natural e constante magnetogírica altas, tais como

o ^1H e o ^{31}P . A maior vantagem da RMN em baixa resolução sobre a espectroscopia em alta resolução e tomografia é o menor custo dos equipamentos, o que tem favorecido o seu uso em aplicações industriais de rotina e no controle de qualidade.

1.1. Fundamentos da Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear

Alguns núcleos possuem o movimento de spin, que é o giro do núcleo em torno de seu próprio eixo. Como resultado deste movimento surge um momento angular (p). Como o núcleo possui carga, o movimento de spin também origina um momento magnético, μ .

Os momentos angular (p) e magnético (μ) são grandezas vetoriais e estão associados entre si por uma constante, chamada constante magnetogírica (γ), através da equação 1:

$$\gamma = \mu / p \quad \text{Eq. 1}$$

Essa constante tem valor específico para cada isótopo, podendo ser positiva para a grande parte dos isótopos ou negativa para uma minoria, e está diretamente relacionada com a sua sensibilidade [2,5].

A magnitude do momento angular p é quantizada, isto é, somente pode assumir valores discretos, segundo a equação 2:

$$p = h[I(I+1)]^{1/2}/2\pi \quad \text{Eq. 2}$$

Onde:

$$h = \text{constante de Planck } (6,6256 \cdot 10^{-34} \text{ J s})$$

I = número quântico de spin nuclear (ou número de spin).

O número quântico de spin I pode assumir valores como zero e também valores múltiplos de $\frac{1}{2}$. Somente quando $I \neq 0$ um núcleo é magneticamente ativo, ou seja, pode ser observado por RMN. O valor do número de spin I pode ser determinado a partir do número atômico (Z) e de massa (A) do nuclídeo, sendo I igual a zero para Z e A pares, I múltiplo de 1 para A par e Z ímpar e I meio inteiro para A ímpar e Z par ou ímpar.

Os núcleos com $I > \frac{1}{2}$ possuem também momento de quadrupolo, devido à distribuição não esférica e uniforme da carga, o que afeta o tempo de relaxação e o acoplamento com os núcleos vizinhos. Por não possuírem este inconveniente, os núcleos com $I = \frac{1}{2}$, são preferencialmente observáveis por RMN.

Quando submetidos a um campo magnético intenso e uniforme, denominado B_0 , os núcleos com $I \neq 0$ se orientam em relação a eixo de B_0 (convencionado como eixo z). O número de orientações possíveis para cada núcleo também depende do número de spin I : são $2I + 1$ orientações. Portanto, no caso de núcleos com $I = \frac{1}{2}$ são duas as possíveis orientações: a favor $+1/2$ (α) e contra $B_0 - 1/2$ (β), conforme a figura 1.1:

Figura 1.1: Separação dos níveis de energia de um núcleo com spin $\frac{1}{2}$ na presença de B_0 ^[6].

As orientações α e β possuem energias distintas segundo a figura 1.2. Os núcleos orientados a favor do campo B_0 (α) apresentam menor energia, enquanto os orientados contra o campo (β) apresentam maior energia. Desta forma, os estados de spin α e β possuem uma diferença de energia ou ΔE (figura 1.2)^[2].

Figura 1.2: Representação da diferença de energia entre as orientações α ($1/2$) e β ($-1/2$).

Como efeito da interação com B_0 , o núcleo inicia um movimento composto pelo movimento de giro sobre seu próprio eixo (spin) somado ao giro ao redor do eixo de B_0 (eixo z), chamado de movimento de precessão^[2]. A figura 1.3 ilustra o movimento de precessão quando o núcleo interage com B_0 .

Figura 1.3: Representação do movimento de precessão em relação ao campo magnético B_0 .

A velocidade de precessão é definida a partir da velocidade angular com que o spin gira ao redor do eixo de B_0 e é conhecida como frequência de Larmor. A frequência de Larmor (ω) depende da constante magnetogírica (γ) do núcleo e do campo magnético estático (B_0) e está relacionada com a equação 3.

$$\omega \text{ (radianos/s)} = \gamma \cdot B_0 \quad \text{Eq. 3}$$

Onde:

$$\omega = \nu 2\pi.$$

O fenômeno da ressonância magnética nuclear ocorre quando o núcleo (sob B_0) é irradiado por uma rádio frequência, segundo $\nu = \gamma B_0 / 2\pi$. A figura 1.4 mostra a transição dos níveis α e β pela incidência da rf na frequência de Larmor.

Figura 1.4: Diagrama da transição entre os níveis α e β , induzido pela incidência da rádio frequência.

Pela figura acima se observa que em cada nível energético existe uma determinada quantidade de núcleos, ou população de spins (N), sendo que existe sempre um pequeno excesso de núcleos alinhados a favor de B_0 ($N_\alpha > N_\beta$). O que é relevante para medidas de RMN é este pequeno excesso populacional (N_α/N_β), que

está relacionado com a diferença de energia (ΔE) pela equação de distribuição de Boltzmann, segundo a equação 4:

$$N_{\alpha} / N_{\beta} = \exp(\Delta E/kT) \quad \text{Eq.4}$$

Onde:

N_{α} = população no nível de menor energia

N_{β} = população no nível de maior energia

k = constante de Boltzmann

T = temperatura (K).

No modelo vetorial, amplamente utilizado em RMN, os núcleos são representados por seus vetores momentos magnéticos individuais (μ) e estão distribuídos aleatoriamente no plano xy , como ilustra a figura 1.5a. Como consequência da distribuição aleatória, quando o sistema está em equilíbrio, a resultante no plano xy é nula. Porém, como há sempre um excesso de população alinhada a favor de B_0 (α), a componente no eixo $+z$ não é nula. O vetor resultante do somatório dos vetores individuais μ em relação ao eixo $+z$ é chamado de magnetização resultante ou M_0 , a figura 1.5b ilustra esse caso.

Para observar os sinais de RMN é necessário perturbar a condição de equilíbrio. Tal perturbação é obtida quando um campo magnético oscilante, B_1 , na frequência de Larmor é incidido na amostra por meio de uma bobina. No modelo de coordenada girante, o campo B_1 gera um torque sobre a magnetização resultante (M_0) conforme a figura 1.6. O sistema de coordenadas girantes é um modelo vetorial

utilizado para facilitar a visualização do efeito de um pulso de rf sobre a magnetização.

Figura 1.5: Representação do cone de precessão (a) e do vetor magnetização resultante (M_0) no estado de equilíbrio térmico (b).

Nesse modelo, é considerado que o sistema de coordenadas xyz gire ao redor do eixo z, junto com a precessão nuclear, no mesmo sentido e na mesma velocidade. Neste sistema os eixos x e y são designados $x'y'^{[2]}$.

Figura 1.6: Efeito da aplicação de B_1 em M_0 no referencial rotativo.

Na RMN pulsada aplica-se o campo magnético oscilante B_1 , na frequência de ressonância, por um período muito curto, para excitar todas as

freqüências de uma vez só. O pulso exerce um torque sobre a magnetização fazendo com que ela se desloque da direção z , para o plano xy .

O ângulo do deslocamento da magnetização (θ) depende de γ , da intensidade de B_1 e do tempo de duração do pulso (τ), onde $\theta = \gamma B_1 \tau$.

Logo após o campo B_1 ser desligado inicia-se o restabelecimento do equilíbrio térmico ($N_\alpha > N_\beta$). Esse fenômeno é conhecido como relaxação.

A figura 1.7a mostra a rotação da magnetização no plano $x'y'$ (M_{xy}), que induz uma voltagem oscilante na bobina de recepção, cuja freqüência é igual à freqüência de Larmor, (figura 1.7b). A voltagem induzida gera um sinal analógico, denominado FID (Free Induction Decay).

Figura 1.7: Rotação de M_{xy} na bobina de recepção (a) sinal induzido (FID) (b).

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

Após a perturbação do sistema, a magnetização retorna ao estado de equilíbrio térmico, onde $M_{xy} = 0$ e $M_z = M_0$. Esse processo é conhecido como relaxação longitudinal ou spin-rede^[2], e é descrito por uma constantes de tempo T_1 .

Além disso, a coerência da magnetização pode desaparecer no plano xy, através da relaxação spin-spin ou transversal, com uma constante de tempo T_2 . Esses dois processos são muito usados para separação dos componentes de uma amostra heterogênea em experimentos em baixa resolução e serão descritos em mais detalhes a seguir.

1.1.1. Relaxação longitudinal

A relaxação longitudinal (T_1) é a constante de tempo relativa ao retorno da magnetização à condição de equilíbrio térmico, ou ao eixo z, ou seja, $M_z = M_0$ (figura 1.8). A relaxação longitudinal, também denominada relaxação spin-rede, restabelece o equilíbrio térmico dos spins, correspondendo assim a um processo entálpico.

Figura 1.8: Representação vetorial durante o retorno da magnetização para o eixo z.

Segundo Block^[37] a recuperação da magnetização no eixo z (M_z) segue um comportamento exponencial de acordo com a equação:

$$M_z(t) = M_0 [1 - \exp(-t/T_1)] \quad \text{Eq.5}$$

Onde:

M_0 = magnetização no equilíbrio térmico

T_1 = constante de tempo longitudinal.

De acordo com a equação acima, para que 99,33% da população retorne ao equilíbrio é necessário aguardar um tempo correspondente a $5T_1$ ^[6], figura 1.9.

Figura 1.9: Recuperação da magnetização M_z/M_0 em relação ao tempo t/T_1 .

O principal método para medida de T_1 é o método denominado de inversão-recuperação (IR), figura 1.10, que consiste na aplicação de um pulso de r.f de 180° (figura 1.11), o que conduz a magnetização ao eixo -z, seguido de um tempo τ (figura 1.11) e de um pulso de 90° (figura 1.11), antes da aquisição do sinal de RMN^[6]. O valor de T_1 é então calculado a partir da intensidade do sinal de RMN em função do tempo τ . O tempo τ precisa ser suficientemente longo, maior que $5T_1$, para que o sinal não sature.

Figura 1.10: Representação esquemática da sequência inversão-recuperação^[11].

Figura 1.11: Representação vetorial da sequência de pulsos IR^[6].

1.1.2. Relaxação transversal

A relaxação transversal (T_2) resulta da perda de coerência de fase entre os momentos magnéticos individuais (obtida com o pulso de rf), correspondendo a um processo entrópico^[6]. A figura 1.12 ilustra, segundo o modelo vetorial, o comportamento da magnetização pelo processo de relaxação transversal após o pulso de r.f.

Figura 1.12: Modelo vetorial representando o processo de perda de coerência de fase no plano $x'y'$.

Quando há a perda de coerência de fase as componentes da magnetização no plano xy se anulam, ou seja, $M_{xy} = 0$ e voltam a precessionar aleatoriamente em torno de B_0 .^[6,12]

Segundo Block, a relaxação transversal decai exponencialmente com uma constante de tempo T_2 . (equação 6):

$$M_{xy} = M_0 \exp(-t/T_2) \quad \text{Eq.6}$$

Onde:

T_2 = constante de tempo transversal

M_{xy} = magnetização no plano x'y'.

Devido à falta de homogeneidade do campo (ΔB_0) a constante de tempo observada no FID não decai com T_2 e sim observamos uma constante T_2^* .

$$1/T_2^* = 1/T_2 + 1/T_{2(\Delta B_0)} \quad \text{Eq.7}$$

A largura de linha à meia altura de um sinal de RMN é relacionada com T_2^* segundo a equação 8. Desta forma a não homogeneidade de campo é o principal fator de alargamento do sinal nos aparelhos de baixa resolução.

$$\Delta\nu_{1/2} = 1/\pi T_2^* \quad \text{Eq.8}$$

Onde:

$\Delta\nu_{1/2}$ = largura do sinal à meia altura.

Segundo a equação 8, quanto mais rápida for T_2^* mais largo será o sinal no domínio da frequência obtido com a Transformada de Fourier. O inverso também verdadeiro^[2].

O método mais usado para a medida de T_2 é conhecido como CPMG, que traz as iniciais de seus autores: Carr-Purcell-Meibom-Gill^[6]. As seqüências de eco como a CPMG recuperam o sinal de RMN na forma de eco de spin, independente da não homogeneidade do campo. A seqüência CPMG consiste de um pulso de rf de 90° , aplicado no eixo x' , seguido de um intervalo de tempo τ e de um trem de pulsos de 180° , aplicado no eixo y' . A intensidade do sinal de RMN da seqüência CPMG (eco), obtida em função de τ , decai exponencialmente com uma constante de tempo T_2 . A seqüência CPMG é ilustrada na figura 1.13.

Figura 1.13: Representação esquemática da seqüência de pulsos CPMG.

A figura 1.14 ilustra a seqüência de CPMG no modelo vetorial, onde inicialmente um pulso de $90^\circ_{x'}$ é aplicado em M_0 (a), fazendo com que a magnetização vá para o plano $x'y'$ (b). Ao longo do tempo τ os spins dispersam-se no plano $x'y'$ (c). Com a aplicação do pulso de $180^\circ_{y'}$ (d) e após 2τ ocorre a refocagem dos spins (e). Na seqüência CPMG o valor de n , $(\tau-\pi-\tau)$, é sempre par, para que as imperfeições da largura de pulso sejam canceladas. Com essa

seqüência obtêm um sinal como da figura 1.15, onde obtêm-se um decaimento exponencial, cuja constante de tempo é T_2 .

Figura 1.14: Representação vetorial do efeito da seqüência de pulsos de CPMG sobre o sinal de RMN.

Figura 1.15: Decaimento exponencial do sinal CPMG.

1.1.3. Ressonância Magnética Nuclear em baixa resolução

Até a metade da década de noventa, a RMN em baixa resolução era usada principalmente em medidas quantitativas, como medida do teor de óleo em sementes, umidade em alimentos e produtos químicos entre outras medidas. Mais recentemente, com o uso de métodos quimiométricos e de análise de relaxação multiexponencial^[9], tornou-se possível analisar todo o sinal de RMN em baixa resolução (FID, decaimento CPMG, entre outros) e obter outras informações sobre as propriedades físico-químicas das amostras.

Os métodos quimiométricos são baseados em técnicas estatísticas de análise de variância (ANOVA), análise de componentes principais (PCA), análise agrupamentos hierárquicos (HCA), regressão de mínimos quadrados parciais (PLS), análise fatorial, decomposição de valor singular (SVD), redes neurais, entre outros^[8,9].

Desses métodos, os mais usados são os de PCA, HCA e PLS. Dos métodos de regressão multivariada, como o PLS, obtêm-se uma relação entre os dados de RMN e de certas propriedades da amostra. Em uma amostra que contenha água e óleo, por exemplo, é possível obter a relação entre o decaimento do sinal do eco (fornecido pela técnica CPMG) e as respectivas concentrações dos produtos a serem medidos. Desta maneira, com a obtenção de uma matriz de calibração, pode-se calcular o teor de água e óleo em uma amostra desconhecida a partir de seus dados de CPMG. Recentemente, foi demonstrado que pode-se usar as análises por RMN em baixa resolução, usando esses métodos quimiométricos, para medidas *on line* da qualidade de óleos vegetais^[52]. Foi possível medir

diretamente nas sementes a viscosidade do óleo, o índice de iodo, o número de cetano entre outras propriedades de interesse para a produção de biodiesel.

Os métodos de análise multiexponencial do sinal CPMG são baseadas tanto no ajuste discreto dos dados, com métodos estatísticos de mínimos quadrados quanto na transformada inversa de Laplace^[16]. Nestas técnicas considera-se que o decaimento do sinal CPMG, no domínio do tempo, seja uma somatória de exponenciais.

Com o ajuste discreto é necessário informar o número de exponenciais para ajustar o sinal. Já no caso da transformada inversa de Laplace, obtém-se um “espectro” contendo o perfil dos tempos de relaxação que compõem o sinal de RMN. A posição dos picos e as áreas dos sinais são interpretadas de acordo com os tempos de relaxação T_2 das substâncias presentes na amostra.

Além do uso do sinal CPMG tem sido demonstrado que a técnica CWFP, Continuous Wave Free Precession, pode ser uma técnica alternativa ou superior à de CPMG para medidas qualitativas em RMN em baixa resolução. A técnica CWFP é mais simples que a de CPMG, pois usa apenas um trem de pulsos de 90° separados por um tempo τ . Como o tempo τ deve ser menor do que T_2^* e independente de T_1 , obtém-se um sinal com amplitude contínua, o que permite somar milhares de espectros por segundo e obter um grande aumento de dezenas de vezes na razão sinal ruído em medidas quantitativas em RMN em baixo campo^[14].

Na figura 1.16a está o sinal do FID de uma amostra de óleo vegetal e na figura 1.6b o sinal CWFP para a mesma amostra, com um ganho na razão sinal ruído de oito vezes, para um mesmo tempo de medida^[14]. Como pode-se ver nesta

figura, o sinal entre os pulsos (a cada 300 microssegundos) é um sinal senoidal, com amplitude constante.

Figura 1.16: Sinais de RMN- H^1 de uma amostra de 2,2mg de óleo de girassol: a) experimento FID adquirido com $T_p = 5T_1 = 690\text{ms}$, b) experimento de CWFP com T_p de 0,3ms. Para ambos os casos o tempo total de análise foi de 1,38s^[17,32].

Além das medidas em amostras estáticas foi recentemente demonstrado que a RMN-CWFP pode ser usada como um método ultra-rápido de medidas on-line, com potencial de análise de mais 20 mil amostras por hora. Na figura 1.17 e 1.18, estão o diagrama do sistema para medidas quantitativas em fluxo, o sinal obtido com a análise de sementes oleaginosas (1.18a) e a correlação entre a intensidade do sinal e a massa de óleo das respectivas sementes (1.18b).

Figura 1.17: Desenho esquemático de um sistema on line para medidas de CWFP^[53].

Figura 1.18: Amplitude do sinal CWFP para 96 amostras de semente de macadâmia com massas de óleo variando de 0,1 a 0,7 gramas, os 96 picos foram obtidos em 14 segundos (a). Massa de óleo em função do sinal CWFP da figura (b) o coeficiente de regressão linear foi de $r^2 = 0,95^{[53]}$.

Além dessa aplicação foi demonstrado que a RMN-CWFP pode ser usada para medidas da difusividade térmica, medida rápida e simultânea dos tempos de relaxação T_1 e $T_2^{[17]}$.

Pelos métodos convencionais, as medidas de T_1 e T_2 utilizam dois experimentos diferentes, a inversão-recuperação (IR) que é bastante demorada (até dezenas de horas)^[15] e a CPMG. A técnica CWFP pode medir esses dois tempos de relaxação em alguns segundos^[15], tempo similar ao necessário para as medidas com CPMG.

Para essa medida usa-se o sinal de RMN obtido com um trem de pulsos de 90° e tempo de repetição $tp > T_2^*$, desde o equilíbrio térmico até atingir o

estado estacionário CWFP. O sinal obtido neste tempo pode ser dividido em três regiões distintas, figura 1.19. Do primeiro pulso (A) até o ponto (B), o sinal apresenta uma alternância de amplitude entre cada pulso. Após isso a alternância de amplitude cessa, denominado estado quasi-estacionário (C) e o sinal decai exponencialmente até o ponto (D), onde atinge o estado estacionário, CWFP ^[18].

Figura 1.19: Representação do sinal de CWFP para uma amostra de ácido fosfórico com $T_1 = 190\text{ms}$ e $T_2 = 140\text{ms}$ ^[17].

A intensidade do sinal (M_z) no estado estacionário CWFP (equação 9) bem como a constante de tempo no estado quasi-estacionário (equação 10) dependem dos tempos de relaxação T_1 e T_2 .

$$M_z = M_0 T_2 / (T_1 + T_2)$$

Eq.9

$$T^* = 2T_1T_2/(T_1+T_2) \quad \text{Eq.10}$$

Pelas equações 9 e 10 pode-se calcular a dependência dos valores de T_1 e de T_2 com relação a intensidade do sinal inicial e relação no estado estacionário e a constante de tempo T_2^* pelas equações 11 e 12.

$$T_1 = (T^*/2)/M_z/M_0 \quad \text{Eq.11}$$

e

$$T_2 = (T^*/2)/1 - M_z/M_0 \quad \text{Eq.12}$$

Onde:

M_0 está relacionado com a intensidade do primeiro pulso aplicado e M_z no estado estacionário.

1.1.4 Aplicações de RMN em frutas

As aplicações de RMN em frutas tem se dado principalmente com o uso da tomografia^[6,7,8]. A tomografia por ressonância magnética nuclear (TORMN) vem sendo avaliada para a análise da qualidade interna de frutas *in natura* desde a década de 80¹⁻⁴. A tomografia tem sido usada para a verificação da qualidade interna de frutas, do efeito de injúrias mecânicas e de baixas temperaturas, dos defeitos fisiológicos, da infestação de pragas e de doenças, entre outras aplicações^[6,7,8].

Zion *et al.*^[47], em 1995, desenvolveram um método rápido por imagens (MRI) para detectar injúrias mecânicas em maçãs. Demonstraram que é possível distinguir entre maçãs danificadas das não danificadas em imagens de três dimensões.

Saito *et al.*^[45], em 1996, aplicaram a MRI para detectar espaços vazios em melancia intactas. Eles empregaram projeções unidimensionais para aumentar a velocidade das medidas. As análises puderam ser realizadas em torno de 1 segundo por amostra. Eles sugeriram que essa técnica poderia ter custo aceitável para análise de produtos agrícolas.

Nascimento *et al.*^[48], em 1999, aplicaram a TORMN para obter imagens de manga infestadas por moscas-das-frutas, figura 1.20a, bem como distúrbios fisiológicos, como por exemplo o espaço vazio na manga da figura 1.20b.

Figura 1.20: Imagem tomográfica de manga com infestação (a), imagem tomográfica de espaços vazios ocasionados por distúrbios fisiológicos (b)^[48].

Mattiuz^[49], em seu trabalho de doutorado em 2002, avaliou com TORMN as injúrias mecânicas de goiabas. A figura 1.21 ilustra goiaba com e sem impacto, a esquerda são imagens do controle, as do meio são as frutas sofrendo

impacto, elas foram deixadas a cair de uma altura de um metro e vinte centímetros, e as da direita são frutas que sofreram compressão de 3N.

Figura 1.21: Imagem tomográfica de injúrias mecânicas de goiaba. À esquerda é o controle do primeiro ao sexto dia, central sofreu impacto e à direita foi comprimida^[49].

Létal *et al.*^[44], em 2003, obtiveram imagens por MRI de diferentes variedades de maçãs durante o amadurecimento e estocagem. Realizaram análises de textura para correlacionar com firmeza, presença de sólidos solúveis e ácidos. A correlação dos parâmetros de análises de textura com as imagens pode ser usada para caracterizar o amadurecimento de frutas.

A espectroscopia de RMN em alta resolução e TORMN também tem sido usada na análise da qualidade interna de frutas on-line. Kim *et al.*^[42], em 1999, construíram e testaram um sensor de RMN *on line*, com um ímã supercondutor. Foram adquiridos espectros de abacate e as imagens de cerejas foram adquiridas enquanto as frutas se moviam. Eles usaram os espectros para medirem a razão de óleo e água. Essa razão foi correlacionada com porcentagem em peso seco, o coeficiente de correlação variou de 0,97 a 0,89 e diminuiu com o aumento da

velocidade. Eles usaram as imagens unidimensionais para detectar a presença de cortes (pit) nas cerejas. Usaram um algoritmo dedicado para detectar a mudança no perfil das imagens de cereja com e sem buraco. Com esse método obtiveram uma boa classificação das frutas com e sem dano tanto em condições estáticas quanto dinâmicas.

Chen *et al.*^[43], em 1996, desenvolveram uma técnica de RMN *on-line* em alta velocidade para avaliar a qualidade de frutas e vegetais. Eles usaram essa técnica para avaliação da maturidade de abacates e a quantidade de açúcares presentes no fruto fresco. Obtiveram com sucesso espectros do FID de um único pulso em uma velocidade acima de 250mm/s. A razão óleo/água foi muito boa para o peso seco do fruto.

A RMN em alta resolução também tem sido usada na análise de sucos de frutas. Pereira *et al.*^[38], em 2005, aplicaram análises de componentes principais para os dados de RMN de ^1H e dados físico-químicos para a investigação da variabilidade dos compostos presentes em uvas e posterior caracterização dos grupos.

Campo *et al.*^[39], em 2006, aplicaram RMN de ^1H para determinar quantitativamente os ácidos málico e cítrico em sucos de maçã, pêra, kiwi, laranja, morango e melancia. Em 1997, Belton *et al.*^[40] obtiveram espectros de RMN de ^1H de sucos de maçãs de vários cultivares, observando diferenças significativas. Pelos espectros puderam identificar as origens dos sucos, a autentificação dos sucos e também as trocas bioquímicas que ocorrem tanto na fruta quanto em seu suco.

Em 1993, Ni *et al.*^[41], usaram a RMN de alta resolução para obter espectros dos tecidos intactos de frutas (uva, banana, maçã). A combinação de resultados teve implicações para análises não destrutíveis de materiais

heterogêneos e para desenhos de novos dispositivos para avaliação da qualidade, análises laboratoriais e processos de monitoramento.

A RMN em baixa resolução também vem sendo usada na análise de frutas. Keener *et al.*^[50], em 1999, utilizaram um aparelho de RMN de baixo campo para medir o coeficiente de difusão da água e T_2 em tecidos de maçãs. O coeficiente de difusão e T_2 foram comparados com diferentes quantidades de concentração de sólidos solúveis com ou sem defeitos na fruta. Algumas variedades de maçãs foram estudadas e não houve diferenças mensuráveis no coeficiente de difusão entre os tecidos saudáveis dos doentes, e o T_2 mostrou nenhuma relação entre tecidos saudáveis e doentes.

Snaar *et al.*^[51], em 1992, utilizaram a RMN de ^1H em tecidos parenquimáticos de maçãs, onde puderam identificar três populações, com tempos de relaxação característicos.

Tu *et al.*^[46], em 2007, estudaram o uso do tempo de relaxação T_2 da RMN, para qualificar tomates. Eles determinaram se a firmeza é um indicador de maturidade, avaliaram o efeito dos defeitos comuns na firmeza e correlacionaram T_2 com a firmeza. Trabalhos anteriores feitos por eles não obtiveram boa correlação entre T_2 e a firmeza. Mesmo com esses resultados eles continuarão desenvolvendo um sensor de RMN baseado nas diferenças de T_2 para classificação *in line* de tomates.

Raffo *et al.*^[25], em 2005, através de medidas de RMN de ^1H monitoraram o amadurecimento em tecidos de bananas pelo tempo de relaxação T_2 . Eles atribuíram três valores de T_2 para bananas, pertencentes ao citoplasma, vacúolo e parede celular, como propuseram anteriormente Belton e Hills^[59]. O

coeficiente de difusão também foi obtido para a água presente no citoplasma e no vacúolo diferem um do outro e pode ser calculado através de experimentos de RMN.

1.2. Amadurecimento de frutas

Quando a fruta alcança seu estágio final de crescimento, inicia-se o processo de amadurecimento, que leva à algumas alterações externas como mudanças de cor e redução da firmeza, e internamente, a mudança de sabor devido ao aumento do açúcar e redução da acidez entre outros^[19]. O principal hormônio que controla essas mudanças é o etileno, que ativa várias enzimas, como quinases, amilases, hidrolases, pectinases entre outras, a figura 1.22 ilustra esse caso, que fazem com que haja uma redução da acidez, a conversão de amido em açúcar solúvel, a redução da clorofila e o aparecimento das antocianinas entre outras conversões.

Figura 1.22: Mudanças ocorridas no amadurecimento de uva.^[35]

Na figura 1.23 está um esquema que mostra essas várias mudanças em função da formação do fruto e amadurecimento das uvas. Neste gráfico pode-se ver que apenas a quantidade de ácidos orgânicos decai com a formação e maturação dos frutos. O tamanho da fruta, pH e açúcares solúveis aumentam desde a formação do fruto, mantendo uma aceleração durante a maturação. As antocianinas por outro lado só tem uma mudança drástica após o início da maturação. Então com o processo de amadurecimento as frutas tendem a ficarem mais doces, mais macias e mais coloridas.

Figura 1.23: Representação gráfica das composições de uma uva durante seu desenvolvimento e amadurecimento^[34].

Algumas frutas como uva, maçã, morango, laranja, limão entre outras encerram o processo de amadurecimento ao serem colhidas, isso porque passam a produzir pouco etileno. Essas frutas são denominadas não-climatéricas e o ponto de colheita é um importante fator que irá determinar a qualidade do produto final, como sabor, aroma, cor entre outras. Já as frutas climatéricas como a banana, manga,

goiaba, mamão, e outras, continuam o processo de amadurecimento após a colheita. Isso se deve ao fato das frutas continuarem a produção de etileno, mesmo depois de colhidas^[20]. Neste caso o ponto de colheita não é tão crítico.

Assim como a banana, a uva é uma das frutas mais consumidas no mundo. Também está entre as frutas mais antigas domesticada pelo homem. É usada tanto para consumo *in natura* quanto industrializada na forma de suco, vinho, etc. Existe uma grande variedade de uvas e a maioria apresenta uma cor característica ao amadurecer, o que facilita a identificação do ponto de colheita e sua comercialização. No entanto algumas variedades como a uva Itália apresentam poucas alterações visuais quando amadurecem, dificultando a identificação do ponto ideal de colheita e do grau de maturação pelos consumidores.

Diferentemente da banana, a uva é uma fruta não-climatérica e assim, não continua amadurecendo após a colheita. Isso é um problema para as uvas verdes como a Itália, uma vez que colhidas fora do ponto ideal, tem baixo teor de sólidos solúveis totais (brix) e conseqüentemente ficam de baixa qualidade sensorial.

2. OBJETIVOS

O objetivo do projeto de mestrado foi avaliar o uso da relaxometria por RMN em baixa resolução, com as técnicas CPMG, IR e CWFP, para a qualidade de frutas frescas, como banana e uva, através das correlações entre os tempos de relaxação longitudinal (T_1) e Transversal (T_2) e parâmetros físico-químicos como brix, pH, firmeza e umidade.

Objetivos específicos:

1. Avaliar a qualidade de frutas utilizando a técnica de CPMG.
2. Avaliar a qualidade de frutas utilizando a técnica de CWFP.
3. Analisar os dados obtidos com a técnica CPMG com Métodos multiexponenciais.
4. Analisar os dados obtidos com as técnicas CPMG e CWFP com métodos quimiométricos.

3. MATERIAS E MÉTODOS

3.1. Amostras

As amostras estudadas foram principalmente frutas frescas de ‘banana ouro’ e ‘uva Itália’ adquiridas no comércio local.

As amostras foram selecionadas para que entrasse na bobina, sem causar algum tipo de injúria mecânica. A escolha da banana foi por ser a fruta fresca mais consumida no mundo e tenra e muito sensível a danos por impacto ou compressão^[22,23,24]. A ‘banana ouro’ foi escolhida por ser uma banana tão doce quanto a nanica (a mais consumida), mas bem menor e sem curvatura (quase um cilindro). Essas características facilitam as análises por RMN, permitindo inserir a banana intacta na bobina de detecção, que permite acompanhar todo o processo em uma única amostra. A uva Itália foi escolhida por ser uma uva bastante consumida no Brasil e que praticamente não muda de cor ao amadurecer^[54]. Esta propriedade dificulta tanto a identificação visual de seu ponto de colheita quanto o estado de maturação pelos comerciantes e consumidores finais. Como a uva é uma fruta não

climatérica, a colheita antes do final da maturação leva a uma uva com baixo brix e azeda. Para o consumidor isso pode representar a compra de um produto de baixa qualidade.

3.2 Métodos de análises de frutas

As principais análises utilizadas para medir a qualidade interna de frutas são as da firmeza e dos sólidos solúveis totais, usualmente realizadas com métodos de medida de resistência a penetração (durômetro) e sólidos solúveis por refratometria, respectivamente^[5,7,13,30]. No entanto, como esses métodos são destrutivos, só podem ser aplicados em amostras de um determinado lote e não podem ser usados para a análise de todas as frutas^[30,31].

3.2.1 Medida de Brix

A medida dos sólidos solúveis totais é medida por refratometria onde o índice de refração é obtido pela medição do ângulo crítico de um feixe de luz atingindo a amostra^[33]. Neste ângulo crítico não existe mais luz refratada, então esse feixe de luz inteiro é refletido. Esta reflexão total é detectada por um sensor ótico que converte para o índice de refração conhecido como “graus Brix”.

A medida de brix foi realizada dividindo a fruta em duas partes, na qual uma das partes foi coletada algumas gotas e colocadas diretamente no refratômetro (RT-30-ATC), o seu valor na ordem de graus Brix é obtido diretamente quando exposto a claridade.

3.2.2 Medida de Firmeza

A firmeza que depende da turgescência celular foi medida com um aparelho denominado firmômetro. Este método gera estimativa de firmeza dependente da pressão de turgor. A firmeza ($F = \text{kgf/cm}^2$) foi obtida dividindo-se o peso da ponta de prova (P) sob a área amassada do firmômetro pela área aplanada (A) em centímetros quadrados pela área da ponta de prova (cm^2) no firmômetro^[60].

$$F = P/A \quad \text{Eq. 13}$$

Técnica firmômetro: $F = P/A \rightarrow F = [(x-b).c]/(p.(d)^2/4)$, sendo:

x = leitura da firmeza da fruta;

b = branco, ou seja, a leitura em força zero (valor registrado no multímetro antes da aplicação da força para amassar a fruta);

c = fator de calibração (inclinação na curva entre força aplicada e leitura x);

d = diâmetro da ponta de prova circular = 0,472 cm.

$$F = [(x - b). 1,037051]/0,1711997 \quad \text{Eq.14}$$

3.2.3 Medida de pH

Para medidas de pH foram coletadas algumas gotas provenientes da mesma parte da uva que foi utilizada para medida de brix. O potenciômetro

(ANALION PM 608) foi calibrado para padrão igual a 4 e então obtido os valores de pH de cada uva.

3.2.4 Medida de umidade

Para a realização das medidas de umidade a outra parte da uva foi colocada em uma estufa a 105° por 24 horas. O valor da umidade foi então calculado em porcentagem de massa perdida.

3.3 Análises por RMN

As medidas do sinal de RMN em baixa resolução foram realizadas em um espectrômetro de RMN de baixo campo baseado em um transmissor/receptor CAT-100, Tecmag, com um amplificador de potência 2035 AMT e um pré-amplificador AU1448 da Miteq e um ímã supercondutor Oxford de 2,1 Tesla, (85MHz para ^1H) e com 30cm de bore.

As medidas de T_1 e T_2 das frutas foram realizadas com as técnicas de inversão-recuperação (IR) e de eco de spin (CPMG), respectivamente. As amostras foram também analisadas com a técnica de medida rápida e simultânea de T_1 e T_2 , recentemente desenvolvida, baseada em RMN-CWFP^[15].

3.3.1. Aquisição das constantes de tempos de relaxação longitudinal (T_1) utilizando o método de Inversão Recuperação

Para avaliar o comportamento da água nos compartimentos das frutas foram feitas medidas de T_1 utilizando a seqüência de inversão-recuperação. As condições de aquisição foram: largura do pulso de 90° variando de 15 a 18 μ s, tempo de repetição entre cada pulso (τ) de 0,2 ms, número de ecos, tempo de aquisição (t_a) de cada eco de 204,8 ms, número de aquisições igual a 1 e tempo de espera de 10 s.

Foi empregado o software NTNMR da Tecmag para a obtenção dos dados de T_1 . Para calcular o valor de T_1 usa-se o gráfico semi-logarítmico de $\ln(M_\infty - M(T_p))$ em função de T_p que resulta em uma reta decrescente com coeficiente angular igual a $1/T_1$.

3.3.2. Aquisição das constantes de tempos de relaxação transversal (T_2) utilizando o método de CPMG

As medidas de CPMG foram realizadas utilizando a seqüência de pulso CPMG. As condições de aquisição foram: largura do pulso de 90° variando de 11 μ s, tempo de repetição entre cada pulso de 0,2 ms, número de ecos de 5000, tempo de aquisição (t_a) de cada eco de 16 μ s, número de aquisições igual a 4, e tempo de espera de 10s. O processamento da aquisição dos dados foi utilizado o software NTNMR da Tecmag. As fases dos decaimentos CPMG foram ajustadas tendo o valor máximo no canal real e valor mínimo no imaginário. Após foram exportados em arquivos com extensão txt. Os dados foram importados pelo programa Origin, e

excluídas as colunas que apresentaram sinal imaginário, pois havia apenas ruído. Os dados reais foram expandidos em 16 colunas, realizando assim a média aritmética de cada coluna. Esse valor médio foi usado para a construção da curva de decaimento, este decaimento é visto no eixo y e no eixo x é apresentado o valor do tempo dado em segundos.

3.3.3 Aquisição simultânea de T_1 e T_2 utilizando o método de CWFP

A medida de CWFP avalia simultaneamente T_1 e T_2 , com isso foi de interesse avaliar esse comportamento com as duas constantes juntas.

As condições de aquisição foram: largura do pulso de 90° variando de $15\mu\text{s}$, tempo de repetição entre cada pulso 256, número de ecos de 5000, tempo de aquisição (at) de cada eco $256\mu\text{s}$ número de aquisições igual a 4, e tempo de espera de 10s, com um ângulo de defasagem (offset) ψ de 3π , equivalente a uma frequência de 5 KHz^[15].

3.4. Programas usados para as realizações dos ajustes monoexponencial, biexponencial, triexponencial e da Transformada Inversa de Laplace (ILT)

Para a aquisição dos ajustes multiexponenciais: monoexponencial, biexponencial e triexponencial foi usado o programa Origin, na versão 7.0. Para a realização dos dados da Transformada Inversa de Laplace (ILT) foi usado um

programa que se baseia no algoritmo do CONTIN, chamado de multiexp, que foi desenvolvido pelo Professor Daniel Pusiol da Universidade de Córdoba, Argentina.

3.5 Análise quimiométrica

Para as análises quimiométricas como as Análises de Componentes Principais (PCA) e a Regressão por Mínimos Quadrados Parciais (PLS), foram realizados no programa Pirouette, versão 3.11 (Infometrix).

O pré-processamento utilizado para os dados de RMN foi centrado na média, esse é o pré-processamento utilizado para dados espectrais^[55], onde calcula-se a média dos dados de determinada coluna (variável) e, em seguida, subtrai-se de cada dado da referida coluna. Portanto, as médias das variáveis são igualadas a zero. Foi utilizado também o pré-processamento autoescalado^[55], onde calculam-se as médias e os desvios padrões, subtrai-se cada valor da média, e divide-se o resultado pelo desvio padrão. Portanto, a média de cada variável é igualada a zero e o desvio padrão igualado a 1.

Quando se usa quimiometria os dados utilizados geralmente são organizados em uma única matriz original $\mathbf{X}$. A matriz $\mathbf{X}$ é construída por n amostras e m variáveis $(n \times m)^{[57]}$, onde cada amostra corresponde a uma linha e cujos elementos são os valores das variáveis medidas. Os valores de $a_1, a_2 \dots a_n$, da matriz de dados de RMN, são os números de amostras e os valores de $d_1, d_2 \dots d_n$ são os dados de CPMG ou do CWFP, como ilustra a figura 3.1.

Figura 3.1: Representação da matriz de dados de RMN para análise de PCA^[58].

Através de um processo iterativo o modelo PLS é obtido, em que otimiza-se a projeção das amostras sobre o(s) *loadings*, para a determinação dos *scores*, e o ajuste por uma função linear dos *scores* da matriz X aos *scores* da matriz Y ao mesmo tempo, de modo a minimizar os desvios. Mas essa otimização simultânea acarreta pequenas distorções nas direções dos *loadings*, a ponto de perderem rigorosamente a ortogonalidade, ocasionando pequenas redundâncias de informação. Contudo, essas pequenas redundâncias são as responsáveis pela otimização da relação linear entre os *scores*.^[55,56]

Uma grande vantagem do método PLS é sua robustez. Isso significa que os parâmetros do modelo não se alteram de maneira significativa quando novas amostras são acrescentadas ou retiradas do conjunto de calibração^[58].

Para a análise de regressão por quadrados mínimos parciais (PLS) a matriz de dados foi composta dos dados de RMN e das análises físico-químicas. As variáveis independentes (X) constituem os dados de RMN e as variáveis dependentes (Y) os dados físico-químicos. Na figura 3.2 estão as matrizes de dados utilizada para a análise de PLS.

Figura 3.2: Representa a matriz de dados de RMN e a dos parâmetros físico-químicos para a análise de PLS^[58].

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Serão apresentados os resultados do estudo da qualidade de uma fruta climatérica ('banana ouro') e uma não climatérica ('uva Itália') por RMN em baixa resolução.

As análises de banana por método de RMN em baixa resolução apresentados por Rafo e colaboradores^[25] utilizaram pequenos pedaços de banana (2,5 mm³), o que levou ao uso de diferentes amostras para cada dia de estudo, além de causar injúria na amostra. Como será demonstrado neste trabalho, danos mecânicos podem levar a resultados errôneos tanto do tempo de relaxação quanto da área do sinal de RMN. Os estudos com banana envolveram a análise do tempo de relaxação transversal, em relação ao amadurecimento de 'bananas ouro' e ao efeito de amassamento e congelamento.

Os estudos com uva envolveram o comportamento do tempo de relaxação transversal e longitudinal em relação ao brix, firmeza, pH e umidade.

Para analisar a qualidade dessas frutas foram usados nesse trabalho as técnicas de RMN em baixa resolução envolvendo as técnicas convencionais inversão recuperação (IR)^[6] e CPMG^[6] para medidas de T_1 e T_2 separadamente ou a técnica CWFP recentemente desenvolvida^[14], que permite a medida desses dois tempos de relaxação de maneira rápida e simultânea^[15].

4.1. Análise dos dados de CPMG por métodos multiexponenciais

Antes de aplicar a técnica de CPMG na análise da qualidade de frutas foram feitos alguns estudos para determinar qual seriam as vantagens e desvantagens dos principais métodos de decomposição do decaimento multiexponencial usados na literatura, que são os ajuste multiexponencial discreto^[25] e transformada inversa de Laplace (método contínuo)^[29].

A figura 4.1 mostra o decaimento do sinal CPMG para uma ‘banana ouro’ com os ajustes monoexponencial (A), biexponencial (B) e triexponencial discretos (C). Os sinais (B) e (C) foram deslocados verticalmente para uma melhor visualização dos ajustes.

Como pode ver nesta figura, o ajuste monoexponencial (em vermelho) não representa bem a curva de decaimento. A explicação para isso é devido ao fato da curva de decaimento exponencial em tecidos vegetais observados ser multiexponencial, ou seja, compostos por dois ou mais tempos de relaxação T_2 ^[28]. O sinal de CPMG com os ajustes biexponencial e triexponencial ajustam perfeitamente a curva CPMG, possui $R^2 = 0,998$, o que não permite dizer qual dos dois ajuste é o melhor.

Figura 4.1: Curvas de decaimento exponencial obtido com a técnica de CPMG para a amostra de 'banana ouro' (linha cheia) e os ajustes monoexponencial (A), biexponencial (B) e triexponencial (C) (linha vermelha).

A tabela 4.1 mostra os valores dos ajustes monoexponencial (T_2) e biexponencial ($T_{2,1}$ e $T_{2,2}$) e suas intensidades (I_1 e I_2) e ajuste triexponencial ($T_{2,1}$; $T_{2,2}$; $T_{2,3}$) com suas respectivas intensidades (I_1 ; I_2 ; I_3). para os ajuste do sinal da figura 4.1.

Tabela 4.1: Valores de T_2 e intensidades dos ajustes monoexponencial e biexponencial ajuste triexponencial ($T_{2,1}$; $T_{2,2}$; $T_{2,3}$) com suas respectivas intensidades (I_1 ; I_2 ; I_3) para 'banana ouro'.

Mono	Bi				Tri					
$T_2(s)$	$T_{2,1}(s)$	$T_{2,2}(s)$	I_1	I_2	$T_{2,1}(s)$	$T_{2,2}(s)$	$T_{2,3}(s)$	I_1	I_2	I_3
0,51	0,58	0,14	0,74	0,18	0,14	0,58	0,58	0,19	0,27	0,48

Nota-se que existe diferença nos valores de T_2 encontrado para o ajuste monoexponencial e para os ajustes biexponencial e triexponencial. No entanto o valor de T_2 do ajuste monoexponencial (0,51s) aproxima mais do valor de T_2 com maior intensidade para bi e triexponencial (0,58s).

O ajuste triexponencial foi utilizado, por Raffo e colaboradores^[25] que propuseram que em pedaços de banana nanica o decaimento do sinal CPMG se dá por três tipos de água, que levam a três diferentes valores de T_2 . A figura 4.2 apresenta o esquema de uma célula de banana com três compartimentos com água, o vacúolo (1), o citoplasma (2) e a parede celular (3). O sinal da água do vacúolo é o que apresenta maior área (75%) e o maior valor de T_2 (0,5s). O sinal da água do citoplasma tem menor valor de T_2 (0,1s) e intensidade (15%) que do vacúolo. O sinal da água associado à parede celular tem o menor valor de T_2 (0,01s) e de área (5%).

Para explicar esse três tempos de relaxação na banana Raffo e colaboradores^[25] consideram que os diferentes valores de T_2 são controlados pela troca química entre a água e outras moléculas presentes nestes compartimentos. Eles associaram o maior valor de T_2 à água presente no vacúolo, pois o vacúolo ocupa uma grande parte da célula. No vacúolo existem vários tipos de substâncias diluídas, como açúcares, sais e outras pequenas moléculas orgânicas, que reduzem pouco a mobilidade da água e conseqüentemente o valor de T_2 . A água no citoplasma tem o valor intermediário de T_2 . No citoplasma estão as diversas organelas, e as macromoléculas, como proteínas, e carboidrato, como o amido, que faz com que o T_2 seja menor do que no vacúolo. Por isso a troca entre a água e esses componentes têm um valor intermediário. Já para o menor valor de T_2 é associada com a água localizada na parede celular, neste caso a troca química

entre a água e as substâncias presentes é rápida o que caracteriza um valor de T_2 pequeno.

Figura 4.2: Esquema de uma célula vegetal explicando os diversos tempos de relaxação encontrados. (1) vacúolo, (2) citoplasma, (3) parede celular^[28].

Uma outra metodologia usada para obter os valores dos tempos de relaxação e suas respectivas contribuições (área) é baseado na transformada inversa de Laplace (ILT), usando algoritmo denominado de CONTIN^[29]. O resultado da ILT é um espectro contendo os tempos de relaxação que compõem o sinal e suas respectivas áreas (figura 4.3). Esse tipo de espectro é denominado de espectro de relaxometria. Como pode-se ver no resultado da ILT, que o sinal CPMG, contém três tempos de relaxação (T_{21} , T_{22} e T_{23} , 0,6, 0,2, 0,02 s, e as respectivas áreas 1,2 e 3(65,3; 24,5; 10,2).

Esse método difere do método de ajuste multiexponencial discreto, pelo fato de não necessitar de intervenção do operador para definir o número de exponenciais do sinal. No entanto o operador pode atribuir diferentes valores de α , parâmetro de regularização, forçando os pontos da vizinhança a aproximarem entre si, isso faz com que os sinais fiquem mais largos, também rejeita soluções com grande número de picos. Esse parâmetro funciona como um filtro passa baixa, diminuindo as incertezas produzidas pela transformada inversa de Laplace.

Figura 4.3: Espectro de relaxação transversal (relaxometria de T_2) do sinal da figura 4.1, utilizando a ILT.

4.2. Análise da qualidade de 'banana ouro' por RMN

4.2.1 Análise do amadurecimento de 'banana ouro'

A figura 4.4 apresenta as curvas de decaimento de T_2 obtidas com a técnica CPMG para uma mesma banana analisada no 1º, 5º e 8º dias após a colheita. A banana utilizada neste experimento já estava bem amarelada no 1º dia (figura 4.5, superior) e será denominada de banana amarela. Na figura 4.4 observa-se que o decaimento do sinal fica mais longo com o amadurecimento da banana, indicando um aumento do tempo de relaxação com o tempo de maturação. Esse efeito pode ser melhor acompanhado com o processamento com a ILT (figura 4.6). Com o espectro de relaxometria também pode-se ver que o sinal do vacúolo, de maior intensidade e área, se desloca para maiores valores de T_2 , com a maturação. Nas figuras 4.7a e 4.7b estão os gráficos da variação de T_2 do maior sinal da

relaxometria para uma das bananas maduras e para a média de três amostras maduras em função do tempo de maturação. O tempo de relaxação T_2 para essas bananas foi uma variação de cerca de 0,4 a 0,7s.

Figura 4.4: Curvas de decaimento exponencial obtidas com a técnica de CPMG para uma amostra de banana amarela no 1º, 5º e 8º dias após a colheita.

Figura 4.5: Aspecto externo de 'bananas ouro' utilizadas nas medidas. A superior foi considerada banana amarela e a inferior banana verde.

Figura 4.6: Espectro de relaxação (relaxometria) para uma ‘banana ouro’ amarela em função do tempo de maturação.

Os dados das figuras 4.7a e 4.7b foram ajustados linear e sigmoidalmente. O ajuste linear para os dois conjuntos de dados apresentou coeficientes de correlação de 0,89 e 0,94 respectivamente. Apesar desse alto coeficiente de correlação, o ajuste sigmoidal representou melhor os dados ($r=0,93$ e $0,94$ respectivamente) e pode estar refletindo um comportamento da velocidade de maturação, que é lenta no início, acelera e depois atinge um patamar, no final do processo.

Figura 4.7: Correlação entre o T_2 e os tempos de maturação para uma 'banana ouro' amarela (a) e média de 3 amostras (b). A curva preta é o ajuste linear e a vermelha o sigmoidal.

Na figura 4.8 está a variação da área dos sinais de relaxometria da média de três bananas amarelas em função do tempo de maturação. Como pode-se ver nesta figura, o sinal de maior intensidade, relacionado à água no vacúolo aumenta de 60 a 90% até o 3º dia e depois se estabiliza. Para os outros dois sinais a área conseqüentemente diminui com o tempo de maturação.

Os resultados para as bananas consideradas verdes, figuras 4.9 e 4.10 foram muito similares aos obtidos com as bananas amarelas. As principais diferenças foram os valores iniciais e finais de T_2 (~0,3 a 0,6s – figura 4.9), que foram menores do que para as bananas amarelas e que a área máxima do sinal de maior intensidade ocorreu no 4º dia (figura 4.10).

Figura 4.8: Variação da intensidade dos três sinais de relaxometria das médias de três ‘bananas ouro’ amarelas em função do tempo de maturação, (▲) água no vacúolo, (●) água no citoplasma (■) água na parede celular.

Figura 4.9: Correlação entre o T_2 e os tempos de maturação para uma ‘banana ouro’ verde (a) e média de 3 amostras (b). A curva preta é o ajuste linear e a vermelha o sigmoide.

Raffo e colaboradores^[25] obtiveram este mesmo efeito do aumento do valor de T_2 com o tempo de maturação de banana nanica. Eles usaram pequenos fragmentos de bananas de $2,5 \text{ mm}^3$ e utilizaram diferentes bananas nos 7 dias de

estudo. Eles explicaram a variação de T_2 com base no efeito da troca química entre a água e os polissacarídeos.

Figura 4.10: Variação da intensidade dos três sinais de relaxometria das médias de três ‘bananas ouro’ verdes em função do tempo de maturação, (▲) água no vacúolo, (●) água no citoplasma (□) água na parede celular.

A figura 4.11 ilustra o comportamento da molécula de água se ligando ao amido, quando a banana está verde e a sacarose, quando está madura. Na banana verde, a água está em equilíbrio entre a água livre e a água ligada ao amido. Como o amido tem tempo de correlação longo e T_2 curto, a água ligada se comporta como ele. Por outro lado, a água livre tem um tempo de correlação curto e T_2 longo. Assim, o valor do T_2 medido na banana tem dependência das concentrações da água livre e ligada e da constante de equilíbrio. Com o amadurecimento da banana há uma redução na concentração de amido, e o valor de T_2 tende para o da água livre. O aumento de concentração da sacarose, que é uma molécula bem menor que o amido, tem pouca influência no T_2 da água ligada.

Figura 4.11: Uma ilustração do que pode ser a ligação da molécula de água com os carboidratos, amido e açúcar.

Raffo e colaboradores não observaram mudança da intensidade do sinal com maior T_2 , com o amadurecimento, como observado nas figuras 4.8 e 4.10. Uma explicação para isso pode ser devido às diferenças entre as duas bananas ('ouro' e 'nanica') ou devido às injúrias causadas na amostra durante o corte, no trabalho de Raffo e colaboradores^[25]. Para tentar entender melhor essa alteração na intensidade do sinal com a maturação foram feitos experimentos de injúria mecânica e por baixa temperatura.

4.2.2. Análise do efeito da injúria mecânica no T_2 de 'bananas ouro'

A figura 4.12 ilustra o efeito da injúria mecânica (amassamento de toda a região analisada) no espectro de relaxação de uma banana e a figura 4.13, uma média de seis amostras, em função do tempo (até 2 horas). A figura (a) é da banana antes do amassamento; (b), recém amassada (1 a 5 minutos após a compressão) e (c e d), após 1h e 2 horas respectivamente. Nestas figuras podem-se ver os três picos correspondentes ao vacúolo, ao citoplasma e à parede celular.

No caso das bananas individuais houve uma flutuação nos três valores de T_2 . Já a área do T_2 mais longo diminuiu com o tempo após o amassamento enquanto que dos outros dois componentes cresceram (4.12b) No caso dos valores médios de T_2 , figura 4.13, os tempos dos dois componentes mais longos ficaram

praticamente constantes e um aumento do tempo para o componente com menor valor de T_2 , mesmo após 2 horas do dano. No caso das áreas observaram-se um comportamento similar ao das bananas individuais, com a redução da área do componente com T_2 mais longo e aumento dos outros dois componentes.

Figura 4.12: Espectros de relaxometria T_2 de uma 'banana ouro' em função do tempo após o amassamento.

Figura 4.13: Espectros de relaxometria T_2 de média de seis 'bananas ouro' em função do tempo de amassamento.

Esses resultados demonstram que no trabalho de Raffo e colaboradores^[25] que usou pequenos pedaços de banana, as áreas relativas não devem corresponder aos valores observados para as amostras intactas uma vez que o processo de corte leva automaticamente a um certo amassamento da amostra.

A situação de amassamento é muito comum em bananas durante a estocagem e transporte, onde as bananas são comprimidas umas contra as outras, ou até por quedas. Essa condição não altera rapidamente o valor de T_2 , mas causa uma alteração das proporções de água entre os compartimentos celulares.

Fez-se também experimento onde causou-se um menor dano na banana atingindo cerca de 50% de seu diâmetro por um período de 7 horas (figura 4.14). Nas figuras 4.12 e 4.13 observa-se que o T_2 do maior componente apresentou redução significativa principalmente após 2 horas, variando de 0,5s antes de amassar decaindo para 0,4s após as 7 horas. Com relação às áreas observou-se o efeito idêntico ao da figura 4.10, com a redução da intensidade do sinal com maior T_2 e o aumento principalmente do componente com valor de T_2 intermediário, figura 4.15. A área do pico com menor valor de T_2 ficou praticamente inalterada.

Figura 4.14: Espectros de relaxometria T_2 de uma 'banana ouro' em função do tempo após o amassamento.

Figura 4.15: Variação da intensidade dos três sinais de relaxometria das médias de três ‘bananas ouro’ verdes em função do tempo após o amassamento, (▲) água no vacúolo, (●) água no citoplasma (□) água na parede celular.

4.2.3. Análise do efeito congelamento no T_2 de ‘bananas ouro’

Para melhor entender esse deslocamento do sinal de relaxação frente ao amadurecimento e injúria mecânica, foram feitos experimentos com bananas que foram congeladas. Durante o congelamento, a água se cristaliza, rompendo as membranas intracelulares, e das organelas, fazendo com que os solutos inicialmente compartimentados nesse diferentes ambientes (vacúolos, citoplasma e espaço intracelulares) se misturem. Para isso congelaram-se 5 amostras de banana em um freezer à -20°C por 24 horas. Em seguida, as bananas foram colocadas na temperatura das medidas (22°C) até atingir o equilíbrio térmico (aproximadamente 6 horas).

Na figura 4.16 estão os espectros de T_2 das 5 amostras, onde pode-se ver que o sinal com grande área (75%) em torno de 0,5 s, presente nas bananas intactas quase desapareceu, decaindo para cerca de (5%). Os outros dois sinais em torno de 0,1s e 0,03 s, que antes do congelamento correspondiam 20 e 5% passaram para 60 e 45% respectivamente. Essa mudança pode ser melhor observada na figura 4.17 , onde se tem a comparação dos espectros da banana intacta 4.17a, e a média das cinco bananas congeladas, 4.17b. Por esta figura nota-se que o sinal relativo ao T_2 intermediário quase não se desloca com o congelamento, apenas sua intensidade enquanto que os outros dois sinais se deslocaram para maiores valores de T_2 .

Figura 4.16: Espectros dos tempos de relaxação versus intensidade para cinco amostras de ‘bananas ouro’ congeladas caracterizadas como B1, B2, B3, B4 e B5.

Figura 4.17: Média dos espectros obtidos das amostras de ‘bananas ouro’ intactas (a) e das amostras congeladas (b).

Essas mudanças de concentração e dos tempos de relaxação dos dois sinais com menor e maior T_2 , podem ser explicados pela mistura da água de todos os componentes celulares. Com o rompimento das membranas, a solução que antes está restrita ao vacúolo, agora se misturou a do citoplasma e outros componentes. Assim o sinal relativo a água do vacúolo foi reduzida e conseqüente aumento dos outros dois componentes. Pelos resultados pode-se ver que o aumento do sinal relativo à água que estava no citoplasma não sofreu alteração significativa do valor de T_2 , pois a água do vacúolo ao se misturar com a do citoplasma entrou em contato com macromoléculas e outras estruturas de grande porte, ficando parecida com a do citoplasma. Já no caso do sinal de menor tempo de relaxação a presença de maior quantidade de água levou a um maior tempo de relaxação, pois a água do vacúolo e o seu tempo T_2 eram bem maiores do que o observado inicialmente para esse sinal.

4.2.4 Análise da qualidade de ‘uva Itália’ por RMN

Atualmente os métodos usados para avaliar o sólidos solúveis das uvas é principalmente o de refratometria, que é um método destrutivo e que inviabiliza seu uso em todas as amostras. Assim, têm sido estudados alguns métodos não destrutivos para medidas da qualidade interna de uvas, baseados em métodos acústicos e espectroscópicos, na região do UV-visível, infravermelho e RMN. Os estudos com RMN em baixa resolução com uvas intactas foram realizados com um sistema de ímã aberto (single side NMR) e envolveram medidas do coeficiente de difusão da água em função dos dias das análises^[27]. Neste trabalho^[27] os autores estavam demonstrando o potencial de análise do sistema aberto de RMN em vários tecidos biológicos. Assim, a interpretação dos resultados para o caso da uva foi equivocada, pois correlacionaram as mudanças no coeficiente de difusão da água com o tempo de maturação das frutas. Como a uva é uma fruta não-climatérica isso não é possível. Assim usamos nesta parte do trabalho a relaxometria de RMN em baixa resolução, com medidas T_1 (IR), T_2 (CPMG) e ambos T_1 e T_2 com a técnica CWFPP para avaliar a qualidade interna de uva Itália. Os resultados dessas medidas foram correlacionados com as medidas de brix, firmeza, pH e umidade.

Os primeiros experimentos foram feitos para verificar a estabilidade da uva após vários dias de armazenamento. Quando as uvas foram armazenadas a cerca de 4° C não se observou diferença significativa por mais de uma semana, indicando que não há uma dependência muito grande do sinal de RMN e o tempo de colheita das uvas. Para acelerar o processo de deterioração das uvas foram feitos estudos a 28°C por 7 dias. Nestes experimentos as uvas perderam cerca de 22% de massa, passando de cerca de 5,8 para 4,5 gramas por uva. Na figura 4.18 estão

dados de relaxometria de uma das uvas estudadas onde pode-se ver que houve uma redução dos tempos de relaxação T_2 , principalmente para os sinais em 0,5 e 0,09s.

Figura 4.18: Espectro de relaxometria dos dados de CPMG (ILT) de uma das uvas armazenada à 28° C durante 7 dias, (a) amostra para o primeiro dia e (b) para o último dia.

Em seguida foram feitas análises de 21 uvas Itália coletadas aleatoriamente, de um mesmo cacho, com as técnicas de RMN CPMG, IR e CWFP e posteriormente verificada a ocorrência de correlação com as medidas de firmeza e brix.

A tabela 3.1 mostra os valores das respectivas amostras de uvas, denominadas como sendo cacho 1 – 1p, a amostra do cacho 1 a primeira amostra de uva da parte proximal do pedúnculo (1p), a segunda 2p e a terceira 3p, cacho 1 – 1m a amostra do cacho 1 a primeira amostra de uva da parte média do pedúnculo (1m), a segunda 2m e a terceira 3m, cacho 1 – 1d a amostra do cacho 1 a primeira amostra de uva da parte distal do pedúnculo (1d), a segunda 2d e a terceira 3d, e assim sucessivamente, com os respectivos valores de sólidos solúveis, firmeza (kgf/cm^2), umidade e pH, usadas para correlacionar os dados de CPMG, IR e CWFP.

Tabela 4.2: Valores de brix, firmeza, umidade e pH das amostras de uvas de cinco cachos diferentes.

Medidas Amostras	Sólidos Solúveis (°brix)	Firmeza (kgf/cm ²)	Umidade (%)	pH
Cacho 1 – 1p	13,7	0,669	84,5	2,97
Cacho 1 – 2p	14	0,669	86,6	3,55
Cacho 1 – 3p	12,6	0,772	86,5	3,11
Cacho 1 – 1m	13,5	0,747	85,2	3,04
Cacho 1 – 2m	14,4	0,772	85	2,92
Cacho 1 – 3m	12,6	0,747	87,1	3,15
Cacho 1 – 1d	12,8	0,695	85,3	2,71
Cacho 1 – 2d	12,4	0,721	86	2,70
Cacho 1 – 3d	15,2	0,644	86,2	2,88
Cacho 2 – 1p	12	0,669	85,8	3,36
Cacho 2 – 2p	12,2	0,721	86,4	3,46
Cacho 2 – 3p	12,4	0,721	86,7	2,94
Cacho 2 – 1m	11,8	0,695	86,8	3,45
Cacho 2 – 2m	12,1	0,798	88,5	3,47
Cacho 2 – 3m	9,8	0,875	88,7	3,24
Cacho 2 – 1d	12	0,644	87,2	2,73
Cacho 2 – 2d	11,6	0,772	86,5	2,78
Cacho 2 – 3d	11,4	0,772	86,6	2,60
Cacho 3 – 1p	12	0,850	86,9	3,21
Cacho 3 – 2p	14,3	0,824	85,6	2,74
Cacho 3 – 3p	14,8	0,798	84,4	2,93
Cacho 3 – 1m	10,9	0,721	87,5	2,61
Cacho 3 – 2m	11,6	0,901	87,9	2,65
Cacho 3 – 3m	10,6	0,978	88,1	2,73
Cacho 3 – 1d	8,9	1,055	88,7	2,57
Cacho 3 – 2d	10,1	0,953	88,8	2,61
Cacho 3 – 3d	10	1,13	88,3	2,72
Cacho 4 – 1p	17	0,644	80,7	3,37
Cacho 4 – 2p	17	0,566	80,7	3,36
Cacho 4 – 3p	17,5	0,592	80,3	2,76
Cacho 4 – 1m	18,2	0,566	80,3	2,78
Cacho 4 – 2m	18,2	0,695	80,2	2,88
Cacho 4 – 3m	17	0,566	81,3	2,92
Cacho 4 – 1d	11	0,566	87,3	2,62
Cacho 4 – 2d	16,2	0,644	82,8	2,76
Cacho 4 – 3d	12,4	0,772	86,1	2,53
Cacho 5 – 1p	15,6	0,798	83,9	2,72
Cacho 5 – 2p	18,6	0,695	81,4	2,72
Cacho 5 – 3p	17,9	0,721	81,4	2,80
Cacho 5 – 1m	14,7	0,695	83,9	2,63
Cacho 5 – 2m	16,2	0,644	82,4	2,63
Cacho 5 – 3m	15,7	0,644	83	2,78
Cacho 5 – 1d	14,6	0,695	83,8	2,64
Cacho 5 – 2d	16,9	0,772	82,8	2,70
Cacho 5 – 3d	14,4	0,747	85,3	2,80

A figura 4.19 mostra a correlação dos valores de tempo de relaxação T_2 medido com a técnica CPMG versus brix para amostras de 'uvas Itália'.

Figura 4.19: Correlação dos valores de brix versus tempo de relaxação T_2 em segundos para 21 uvas ($R=-0,85$).

Nesta figura pode se ver que para as uvas com brix acima de 10 tem uma alta correlação negativa ($r = -0,85$) com T_2 . Por outro lado quando se incluem os valores de brix abaixo de 10, essa correlação cai para 0,3, o que impede o uso de T_2 para prever os valores de brix. Essa discrepância de T_2 e brix abaixo de 10 pode estar relacionada com o diferente grau de maturação, das uvas dentro do cacho. Ou seja, quando esse cacho foi colhido, algumas uvas ainda estavam no estágio inicial de maturação (baixo brix), mas também estavam certamente mais firmes do que as maduras, o que pode ter contribuído para a não correlação de T_2 com o brix. A diferença de estágio de maturação no caso de uva Itália não é facilmente observado o que dificulta a determinação do melhor ponto de colheita.

Na figura 4.20 está o gráfico de correlação entre T_2 e a firmeza, que demonstra que praticamente não houve correlação ($r = -0,19$) entre as duas medidas dessas amostras.

Figura 4.20: Correlação dos valores de firmeza (kgf/cm²) versus tempo de relaxação T_2 para 21 uvas.

Apesar da medida de T_1 por IR, ter longo tempo de medida, o que dificulta o uso comercialmente (larga escala) fez-se também a medida para essas mesmas uvas e correlacionou-se com brix (figura 4.21).

Pela figura 4.21 pode-se observar que a medida de T_1 apresentou uma melhor separação das uvas com os valores de brix acima e abaixo de 10. No entanto também houve certa sobreposição dos valores de T_1 com médio e baixo brix. A correlação foi de $r = 0,58$ para todos os valores, sem discriminar os valores abaixo de brix 10.

Figura 4.21: Correlação entre os valores de brix e o tempo de relaxação T_1 para 21 uvas.

Na figura 4.22 está o gráfico de correlação entre T_1 e firmeza. Neste gráfico pode ver que a correlação entre firmeza e T_1 foi de $r=0,55$, similar a do brix versus T_1 . Esse resultado também mostra que a firmeza não pode ser totalmente discriminada por T_1 .

Figura 4.22: Correlação entre os valores de firmeza (kgf/cm²) e o tempo de relaxação T_1 em segundos para 21 uvas.

Fez-se uma avaliação das medidas de relaxometria com a técnica de CWFP, que contém informações tanto de T_1 quanto de T_2 . Com essa técnica é possível medir dois parâmetros relacionados à relaxação, a razão entre a intensidade do sinal no equilíbrio térmico (M_0) e o sinal no estado estacionário (M_z), onde $(M_z/M_0 = T_2/T_1 + T_2)$ e o segundo parâmetro é a constante de tempo T^* , ($T^* = 2T_1T_2 / T_1 + T_2$), que é a constante de tempo entre o estado quase-estacionário ao estacionário^[15]. Na figura 4.23 encontram-se os valores de brix e a razão entre M_z/M_0 , a correlação foi de -0,67, essa correlação foi maior que a do T^* , que foi de 0,4. Neste gráfico houve uma melhor discriminação entre os valores acima e abaixo de brix 10, isso se deve ao fato que a técnica de CWFP depende de ambos os valores de T_1 e T_2 , obtendo assim uma melhor resposta. As duas linhas perpendiculares da figura 4.23 foram colocadas apenas para melhor visualização dos valores acima e abaixo de brix 10 e dos correspondentes valores da razão M_z/M_0 .

Figura 4.23: Correlação entre os dados da razão M_z/M_0 versus brix para 21 uvas. As duas linhas foram colocadas apenas para visualizar melhor a separação entre os valores acima e abaixo de brix 10.

A figura 4.24 ilustra a correlação entre os valores de firmeza e a razão M_z/M_0 , que foi de 0,66. Apesar da técnica de CWFP apresentar valores tanto de T_1 quanto de T_2 , os dados de firmeza com a razão M_z/M_0 não apresentou um bom resultado. Isso pode estar relacionado com o grau de maturação, ou seja, as uvas não apresentam um amadurecimento uniforme.

Figura 4.24: Correlação entre os dados de M_z/M_0 versus firmeza para 21 uvas.

Também foram feitas análises com mais amostras e utilizando uvas de cachos diferentes. Utilizaram-se 9 uvas de 5 cachos (45 amostras). Dentro de cada cacho as uvas foram separadas em 3 partes, a parte distal do pedúnculo, parte média e parte proximal.

Para essas análises foram realizadas medidas de T_1 , T_2 e a razão M_z/M_0 , pelas técnicas de IR, CPMG e por CWFP, respectivamente. Também avaliaram-se os dados de CPMG e CWFP com métodos quimiométricos como análise de componentes principais (PCA) e regressão pelo método de mínimos quadrados

parcial (PLS). Esses resultados foram correlacionados com os resultados de firmeza, brix, pH e umidade.

Nas figuras 4.25 a 4.28 estão os gráficos da correlação de T_2 com de brix, firmeza, umidade e pH respectivamente. A figura 4.25 ilustra a correlação entre brix e T_2 , que foi de -0,64. Os valores abaixo da curva de regressão são de uvas pertencentes à parte distal do cacho, pertencentes na maioria do mesmo cacho (cacho 3). Todas as uvas dos cachos 1 e 2 ficaram concentradas em uma região, enquanto as dos cachos 3, 4 e 5 as uvas não tiveram um bom agrupamento. Nestes últimos cachos percebe-se que as uvas estão na maioria muito doces (cachos 4 e 5, com alto brix) ou pouco doce (cacho 3, com baixo brix).

Figura 4.25: Correlação entre os dados de brix com o tempo de relaxação T_2 em segundos para 45 uvas, cacho 1 (■), cacho 2 (○), cacho 3 (▲), cacho 4 (◆), cacho 5 (□).

A figura 4.26 ilustra a correlação de T_2 (s) com a firmeza (kgf/cm^2), que foi muito baixa, na ordem de 0,2. Neste gráfico também tentou-se agrupar as uvas

dentro de cada cacho. Os cachos 1 e 2 tiveram um bom agrupamento. Os cachos 3, 4 e 5 também não tiveram bom agrupamento assim como no Brix.

Figura 4.26: Correlação entre os dados de firmeza (kgf/cm²) e o tempo de relaxação T₂ em segundos para 45 uvas, cacho 1 (■), cacho 2 (○), cacho 3 (▲), cacho 4 (◆), cacho 5 (□).

A figura 4.27 ilustra a correlação entre T₂ e umidade. A correlação dos valores de T₂ e umidade foi de 0,66. Novamente, os cachos 1 e 2 tiveram um bom agrupamento, seus valores de T₂ encontram-se próximos dos seus respectivos cachos. Novamente os cachos 3, 4 e 5 não tiveram um bom agrupamento.

O gráfico da correlação entre os valores de pH e T₂ está na figura 4.28. Neste gráfico não houve agrupamento para nenhum cacho. O que não permite identificar os cachos pelo pH correlacionados com T₂.

Figura 4.27: Correlação entre os dados de umidade, em porcentagem de massa de água, e o tempo de relaxação T₂ em segundos para 45 uvas, cacho 1 (■), cacho 2 (○), cacho 3 (▲), cacho 4 (◆), cacho 5 (□).

Figura 4.28: Correlação entre os dados de pH e o tempo de relaxação T₂ em segundos para 45 amostras, cacho 1 (■), cacho 2 (○), cacho 3 (▲), cacho 4 (◆), cacho 5 (□).

Como a medida de T_1 por IR é muito longa utilizaram-se apenas 15 uvas, ou seja, 3 uvas de cada cacho, uma de cada parte distal, média e proximal do cacho. As figuras 4.29a-d mostram as correlações de brix, firmeza, umidade e pH respectivamente versus o tempo de relaxação T_1 .

As correlações entre T_1 e brix (-0,35), firmeza (-0,2), umidade (0,43) e pH (0,49) não foram elevada como observado para as medidas em um mesmo cacho (figura 4.19 e 4.20). Isso pode ter ocorrido pelas diferenças de maturação que podem estar ocorrendo entre os cachos.

Figura 4.29: Correlação entre os dados de brix (a), firmeza (b), umidade (c) e pH (d) com o tempo de relaxação T_1 em segundos para 15 uvas.

As figuras 4.30a - d estão os gráficos de correlação entre M_z/M_0 versus brix, umidade, pH e firmeza. Nesta figura pode-se ver que o brix e a umidade tiveram um bom coeficiente de correlação, $r=-0,66$ e $0,66$ respectivamente. O pH apresentou um $r=0,44$ e a firmeza não teve correlação assim como nos dados de T_1 e T_2 .

Figura 4.30: Correlações entre os dados da razão de M_z/M_0 versus brix (a), umidade (b), pH (c) e firmeza (d).

Para fazer uma avaliação mais detalhada dos dados obtidos com as técnicas de CPMG e CWFP, utilizou-se de métodos quimiométricos que permitem a análise de todos os dados do sinal não apenas alguns parâmetros como, por exemplo, constantes de tempo.

4.3. Análises Quimiométricas

Os dados de CPMG e CWFP de amostras de uvas foram analisados através de métodos quimiométricos, como PCA e PLS.

No método quimiométrico há pouca ou nenhuma interferência do operador como no método multiexponencial. As análises quimiométricas podem ser usadas tanto para uma análise exploratória de um conjunto de dados, como a Análise de Componentes Principais (PCA) quanto para medidas quantitativas, baseados na regressão multivariada pelos métodos dos mínimos quadrados parciais (PLS).

A Análise de Componentes Principais (PCA) pode ser usada tanto para a visualização de similaridades ou diferenças de um conjunto de dados, quanto para reduzir a sua dimensão. Os primeiros componentes principais (PCs) condensam as informações mais relevantes e os últimos PCs as menos importantes ou irrelevantes. Usando-se os primeiros PCs, e não todos os dados, pode-se reduzir a dimensionalidade dos dados.

Os PCs são apresentados em ordem decrescente de variância e cada novo PC é ortogonal ao anterior (ou seja sem correlação). Assim, a primeira componente principal (PC1) descreve a maior variância dos dados do que as componentes subsequentes ($PC1 > PC2 > PC3... > PCn$). A variância está relacionada com a quantidade de informações dos dados originais que é descrita pelas componentes principais^[58].

O PCA decompõe a matriz de dados originais X , com m amostras e n dados por amostras ($X = m \times n$) em duas outras matrizes S e L . A matriz de escores S , é uma matriz ortogonal de autovetores das linhas da matriz X e a matriz de pesos

L , é uma matriz ortogonal de coeficientes, ou seja, $\mathbf{X} (\mathbf{m} \times \mathbf{n}) = \mathbf{S} \cdot \mathbf{L}^T$, onde L^T é a matriz L transposta. A matriz S contém as informações das interações entre as amostras e a matriz L indica quais variáveis são as mais importantes e que contribuem para cada componente principal^[58].

A visualização de todos os dados da matriz S não é possível, utilizam-se os primeiros PCs, pois são os dados que contêm maior variância. Podendo, assim, gerar gráficos bidimensionais entre os dados do PC1 e PC2, PC1 e PC3 etc^[56].

4.3.1. Análise dos dados de CPMG por PCA

A figura 4.31 apresenta o gráfico dos escores entre PC1 e PC2 dos dados de CPMG das 45 uvas analisadas. Esses dois PCs representam 99,05% de variância total dos dados. Nesta figura, as amostras de um mesmo cacho foram identificadas com símbolos iguais para facilitar a análise. Pode-se observar que houve bom agrupamento para as amostras dos cachos 1 e 2, que ficaram em valores positivos de PC1. As amostras dos cachos 3, 4 e 5 ficaram bem mais espalhadas, assim como observado na figura 4.25. As amostras do cacho 3, ficaram em valores negativos e positivos, próximo a zero, em PC1 e as amostras dos cachos 4 e 5 ficaram no lado negativo de PC1.

Na figura 4.32 estão os dados CPMG de PC1 e PC2 da figura 4.31, mas agrupados pelos valores de brix. As amostras com brix abaixo de 12 ($\exists$), de 12 a 16 (o) e acima de 16 (8) estão bem sobrepostas demonstrando que há muita similaridade entre os dados de CPMG, se considerando o brix. Pela figura 4.31, pode-se observar que a separação pelo cacho foi bem melhor.

Figura 4.31: Gráfico de escores dos dados de CPMG para todas as amostras de uvas, identificadas por cacho.

Figura 4.32: Gráfico de escores dos dados de CPMG para todas as amostras de uvas, identificadas por brix abaixo de 12 (∇), de 12 a 16 (o) e acima de 16 (Δ).

4.3.2. Análise dos dados de CWFP por PCA

A figura 4.33 apresenta o gráfico dos escores entre PC1 e PC2 dos dados de CWFP das 45 uvas analisadas. Esses dois PCs representam 47,05% de variância total dos dados. Assim, como no caso dos dados de CPMG, pode-se observar que houve bom agrupamento para as amostras dos cachos 1 e 2, que ficaram em valores positivos de PC1. Uma amostra do cacho 2 ficou em valor negativo e no extremo de PC1 indicando que os dados não tenham sido coletados corretamente. As amostras dos cachos 3, 4 e 5 ficaram bem mais espalhadas, assim como nos dados de CPMG. As amostras do cacho 3, ficaram em valores mais negativos do que positivos, próximo a zero, em PC1 e as amostras dos cachos 4 e 5 ficaram no lado negativo de PC1.

Figura 4.33: Gráficos dos escores dos dados de CWFP de amostras de uvas, identificadas por cacho.

Na figura 4.34 estão os dados CWFP de PC1 e PC2 da figura 4.33, mas agrupados pelos valores de brix. As amostras com brix abaixo de 12 (Ξ), de 12 a 16 (o) e acima de 16 (Δ) estão bem sobrepostas demonstrando que há muita similaridade entre os dados de CWFP, se considerando o brix, assim como observado por CPMG. Pela figura 4.33, pode-se observar que a separação pelo cacho foi bem melhor.

Figura 4.34: Gráfico de escores dos dados de CWFP para todas as amostras de uvas, identificadas por brix abaixo de 12 (Ξ), de 12 a 16 (o) e acima de 16 (Δ).

4.3.3 Análise dos dados físico-químicos por PCA

Fez-se a análise de PCA com os dados de brix, pH, firmeza e umidade para ver a diferenciação entre as amostras do mesmo cacho.

A figura 4.35a mostra o gráfico de escores (PC1 e PC2) com todos os parâmetros físico-químicos analisados. Os dados foram centrados na média,

utilizando 3 componentes principais com uma variância acumulativa de 99,97%, sendo que a componente PC1 e PC2 representam 99,88% da variância total dos dados. Essa figura não mostra uma boa separação entre os cachos. A figura 4.35b mostra o gráfico dos escores com os parâmetros físico-químicos analisados, a diferença é que os dados foram autoescalado, utilizando 3 componentes principais tendo uma variância acumulativa de 99,76%, a componente PC1 e PC2 representam 88,10% da variância total dos dados. Observa-se que há uma melhor separação entre o autoescalado que o centrado na média. Os cachos 3, 4 e 5 tiveram uma melhor separação que as outras análises.

Figura 4.35: Gráfico dos escores. PC1 versus PC2 das amostras de uvas obtidas pelos métodos convencionais, centrado na média (a) autoescalado (b).

4.3.4 Regressão por mínimos quadrados parciais (PLS)

Utilizou-se também o método de regressão multivariada para correlacionar as informações de RMN (CPMG e CWFP) com o brix, pH, firmeza e umidade. No método PLS além da variância das variáveis independentes, calcula-se

também a correlação entre as variáveis latentes e as variáveis dependentes. No método PLS são construídos dois modelos, um para as variáveis independentes X, com os dados de RMN, e outro para as variáveis dependentes Y, com os dados dos parâmetros físico-químicos^[55,56].

Foi realizada também análise de PLS para as amostras de uvas. A figura 4.36 ilustra a correlação linear dos dados de RMN com os parâmetros físico-químicos. Observa-se que o Brix e umidade tiveram alta correlação e pH e firmeza tiveram baixa correlação, assim como medido diretamente pelos valores de T_2 (figura 4.25 a 4.30).

A tabela 4.2 mostra os coeficientes de correlações dos sinais de CPMG e CWFP com os parâmetros físico-químicos para as amostras de uvas. Somente o brix e a umidade tiveram boa correlação com CPMG ($r = 0,76$ e $r = 0,79$ respectivamente). No CWFP também obtiveram boa correlação o brix e a umidade ($r = 0,62$ e $r = 0,75$ respectivamente).

Tabela 4.3: Coeficientes de correlações dos sinais de CPMG e CWFP previsto com PLS e os respectivos parâmetros físico-químicos das uvas.

	Parâmetros físico-químicos			
	Brix	pH	Firmeza	Umidade
CPMG	0,76	0,29	0,26	0,79
CWFP	0,62	0,31	0,40	0,75

Figura 4.36: Correlação entre os valores de CPMG e os parâmetros físico-químicos, (a) brix, (b) pH, (c) firmeza, (d) umidade.

A figura 4.37 ilustra os dados de RMN CWFP em correlação entre os parâmetros físico-químicos. Observa-se também que houveram as melhores correlações com o brix e umidade, similar aos obtidos com a razão M_z/M_0 .

Figura 4.37: Correlação entre os valores de CWFP e os parâmetros físico-químicos, (a) brix, (b) pH, (c) firmeza, (d) umidade.

5. CONCLUSÕES

Concluiu-se que o ajuste monoexponencial não representa perfeitamente a curva de decaimento do sinal do CPMG, obtido de bananas intactas. No entanto, o valor de T_2 monoexponencial é próximo do valor, com maior intensidade, observado nos ajustes bi e triexponenciais, que ajustam perfeitamente o sinal de CPMG. Também não foi possível distinguir entre esse dois ajustes qual é o mais indicado para cada amostra.

A análise do sinal CPMG com a transformada inversa de Laplace (ILT) mostrou ser uma melhor opção para a determinação dos T_2 do que os ajustes exponenciais discretos, pois não precisa da informação do número de exponenciais, que deve ser fornecida pelo operador. No entanto, também está sujeito a erros na determinação de T_2 , principalmente quando se tem espectros com baixa razão sinal ruído, o pode gerar sinais expúrios.

Conclui-se com a análise do sinal CPMG pela ILT a banana, apresenta a água distribuída em três compartimentos que são: vacúolo, citoplasma e parede celular, apresentando valores de T_2 de aproximadamente 0,5, 0,1 e 0,01s

respectivamente. Esses sinais têm intensidade relativa de 75%, 15% e 5% respectivamente. Demonstrou-se que durante o amadurecimento das bananas todos os valores de T_2 aumentam, que tanto as injúrias mecânicas e congelamento reduzem a intensidade do sinal com T_2 mais longo, relativo ao vacúolo, pois esses procedimentos rompem as paredes celulares, e misturam as “águas” antes compartimentadas.

As análises da qualidade interna das uvas com as técnicas de RMN baseadas na medida dos tempos de relaxação T_1 e T_2 , com as seqüências inversão-recuperação (IR), CPMG e CWFP tiveram uma boa correlação com o brix e umidade. No entanto, tiveram pouca ou nenhuma correlação com pH e firmeza. Como as técnicas CPMG e CWFP são mais rápidas do que a IR, elas são as mais indicadas para as análises da qualidade das uvas por RMN em baixa resolução.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

¹RAHMAN, A-U.; CHOUDHARY, M. **Solving problems with NMR spectroscopy**. California: Academic Press, 1995.

²CLARIDGE, T. D. W. **High-resolution NMR techniques in organic chemistry**. Amsterdam: Elsevier, 1999.

³LEYDEN, D. E.; COX, R. H. **Analytical applications of NMR**. New York, Wiley-Interscience Publication, 1977, v.48, p.256-271.

⁴SOLOMONS, T. W. G; FRYHLE, C. B. **Química Orgânica 1**. 7 ed. Rio de Janeiro: LTC, 2001.

⁵GUNASEKAREN, S. **Nondestrutive food evalution: Techniques to analyse properties and quality**. New York, M. Dekker, 2001.

⁶GIL, V. M. S.; GERALDES, C. F. G. C. **Ressonância magnética nuclear: fundamentos, métodos e aplicações**. Lisboa: Fundação Calouste, 1987.

⁷BISCEGLI, C. I.; FRANCO, R. W. A.; TANNUS, A.; COLNAGO, L. A. Use of magnetic resonance imaging and spectroscopy in tropical fruits: Challenges and Opportunities. **Advances in Agricultural Tomography**, Embrapa Agricultural Instrumentation, 2000, p. 77-82.

- ⁸JOYCE, D. C.; HOCKINGS, P. D.; MAZUCCO, R. A.; SHORTER, A. J. Nuclear magnetic resonance imaging of ripening 'Kensington Pride' mango fruit. **Functional Plant Biology**, v. 29, p. 873-879, 2002.
- ⁹NORDON, A.; MCGILL, C. A.; LITTLEJOHN, D. Process NMR spectrometry. **Analyst**, v. 126, n. 2, p. 260-272, 2001.
- ¹⁰FREIBOLIN, H. **Basic one – and two dimensional NMR spectroscopy**. 2. ed. New York. VCH Publishers, 1993.
- ¹¹AZEREDO, R. B. V. **Espectroscopia de RMN CWFP**. 85f. Tese de doutorado – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Carlos, São Carlos, 2004.
- ¹²SANDERS, J. K. M.; HUNTER, B. K. **Modern NMR spectroscopy: a guide for chemists**. 2. ed. New York, Oxford University Press, 1993.
- ¹³COLNAGO, L. A.; MARTIN-NETO, L.; BISCEGLI, C. I.; NASCIMENTO, O. R.; BONAGAMBA, T. J.; PANEPUCCI, H.; VIEIRA, E. M.; SEIDEL, P. R.; SPOSITO, G.; OPELLA, S. J. Aplicações da ressonância magnética nuclear (RMN) e ressonância paramagnética eletrônica (EPR). In: CRESTANA, S.; CRUVINEL, P.E.; MASCARENHAS, S.; BISCEGLI, C. I.; MARTIN-NETO, L.; COLNAGO, L. A. (Ed) **Instrumentação agropecuária: contribuições no limiar do novo século**. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1996. Cap. 1, p. 15-50.
- ¹⁴AZEREDO, R. B. V.; COLNAGO, L. A.; SOUZA, 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.
- ¹⁵VENÂNCIO, 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. 34-36, 2005.
- ¹⁶ALBERT, G.; PUSIOL, D. J.; ZURIAGA, M. J.; Spin-spin and spin-lattice relaxometry in sunflower seeds by NMR. In: BELTON, P. S.; GIL, A. M.; WEBB, G. A.; RUTLEDGE, D. **Resonance in Food Science: Latest Developments**. Cambridge: Royal Society of Chemistry, Cap. 1, p. 93-100, 2003.
- ¹⁷VENÂNCIO, T. **Novas aplicações da precessão livre em onda contínua em Ressonância Magnética Nuclear de baixa e alta resolução**. 151f. Tese de Doutorado - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Carlos, São Carlos, 2006.

- ¹⁸VENÂNCIO, T.; ENGELSBERG, M.; AZEREDEO, R. B. V.; COLNAGO, L. A. Thermal diffusivity and nuclear spin relaxation: A continuous wave free precession NMR study. **Journal of Magnetic Resonance**, p. 2-5, 2006.
- ¹⁹LEOPOLD, A. C.; KRIEDEMANN, P. E. **Plant Growth and development**. McGraw Hill, 1975.
- ²⁰BARRET, D. M.; LASZLO, S.; HOSAHALLI R. **Processing fruits. Science and technology**. 2 ed. CRC Press, 2005.
- ²¹BERTRAM, H C.; AASLYNG, M. D.; ANDERSEN, H. J. Elucidation of the relationship between cooking temperature, water distribution and sensory attributes of pork – a combined NMR and sensory study. **Meat Science**, v. 70, p. 75-81, 2005.
- ²²NASCENTE, A. S. A Fruticultura no Brasil. Embrapa Rondônia. Disponível em: <http://www.cpafrro.embrapa.br/embrapa/Artigos/frut_brasil.html>. Acesso em: julho/2007.
- ²³FIORAVANÇO, J. C. Mercado mundial da banana: produção, comércio e participação brasileira. **Informações Econômicas**, v. 33, n. 10, p. 15-27, 2003.
- ²⁴VILELA, P. S.; CASTRO, C. W.; AVELLAR, S. O. C. Análise da oferta e da demanda de frutas selecionadas no Brasil para o decênio 2006-2015. Disponível em: <<http://www.faemq.org.br/arquivos/An%C3%A1lise%20da%20oferta%20demanda%20de%20frutas.pdf>>. Acesso em: julho/2007.
- ²⁵RAFFO, A., GIANFERRI R., BARBIERI R., BROSIO E. Ripening of banana fruit monitored by water relaxation and diffusion ¹H-NMR measurements. **Food Chemistry**, v. 89, p. 149-158, 2005.
- ²⁶MATSUURA, F. C. A. U.; CARDOSO, R. L.; RIBEIRO, D. E. Qualidade sensorial de frutos de híbridos de bananeira cultivar pacovan¹. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 24, n. 1, p. 263-266, 2002.
- ²⁷RAHMATALLAH, S.; LI, Y.; SETON, H. C.; GREGORY, J. S.; ASPDEN, R. M.; Measurement of relaxation times in foodstuffs using a one-sided portable magnetic resonance probe. **European Food Research and Technology**, v. 222, p. 298-301, 2006.

- ²⁸KROEKER, R. M.; HENKELMAN, R. M. Analysis of biological NMR relaxation data with continuous distributions of relaxation times. **Journal of Magnetic Resonance**, v. 69, p. 218-235, 1986.
- ²⁹SALISBURY, F. B.; ROSS, C. W. **Plant Physiology**. 4 ed. California: Wadsworth Publishing Company, 1992.
- ³⁰RIBEIRO, F. Z.; VIZZOTTO, L.; BARBOSA, L. L.; COLNAGO, L. A. Avaliação da qualidade interna de uvas Itália por relaxometria de RMN de baixa resolução. In: **IX Jornada Brasileira de Ressonância Magnética**, Recife, 2006.
- ³¹RUTLEDGE, D. N. Low resolution pulse nuclear magnetic resonance in agro-food industry. **Journal of Chemistry Physics**, v. 89, n. 2, p. 273-285, 1992.
- ³²AZEREDO, R. B. V.; COLNAGO, L. A.; ENGELSBERG, M. Quantitative analysis using steady-state free precession nuclear magnetic resonance. **Analytical Chemistry**, v. 72, p. 2401-2405, 2000.
- ³³MARIGHETO, N.; WRIGHT, K.; HILLS, B. P. NMR Protocol for on-line Brix determination. **Applied Magnetic Resonance**, v. 30, p. 13-23, 2006.
- ³⁴HELLMAN, E. How to judge grape ripeness before harvest. Southwest Regional Vine & Wine Conference, Texas A&M University, 2004. Disponível em: <http://winegrapes.tamu.edu/grow/ripening.pdf>, acesso em 05/12/2005.
- ³⁵Fruit Growth and Ripening. Disponível em: <http://www.biologie.uni-hamburg.de/b-online/ibc99/koning/fruitgrowripe.html>, acesso em 05/12/2005.
- ³⁶BONAGAMBA, T. J.; CAPELLE, K. W.; AZEVEDO, E. R. A RMN e suas aplicações atuais. **Ciência Hoje**, v. 37, n. 221, p. 40-48, 2005.
- ³⁷RUSHWORTH, F. A.; TUNSTALL, D. P. **Nuclear Magnetic Resonance**, New York, Science Publishers, 1973.
- ³⁸PEREIRA, G. E.; GAUDILLERE, J-P.; LEEUWEN, C. V.; HILBERT, G.; LAVIALLE, O.; MAUCOURT, M.; DEBORDE, C.; MOING, A.; ROLIN, D. ¹H NMR and chemometrics to characterize mature grape berries in four wine-growing areas in Bordeaux, France. **Journal of Agricultural and food Chemistry**, v. 53 p. 6382-6389, 2005.

- ³⁹CAMPO, G.; BERREGI, I.; CARACENA, R.; SANTOS, J. I. Quantitative analysis of malic and citric acids in fruit juices using próton nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Analytica Chimica Acta**, v. 556, p. 462-468, 2006.
- ⁴⁰BELTON, P. S.; DELGADILLO, I.; GIL, A. M.; ROMA, P.; CASUSCELLI, F.; COLQUHOUN, I. J.; DENNIS, M. J. High-field proton NMR studies of apple juices. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 35, p.52-60, 1997.
- ⁴¹NI, Q. W.; EADS, T. M. Liquid-phase composition of intact fruit tissue measured by High-Resolution proton NMR. **Journal of Agricultural and food Chemistry**, v. 41, p. 1026-1034, 1993.
- ⁴²KIM, S. M.; CHEN, P.; MACCARTHY, J.; ZION, B. Fruit internal quality evaluation using on-line Nuclear Magnetic Resonance sensors. **Journal of Agricultural Engineering Research**, v. 74, p. 293-301, 1999.
- ⁴³CHEN, P.; MACCARTHY, M. J.; KIM, S. M.; ZION, B. Developments of a high-speed NMR technique for sensing maturity of avocados. **Transactions of the Asae**, v. 39, n. 6, p. 2205-2209, 1996.
- ⁴⁴LÉTAL, J.; JIRÁK, D.; ŠUDERLOVÁ, L.; HÁJEK, M. MRI 'texture' analysis of MR images of apples during ripening and storage. **Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie**, v. 36, p. 719-727, 2003.
- ⁴⁵SAITO, K.; MIKI, T.; HAYASHI, S. KAJIKAWA, H.; SHIMADA, M.; KAWATE, Y.; NISHIZAWA, T.; IKEGAYA, D.; KIMURA, N.; TAKABATAKE, K.; SUGIURA, N.; SUZUKI, M. Application of magnetic resonance imaging to non-destructive void detection in watermelon. **Cryogenics**, v. 36, n. 12, p. 1027-1031, 1996.
- ⁴⁶TU, 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.
- ⁴⁷ZION, B.; CHEN, P.; MCCARTHY, M. J.; Detection of bruises in magnetic resonance images of apples. **Computers and Electronics in Agriculture**, v. 13, p. 289-299, 1995.
- ⁴⁸NASCIMENTO, A. S.; BISCEGLI, C. I.; MENDONÇA, M. C.; CARVALHO, R. S. Avanços em tratamentos quarentenários para exportação de manga brasileira (Tratamento Hidrotérmico e Tomografia de Ressonância Magnética). In: ALVES, R. E.; VELOZ, C. S. **Exigências quarentenárias para exportação de frutas tropicais e subtropicais**. Fortaleza: Embrapa-CNPAT/CYTED/CONACYT, 1999, p. 155-171.

- ⁴⁹MATTIUZ, B-H, **Injúrias mecânicas e processamento mínimo de goiabas: fisiologia e qualidade pós-colheita**. 120f. Tese de Doutorado – Universidade Estadual Paulista – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Jaboticabal, 2002.
- ⁵⁰KEENER, K. M.; STROSHINE, R. L.; NYENHUIS, J. A. Evalution of low field (5.40-MHz) proton magnetic resonance measurements of D-w and T₂ as methods of nondestructive quality evalution of apples. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 124, n. 3, p. 289-295, 1999.
- ⁵¹SNAAR, J. E. M.; VAN AS, H. Probing water compartments and membrane permeability in plant cells by ¹H NMR relaxation measurements. **Journal Biophys**, v. 63, p. 1654-1658, 1992.
- ⁵²PRESTES, R. A.; COLNAGO, L. A.; FORATO, L. A.; VIZZOTTO, L.; NOVOTNY, E. H.; CARRILHO, E. A rapid and automated low resolution NMR method analyse oil quality in intact oilseeds. **Analytica Chimica Acta**, v. 596, p. 325-329, 2007.
- ⁵³COLNAGO, 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.
- ⁵⁴LIMA, M. B.; SILVA, S. O.; FERREIRA, C. F. **Banana O Produtor Pergunta, A Embrapa Responde. Coleção 500 perguntas 500 Respostas**. Brasília: EMBRAPA INFORMAÇÃO TECNOLÓGICA, 2003.
- ⁵⁵PARREIRA, F.T. **Utilização de métodos quimiométricos em dados de natureza multivariados**. 110f. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Química, Universidade de Campinas, Campinas, 2003.
- ⁵⁶FERREIRA, M. C. M.; ANTUNES, M. A.; MELGO, S. M.; VOLPE, L. O. P. Quimiometria I: Calibração multivariada, um tutorial. **Química Nova**. v. 22, p. 1-19, 2007.
- ⁵⁷MOITA, M. N. J; MOITA, C. G. Uma introdução à análise exploratória de dados multivariados. **Química Nova**. v. 21, p. 467-469, 1998.
- ⁵⁸CORREIA, C. C. **Análise da qualidade de carne bovina por Ressonância Magnética Nuclear em baixa resolução**. 101f. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Carlos, São Carlos, 2007.

- ⁵⁹BELTON, P. S.; HILLS, B. P. The effects of diffusive exchange in heterogeneous systems on NMR line shapes and relaxation processes. **Molecular Physics**. v. 61, n. 4, p. 999-1018, 1987.
- ⁶⁰LUENGO, R. F. A.; CALBO, A. G.; JACOMINO, A. P.; PESSOA, J. D. C. Avaliação da compressão em hortaliças e frutas e seu emprego na determinação do limite físico da altura da embalagem de comercialização. **Horticultura Brasileira**. v. 21, n. 4, p. 704-707, 2003.