UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

TATIANA MONARETTO

DESENVOLVIMENTO E APLICAÇÃO DE SEQUÊNCIAS DE PULSOS
CWFP COM ALTERNÂNCIA DE FASE EM RMN NO DOMÍNIO DO
TEMPO

São Carlos
2015

TATIANA MONARETTO

**DESENVOLVIMENTO E APLICAÇÃO DE SEQUÊNCIAS DE PULSOS
CWFP COM ALTERNÂNCIA DE FASE EM RMN NO DOMÍNIO DO
TEMPO**

Dissertação apresentada ao Instituto de Química de
São Carlos da Universidade de São Paulo como
parte dos requisitos para a obtenção do título de
mestre em ciências (Físico-Química).

Orientador: Dr. Luiz Alberto Colnago

**São Carlos
2015**

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Aparício e Terezinha e ao meu irmão Adriano pelo apoio incondicional em todos os momentos da minha vida. A minha cunhada Sinara e aos meus sobrinhos Ana Clara e Arthur pela força, amor e carinho.

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

AGRADECIMENTOS

A Deus.

A toda a minha família.

Ao Dr. Luiz Alberto Colnago pela amizade, orientação sempre muito dedicada, confiança e incentivo no desenvolvimento desse trabalho.

À Dra. Fabiana Diuk de Andrade pelo seu incentivo, carinho, amizade e valiosa contribuição no desenvolvimento deste trabalho.

Ao professor Dr. Eduardo Ribeiro de Azevedo pela ajuda no desenvolvimento das sequências de pulsos e pela concessão do espectrômetro para realização das medidas.

Ao Me. Tiago Bueno de Moraes pela colaboração no desenvolvimento deste trabalho.

Aos amigos do grupo de RMN da Embrapa Instrumentação: Fabiana, Gabriela, Paulo, Flávio, Bruna, Cirlei, Esther, Tiago, André, Mario, Rodrigo, Roberta, Luiz, Diego e Carlos pela amizade, convivência e ajuda mútua.

Aos todos os amigos que fiz em São Carlos.

À Embrapa Instrumentação pela infra-estrutura e por todas as suas facilidades oferecidas.

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

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo suporte financeiro através do processo 2013/03770-1.

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

*“The world is my country, all
mankind are my brethren and to do
god is my religion.”*

Thomas Paine

RESUMO

Os tempos de relaxação longitudinal (T_1) e transversal (T_2) têm sido frequentemente utilizados na RMN no domínio tempo (RMN-DT) para a obtenção de propriedades físicas e químicas de alimentos, polímeros, petróleo e produtos farmacêuticos. A sequência de pulsos Carr-Purcell- Meiboom-Gill (CPMG) é o método tradicional e mais utilizado para medida de T_2 , por ser uma técnica rápida para determinação deste tempo de relaxação. Por outro lado, a determinação do T_1 não é muito comum, pois as técnicas tradicionalmente utilizadas para sua mensuração, Inversão Recuperação (IR) e Saturação Progressiva (SP), requerem longo tempo de análise. Desta forma, vários autores vêm desenvolvendo métodos bidimensionais (2D) rápidos, para medida de ambos os tempos de relaxação ou da razão T_1/T_2 . Entretanto, estes métodos requerem sequências de pulsos e tratamentos de dados mais sofisticados do que os métodos unidimensionais (1D). Recentemente têm sido desenvolvidas técnicas 1D rápidas para determinação simultânea de T_1 e T_2 no estado estacionário de precessão livre (*Steady State Free Precession* - SSFP). Estas sequências são denominadas de *Continuous Wave Free Precession* (CWFP) e Carr-Purcell *Continuous Wave Free Precession* (CP-CWFP). A desvantagem desses métodos, é que estes necessitam o ajuste da frequência de *offset* e do tempo entre os pulsos (T_p), a fim de se obter um ângulo de precessão múltiplo ímpar de π . Desta forma, neste estudo foi proposta a utilização de técnicas provenientes da CWFP com alternância de fase (AF) de π entre os pulsos, as quais na condição de ressonância são independentes do T_p , para $T_p < T_2^*$. Estas sequências são a $CWFP_{x-x}$ e $CP-CWFP_{x-x}$, que se diferem da CWFP e CP-CWFP somente pela AF de π entre os pulsos de refocalização (x' e $-x'$) e a $CPMG_{90y-y}$ que é similar a $CPMG_{90}$, porém, os pulsos de refocalização são com alternância de fase (y e $-y$). Nestas sequências, os tempos de relaxação são determinados através da amplitude do sinal logo após o primeiro pulso, $|M_0|$, a amplitude do sinal no estado estacionário, $|M_{EE}|$, e a constante de tempo exponencial T^* . As constantes de tempo T_1 e T_2 obtidas com as sequências com AF de π foram iguais ou muito similares às obtidas pelos métodos padrão de determinação destas constantes de tempo (IR e CPMG). Entretanto, dentre as sequências com e sem AF de π apresentadas neste estudo, a $CP-CWFP_{x-x}$ demonstrou ser a melhor sequência para determinação de T_1 e T_2 . Já que o sinal desta apresenta elevada faixa dinâmica do estado *quasi*-estacionário ao estado estacionário que permite a determinação dos tempos de relaxação em amostras com qualquer razão T_1/T_2 . Ainda, esta característica da $CP-CWFP_{x-x}$ possibilita que está também seja aplicada em casos onde há baixa razão sinal ruído.

ABSTRACT

Longitudinal (T_1) and transverse (T_2) relaxation times have been often used in time domain NMR (TD-NMR) to obtain physical and chemical properties of the food, polymers, petroleum and pharmaceutical materials. The Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) pulse sequence is the standard method to measure T_2 because it is a fast and accurate method. On the other hand, pulse sequences for T_1 determination, as Inversion Recovery (IR) and Saturation Progressive (SP), is not common, such require long time. Under these circumstances, several authors developed two-dimensional (2D) fast methods to determine relaxation times and/or T_1/T_2 ratio. However, these methods require pulse sequences that are more sophisticated and difficult data processing than one-dimensional (1D) method. This way, recently, fast 1D techniques, based on Steady State Free Precession (SSFP), has been developed to determine simultaneous T_1 and T_2 . These methods are named the *Continuous Wave Free Precession* (CWFP) and Carr-Purcell *Continuous Wave Free Precession* (CP-CWFP). The main disadvantage of these methods is that they require the adjustment of the *offset* frequency and the time between pulses (T_p) in order to obtain a precession angle odd multiple of π . Therefore, in this study, it proposed to use CWFP technique with π phase alternation (PA), which in resonance are T_p independent, when $T_p < T_2^*$. These pulse sequences were named CWFP_{x-x}, CP-CWFP_{x-x}. They are similar to CWFP and CP-CWFP, however with π PA between refocusing pulse (x' and $-x'$). In addition, other pulse sequence, named CPMG_{90y-y} will be analyzed. It is similar to CPMG₉₀, however, the refocusing pulses have PA (y' and $-y'$). In these pulse sequences, the relaxation times are determined by the signal amplitude immediately after the first pulse $|M_0|$ and in the stationary state $|M_{SS}|$, as well as the exponential time constant T^* . T_1 and T_2 determined by the π PA sequences were similar those one obtained by standard methods, IR and CPMG. Nevertheless, among the sequences with or without PA, shown in this study, the CP-CWFP_{x-x} proved to be the best sequence for T_1 and T_2 determination, because of its highest dynamic range of the quasi-stationary state to stationary state. Thus, it provides the relaxation times determination independent of the T_1/T_2 ratio and can be used in cases of the low-signal-to-noise ratio.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Ecos observados para uma amostra de água quando um trem de pulsos de 90° igualmente espaçados é aplicado para um sistema de spin em equilíbrio térmico.....22
- Figura 2** - Amplitude dos sinais obtidos com a sequência SSFP com pulsos de $\pi/2$, $\Omega = 8,666$ Hz e com T_p (ms) de: (A) 500,1; (B) 108,3; (C) 56,1; (D) 29,1; (E) 15,5; (F) 2,7; (G) 0,9 e (H) 0,3. Em (a) sinais simulados com as constantes de tempo $T_1 = 138$ ms, $T_2 = 53$ ms e $T_2^* = 0,5$ ms. Em (b) sinais experimentais para óleo vegetal.25
- Figura 3** - Sinal CWFP resultante da combinação entre as componentes FID e eco com dependência do ângulo de offset para as condições: (A) $\psi = 2n\pi$ e (B) $\psi = (2n + 1)\pi$26
- Figura 4** - Dependência da amplitude do sinal CWFP normalizado pela variação do ângulo de offset para vários ângulos de rotação do pulso α ($\blacktriangledown$) 45° , ($\blacktriangle$) 80° , ($\blacksquare$) 90° e ($\bullet$) 100° e $T_p = 0,3$ ms. Óleo de girassol com $T_1 = 0,071$ e $T_2 = 0,038$ s; (a) resultados experimentais e (b) resultados simulados.....27
- Figura 5** - Magnitude do sinal CWFP ^1H normalizado para o óleo de amendoim usando $\alpha=90^\circ$, $T_p = 0,3$ ms, e $\psi = 3\pi$. Em verde - regime de transição; em vermelho - EQE e em azul - regime do EE.29
- Figura 6** - Sinais da CWFP e CP-CWFP obtidos em 85 MHz com: (A) amostras de água ($T_1/T_2 \sim 1$) e (B) amostras de sementes de mamona ($T_1/T_2 \sim 11$).30
- Figura 7** - Amplitude do sinal CWFP para o ^1H em função da concentração de óleo de girassol em (A) e de hidrogênios em (B), para os solventes: (1) clorofórmio, (2) 1,1,1 tricloroetano, (3) 1,2 dicloroetano, (4) benzeno, (5) ciclohexano e (6) hexano.31
- Figura 8** - (A) Esquema para medidas em fluxo online, onde v é a velocidade de transporte das amostras, D é a distância entre as cavidades e d é a distância de transporte da amostra da região homogeneia do magneto até antes de entrar na região de transmissão; (B) Amplitude do sinal CWFP correspondente a 96 sementes de macadâmia.31

Figura 9 - Correlação de gordura intramuscular de carne: (A) de T_2 por CPMG com $r=-0,25$ e (B) da razão M_{EE}/M_0 por CWFP com $r = 0,9$32

Figura 10 - (A) Sinal CWFP para 31 sementes obtidas utilizando o método online stop and flow e (B) score obtidos com a análise do PCA através dos dados CWFP.....33

Figura 11 - Esquema de pulsos que representa as sequências com regime de onda continua. (A): CWFP: $\phi_1 = \phi_2 = x'$; CWFP_{x-x}: $\phi_1 = x'$ e $\phi_2 = -x'$; (B): CP-CWFP: $\phi = \phi_1 = \phi_2 = x'$; CP-CWFP_{x-x}: $\phi = \phi_1 = x'$ e $\phi_2 = -x'$; CPMG_{90y-y}: $\phi = x'$, $\phi_1 = y'$ e $\phi_2 = -y'$38

Figura 12 - (A) e (B) - Componente real do sinal obtida pela sequência SSFP(A) e SSFP_{x-x} (B) para a solução de $MnSO_4 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. (C) a (E) - Componente real do sinal obtida pelas sequências CP-SSFP (C) e CP-SSFP_{x-x} (D) e componente imaginária do sinal obtida pela sequência CPMG_{90y-y} para a solução de $CuSO_4 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$44

Figura 13 - Expansão dos primeiros 0,010 s da componente real do sinal obtido com solução $MnSO_4 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ pelas sequência SSFP em (A) e SSFP_{x-x} em (B).....44

Figura 14 - Expansão da região entre 0,349 s a 0,354 s da componente real do sinal obtido com solução $MnSO_4 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ pelas sequência (A) SSFP, (B) SSFP_{x-x} e em (C) magnitude do sinal (A) ou (B).....45

Figura 15 - Dependência da amplitude do sinal normalizado no EE com relação à variação da frequência de offset para um $T_p = 300 \mu s$ para as sequências com AF de π (linha vermelha) e sem AF (linha preta), para uma solução de $CuSO_4 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$47

Figura 16 - Sinais obtidos na condição de ressonância pelas as sequências CWFP_{x-x} (linha azul), CP-CWFP_{x-x} (linha preta) e CPMG_{90y-y} (linha vermelha) com T_p de 200 μs e 300 μs para as soluções de $CuSO_4 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ (A) e $MnSO_4 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ (B).48

Figura 17 - Sinais obtidos com $\Omega = 5 \text{ kHz}$ pelas as sequências CWFP_x (linha azul) e CP-CWFP_x (linha preta) com T_p de 200 μs e 300 μs para as soluções de $CuSO_4 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ (A) e $MnSO_4 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ (B).....49

Figura 18 - Magnitude dos sinais obtidos experimentalmente com as sequências CWFP_{x-x} ($\Omega = 0$ – linha preta), e CWFP ($\Omega = 5\text{kHz}$ – linha vermelha): (A) para uma solução de CuSO_4 $10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ e (B) $10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$50

Figura 19 - Magnitude dos sinais obtidos experimentalmente com as sequências CWFP_{x-x} ($\Omega = 0$ – linha preta), e CWFP ($\Omega = 5\text{kHz}$ – linha vermelha): (A) para uma solução de MnSO_4 $10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e (B) $10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$51

Figura 20 - Gráfico de colunas dos valores de T^* e M_{EE} , obtidos experimentalmente pelas sequências CWFP (coluna verde) e CWFP_{x-x} (coluna azul) para as soluções: CuSO_4 $10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ (1) e $10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ (2); MnSO_4 $10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ (3) e $10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ (4).52

Figura 21 - Gráfico de colunas com as constantes de tempo T_1 pela técnica IR (coluna preta), T_2 pela técnica CPMG (coluna preta), e T_1 e T_2 pelas sequências CWFP (colunas verde) e CWFP_{x-x} (coluna azul), para as soluções: CuSO_4 $10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ (1) e $10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ (2); MnSO_4 $10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ (3) e $10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ (4).53

Figura 22 - Magnitude dos sinais obtidos experimentalmente com as sequências CP-CWFP (linha vermelha) com $\Omega = 5 \text{ kHz}$, CP-CWFP_{x-x} (linha azul) e CPMG_{90y-y} (linha preta) com $\Omega = 0$ e com T_p de $300 \mu\text{s}$: (A) para uma solução de CuSO_4 $10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ e (B) $10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$55

Figura 23 - Magnitude dos sinais obtidos experimentalmente com as sequências CP-CWFP (linha vermelha) com $\Omega = 5 \text{ kHz}$, CP-CWFP_{x-x} (linha azul) e CPMG_{90y-y} (linha preta) com $\Omega = 0$ e com T_p de $300 \mu\text{s}$: (A) para uma solução de MnSO_4 $10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e (B) $10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$55

Figura 24 - Gráfico de colunas com T^* e M_{EE} , obtidos experimentalmente pelas sequências CP-CWFP (coluna verde), CP-CWFP_{x-x} (coluna azul escuro) e CPMG_{90y-y} (coluna azul claro) para as soluções: CuSO_4 $10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ (1) e $10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ (2); MnSO_4 $10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ (3) e $10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ (4).56

Figura 25 - Gráfico de colunas com os valores de T_1 medidos com a sequência IR (colunas verde), T_2 com CPMG (coluna preta), e T_1 e T_2 pelas sequências CP-CWFP (coluna verde), CP-CWFP_{x-x} (coluna azul claro) e CPMG_{90y-y} (coluna azul escuro) para as soluções: CuSO₄ 10⁻² mol L⁻¹ (1) e 10⁻³ mol L⁻¹ (2), MnSO₄ 10⁻³ mol L⁻¹ (3) e 10⁻⁴ mol L⁻¹ (4).57

Figura 26 - Lorentziana obtida da transformada de Fourier do sinal FID adquirido experimentalmente no espectrômetro Minispec com frequência de 19,9 MHz para o ¹H (lorentziana preta) e distribuição das distorções desta lorentziana: em verde sinal em ressonância, em azul escuro deslocado -200 Hz, em vermelho 185 Hz e em azul claro a somatória das três lorentzianas.58

Figura 27 - Módulo dos sinais obtidos com as sequências CWFP_{x-x} (linha vermelha), CP-CWFP_{x-x} (linha azul) e CPMG_{90y-y} (linha preta) para $\Omega = 0$ e $T_p = 300 \mu s$. Em (A e B) os sinais foram obtidos com uma solução CuSO₄ 10⁻² mol L⁻¹, sendo (A) sinais experimentais e (B) simulados e em (C e D) os sinais foram obtidos com uma solução de MnSO₄ 10⁻³ mol L⁻¹, sendo (C) sinais experimentais e (D) simulados.59

Figura 28 - Gráfico de colunas com os valores de T^* e M_{EE} obtidos por simulações numéricas (colunas hachuradas) e experimentalmente (coluna sem hachuras) com sequência CWFP_{x-x} (coluna verde), CP-CWFP_{x-x} (coluna azul escuro) e CPMG_{90y-y} (coluna verde claro) para as soluções: CuSO₄ 10⁻² mol L⁻¹ (1) e MnSO₄ 10⁻⁴ mol L⁻¹ (4). 60

Figura 29 - Em (A e C) componente real dos sinais obtidos com as sequências CWFP_{x-x}, CP-CWFP_{x-x} e imaginário da CPMG_{90y-y} em (B e D) magnitude destes sinais para: (A e B) uma solução de CuSO₄ 10⁻² mol L⁻¹ e (C e D) para uma solução de MnSO₄ 10⁻³ mol L⁻¹.61

Figura 30 - Componente real dos sinais obtidos com as sequências CWFP_{x-x}, CP-CWFP_{x-x} e CPMG_{90y-y} para um solução de CuSO₄ 10⁻² mol L⁻¹ em um espectrômetro com frequência de 2,6 MHz para o ¹H, com $T_p = 300 \mu s$ e em ressonância.62

Figura 31 - Sinal experimental (vermelho) e simulado (preto) obtido pela sequência CWFP_{x-x} em 2,6 MHz para uma solução de CuSO₄ 10⁻² mol L⁻¹. Para a simulação foi utilizado um sinal assimétrico foram de ressonância em 55 Hz.63

Figura 32 - Sinais obtidos por CPMG para as sementes de amendoim (linha preta), linhaça (linha azul claro), macadâmia (linha vermelha), macaúba (linha verde claro), pinhão manso (linha rosa) e mamona (linha azul escuro).....65

Figura 33 - Correlação linear entre os valores da constante de tempo T_2 obtidas pela técnica CPMG com relação aos adquiridos pela sequência CP-CWFP_{x-x} para as sementes de linhaça, macadâmia, macaúba, pinhão manso, amendoim e mamona: (●) T_2 (1) e (■) T_2 (2)..66

Figura 34 - Correlação linear entre as constantes de tempo T_2 e T^* obtidos através da técnica CP-CWFP_{x-x} para as sementes de linhaça, macadâmia, macaúba, pinhão manso, amendoim e mamona: (●) T_2 (1) e (■) T_2 (2).....67

Figura 35 - Componente real dos sinais obtidos pela técnica CP-CWFP_{x-x} para as sementes de amendoim (linha preta), linhaça (linha azul claro), macadâmia (linha vermelha), macaúba (linha verde claro), pinhão manso (linha rosa) e mamona (linha azul escuro).....68

Figura 36 - Sinais obtidos com as sequências CPMG, CWFP_{x-x}, CP-CWFP_{x-x} e CP-CWFP_{y-y} para bananas verde e madura (A e C) e para geleias tradicional e com açúcar (B e D).....69

Figura 37 - Variação da razão M_{EE}/M_0 em função da razão T_1/T_2 70

Figura 38 - Componente real dos sinais obtidos com as sequências CWFP_{x-x} (linha vermelha), CP-CWFP_{x-x} (linha azul) e CPMG_{90y-y} (linha preta) para a banana verde e madura (A) e para a geleia tradicional e zero açúcar (B).71

LISTA DE TABELAS

<i>Tabela 1-</i> Constantes de tempo T_2 obtidas pelas sequências CPMG (A), CPMG _{90y-y} (B), CP-CWFP _{x-x} (C) e CWFP _{x-x} (D) para as sementes de linhaça, macadâmia, macaúba, pinhão manso, amendoim e mamona.	66
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AF – alternância de fase

AR – alta resolução

BR – baixa resolução

CP – Carr-Purcell

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

CP-CWFP_{x-x} – CP-CWFP com AF de π

CPMG – Carr-Purcell-Maiboom-Gill

CPMG₉₀ – CPMG com ângulo de refocalização de 90°

CPMG_{90y-y} – CPMG₉₀ com AF de π

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

CWFP – *Continuous Wave Free Precession*

EE – estado estacionário

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

EQE – estado *quasi*-estacionário

FID – Free Induction Decay

IQSC – Instituto de Química de São Carlos

IR – Inversão Recuperação

RF – radiofrequência

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

SSFP – Steady State Free Precession

USP – Universidade de São Paulo

LISTA DE SÍMBOLOS

τ – tempo de duração do pulso

T_p – tempo entre os pulsos

α – ângulo de rotação

ψ – ângulo de precessão

Ω – frequência de *offset*

γ – constante magnetogírica

ω_0 – frequência de Larmor

ω – frequência angular do campo oscilante de RF B_1

ϕ – fase do pulso

B_0 – campo magnético

B_1 – campo magnético oscilante gerado pela RF

M_0 – amplitude do sinal no equilíbrio térmico

M_{EE} – amplitude do sinal no EE

M_x – magnetização da componente x' ou componente real

M_y – magnetização da componente em y' ou componente imaginária

M_z – magnetização longitudinal

r – coeficiente de correlação

T^* – constante de decaimento do sinal do EQE ao EE

T_2^* – constante de decaimento do FID

T_1 – tempo de relaxação longitudinal

T_2 – tempo de relaxação transversal

M^+ – magnetização após a aplicação do pulso

M^- – magnetização imediatamente antes da aplicação do pulso

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LISTA DE SÍMBOLOS

1	INTRODUÇÃO.....	18
2	REVISÃO DE LITERATURA	21
2.1	Regimes de precessão livre no estado estacionário.....	21
2.1.1	<i>Descrição analítica do estado estacionário de precessão livre (SSFP)</i>	<i>22</i>
2.2	Continuous Wave Free Precession (CWFP)	24
2.3	Determinações simultânea de T_1 e T_2 utilizando técnicas do estado estacionário..	27
2.4	Aplicações da CWFP e CP-CWFP.....	30
3	OBJETIVOS.....	35
4	MATERIAIS E MÉTODOS	36
4.1	Amostras utilizadas	36
4.2	Equipamentos utilizados	36
4.3	Sequências de pulsos de RMN	37
4.3.1	<i>Medidas de tempos de relaxação (T_1 e T_2) - sequências convencionais.....</i>	<i>37</i>
4.3.2	<i>CWFP e CP-CWFP com e sem alternância de fase e CPMG_{90y-y}.....</i>	<i>38</i>
4.4	Simulações dos sinais numéricos	39
5	RESULTADOS E DISCUSÃO	43
5.1	Análise dos sinais CWFP _{x-x} , CP-CWFP _{x-x} e CPMG _{90y-y} na condição SSFP	43
5.2	<i>Influência da variação da frequência de offset e do T_p em sequências de onda continua</i>	<i>46</i>
5.3	Estudo das sequências CWFP _{x-x} , CP-CWFP _{x-x} CPMG _{90y-y}	49
5.3.1	<i>Resultados Experimentais</i>	<i>49</i>
5.3.2	<i>Resultados teóricos.....</i>	<i>58</i>

5.4	Componente real das sequências $CWFP_{x-x}$, $CP-CWFP_{x-x}$ e imaginário da $CPMG_{90y-y}$	60
5.5	APLICAÇÕES	63
5.5.1	<i>Sementes</i>	64
5.5.2	<i>Banana e geleia</i>	68
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	72
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74

1 INTRODUÇÃO

A Ressonância Magnética Nuclear (RMN) é uma técnica espectroscópica que se destaca por sua vasta aplicabilidade em diversas áreas como: química, física, medicina, bioquímica, materiais entre outras áreas. Uma das principais vantagens da RMN é ser uma técnica não destrutiva, permitindo até análises químicas de seres vivos, de forma não invasiva. A RMN pode ser dividida em duas grandes modalidades com relação à sua aplicação: a tomográfica (imagem), designada para diagnósticos médicos e espectroscópica, que se subdivide em espectroscopia de alta resolução e baixa resolução. Na RMN de alta resolução (RMN-AR) são empregados equipamentos de alto campo magnético e com alta homogeneidade, usados para determinação de estruturas moleculares baseados no deslocamento químico e no acoplamento escalar entre outros parâmetros espectrais.

A espectroscopia de RMN de baixa resolução (RMN-BR) ou em baixo campo, utiliza campos magnéticos de baixa intensidade (menor que 2 T) e pouco homogêneos. Embora menos difundida na área acadêmica esta é empregada desde a década de 60 no setor industrial, na área de controle e certificação da qualidade de alimentos, petróleo e cosméticos. A RMN-BR também é conhecida como RMN no domínio do tempo (RMN-DT), pois não possui resolução suficiente para a observação dos deslocamentos químicos. Assim, as medidas são realizadas no domínio do tempo usando sinais do FID (*Free Induction Decay*), eco de spin e do tempo de relaxação longitudinal (T_1) e transversal (T_2). A RMN-DT apresenta uma série de vantagens em relação às espectroscopias de RMN em alto campo e de tomografia. Dentre elas se destacam: baixo custo dos equipamentos, rapidez das análises, não necessita de operadores especializados e nem de refrigeração com líquidos criogênicos como hélio e nitrogênio líquido.

As primeiras aplicações da RMN-DT ocorreram em análises quantitativas, usando a intensidade do FID ou do eco de spin. Mais recentemente passaram a ser realizadas análises qualitativas e quantitativas baseadas nas diferenças de tempo de relaxação longitudinal e transversal dos vários componentes de uma amostra heterogênea. A medida de relaxação mais comum é a da relaxação transversal (T_2) obtido com a sequência de pulsos desenvolvida por Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG).¹ Esta sequência permite obter o sinal de RMN com um decaimento independente da homogeneidade do campo. Como é uma técnica rápida para medidas de T_2 , é muito utilizada para análises qualitativas e quantitativas.^{2, 3} Já a relaxação longitudinal não tem sido muito utilizada para análises por RMN-DT, pois as principais técnicas usadas para sua medida, como inversão-recuperação (IR) e saturação-progressiva

(SP), demandam logo tempo de análise, uma vez que, é necessário fazer dezenas de experimentos para se medir a constante de tempo T_1 .

Técnicas bidimensionais (2D) também são utilizadas para obter informações referentes às constantes de tempo, entretanto estas geralmente demandam longo tempo de análise. Recentemente tem sido proposto técnicas 2D rápidas. Uma delas é a Driven-Equilibrium Carr-Purcell-Meiboom-Gill (DECPMG), que foi introduzida por Mitchell et al.⁴ Esta sequência possibilita a obtenção da razão T_1/T_2 em função de T_2 de uma forma rápida. Outras técnicas 2D são a Driven-Equilibrium Fast-Inversion Recovery (DEFIR) e a Driven-Equilibrium Fast Saturation Recovery (DEFSR) apresentadas por Deng et al. (2014a e 2014b). Estas determinam a razão T_1/T_2 em função de T_1 e são utilizadas para determinação da viscosidade de fluidos de uma maneira rápida.^{5, 6} Ahola e Telkki (2013) baseando-se na técnica *ultrafast*, também introduziram um método 2D que determina a correlação T_1 e T_2 através de uma única varredura.^{7, 8} Entretanto, o inconveniente destas técnicas, com relação as 1D, é que estas requerem sequências de pulsos mais complexas, métodos mais sofisticados para tratar os dados e algumas delas ainda requerem grande quantidade de amostras.

Em 2005, Venâncio et al. propuseram a utilização de um método rápido para medidas simultâneas dos tempos de relaxação T_1 e T_2 . Esta técnica é uma variante da sequência de precessão livre no estado estacionário (*Steady State Free Precession* - SSFP), denominada de *Continuous Wave Free Precession* (CWFP).⁹ No entanto, o sinal obtido pela CWFP apresenta uma baixa faixa dinâmica quando os valores de T_1 e T_2 da amostra são muito próximos, tornando o sinal muito sensível ao ruído. Para resolver esse problema, Andrade et al. introduziram em 2011, a sequência denominada *Carr-Purcell-Continuous Wave Free Precession* (CP-CWFP).¹⁰ Essa técnica apresenta uma alta faixa dinâmica para $T_1 \sim T_2$ e tem sido mais usada para amostras com essa condição.

Apesar dos grandes benefícios das técnicas CWFP e CP-CWFP devido estas serem compostas por um trem de pulsos de radiofrequência (RF) de mesma fase, se torna necessário um deslocamento da frequência de ressonância (*offset*) em alguns kHz. Neste caso, passa a ser necessário o ajuste do valor do tempo entre os pulsos (T_p) de acordo a frequência de *offset*. Este ajuste precisa ser realizado de tal forma que a combinação destes dois parâmetros forneça um ângulo de precessão múltiplo ímpar de π . Porém, determinações imprecisas na frequência de *offset* a ser deslocada e no valor T_p a ser ajustado, pode levar a alguns erros experimentais, podendo comprometer a qualidade dos resultados de uma análise.

Andrade, em 2011¹¹, observou que o sinal CWFP apresentava uma amplitude máxima para frequência de *offset* igual a zero quando se usava alternância de fase (AF) de π entre os pulsos. Com base nesta consideração foram propostas e estudadas neste trabalho de mestrado as sequências de pulsos similares a CWFP, com alternância de fase entre os pulsos de π , a fim de suprimir a necessidade do deslocamento da frequência de *offset* e a dependência do T_p . Ainda foram apresentadas e discutidas, neste trabalho, outras vantagens obtidas por estas sequências.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Regimes de precessão livre no estado estacionário

O estabelecimento do estado estacionário foi primeiramente observado por Bradford em 1951 quando este pulsava com um tempo entre os pulsos (T_p) na ordem do tempo de relaxação T_2 .¹² Mais tarde, em 1958, Carr também observou a formação do estado estacionário aplicando uma técnica composta por um trem de pulsos de mesma fase e intensidade espaçados por um tempo $T_p < T_2$.¹³ Esta ficou conhecida como estado estacionário de precessão livre (*Steady State Free Precession* - SSFP). Nestas sequências, devido o tempo de repetição entre os pulsos ser menor do que a constante de tempo T_2 , após certo número de pulsos o sinal passa a apresentar duas componentes, uma na forma de FID e outra na forma de um eco. A componente FID é observada logo após o pulso, resultante da excitação da magnetização longitudinal e o eco, antes do próximo pulso, resultante da magnetização transversal residual. Nesta técnica, após a aplicação de um determinado número de pulsos a intensidade do sinal não varia mais, neste ponto a magnetização entra no estado estacionário.

Em 1971, Freeman e Hill realizaram um estudo da formação do SSFP. Estes iniciaram a pesquisa com uma sequência de pulso $90^\circ - T_p - 90^\circ$, sendo adicionada a esta mais pulsos de 90° até que o SSFP fosse atingido, conforme apresentado na Figura 1. Nesta figura, depois da aplicação de dois pulsos de 90° é observada a formação de um eco negativo em $2T_p$, conforme Figura 1 (a). A aplicação do terceiro pulso no centro deste eco induz a formação de eco em $3T_p$ e $4T_p$ (Figura 1 (b)). Se aplicarmos quatro e cinco pulsos de 90° (Figura 1 (c e d)), observaremos a formação do estado estacionário onde antes de cada pulso há a formação de um meio eco negativo e após o pulso de um meio FID positivo. É possível observar que o FID e eco na sequência SSFP estão sempre defasados 180° .¹⁴

Figura 1- Ecos observados para uma amostra de água quando um trem de pulsos de 90° igualmente espaçados é aplicado para um sistema de spin em equilíbrio térmico.

Fonte: FREEMAN, R.; HILL, H. D., 1971, p. 373.

A resposta de um sistema de spins para uma sequência com pulsos de RF de mesma intensidade e igualmente espaçados por um tempo T_p foi descrita analiticamente por Ernst e Anderson (1966), com base nas equações de Bloch.¹⁵ A seguir é apresentada uma abordagem analítica da formação do estado estacionário levando-se em consideração as descrições feitas por Ernst e Anderson e as complementações apresentadas Freeman e Hill.¹⁴

2.1.1 Descrição analítica do estado estacionário de precessão livre (SSFP)

Os estudos analíticos da técnica SSFP consideram um sistema de spins submetido a um campo B_0 , onde inicialmente a magnetização resultante deste sistema se encontra no estado de equilíbrio térmico (M_0), no eixo z. A aplicação do primeiro pulso de (RF), com frequência $\omega = \gamma B_1$ (onde B_1 é o campo magnético oscilante e γ a constante magnetogírica), ocasiona a rotação da magnetização por um ângulo $\alpha = \gamma B_1 \tau = \omega \tau$ ao longo do eixo x' , durante um tempo T_p . Este tempo de duração do pulso (τ) é tão pequeno comparado com os tempos de relaxação T_1 e T_2 , que durante o pulso, ambas as relaxações são negligenciadas.¹⁴

¹⁵ Assim, a magnetização resultante logo após o pulso (M^+) é dada pela equação de Bloch.

$$M^+ = R_x(\alpha)M_0 \quad \text{Equação 1}$$

Onde $R_x(\alpha)$ (equação 21) representa a rotação ao redor do eixo x' por um ângulo α , causa do pelo pulso de RF. O segundo pulso é aplicado após T_p . Sendo que durante este tempo entre os pulsos a magnetização realiza um movimento de precessão livremente ao redor do eixo z com um ângulo ψ , de acordo com equação 2.

$$\psi = (\omega - \omega_0)T_p = \Omega T_p \quad \text{Equação 2}$$

Onde, nesta equação, Ω é a frequência de *offset*, ou seja, a variação entre a velocidade angular de precessão dos spins de uma amostra (frequência de Larmor - ω_0) e a frequência angular do campo oscilante de RF $B_1(\omega)$. Durante o T_p ocorre à relaxação spin-rede, descrita por uma constante de tempo longitudinal (T_1) e a relaxação spin-spin, descrita por uma constante de tempo transversal (T_2). O operador $S(T_p, T_1, T_2)$ descreve ambas as relaxações.^{14, 15}

$$S(T_p, T_1, T_2) = \begin{bmatrix} E_2 & 0 & 0 \\ 0 & E_2 & 0 \\ 0 & 0 & E_1 \end{bmatrix} \quad \text{Equação 3}$$

Onde E_1 e E_2 são abreviações para: $E_1 e^{-\left(\frac{T_p}{T_1}\right)}$ e $E_2 = e^{-\left(\frac{T_p}{T_2}\right)}$. No final do T_p a magnetização pode ser descrita pela equação de Bloch abaixo.

$$M^* = R_z(\psi)S(T_p, T_1, T_2)M^+ + (1 - E_1)M_0 \quad \text{Equação 4}$$

Onde o R_z é o operador de rotação ao redor do eixo z .

No estado estacionário (EE) $M^* = M^-$. As três componentes da magnetização no EE antes e depois do pulso são:

$$M_x^- = M_0(1 - E_1)[E_2 \sin \alpha \sin \psi] / D \quad \text{Equação 5}$$

$$M_y^- = M_0(1 - E_1)[E_2 \sin \alpha \cos \psi - E_2^2 \sin \alpha] / D \quad \text{Equação 6}$$

$$M_z^- = M_0(1 - E_1)[1 - E_2 \cos\psi - E_2 \cos\alpha (\cos\psi - E_2)]/D \quad \text{Equação 7}$$

$$M_x^+ = M_x^- \quad \text{Equação 8}$$

$$M_y^+ = M_0(1 - E_1)[(1 - E_2 \cos\psi) \sin\alpha]/D \quad \text{Equação 9}$$

$$M_z^+ = M_0(1 - E_1)[E_2(E_2 - \cos\psi) + (1 - E_2 \cos\psi) \cos\alpha]/D \quad \text{Equação 10}$$

$$D = (1 - E_1 \cos\alpha)(1 - E_2 \cos\psi) - (E_1 - \cos\alpha)(E_2 - \cos\psi)E_2 \quad \text{Equação 11}$$

Onde M_{xy}^+ descrevem a magnetização logo após o pulso (FID) e M_{xy}^- a magnetização antes do próximo pulso (eco). As equações 8 e 9 são idênticas às derivadas por Ernst e Anderson.¹⁵ As outras equações, 5, 6, 7 e 10, foram apresentadas por Freeman e Hill.¹⁴

2.2 Continuous Wave Free Precession (CWFP)

Dependendo do valor de T_p a formação do estado estacionário pode ocorrer de três formas diferentes. Para $5T_1 \geq T_p > 3T_2$, o FID e o eco são formados, porém devido à magnetização já ter retornado quase que totalmente a condição de equilíbrio térmico, o eco não é observável. Em $T_2 \geq T_p \geq T_2^*$ a condição SSFP é atingida, sendo o eco e o FID observáveis. Já para $T_2 \gg T_p < T_2^*$ há uma sobreposição entre FID e eco, condição especial de SSFP, denominada *Continuous Wave Free Precession* (CWFP).

O efeito de diferentes valores de T_p no sinal de RMN foi demonstrado por Azeredo et al. em 2000 (Figura 2).¹⁶ Neste trabalho os autores simularam e realizaram experimentos com a aplicação de uma sequência de pulsos de $\pi/2$ separados por diferentes T_p . Para a simulação, os autores utilizaram os tempos de relaxações $T_1 = 138$ ms e $T_2 = 53$ ms de acordo com os obtidos experimentalmente para sementes de óleo de girassol e a não homogeneidade do campo $T_2^* = 0,5$ ms. Na Figura 2(a) são apresentados os sinais simulados e na Figura 2(b) os sinais experimentais. Em ambas as figuras no sinal (A), onde o valor de $T_p = 500$ ms, praticamente quatro vezes maior que T_1 , não é possível observar a formação do eco. Na medida em que o valor de T_p diminui o eco passa a ser observado e a amplitude do FID

diminui, até chegar um momento em que $T_p < T_2^*$, conforme apresentando nos sinais (H). Nesta condição um estado de onda continua é atingido (CWFP).¹⁶

Figura 2—Amplitude dos sinais obtidos com a sequência SSFP com pulsos de $\pi/2$, $\Omega = 8,666$ Hz e com T_p (ms) de: (A) 500,1; (B) 108,3; (C) 56,1; (D) 29,1; (E) 15,5; (F) 2,7; (G) 0,9 e (H) 0,3. Em (a) sinais simulados com as constantes de tempo $T_1 = 138$ ms, $T_2 = 53$ ms e $T_2^* = 0,5$ ms. Em (b) sinais experimentais para óleo vegetal.

Fonte: AZEREDO, R. B. D. V.; COLNAGO, L. A.; ENGELSBERG, M, 2000, p. 2403.

Na condição CWFP, devido o valor do T_p ser muito pequeno, $T_p < T_2^* \ll T_2$, há uma sobreposição entre FID e eco. No entanto, conforme já mencionado, os sinais de sequências de pulsos sem alternância de fase (AF) que atingem o EE, formam, neste estado, uma combinação das componentes FID e eco, sempre defasados 180° , conforme é apresentado na Figura 3 (A). Assim, na CWFP, nas condições de *offset* igual a zero (condição utilizada pelas sequências convencionais) ou em qualquer *offset* que gere um ângulo de precessão múltiplo par de π ($\psi = 2n\pi$ - onde n é um número inteiro), a interferência entre FID e eco é destrutiva e a amplitude do sinal resultante é mínima (Figura 3 (A)). Portanto, para que haja uma interferência construtiva e se obtenha uma amplitude máxima do sinal no EE, é necessário que a condição $\psi = (2n + 1)\pi$ seja satisfeita. Ou seja, é preciso que o ângulo de *offset* seja deslocado em múltiplos ímpares de π , obtendo assim as componentes FID e eco em fase (Figura 3 (B)).

Figura 3- Sinal CWFP resultante da combinação entre as componentes FID e eco com dependência do ângulo de *offset* para as condições: (A) $\psi = 2n\pi$ (B) $\psi = (2n + 1)\pi$.

Fonte: Autoria própria.

Azeredo e colaboradores (2003) estudaram a influência do deslocamento do ângulo de *offset* no sinal CWFP.¹⁷ A Figura 4 apresenta a amplitude do sinal obtido com a técnica CWFP em função da variação do ângulo de precessão de $4\pi < \psi < 6\pi$ e em função também da variação do ângulo de rotação. Sendo que em (A) são sinais obtidos experimentalmente e em (B) simulados. Nesta figura é possível observar que para os valores pares de ψ (4π e 6π), a amplitude do sinal é mínima. Já para o valor múltiplos ímpares de ψ , neste caso 5π , a amplitude é máxima. Azeredo e colaboradores também ressaltam que a técnica CWFP não apresenta alterações significativas na amplitude do sinal para pequenas diferenças no ângulo de rotação, sendo estas de 10% do pulso há um decréscimo de apenas 2% na amplitude do sinal. Além disso, ao levar em consideração uma mudança pronunciada no ângulo de rotação de $\alpha = \pi/2$ para $\alpha = \pi/4$ a amplitude apresentou uma redução de apenas 9% enquanto que a redução esperada para o sinal FID é de 29%.¹⁷

Figura 4 - Dependência da amplitude do sinal CWFP normalizado pela variação do ângulo de *offset* para vários ângulos de rotação do pulso α ($\blacktriangledown$) 45° , ($\blacktriangle$) 80° , ($\blacksquare$) 90° e ($\bullet$) 100° e $T_p = 0,3$ ms. Óleo de girassol com $T_1 = 0,071$ e $T_2 = 0,038$ s; (a) resultados experimentais e (b) resultados simulados.

Fonte: AZEREDO, R. B. V. et al., 2003, p. 317.

2.3 Determinações simultânea de T_1 e T_2 utilizando técnicas do estado estacionário

Kronenbitter e Schwenk (1977) demonstraram que a técnica SSFP pode ser utilizada para determinar as constantes de tempo T_1 e T_2 através de um conjunto de experimentos. No estudo apresentado por estes autores, em um primeiro momento eram realizados vários experimentos com diferentes ângulos do pulso, a fim de encontrar o ângulo que fornecesse a maior razão M_{EE}/M_0 , onde M_{EE} é a amplitude da magnetização no EE. Este ângulo é denominado de ângulo ótimo. Como pode ser observar na equação 12 a razão M_{EE}/M_0 é dependente da razão T_1/T_2 e também do ângulo do pulso (α). Assim, após encontrar o ângulo ótimo, a partir desta equação é possível determinar a razão T_1/T_2 .^{18, 19}

$$\frac{M_{EE}}{M_0} = \frac{|\sin \alpha| \sqrt{2 - 2 \cos \psi}}{(1 + \cos \alpha)(1 - \cos \alpha) + (1 - \cos \alpha) 2T_1/T_2} \quad \text{Equação 12}$$

Utilizando este ângulo ótimo, outro experimento era realizado a fim de se determinar à constante decaimento do sinal SSFP até o EE. Este decaimento é descrito pela constante de tempo T^* (equação 13). Por meio do T^* pode ser determinado $T_1 + T_2$ e a partir da razão T_1/T_2 e da soma $T_1 + T_2$ pode ser determinada as constantes de tempo T_1 e T_2 .

$$T^* = \frac{2T_1T_2}{\{T_1(1-\cos\alpha)+T_2(1+\cos\alpha)\}} \quad \text{Equação 13}$$

Em 2005, Venâncio et al. propuseram a determinação simultânea de T_1 e T_2 em um único experimento, utilizando a sequência CWFP. Entretanto, ao invés de ser determinar o ângulo ótimo, conforme proposto por Kronenbitter e Schwenk, a largura dos pulsos foi fixadas em 90° . Assim, substituindo o ângulo de rotação (α) por 90° e o ângulo de precessão (ψ) na condição $\psi = (2n + 1)\pi$ para a CWFP nas equações 12 e 13 se obtém uma equação simplificada de T^* e M_{EE} , conforme apresentado nas equações 14 e 15.⁹

$$M_{EE} = \frac{M_0T_2}{(T_1+T_2)} \quad \text{Equação 14}$$

$$T^* = \frac{2T_1T_2}{(T_1+T_2)} \quad \text{Equação 15}$$

O rearranjo das equações 14 e 15 fornecem os valores de T_1 e T_2 , conforme apresentando nas equações 16 e 17.

$$T_1 = \frac{T^*(\pi/2)/2}{M_{EE}/M_0} \quad \text{Equação 16}$$

$$T_2 = \frac{T^*(\pi/2)/2}{1-(M_{EE}/M_0)} \quad \text{Equação 17}$$

Venâncio et al. ainda caracterizaram o decaimento da magnetização da CWFP. Segundo estes o sinal da CWFP é composto por três estágios conforme apresentado na Figura 5. O primeiro estágio apresenta uma característica transiente, havendo alternância na amplitude do sinal entre os pulsos pares e ímpares, os quais apresentam um decaimento modulado pela constante de tempo T_2^* , Figura 5 (parte vermelha). Após esse período oscilatório, o sistema entra em um estado *quasi*-estacionário (EQE), Figura 5 (parte verde). Finalmente no último estágio, o sinal atinge o estado estacionário (EE), Figura 5 (parte azul). As regiões onde são adquiridos os valores de T^* , M_{EE} e M_0 são indicadas na Figura 5.^{9, 20, 21}

Figura 5 – Magnitude do sinal CWFP ^1H normalizado para o óleo de amendoim usando $\alpha=90^\circ$, $T_p=0,3$ ms, e $\psi=3\pi$. Em verde - regime de transição; em vermelho - EQE e em azul - regime do EE.

Fonte: autoria própria.

Apesar de todas as vantagens da técnica CWFP, um dos pontos negativos desta sequência está relacionado com amostras em que os tempos de relaxação longitudinal e transversal são próximos ($T_1 \sim T_2$). Nestes casos, a aplicação da técnica CWFP resulta em um sinal que apresenta um leve decaimento (pequena faixa dinâmica) entre o EQE ao EE. Assim, o *fitting* deste decaimento (T^*) fica muito suscetível à razão sinal/ruído, sendo possível a agregação de erros aos valores de T_1 e T_2 .

Recentemente Andrade e colaboradores (2011) constataram que o acréscimo de um pulso de 90° separado com um $T_p/2$ do trem de pulsos da sequência CWFP, resulta em um sinal que fornece uma melhor razão sinal ruído, que a sequência CWFP, na condição $T_1 \sim T_2$. Esta sequência foi denominada de CP-CWFP por ter características da sequência descrita por Carr-Purcell e ao mesmo tempo ser similar a CWFP.¹⁰ Assim, na CP-CWFP há uma menor agregação de erros para amostras onde $T_1 \sim T_2$ devido a maior faixa dinâmica entre o sinal do EQE ao EE, Figura 6(A). Porém, na condição $T_1 > T_2$ a técnica CWFP é que apresenta uma melhor razão sinal/ruído, conforme Figura 6 (B).

Figura 6 – Sinais da CWFP e CP-CWFP obtidos em 85 MHz com: (A) amostras de água ($T_1/T_2 \sim 1$) e (B) amostras de sementes de mamona ($T_1/T_2 \sim 11$).

Fonte: DE ANDRADE, F. D.; NETTO, A. M.; COLNAGO, L. A., 2012, p. 186.

2.4 Aplicações da CWFP e CP-CWFP

As primeiras aplicações da técnica CWFP foram apresentadas por Azeredo e colaboradores (2000).¹⁶ Estes constataram que a amplitude do sinal CWFP depende linearmente da concentração do analito, conforme apresentado na Figura 7. Nesta figura em (A) é apresentada uma correlação linear entre a amplitude do sinal CWFP, obtida óleos de semente de girassol diluído em tetracloreto de carbono, com a concentração de óleo, sendo o coeficiente de correlação linear neste caso 0,997. Em (B) é mostrada que a amplitude do sinal CWFP adquirida com diferentes solventes em função da concentração de hidrogênio deste segue uma correlação linear, com coeficiente de correlação de 0,998. A sequência CWFP também tem sido utilizada para medida de um analito presente em amostras com multicomponentes como óleo em sementes. Neste caso, para sementes com baixa concentração de água (< 5%), como milho e trigo a CWFP pode ser utilizada para quantificação de óleo.^{16, 17}

Figura 7- Amplitude do sinal CWFP para o ^1H em função da concentração de óleo de girassol em (A) e de hidrogênios em (B), para os solventes: (1) clorofórmio, (2) 1,1,1 tricloroetano, (3) 1,2 dicloroetano, (4) benzeno, (5) ciclohexano e (6) hexano.

Fonte: AZEREDO, R. B. D.; COLNAGO, L. A.; ENGELSBERG, M., 2000, p. 2404 e 2405.

Em 2007, Colnago et al. demonstraram que a técnica CWFP também pode ser utilizada para análise em fluxo, conforme esquema da Figura 8 (A). Na Figura 8 (B) são apresentados 96 picos de diferentes amplitudes que correspondem a 96 sementes. As diferentes amplitudes estão relacionadas com diferentes quantidades de óleo presente nas sementes, já que a amplitude do sinal da CWFP é dependente da quantidade de óleo. Este método tem o potencial de analisar mais de 20.000 amostras/h e poder ser aplicado não somente na análise de sementes da mesma espécie, mas também em uma mistura de sementes de diferentes espécies com composição similar de ácidos graxos.^{22, 23}

Figura 8 – (A) Esquema para medidas em fluxo online, onde v é a velocidade de transporte das amostras, D é a distância entre as cavidades e d é a distância de transporte da amostra da região homogenia do magneto até antes de entrar na região de transmissão; (B) Amplitude do sinal CWFP correspondente a 96 sementes de macadâmia.

Fonte: COLNAGO, L. A.; ENGELSBERG, M.; SOUZA, A. A.; BARBOSA, L. L., 2007, p. 1272 e 1273.

Em 2009, Corrêa et al. utilizaram o sinal obtidos pela sequência CWFP para determinar gordura intramuscular contidas em carne bovina, no modo *stop and flow*. Neste trabalho foi demonstrado que a razão M_{EE}/M_0 do sinal obtido com a sequência CWFP, a qual tem uma dependência de T_1 e T_2 , apresenta uma maior correlação linear com o teor de gordura intramuscular do que os sinais obtidos com a sequência CPMG, que tem dependência somente de T_2 . Sendo os coeficientes de correlação lineares (r) obtidos foram de 0,9 para a CWFP (Figura 9 (B)) e -0,25 para a CPMG (Figura 9 (A)).^{2, 23}

Figura 9- Correlação de gordura intramuscular de carne: (A) de T_2 por CPMG com $r=-0,25$ e (B) da razão M_{EE}/M_0 por CWFP com $r = 0,9$.

Fonte: CORREA, C. C.; FORATO, L. A.; COLNAGO, L. A., 2009, p. 1358.

Em 2011, Colnago et al. utilizaram a sequência CWFP para determinação de óleo em sementes intactas utilizando o método online no modo *stop and flow* em 31 sementes de oleaginosas de diferentes espécies conforme apresentado na Figura 10 (A). Nesta figura os picos mais acentuados indicam o início do sinal CWFP para cada amostra que pode ser utilizado para medir o conteúdo de óleo. Os sinais no retângulo pontilhado da Figura 10 (A) são óleo de sementes intactas de macaúba, mamona e melancia, respectivamente. Dentre estas três amostras, o sinal obtido pela CWFP para a semente de mamona apresenta um decaimento mais rápido do EQE ao EE por apresentar óleo de maior viscosidade. Os valores de T_2 obtidos por CWFP também foram comparados com os valores de T_2 obtidos para por CPMG para as 31 amostras analisadas, sendo obtida alta correlação ($r > 0,9$), indicando que a CWFP, assim como a CPMG, pode ser utilizada para mensurar a parâmetros de qualidade do óleo. Este sistema permite analisar mais de 100 amostras por hora.^{21, 24}

Ainda, neste trabalho é mostrado que com o método de análises dos componentes principais (PCA – *Principal Component Analysis*) aplicado aos dados obtidos com a técnica CWFP possibilita classificar as sementes em diferentes grupos segundo a viscosidade. Os gráficos dos escores de PCA representaram mais de 98% dos dados (PC1 = 95,01% e PC2 = 3,70%) (Figura 10 (B)). Quanto maior é a quantidade de ácidos graxo insaturado menor é a viscosidade. Desta forma, óleos saturados se agruparam a esquerda da Figura 10 (B) como é o caso das sementes de café (●) que são apresentarem mais de 40% de ácidos graxos saturados e terem uma razão $T_1/T_2 > 2$ ficaram na região do PC1 de -100 a -80. As sementes ricas em ácidos graxos monoinsaturados que são a moringa, macadâmia e rabanete (▲), estão entre -60 a -40 no PC1. Já as sementes mais ricas em ácidos graxos poli-insaturados (□ e ★) com razão $T_1/T_2 \sim 1$ ficaram na parte direita do PC1 na região entre -20 a +40.^{21, 23, 24}

Figura 10- (A) Sinal CWFP para 31 sementes obtidas utilizando o método online *stop and flow* e (B) scores obtidos com a análise do PCA através dos dados CWFP.

Fonte: COLNAGO, L. A. et al., 2011, p. 116.

Em 2012, Venâncio e Colnago demonstraram que utilizando a sequências CWFP é possível monitorar reação de polimerização e obter informações sobre a cinética da reação e da dinâmica molecular dos reagentes e produtos. Neste trabalho também foi demonstrado que os tempos de relaxação desta técnica são similares aos obtidos pelos métodos padrão CPMG e IR. Além disso, este tipo de análise pode ser facilmente implementada em aplicações industriais ou laboratoriais.²⁵

Pereira et al. (2013) utilizando as sequências CWFP e CPMG e modelos estatísticos multivariáveis, para tratamento dos dados, conseguiram prever sete parâmetros de qualidade de carne bovina, sendo três sensoriais e quatro físico-químicos. Os resultados deste estudo

mostraram que é possível determinar os parâmetros de qualidade em questão de forma simultânea e confiável, sendo os métodos CWFP e CPMG indicados para aplicações comerciais.²⁶ Em 2014, Santos et al., também utilizam as técnicas CWFP e CPMG para analisar amostras de carne bovina. Neste estudo com o auxílio de estatística multivariável e univariável as amostras foram classificadas de acordo com a raça e sexo do animal. Pela análise univariável teste t-student, foi encontrado que o conjunto de dados obtido com sequência CWFP, o qual leva em consideração a razão M_{EE}/M_0 fornece melhores resultados que os dados encontrados pela CPMG, que são baseados na constante de tempo T_2 .²⁷ Colnago et al. (2015), também propuseram a aplicação das sequências CWFP e CP-CWFP na análise de alimentos tais como determinação do amadurecimento de frutas e na análise de salsichas e no teor de gordura em maioneses.²⁰

Em 2015 Kock e Colnago utilizando as sequências CWFP e CP-CWFP estudaram complexos de EDTA com íons paramagnéticos em solução. Esses métodos foram propostos como uma alternativa para a espectrofotometria, já que os métodos CWFP e CP-CWFP também podem ser utilizados para estudos de complexos incolores contendo íons paramagnéticos.²⁸

3 OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo principal estudar experimental e teoricamente as sequências de pulsos CWFP ($T_p < T_2^*$), com alternância de fase em π . As sequências estudadas foram a CWFP_{x-x}, CP-CWFP_{x-x} e CPMG_{90y-y}. Este trabalho ainda teve como objetivo evidenciar as principais vantagens destas sequências com relação às técnicas CWFP e CP-CWFP, bem como demonstrar algumas aplicações na análise qualitativa de produtos agro-alimentares.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Amostras utilizadas

Neste estudo foram utilizadas amostras com diferentes razões T_1/T_2 , sendo estas solução de sulfato de cobre (CuSO_4) nas concentrações 10^{-2} e 10^{-3} mol L^{-1} , cuja razão $T_1/T_2 \sim 1$ e soluções de sulfato de manganês (MnSO_4) nas concentrações 10^{-3} e 10^{-4} mol L^{-1} , para as quais a razão $T_1/T_2 \sim 4$. Estas soluções foram preparadas com sais de grau analítico de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ e $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, obtidos na SIGMA-ALDRICH e Synth (São Paulo, Brasil), respectivamente.

A fim de estudar as aplicabilidades das sequências com alternância de fase também foram utilizadas algumas amostras adquiridas no mercado local, sendo estas: banana verde e madura, geleia tradicional e zero açúcar e sementes de linhaça, amendoim, macaúba, pinhão manso, macadâmia, soja e mamona.

4.2 Equipamentos utilizados

Para a realização do estudo das sequências com alternância de fase foi utilizado o espectrômetro Minispec mq-20, Bruker, com um magneto de 0,47 T operando na frequência de 19,9 MHz para o ^1H , com *probe* de 10 mm e largura do pulso de $\pi/2$ de 3,22 μs . Outro espectrômetro utilizado neste estudo foi o Maran Ultra DRX F com um magneto de 0,065 T e frequência de 2,6 MHz para o ^1H , com um *probe* de 51 mm e largura do pulso de $\pi/2$ de 12,2 μs .

Ainda, a fim de estudar detalhadamente os sinais dos métodos CWFP_{x-x} , CP-CWFP_{x-x} e CPMG_{90y-y} foram realizados experimentos com estas sequências e com a CWFP e CP-CWFP na condição SSFP ($T_2^* < T_p < T_2$). Para este estudo foi utilizado o espectrômetro adquirido da Spin Lock com um magneto 0,23 T operando na frequência de 9 MHz para o ^1H com uma largura do pulso de $\pi/2$ igual a 35 μs .

Todos os experimentos foram realizados na temperatura $30 \pm 1^\circ\text{C}$ e as sequências de pulsos foram escritas nas respectivas linguagens dos equipamentos.

4.3 Sequências de pulsos de RMN

4.3.1 Medidas de tempos de relaxação (T_1 e T_2) - sequências convencionais

O método Inversão-Recuperação (IR) é o método mais utilizado para determinação da constante de tempo T_1 .²⁹ Este consiste na aplicação de um pulso de π que inverte a magnetização inicial (M_0), que estava no equilíbrio térmico, ou seja, a magnetização é rotacionada de z (M_0), para $-z$ ($-M_0$). Durante um tempo T_p , a magnetização começa a retornar gradualmente ao eixo z . Após este intervalo, é aplicado um pulso de $\pi/2x'$, o qual rotaciona a magnetização M_0 , e $-M_0$, para o plano $x'y'$, nos eixos y' e $-y'$, respectivamente. A magnetização resultante é proporcional ao FID observado após o pulso de $\pi/2x'$. Para obter o valor de T_1 , várias medidas de IR são realizadas variando os valores de T_p , tendo desta forma uma evolução temporal da magnetização, e consequentemente o valor de T_1 . Esta relaxação (T_1) segue um comportamento exponencial de primeira ordem como pode ser observado na Equação 18, nesta M_0 é a magnetização no equilíbrio térmico.

$$M_z(T_p) = M_0[1 - 2 \exp(-T_p/T_1)] \quad \text{Equação 18}$$

Esta sequência é repetida várias vezes com um intervalo de espera entre cada sequência de pulso superior $5T_1$ para que toda magnetização tenha retornado ao equilíbrio térmico.

Para determinação do T_2 a sequência CPMG é o método padrão. Nesta a magnetização que está inicialmente em equilíbrio (M_0), é alinhada ao eixo $-y'$, com a aplicação de um pulso de RF de $\pi/2x'$. Durante um intervalo T_p ocorre um defasamento da magnetização no plano $x'y'$. A aplicação de um trem de pulsos de π em y' faz com que a magnetização seja refocalizada no eixo y' , gerando assim vários ecos. A intensidade do sinal dos ecos a cada $2T_p$, tempo ao eco, decai exponencialmente com uma constante de tempo T_2 .

Os experimentos realizados com as sequências CPMG e IR foram feitos em triplicas, sendo expressos, neste trabalho, os valores médios das constantes de tempo T_1 e T_2 dadas por estas sequências.

4.3.2 CWFP e CP-CWFP com e sem alternância de fase e CPMG_{90y-y}

Na Figura 11 (A e B) são apresentados esquema dos pulsos que compõe as sequências com regime de onda continua. Nesta figura, a letra grega ϕ , ϕ_1 e ϕ_2 , após o ângulo dos pulsos corresponde à fase destes. A Figura 11 com as fases correspondentes a $\phi_1 = \phi_2 = x'$ (diagrama (A)) e $\phi = \phi_1 = \phi_2 = x'$ (diagrama B), representam as sequências CWFP e CP-CWFP, respectivamente. Estes esquemas mostram que a CWFP é composta por um trem de pulsos de $\pi/2x'$ espaçados com um tempo T_p e a CP-CWFP apresenta um pulso de $\pi/2x'$ espaçados por $T_p/2$ de um trem de pulsos de $\pi/2$ em x' espaçados por T_p .^{9, 10, 17}

Conforme apresentando na introdução as sequências CWFP e CP-CWFP requerem o deslocamento da frequência de *offset* de acordo com o valor do T_p , para que se obtenha uma amplitude máxima do sinal. Esta frequência a ser deslocada é determinada pela expressão $\psi = \Omega T_p = 2\pi f T_p$ (equação 2).

Normalmente é utilizado ângulo de precessão $\psi = 3\pi$ (frequência *offset* 5 kHz) e $T_p = 300 \mu s$. Estes parâmetros são frequentemente adotados porque para valores de T_p menores, geralmente se aproximam do limite do equipamento, além disso, a combinação deste T_p e ψ fornecerem valores inteiros de frequência de *offset* a ser deslocada, facilitando o ajuste desta no espectrômetro. Entretanto, outros valores de T_p e ψ podem ser adotados.

Figura 11 – Esquema de pulsos que representa as sequências com regime de onda continua. (A): CWFP: $\phi_1 = \phi_2 = x'$; CWFP_{x-x}: $\phi_1 = x'$ e $\phi_2 = -x'$; (B): CP-CWFP: $\phi = \phi_1 = \phi_2 = x'$; CP-CWFP_{x-x}: $\phi = \phi_1 = x'$ e $\phi_2 = -x'$; CPMG_{90y-y}: $\phi = x'$, $\phi_1 = y'$ e $\phi_2 = -y'$.

Para as sequências com alternância de fase (AF) de π : CWFP_{x-x}, CP-CWFP_{x-x} e CPMG_{90y-y}, as fases dos pulsos que compõem o trem de pulso do digrama (A e B) da Figura 11 são representados com AF de π . Assim, $\phi_1 = x'$ e $\phi_2 = -x'$ para as sequências CWFP_{x-x} (Figura 11 (A)) e CP-CWFP_{x-x} (Figura 11 (B)) e $\phi_1 = y'$ e $\phi_2 = -y'$ para a CPMG_{90y-y} (Figura 11 (B)). Tanto para a CP-CWFP_{x-x} quanto para a CPMG_{90y-y} ϕ corresponde a fase x' . O diagrama dos pulsos para as sequências CWFP_{x-x} e CP-CWFP_{x-x} são muito similares a CWFP

e CP-CWFP, se diferenciando somente na fase dos pulsos de refocalização do trem de pulsos. A sequência CPMG_{90y-y} é similar a CPMG₉₀ ($\pi/2x'-T_p/2 - (\pi/2y'-T_p - \pi/2y'-T_p)n$).³⁰ No entanto, os pulsos de refocalização do trem de pulsos da CPMG_{90y-y} tem alternância de fase de π (y e $-y$) e $0T_p < T_2^*$. Esta sequência, assim com as outras técnicas de onda continua atinge o EE.

A maioria dos experimentos feitos com as sequências CWFP_{x-x}, CP-CWFP_{x-x} e CPMG_{90y-y}, foram realizados na condição de ressonância ($\Omega=0$) e com o valor de T_p de 300 μ s. Somente os estudos com relação a influência da variação da frequência de *offset* e do T_p na amplitude da magnetização foram realizados com diferentes valores de T_p e Ω . Também foram feitos experimentos com estas sequências na condição SSFP, onde $T_p > T_2^*$ (SSFP_{x-x}, CP-SSFP_{x-x} e CPMG_{90y-y}). Neste caso foi utilizado T_p de 1,2 ms e tempo de aquisição entre os pulsos de 1 ms.

Após ter sido feita a aquisição dos sinais, tanto para as sequências sem AF quando para as com AF de π , os tempos de relaxação T_1 e T_2 foram determinados através das Equações 16 e 17 utilizando a constante de tempo T^* , a M_{EE} e a M_0 . Sendo que a M_0 foi adquirida 11 μ s logo após o primeiro pulso, para o espectrômetro com frequência 19,9 MHz para o 1H (Minispec mq -20), a M_{EE} no centro do EE do sinal entre dois pulsos e a constante de tempo T^* foi obtida de um *fitting* mono-exponencial do EQE ao EE. Com exceção para alguns sinais adquiridos na seção aplicações, onde o T^* foi adquirido através de *fitting* bi-exponencial.

Os experimentos realizados com as sequências CWFP, CP-CWFP, CWFP_{x-x}, CP-CWFP_{x-x} e CPMG_{90y-y} foram feitos em triplicas, sendo expressos neste trabalho, os valores médios da M_{EE} e das constantes de tempo T^* , T_1 e T_2 obtidas por estas sequências.

4.4 Simulações dos sinais numéricos

As simulações numéricas apresentadas neste estudo foram realizadas com algoritmos escritos na linguagem Matlab[®] desenvolvidos por Moraes e Colnago (2014).³¹ Este algoritmo, consideram que as frequências estão distribuídas em torno de uma frequência central (frequência de Larmour - ω_0) na forma de uma lorentiziana e também assumem, assim como descritos em outros trabalhos, a somatória das isocromatas pela equação de Bloch.^{31, 32, 33} Abaixo é feita uma breve descrição dos principais algoritmos que são utilizados para a simulação.

A descrição matemática do comportamento da magnetização por estes algoritmos é feita por notações vetoriais, conforme expresso na equação 19.

$$M(t) = \begin{bmatrix} M_{x'} \\ M_{y'} \\ M_z \end{bmatrix} \quad \text{Equação 19}$$

Onde $M_{x'}$, $M_{y'}$ e M_z representam a magnetização no eixo x' , y' e z , respectivamente. Assim, a descrição, da magnetização no equilíbrio termodinâmico é descrita pela equação 20.

$$M(0) = \begin{bmatrix} 0 \\ 0 \\ M_0 \end{bmatrix} \quad \text{Equação 20}$$

Neste programa os pulsos são representados matematicamente através de matrizes de rotação. A matriz a ser utilizada para rotacionar a magnetização depende da fase do pulso. Se for em x' se utiliza a equação 21 e em y' equação 22.

$$R_{\alpha_x} = \begin{bmatrix} 1 & 0 & 0 \\ 0 & \cos\alpha & \sin\alpha \\ 0 & -\sin\alpha & \cos\alpha \end{bmatrix} \quad \text{Equação 21}$$

$$R_{\alpha_y} = \begin{bmatrix} \cos\alpha & 0 & \sin\alpha \\ 0 & 1 & 0 \\ -\sin\alpha & 0 & \cos\alpha \end{bmatrix} \quad \text{Equação 22}$$

Onde α é o ângulo de aplicação do pulso.

Como o comportamento da magnetização, neste programa, é descrito por vetores, após a aplicação de uma das matrizes de rotação no vetor de magnetização inicial é descrito por um segundo vetor, que descreve a magnetização logo após o pulso. Este comportamento é demonstrado na equação 23. Nesta, admite-se a aplicação de um pulso de $\pi/2x'$ na magnetização que se encontra no estado de equilíbrio (M_0).

$$M_1 = R_{90^\circ_x} \cdot M_0 = \begin{bmatrix} 1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 1 \\ 0 & -1 & 0 \end{bmatrix} \cdot \begin{bmatrix} 0 \\ 0 \\ 1 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 0 \\ 1 \\ 0 \end{bmatrix} \quad \text{Equação 23}$$

A dispersão das isocromatas após a aplicação de um pulso é descrita por outra matriz de rotação $R_z(\psi)$, a qual está expressa na equação 24.

$$R_z(\psi) = \begin{bmatrix} \cos\psi & \sin\psi & 0 \\ -\sin\psi & \cos\psi & 0 \\ 0 & 0 & 1 \end{bmatrix} \quad \text{Equação 24}$$

Esta matriz descreve a defasagem das isocromatas no plano $x'y'$. E a relaxação da magnetização, tanto transversal quanto longitudinal, é descrita pela matriz apresentada na equação 25.

$$S(T_p, T_1, T_2) = \begin{bmatrix} E_2 & 0 & 0 \\ 0 & E_2 & 0 \\ 0 & 0 & E_1 \end{bmatrix} \quad \text{Equação 25}$$

Desta forma, no programa descrito por Moraes e Colnago, e conforme determinado por Bloch, a evolução das isocromatas após a aplicação de um pulso envolve a rotação do pulso R_α , a defasar no plano $x' y'$ $R_z(\psi)$ e os fenômenos de relaxação $S(T_p, T_1, T_2)$ conforme apresentado na equação 26.³¹

$$M(t) = R_z(\psi)S(T_p, T_1, T_2)R_\alpha M(0) + (1 - E_1)M_0 \quad \text{Equação 26}$$

Na equação 27 está reescrita a equação acima na forma matricial, a qual é utilizada no programa.

$$\begin{bmatrix} M_{x'} \\ M_{y'} \\ M_z \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \cos\psi & \sin\psi & 0 \\ -\sin\psi & \cos\psi & 0 \\ 0 & 0 & 1 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} E_2 & 0 & 0 \\ 0 & E_2 & 0 \\ 0 & 0 & E_1 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} 1 & 0 & 0 \\ 0 & \cos\alpha & \sin\alpha \\ 0 & -\sin\alpha & \cos\alpha \end{bmatrix} \begin{bmatrix} 0 \\ 0 \\ 1 \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} 0 \\ 0 \\ 1 - E_1 \end{bmatrix} \quad \text{Equação 27}$$

Para que o algoritmo descrito por Moraes e Colnago simulasse as sequências com AF de π , foi acrescentando a este programa matrizes de rotação em $-x'$ e $-y'$ (equações 28 e 29).

$$R_{\alpha-x} = \begin{bmatrix} -1 & 0 & 0 \\ 0 & -\cos\alpha & -\sin\alpha \\ 0 & \sin\alpha & -\cos\alpha \end{bmatrix} \quad \text{Equação 28}$$

$$R_{\alpha-y} = \begin{bmatrix} -\cos\alpha & 0 & -\sin\alpha \\ 0 & -1 & 0 \\ \sin\alpha & 0 & -\cos\alpha \end{bmatrix} \quad \text{Equação 29}$$

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análise dos sinais CWFP_{x-x}, CP-CWFP_{x-x} e CPMG_{90y-y} na condição SSFP

Para realização de um estudo detalhado das sequências CWFP_{x-x}, CP-CWFP_{x-x} e CPMG_{90y-y} foi utilizada a condição SSFP ($T_2 < T_p < T_2^*$), onde T_p tem valores superiores aos da CWFP, possibilitando a visualização dos FIDs e ecos formados entre os pulsos. Nesta condição, as sequências CWFP, CWFP_{x-x}, CP-CWFP, CP-CWFP_{x-x} e CPMG_{90y-y} são denominadas de SSFP, SSFP_{x-x}, CP-SSFP, CP-SSFP_{x-x} e CPMG_{90y-y}. Estes experimentos foram realizados no espectrômetro Tecmag com frequência de 9 MHz para o ^1H , sendo utilizado um T_p de 1,2 ms e o tempo de aquisição entre os pulsos foi de 1 ms.

Para este estudo foram utilizadas soluções com diferentes razões T_1/T_2 . Sendo selecionada para analisar cada sequência, a solução que proporciona sinais com uma maior faixa dinâmica entre EQE ao EE, de acordo com o apresentado na introdução.⁹ Assim, a solução de MnSO_4 10^{-3} mol L^{-1} , cujo $T_1 \sim 4T_2$, foi utilizada para estudar os sinais obtidos pelas sequências CWFP e CWFP_{x-x} e a solução de CuSO_4 10^{-2} mol L^{-1} , que apresenta $T_1 \sim T_2$, para CP-CWFP, CP-CWFP_{x-x} e CPMG_{90y-y}. Os sinais obtidos com este estudo são apresentados na Figura 12.

A Figura 12 (A, B, C e D) apresenta as componentes reais dos sinais obtidos com as sequências SSFP, SSFP_{x-x}, CP-CWFP, e CP-CWFP_{x-x}, respectivamente, e a Figura 12 (E) mostra a componente imaginária do sinal adquirido com a sequência CPMG_{90y-y}. Nesta figura é possível observar que o sinal obtido com a SSFP_{x-x}, assim com os adquiridos pela SSFP, decaem exponencialmente até atingir o EE. Da mesma forma, os sinais obtidos com as sequências CP-SSFP_{x-x} e CPMG_{90y-y} são similares aos adquiridos pela CP-SSFP. Ou seja, decaem a uma amplitude mínima para depois aumentar exponencialmente até atingir o EE. Os sinais apresentados pelas três sequências com AF, assim como os obtidos pela CWFP e CP-CWFP são constituídos por três estados: alternância de amplitude, estado *quasi*-estacionário e estado estacionário.

Figura 12 – (A) e (B) - Componente real do sinal obtida pela sequência SSFP (A) e SSFP_{x-x} (B) para a solução de MnSO₄ 10⁻³ mol L⁻¹. (C) e (D) - Componente real do sinal obtida pelas sequências CP-SSFP (C) e CP-SSFP_{x-x} (D) e componente imaginária do sinal obtida pela sequência CPMG_{90y-y} para a solução de CuSO₄ 10⁻² mol L⁻¹.

Para as sequências SSFP_{x-x} e SSFP, o primeiro estágio pode ser observado na Figura 13 (A e B), onde é apresentada uma ampliação dos primeiros 0,010 s dos sinais apresentados na Figura 12 (A e B). Nesta ampliação é possível observar que, após os primeiros pulsos, o sinal obtido com a sequência SSFP_{x-x}, da mesma forma que a SSFP, passa por um período oscilatório, onde há formação de FIDs e ecos entre os pulsos com diferentes amplitudes. Neste estágio, as sequências SSFP e SSFP_{x-x} somente se diferem em relação a fase e a periodicidade com que o FID e o eco são formados entre os pulsos.

Figura 13 – Expansão dos primeiros 0,010 s da componente real do sinal obtido com solução MnSO₄ 10⁻³ mol L⁻¹ pelas sequências SSFP em (A) e SSFP_{x-x} em (B).

O primeiro estágio dos sinais obtidos pelas sequências CP-CWFP, CP-SSFP_{x-x} e CPMG_{90y-y} também são constituídos por um período oscilatório. Sendo que este estágio é semelhante entre três sequências com AF de π e o CP-SSFP é similar ao da SSFP.

Após o período oscilatório, as sequências com AF de π , bem como a SSFP e a CP-SSFP, passam pelo EQE e em seguida atinge o EE. Neste último estágio FID e eco tem a mesma amplitude, de acordo a Figura 14. Nesta figura são apresentadas ampliações da região entre 0,349 s a 0,354 s dos sinais apresentados nas Figuras 13 (A e B), sendo que (A) corresponde a ampliação para a sequência SSFP e (B) para a SSFP_{x-x}. A expansão apresentada em (A) também pode ser considerada para a CP-CWFP, já que, no EE a componente real do sinal obtido com esta sequência apresentar o mesmo comportamento que a SSFP. A mesma consideração pode ser feita para as sequências com AF de π que também apresentam comportamento similar no EE. Ou seja, a expansão apresentada em (B) também pode ser considerada para a componente real da CP-SSFP_{x-x} e imaginária da CPMG_{90y-y}. Ainda nesta figura, a linha contínua indica a posição dos pulsos e a linha tracejada a separação entre FID (à esquerda) e eco (à direita).

Figura 14 – Expansão da região entre 0,349 s a 0,354 s da componente real do sinal obtido com solução $\text{MnSO}_4 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ pelas sequência (A) SSFP, (B) SSFP_{x-x} e em (C) magnitude do sinal (A) ou (B).

Conforme pode ser observado na Figura 14, no EE, as sequências na condição SSFP com e sem AF de π se diferem em relação à fase do FID e do eco entre os pulsos. Para as

sequências SSFP e CP-SSFP no EE há a formação, durante cada T_p , de um FID (logo após o pulso) e de um eco (antes do próximo pulso) defasado π , (Figura 14 (A)). Já nas sequências SSFP_{x-x}, CP-SSFP_{x-x} e CPMG_{90y-y}, durante cada T_p , o FID e eco formados têm a mesma fase. Porém, as fases de FID e eco estão π defasados entre os consecutivos pulsos, de acordo com Figura 14 (B). Nos sinais apresentados na Figura 14 (A e B) os sinais foram adquiridos com a fase do receptor em x' . Ao alternarmos a fase deste em x' e $-x'$ para a sequência com AF de π , obteremos FIDs e ecos sempre com mesma fase, igual ao modulo do sinal para estas sequências (Figura 14 (C)). Esta alternância de fase do receptor não causa nenhum efeito na sequência SSFP, porém o modulo do sinal obtido com esta sequência (Figura 14 (A)) é similar a Figura 14 (C).

5.2 Influência da variação da frequência de offset e do T_p em sequências de onda contínua

Conforme demonstrado no estudo anterior, na condição SSFP, as sequências com e sem AF de π apresentam diferenças significativas, na condição de ressonância, com relação à formação de FID e eco durante cada T_p no EE. Entretanto, estas diferenças não acarretam em grandes alterações dos sinais na SSFP. Já na condição de onda contínua, enquanto nas sequências com AF de π os sinais podem ser adquiridos em ressonância, na CWFP e CP-CWFP há necessidade do deslocamento da frequência de *offset*. Isso ocorre, porque na condição de onda continua devido $T_p < T_2^* \ll T_2$, há a sobreposição entre FID e eco durante cada T_p . Assim, as sequências CWFP e CP-CWFP, devido o FID e o eco estarem defasados π , na condição de ressonância, há interferência destrutiva entre estes. Desta forma, é necessário o deslocamento da frequência de *offset* para que a condição $\psi = (2n + 1)\pi$ seja satisfeita (Figura15 (linha preta)), conforme citado na introdução. Já nas sequências com AF de π , na condição de ressonância e em ângulo de precessão múltiplo par ($\psi = 2n\pi$), FID e eco estão em fase, resultando em interferência construtiva da interação destes (Figura15 (linha vermelha)). Assim, as sequências com AF de π , ao contrário da CWFP e CP-CWFP, podem ser utilizadas na condição de ressonância, não necessitando neste caso o deslocamento da frequência de *offset*.

A Figura15 apresenta a dependência da amplitude do sinal de RMN no EE sobre a frequência de *offset* (Ω) para as sequências CWFP_{x-x}, CP-CWFP_{x-x} e CPMG_{90y-y} (linha vermelha) e CWFP e CP-CWFP (linha preta), para um T_p de 300 μ s. Para obtenção destes sinais foi utilizado solução de CuSO_4 10^{-2} mol L^{-1} e os experimentos foram realizados no

espectrômetro de 19,9 MHz para o ^1H . Nesta Figura foi possível comprovar o que foi exposto anteriormente. Isto é, para frequência de *offset* igual a zero ($\Omega = 0$ - em ressonância) a amplitude da magnetização é máxima para as sequências com AF de π (Figura15 (linha vermelha)). Nesta mesma frequência de *offset*, a amplitude do sinal é mínima para as sequências sem AF (Figura15 (linha preta)). Porém em $\Omega = 1,67$ kHz, para o $T_p = 300$ μs , o ângulo de precessão corresponde a $\psi = 1$, a condição $\psi = (2n + 1)\pi$ é satisfeita, sendo máxima a amplitude dos sinais para as sequências sem AF.

Figura15 – Dependência da amplitude do sinal normalizado no EE com relação à variação da frequência de *offset* para um $T_p = 300$ μs para as sequências com AF de π (linha vermelha) e sem AF (linha preta), para uma solução de CuSO_4 10^{-2} mol L^{-1} .

Por não necessitarem o deslocamento da frequência de offset, na condição de ressonância as sequências CWFP_{x-x} , CP-CWFP_{x-x} e CPMG_{90y-y} também acabam sendo independentes do T_p , para $T_2 \gg T_p < T_2^*$, conforme pode ser observado na Figura 16. Nesta figura são apresentados os sinais obtidos com as três sequências com AF de π na condição de ressonância para valores de T_p de 200 μs e de 300 μs . Os sinais exibidos nesta figura correspondem a duas amostras com diferentes razões T_1/T_2 , sendo que em (A) é para solução de CuSO_4 10^{-2} mol L^{-1} , cuja razão $T_1/T_2 \sim 1$ e em (B) para a solução de MnSO_4 10^{-3} mol L^{-1} com $T_1/T_2 \sim 4$. Os sinais deste estudo foram adquiridos no espectrômetro com frequência de 19,9 MHz, para o ^1H . Nesta figura é possível observar que os sinais obtidos pelas sequências CWFP_{x-x} , CP-CWFP_{x-x} e CPMG_{90y-y} não são influenciados pela variação do valor do T_p . Uma vez que, para ambos os T_p (200 μs e 300 μs) os sinais se mantiveram iguais, tanto para a condição $T_1/T_2 \sim 1$ em (A), quanto para $T_1/T_2 \sim 4$ em (B).

Figura 16 – Magnitude dos sinais obtidos na condição de ressonância pelas as sequências CWFP_{x-x} (linha azul), CP-CWFP_{x-x} (linha preta) e CPMG_{90y-y} (linha vermelha) com T_p de 200 μ s e 300 μ s para as soluções de CuSO_4 10^{-2} mol L^{-1} (A) e MnSO_4 10^{-3} mol L^{-1} (B).

Em contrapartida, as sequências sem AF por necessitarem o deslocamento da frequência de *offset* são dependentes do T_p , uma vez que este precisa ser ajustado para diferentes valores de frequência de *offset* de acordo com a Equação 2. A Figura 17 mostra a dependência do T_p das sequências CWFP e CP-CWFP. Nesta figura são apresentados os sinais para as sequências sem AF para $T_p = 200$ μ s e 300 μ s e $\Omega = 5$ kHz. Na Figura 17(A) os sinais foram adquiridos com uma solução de CuSO_4 10^{-2} mol L^{-1} ($T_1/T_2 \sim 1$) e na (B) com uma solução de MnSO_4 10^{-3} mol L^{-1} ($T_1/T_2 \sim 4$) em ambos os casos no espectrômetro com frequência 19,9 MHz para o ^1H . Nesta figura é possível observar que, tanto a condição (A), quanto à (B), para o T_p de 300 μ s, que está ajustado para a $\Omega = 5$ kHz, a amplitude dos sinais no EE são as mesmas das encontradas para as sequências com AF π na Figura 16. Porém, para T_p de 200 μ s os sinais apresentados na Figura 17 (A e B) perdem totalmente a característica dos sinais adquiridos com as sequências CWFP e CP-CWFP.

Figura 17 – Magnitude dos sinais obtidos com $\Omega = 5$ kHz pelas as sequências CWFP (linha azul) e CP-CWFP (linha preta) com T_p de 200 μ s e 300 μ s para as soluções de CuSO_4 10^{-2} mol L^{-1} (A) e MnSO_4 10^{-3} mol L^{-1} (B).

5.3 Estudo das sequências CWFP_{x-x}, CP-CWFP_{x-x} CPMG_{90y-y}

5.3.1 Resultados Experimentais

Com a finalidade de avaliar os valores das constantes de tempo longitudinal e transversal e também as características dos sinais obtidos pelas sequências CWFP_{x-x}, CP-CWFP_{x-x} e CPMG_{90y-y}, foi realizado um estudo no espectrômetro operando na frequência de 19,9 MHz para o ^1H com soluções de diferentes razões T_1/T_2 . Sendo estas: CuSO_4 10^{-2} e 10^{-3} mol L^{-1} , cujo $T_1 \sim 1,09 T_2$ ($T_1 \sim T_2$) e MnSO_4 10^{-3} e 10^{-4} mol L^{-1} com $T_1 \sim 4 T_2$ ($T_1 > T_2$). Neste estudo, os valores das constantes de tempo T_1 e T_2 mensurados pelas sequências com AF de π foram comparados com os obtidos pela CWFP, CP-CWFP e pelos métodos convencionais de determinação de T_1 (IR) e T_2 (CPMG). Ainda, foi realizada uma correlação entre os sinais obtidos pelas sequências CWFP_{x-x}, CP-CWFP_{x-x} e CPMG_{90y-y} com os adquiridos pelas técnicas CP-CWFP e CWFP. Para determinação dos valores de M_{EE} , T^* , T_1 e T_2 apresentados a seguir foram realizados experimentos em triplicatas sendo apresentados os valores médios destes parâmetros com os respectivos erros.

CWFP e CWFP_{x-x}

Na Figura 18 é apresentada a magnitude dos sinais obtidos experimentalmente com as sequências CWFP_{x-x} ($\Omega = 0$ - linha preta), e CWFP ($\Omega = 5\text{kHz}$ - linha vermelha), para soluções de CuSO_4 de concentração 10^{-2} mol L^{-1} em (A) e 10^{-3} mol L^{-1} em (B). Analisando esta

figura foi possível observar que, para a condição $T_1 \sim T_2$, os sinais obtidos com a sequência $CWFP_{x-x}$, são similares ao da $CWFP$, ou seja, decaem exponencialmente até atingir o EE. Além disso, ambas as sequências apresentaram o mesmo valor de M_{EE} ($\sim 0,5$ s), tanto para a solução de $CuSO_4$ 10^{-2} mol L^{-1} (A) quanto para a 10^{-3} mol L^{-1} (B).

Os sinais obtidos pelas sequências $CWFP$ e $CWFP_{x-x}$ para a solução de $CuSO_4$ 10^{-2} mol L^{-1} somente se distinguem dos obtidos para a concentração 10^{-3} mol L^{-1} com relação ao tempo necessário para a magnetização atingir o EE. Sendo que este foi $\sim 0,4$ s para o $CuSO_4$ 10^{-2} mol L^{-1} e $\sim 0,6$ s para o $CuSO_4$ 10^{-3} mol L^{-1} . Esta variação está relacionada às diferentes concentrações de íons paramagnéticos, neste caso, o cobre (Cu^{+2}), que auxiliam no processo de relaxação. Desta forma, quanto maior a concentração de íons paramagnéticos, menores são os tempos de relaxação. Como a constante de tempo T^* tem uma dependência direta dos tempos de relaxação, de acordo com a equação 15, esta também é influenciada pela concentração dos íons paramagnéticos. Portanto, quando maior a concentração destes íons, menor é o valor do T^* (Figura 20 (T^*)) e mais rápido é o decaimento da magnetização ao EE. Justificando assim, o fato da solução de $CuSO_4$ de concentração 10^{-2} mol L^{-1} ter atingido o EE mais rapidamente que a 10^{-3} mol L^{-1} .

Figura 18- Magnitude dos sinais obtidos experimentalmente com as sequências $CWFP_{x-x}$ ($\Omega = 0$ – linha preta), e $CWFP$ ($\Omega = 5kHz$ – linha vermelha): (A) para uma solução de $CuSO_4$ 10^{-2} mol L^{-1} e (B) 10^{-3} mol L^{-1} .

Também foi realizado um estudo entre os sinais obtidos pelas sequências $CWFP$ e $CWFP_{x-x}$ para amostras com $T_1 > T_2$, conforme exibido na Figura 19. Nesta são apresentados os módulos dos sinais obtidos experimentalmente com as sequências $CWFP_{x-x}$ ($\Omega = 0$ - linha preta), e $CWFP$ ($\Omega = 5kHz$ - linha vermelha), para as soluções de $MnSO_4$ nas concentrações 10^{-3} mol L^{-1} em (A) e 10^{-4} mol L^{-1} em (B). Na Figura 19, da mesma forma que para a soluções

de CuSO_4 (Figura 18), foi observada elevada similaridade entre os sinais obtidos pelas sequências CWFP com e AF de π . Sendo que ambas as técnicas obtiveram valores da M_{EE} parecidos ($\sim 0,2$), tanto para a solução de MnSO_4 $10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ quando para a $10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Somente são encontradas diferenças, no tempo necessário para a magnetização atingir o EE, tanto para o sinal da sequência CWFP quanto para o sinal da CWFP_{x-x} entre ambas as soluções de MnSO_4 . Isto é, assim como para o CuSO_4 , a solução de MnSO_4 de menor concentração atinge o EE mais rapidamente ($\sim 0,8 \text{ s}$) que a de maior concentração ($\sim 1,5 \text{ s}$). Esta diferença é devido a concentração dos íons de manganês (Mn^{+2}), os quais, da mesma forma que o cobre, são íons paramagnéticos. Desta forma, por a solução de MnSO_4 $10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, ter uma maior quantidade de íons de manganês, esta atingiu o EE mais rapidamente do que a solução de MnSO_4 $10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.

Figura 19 – Magnitude dos sinais obtidos experimentalmente pelas sequências CWFP_{x-x} ($\Omega = 0$ – linha preta), e CWFP ($\Omega = 5\text{kHz}$ – linha vermelha): (A) para uma solução de MnSO_4 $10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e (B) $10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.

Comparando os sinais obtidos com as técnicas CWFP e CWFP_{x-x} entre os diferentes compostos estudados (Figura 18 e 19), foi observado que a M_{EE} obtidas por ambas as sequências com as soluções de MnSO_4 ($\sim 0,2$) se diferem das obtidas para as soluções de CuSO_4 ($\sim 0,5$). Essa distinção se deve a diferente razão T_1/T_2 entre os compostos. Onde para $T_1 \sim T_2$ a M_{EE} é próxima a 0,5 e para $T_1 > T_2$ esta apresenta valores abaixo de 0,5. Ainda analisando as variações entre os diferentes compostos, foi verificado que a sequência CWFP_{x-x}, assim como a CWFP, apresentou um decaimento acentuado com relação a amplitude da magnetização do EQE ao EE para as soluções de MnSO_4 , cujo $T_1 > T_2$. Já para as soluções CuSO_4 este decaimento foi breve, devido $T_1 \sim T_2$. Desta forma, encontramos que a CWFP_{x-x} segue o mesmo princípio já apresentado na introdução para a CWFP. Ou seja, em amostras

cujo $T_1 > T_2$ os sinais obtidos por estas sequências apresentam uma maior faixa dinâmica, fornecendo assim *fittings* mais confiáveis que amostras com $T_1 \sim T_2$.

Os gráficos de colunas da Figura 20 apresentam os valores de T^* e da M_{EE} determinados experimentalmente com as sequências CWFP (coluna verde) e CWFP_{x-x} (coluna azul), para as soluções estudadas. Neste gráfico a média dos valores de T^* obtida entre as sequências CWFP e CWFP_{x-x} são $0,112 \pm 0,003$ s, $0,798 \pm 0,006$ s e $0,288 \pm 0,001$ s para as soluções de CuSO_4 10^{-2} e 10^{-3} mol L⁻¹ e MnSO_4 10^{-4} mol L⁻¹, respectivamente. Para a solução de MnSO_4 10^{-3} mol L⁻¹ por ambas as sequências se obteve o mesmo valor de T^* (0,127 s). Analisando os dados apresentados na Figura 20 foi possível comprovar que as constantes de tempo T^* obtidas pela sequência CWFP com e sem AF de π apresentam pequena ou nenhuma variação. Sendo que a maior variação encontrada entre estas foi de $\pm 3,51\%$ para a solução de CuSO_4 10^{-3} mol L⁻¹ (Figura 20 (solução 2 - T^*)).

Figura 20 – Gráfico de colunas dos valores de T^* e M_{EE} , obtidos experimentalmente pelas sequências CWFP (coluna verde) e CWFP_{x-x} (coluna azul) para as soluções: CuSO_4 10^{-2} mol L⁻¹ (1) e 10^{-3} mol L⁻¹ (2); MnSO_4 10^{-3} mol L⁻¹ (3) e 10^{-4} mol L⁻¹ (4).

No gráfico da Figura 20 a média dos valores da M_{EE} para soluções de CuSO_4 10^{-2} mol L⁻¹ e MnSO_4 10^{-4} mol L⁻¹, são de $0,479 \pm 0,003$ e $0,196 \pm 0,001$, nesta ordem. Para as soluções de CuSO_4 10^{-3} mol L⁻¹ e MnSO_4 10^{-3} mol L⁻¹ as M_{EE} obtidas por ambas as sequências tiveram o mesmo valor, 0,474 e 0,186, respectivamente. Analisando os dados desta figura foi possível observar que praticamente não houve diferença entre as M_{EE} obtidas pelas sequências CWFP com e sem AF de π . Sendo que, a diferença entre as M_{EE} da sequência CWFP_{x-x} com relação a CWFP, são inferiores das apresentadas pela constante de tempo T^* .

Na Figura 21 são apresentados dois gráficos com os valores das constantes de tempo T_1 e T_2 obtidos pelas sequências convencionais (IR e CPMG – coluna preta), pela CWFP (colunas verde) e $CWFP_{x-x}$ (coluna azul) para as soluções estudadas. Nesta figura a média entre os valores de T_1 mensurados pelas sequências IR, $CWFP_{x-x}$ e CWFP são $0,118 \pm 0,001$ s e $0,844 \pm 0,005$ s para as soluções de $CuSO_4$ 10^{-2} e 10^{-3} mol L^{-1} e $0,340 \pm 0,003$ s e $0,728 \pm 0,005$ s para as soluções $MnSO_4$ 10^{-3} e 10^{-4} mol L^{-1} . A média com relação ao valor de T_2 obtido pelas sequências CPMG, CWFP e $CWFP_{x-x}$ são $0,109 \pm 0,002$ s e $0,757 \pm 0,006$ s para as soluções de $CuSO_4$ 10^{-2} e 10^{-3} mol L^{-1} e $0,078 \pm 0,001$ s e $0,179 \pm 0,001$ s para as soluções $MnSO_4$ 10^{-3} e 10^{-4} mol L^{-1} . Através das informações mostradas na Figura 21 foi encontrado que os valores de ambas as constantes de tempo obtidas pela sequência $CWFP_{x-x}$ foram muito similares aos mensurados pelas técnicas CWFP, IR e CPMG. Sendo que a maior variação encontrada foi de $\pm 2,73\%$, decorrente da comparação do T_1 adquirido com a sequência $CWFP_{x-x}$ com relação ao obtido pela CWFP.

Figura 21- Gráfico de colunas com as constantes de tempo T_1 pela técnica IR (coluna preta), T_2 pela técnica CPMG (coluna preta), e T_1 e T_2 pelas sequências CWFP (coluna verde) e $CWFP_{x-x}$ (coluna azul), para as soluções: $CuSO_4$ 10^{-2} mol L^{-1} (1) e 10^{-3} mol L^{-1} (2); $MnSO_4$ 10^{-3} mol L^{-1} (3) e 10^{-4} mol L^{-1} (4).

CP-CWFP, CP-CWFP_{x-x} e CPMG_{90y-y}

Na Figura 22 e 23 são apresentados a magnitude dos sinais obtidos experimentalmente com as sequências CP-CWFP_{x-x} (linha azul) e CPMG_{90y-y} (linha preta) com $\Omega = 0$ e CP-CWFP (linha vermelha) com $\Omega = 5$ kHz. Para todas as sequências foi utilizado T_p de 300 μ s. Na Figura 22 os sinais foram adquiridos para soluções de $CuSO_4$ ($T_1 \sim T_2$) nas

concentrações $10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ apresentados em (A) e $10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em (B) e na Figura 23 para as soluções de MnSO_4 ($T_1 > T_2$) nas concentrações $10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ exibidos em (A) e $10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em (B). Em ambas as figuras, foi possível observar que os sinais obtidos com as sequências CP-CWFP_{x-x} e CPMG_{90y-y} apresentam as mesmas características que os adquiridos pela CP-CWFP , ou seja, decaem a uma amplitude mínima para depois aumentar exponencialmente até encontrarem o EE.

Apesar desta similaridade, tanto para Figura 22 quanto para Figura 23, as sequências CP-CWFP_{x-x} e CPMG_{90y-y} apresentam diferenças com relação a CP-CWFP no instante em que a amplitude da magnetização atinge uma amplitude mínima para depois aumentar exponencialmente. Ambas as sequências com AF de π , se diferem da CP-CWFP , por a magnetização destas atingir uma amplitude igual à zero, para depois crescer exponencialmente. Além disso, a técnica CP-CWFP_{x-x} também necessita de um tempo maior para atingir o ponto onde a amplitude da magnetização é mínima. Porém, esta defasagem entre os sinais das sequências com e sem AF de π não influencia nos fatores fundamentais para determinação simultânea de T_1 e T_2 , que são o *fitting* do EQE ao EE (T^*), a amplitude da magnetização no EE (M_{EE}) e a amplitude da magnetização inicial (M_0). Ainda, o fato de a magnetização das sequências CP-CWFP_{x-x} e CPMG_{90y-y} atingir uma amplitude igual à zero, para depois crescer exponencialmente é uma vantagem com relação a sequência CP-CWFP . Já que devido a este fato a faixa dinâmica dos sinais com AF de π é maior que o da CP-CWFP .

Na Figura 22 foi possível observar que as sequências CP-CWFP_{x-x} e CPMG_{90y-y} , apresentaram o mesmo valor de M_{EE} ($\sim 0,5 \text{ s}$) que a CP-CWFP , para ambas as soluções de CuSO_4 . Nesta figura, ainda foi constatado, para as três sequências, distinção no tempo necessário para a magnetização atingir o EE entre as duas soluções de CuSO_4 , sendo este $\sim 0,7$ para a concentração $10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ e $\sim 6 \text{ s}$ para a $10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Este efeito, assim como já foi apresentado para as sequências CWFP_{x-x} e CWFP , é decorrente da variação da concentração do íon paramagnético, que neste caso é o Cu^{2+} .

Figura 22- Magnitude dos sinais obtidos experimentalmente com as sequências CP-CWFP (linha vermelha) com $\Omega = 5$ kHz, CP-CWFP_{x-x} (linha azul) e CPMG_{90y-y} (linha preta) com $\Omega = 0$ e com T_p de 300 μ s: (A) para uma solução de CuSO₄ 10⁻² mol L⁻¹ e (B) 10⁻³ mol L⁻¹.

Para ambas as soluções de MnSO₄ (Figura 23), foi encontrado que as M_{EE} das sequências CP-CWFP, CP-CWFP_{x-x} e CPMG_{90y-y} foram próxima ($\sim 0,2$). Entretanto, devido à concentração dos íons paramagnéticos de Mn²⁺, para a solução de MnSO₄ 10⁻³ mol L⁻¹, os sinais das três sequências em questão, atingiram o EE mas rapidamente ($\sim 0,6$ s) que os sinais obtidos para a solução 10⁻⁴ mol L⁻¹ ($\sim 1,3$ s).

Figura 23 - Magnitude dos sinais obtidos experimentalmente com as sequências CP-CWFP (linha vermelha) com $\Omega = 5$ kHz, CP-CWFP_{x-x} (linha azul) e CPMG_{90y-y} (linha preta) com $\Omega = 0$ e com T_p de 300 μ s: (A) para uma solução de MnSO₄ 10⁻³ mol L⁻¹ e (B) 10⁻⁴ mol L⁻¹.

Também foi realizada uma análise comparativa dos sinais obtidos pelas sequências CP-CWFP, CP-CWFP_{x-x} e CPMG_{90y-y} para composto de CuSO₄ com relação aos obtidos para o MnSO₄. Nesta, assim como já apresentando para a CWFP e CWFP_{x-x}, foi possível observar

que as M_{EE} são diferentes entre os compostos estudados, devido às diferenças nas razões T_1/T_2 . Porém, as sequências CP-CWFP_{x-x} e CPMG_{90y-y} assim como a CP-CWFP, tiveram comportamento oposto ao encontrado pelas técnicas CWFP e CWFP_{x-x}. Ou seja, apresentaram uma maior diferença entre a amplitude do EQE ao EE, para as soluções de CuSO₄, onde $T_1 > T_2$, do que para as soluções de MnSO₄, cujo $T_1 \sim T_2$. Seguindo assim, as mesmas características já apresentadas na introdução para a sequência CP-CWFP.

A Figura 24 apresenta um estudo das constantes de tempo T^* e das M_{EE} , referentes aos sinais obtidos com as sequências CP-CWFP_{x-x} (coluna azul escuro), CPMG_{90y-y} (coluna azul claro) e CP-CWFP (coluna verde) para as soluções estudadas. Nesta figura, para as soluções de CuSO₄ 10^{-2} e 10^{-3} mol L⁻¹ a média entre os valores de T^* obtidos com as sequências CP-CWFP, CP-CWFP_{x-x} e CPMG_{90y-y} são $0,112 \pm 0,002$ s e $0,810 \pm 0,001$ s e para as soluções de MnSO₄ 10^{-3} e 10^{-4} mol L⁻¹ $0,128 \pm 0,001$ s e $0,288 \pm 0,002$ s. A média para a M_{EE} também apresentadas na Figura 24, para as três sequências em questão, são $0,196 \pm 0,002$ para a solução de MnSO₄ 10^{-3} mol L⁻¹ e $0,479 \pm 0,002$ e $0,474 \pm 0,001$ para as soluções de CuSO₄ 10^{-2} e 10^{-3} mol L⁻¹. Para a solução de MnSO₄ 10^{-4} mol L⁻¹, tanto as duas sequências com AF de π , quando a sem AF, apresentaram o mesmo valor para a M_{EE} (0,185).

Com relação aos dados apresentados na Figura 24, pôde ser comprovado que praticamente não houve diferença quando comparados os valores de T^* e das M_{EE} obtidos com as sequências CP-CWFP_{x-x} (coluna azul escuro) e CPMG_{90y-y} com relação aos adquiridos pela CP-CWFP. Sendo que a maior variação encontrada foi de $\pm 3,65\%$ para o valor de T^* obtido com a sequência CP-CWFP_{x-x} com relação ao adquirido pela CP-CWFP, para a solução de CuSO₄ 10^{-2} mol L⁻¹ (Figura 24 solução 1 - T^*).

Figura 24- Gráfico de colunas com T^* e M_{EE} , obtidos experimentalmente pelas sequências CP-CWFP (coluna verde), CP-CWFP_{x-x} (coluna azul escuro) e CPMG_{90y-y} (coluna azul claro) para as soluções: CuSO₄ 10^{-2} mol L⁻¹ (1) e 10^{-3} mol L⁻¹ (2); MnSO₄ 10^{-3} mol L⁻¹ (3) e 10^{-4} mol L⁻¹ (4).

Na Figura 25 são apresentadas as constantes de tempo de relaxação T_1 e T_2 determinadas através dos sinais obtidos pelos métodos convencionais (IR e CPMG – coluna preta) e pelas sequências CP-CWFP (coluna verde), CP-CWFP_{x-x} (coluna azul escuro) e CPMG_{90y-y} (coluna azul claro). Nesta figura, para a solução de CuSO_4 10^{-3} mol L^{-1} , a média obtida entre os valores da constante de tempo T_1 , mensurados pelos métodos IR, CP-CWFP, CP-CWFP_{x-x} e CPMG_{90y-y} são $0,853 \pm 0,004$ s e para as soluções de MnSO_4 10^{-3} e 10^{-4} mol L^{-1} são $0,343 \pm 0,005$ s e $0,734 \pm 0,008$ s. Ainda, o valor de T_1 obtido para a solução de CuSO_4 10^{-2} mol L^{-1} foi o mesmo para as quatro técnicas em questão, sendo o valor deste 0,119 s. A média das constantes de tempo T_2 mensuradas pelos métodos CPMG, CP-CWFP, CP-CWFP_{x-x} e CPMG_{90y-y}, também apresentadas na Figura 25, são $0,109 \pm 0,001$ s $0,768 \pm 0,005$ s para as soluções de CuSO_4 10^{-2} e 10^{-3} mol L^{-1} e $0,078 \pm 0,001$ s e $0,180 \pm 0,002$ s para as soluções de MnSO_4 10^{-3} e 10^{-4} mol L^{-1} .

Através dos dados apresentados na Figura 25, pôde ser comprovar que, as constantes de tempo T_1 e T_2 obtidas pelas sequências CP-CWFP_{x-x} e CPMG_{90y-y}, são similares as obtidas pelas sequências convencionas de determinação de T_1 e T_2 , IR e CPMG, e ainda, também são parecidas com as obtidas pela técnica CP-CWFP. Uma vez que, as variação dos valores das constantes de tempo mensuradas pelas técnicas CP-CWFP_{x-x} e CPMG_{90y-y} apresentaram variações inferiores a 3% com relação as obtidas pelas outras técnicas.

Figura 25–Gráfico de colunas com os valores de T_1 medidos com a sequência IR (colunas verde), T_2 com CPMG (coluna preta), e T_1 e T_2 pelas sequências CP-CWFP (coluna verde), CP-CWFP_{x-x} (coluna azul claro) e CPMG_{90y-y} (coluna azul escuro) para as soluções: CuSO_4 10^{-2} mol L^{-1} (1) e 10^{-3} mol L^{-1} (2), MnSO_4 10^{-3} mol L^{-1} (3) e 10^{-4} mol L^{-1} (4).

5.3.2 Resultados teóricos

Com a finalidade de demonstrar que os sinais obtidos experimentalmente pelas sequências $CWFP_{x-x}$, $CP-CWFP_{x-x}$ e $CPMG_{90y-y}$ seguem o previsto em teoria, foram realizadas simulações numéricas destes sinais. Para estas simulações foram utilizados os tempos de relaxação T_1 e T_2 obtidos experimentalmente pelas sequências IR e CPMG com o espectrômetro Minispec operando na frequência 19,9 MHz para o 1H .

Conforme pode ser observado na Figura 26, devido a não homogeneidade do campo magnético o sinal experimental (linha preta) é assimétrico, consistindo em um sinal em ressonância (linha verde) e dois ombros que estão fora de ressonância (linha vermelha e azul). A fim de simular estas distorções do campo magnético foi incluído na simulação o valor do T_2^* experimental, que neste caso foi de 1ms (para o espectrômetro 19,9 MHz). Também foi assumida a distribuição de três lorentzianas, uma em ressonância (Figura 26 – linha verde (0 Hz)), e duas fora de ressonância (Figura 26 – linha vermelha (-200 Hz) e azul (185 Hz)). A lorentziana cinza na Figura 26 é a somatória das três lorentziana, indicando que foi obtida uma boa aproximação do sinal adquirido experimentalmente.

Figura 26 – Lorentziana obtida da transformada de Fourier do sinal FID adquirido experimentalmente no espectrômetro Minispec com frequência de 19,9 MHz para o 1H (lorentziana preta) e distribuição das distorções desta lorentziana: em verde sinal em ressonância, em azul deslocado -200 Hz, em vermelho 185 Hz e em cinza a somatória das três lorentzianas.

Na Figura 27 são apresentados os sinais experimentais (A e C) e simulados (B e D) com a sequência $CWFP_{x-x}$ (linha vermelha), $CP-CWFP_{x-x}$ (linha azul) e $CPMG_{90y-y}$ (linha

preta). Nesta figura, os sinais exibidos em (A e B) foram obtidos para uma solução de CuSO_4 $10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ e os apresentados em (C e D) para uma solução de MnSO_4 $10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.

Figura 27—Magnitude dos sinais obtidos com as sequências CWFP_{x-x} (linha vermelha), CP-CWFP_{x-x} (linha azul) e CPMG_{90y-y} (linha preta) para $\Omega = 0$ e $T_p = 300 \mu\text{s}$. Em (A e B) os sinais foram obtidos com uma solução CuSO_4 $10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, sendo (A) sinais experimentais e (B) simulados e em (C e D) os sinais foram obtidos com uma solução de MnSO_4 $10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, sendo (C) sinais experimentais e (D) simulados.

Analisando a Figura 27 é possível observar que os sinais experimentais e simulados numericamente obtidos com as três sequências com AF de π são similares tanto para a condição $T_1 \sim T_2$ (Figura 27 (A e B)) quanto para $T_1 > T_2$ (Figura 27 (C e D)). Também foi observada similaridade entre os valores da constante de tempo T^* e da M_{EE} experimentais e simulados, obtidos pelas sequências com AF de π , conforme exibido na Figura 28. Nesta figura são apresentadas as constantes de tempo T^* e a M_{EE} obtidas com as sequências CWFP_{x-x} (verde), CP-CWFP_{x-x} (azul claro) e CPMG_{90y-y} (azul escuro) para as soluções de CuSO_4 $10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ (solução 1) e MnSO_4 $10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ (solução 2). Ainda nesta figura as colunas com hachura representam os valores de T^* e da M_{EE} obtidos por simulação e os sem hachuras apresentam os adquiridos experimentalmente.

Na Figura 28 a média entre valores da constante de tempo T^* obtido experimentalmente e por simulação pelas sequências $CWFP_{x-x}$, $CP-CWFP_{x-x}$ e $CPMG_{90y-y}$ para as soluções de $CuSO_4 10^{-2}$ e $MnSO_4 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ são de $0,113 \pm 0,001 \text{ s}$ e $0,126 \pm 0,002 \text{ s}$, respectivamente. Nesta figura foi possível observar que para a solução de $CuSO_4 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ a $CWFP_{x-x}$ foi a que apresentou uma variação mais visível entre valores experimentais (coluna verde sem hachura) e simulado (coluna verde com hachura), do que as outras sequências com AF de π . Sendo esta variação de 4%. Para a solução de $MnSO_4 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ estas variações entre valores de T^* experimentais e simulados, para as três sequências com AF de π , foram inferiores a 4%.

Ainda na Figura 28, mas com respeito a M_{EE} , para solução de $CuSO_4 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, as três sequências com AF de π , não apresentaram variações entre valores da M_{EE} (0,477) obtido experimentalmente e por simulação. Já para a solução de $MnSO_4 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ houve pequenas variação dos valores de M_{EE} obtidos por simulação com relação aos adquiridos experimentalmente para as sequências $CWFP_{x-x}$ e $CP-CWFP_{x-x}$. Porém, estas variações são inferiores a 2%. Para esta solução, a média entre o valor da M_{EE} determinados pelas três sequências com AF de π por ambas às condições em questão é $0,184 \pm 0,001$.

Figura 28—Gráfico de colunas com os valores de T^* e M_{EE} obtidos por simulações numéricas (colunas hachuradas) e experimentalmente (coluna sem hachuras) com sequência $CWFP_{x-x}$ (coluna verde), $CP-CWFP_{x-x}$ (coluna azul escuro) e $CPMG_{90y-y}$ (coluna verde claro) para as soluções: $CuSO_4 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ (1) e $MnSO_4 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ (2).

5.4 Componente real das sequências $CWFP_{x-x}$, $CP-CWFP_{x-x}$ e imaginário da $CPMG_{90y-y}$

Até o momento foi utilizada somente a magnitude do sinal para determinação do T^* . No entanto, esta constante de tempo também pode ser determinada através da componente

real ou imaginária da magnetização, com a realização do ajuste de fase no momento da aquisição do sinal. Porém, para a CWFP e CP-CWFP não há grandes vantagens da utilização da componente real do sinal ao invés da magnitude. Ao contrário destas, nem todas as sequências com AF de π apresentam este mesmo comportamento. A componente real da CP-CWFP_{x-x}, apresentam um aumento na faixa dinâmica entre o EQE ao EE com relação ao modo magnitude, conforme pode ser observado na Figura 29. Nesta figura são mostradas as componentes reais dos sinais obtidos pelas sequências CWFP_{x-x}, CP-CWFP_{x-x} e imaginário da CPMG_{90y-y} em (A e C) e a magnitude destes sinais em (B e D). Sendo que, em (A e B) os sinais foram obtidos com uma solução de CuSO₄ 10^{-2} mol L⁻¹ e em (C e D) com uma solução de MnSO₄ 10^{-3} mol L⁻¹. Para obtenção destes sinais foi utilizado um espectrômetro com frequência de 19,9 MHz para o ¹H na condição de ressonância e com T_p de 300 μ s.

Figura 29 – Em (A e C) componente real dos sinais obtidos com as sequências CWFP_{x-x} (linha vermelha), CP-CWFP_{x-x} (linha azul) e imaginário da CPMG_{90y-y} (linha preta) em (B e D) magnitude destes sinais para: (A e B) uma solução de CuSO₄ 10^{-2} mol L⁻¹ e (C e D) para uma solução de MnSO₄ 10^{-3} mol L⁻¹.

De acordo com a Figura 29, a componente real da sequência CWFP_{x-x} (linha vermelha) e imaginária da CPMG_{90y-y} (linha preta), assim como para as sequências sem AF,

apresenta a mesma faixa dinâmica que a magnitude do sinal, tanto para a condição $T_1 \sim T_2$ (Figura 29 (A e B)) quanto para $T_1 > T_2$ (Figura 29 (C e D)). Por outro lado, a componente real do sinal da sequência CP-CWFP_{x-x}, tanto para a condição $T_1 \sim T_2$, quanto para $T_1 > T_2$ (Figura 29 (A e C) - linha azul), apresenta uma maior faixa dinâmica entre o EQE ao EE do que o modo magnitude do sinal (Figura 29 (B e D)). Assim, podemos dizer que a faixa dinâmica da componente real da CP-CWFP_{x-x} > CPMG_{90y-y} > CWFP_{x-x} para amostras em que $T_1 \sim T_2$ (Figura 29 (A)) e para amostras cujo $T_1 > T_2$ (Figura 29 (B)) a faixa dinâmica da CP-CWFP_{x-x} > CWFP_{x-x} > CPMG_{90y-y}. Desta forma, dentre as sequências com e sem AF de π apresentadas neste estudo, a CP-CWFP_{x-x} é a melhor sequência para determinação dos tempos de relaxação T_1 e T_2 , uma vez que, está é independente da razão T_1/T_2 .

Ainda, devido à elevada faixa dinâmica, a sequência CP-CWFP_{x-x} pode ser utilizada também em condições onde há uma baixa razão sinal ruído. Como por exemplo, em espectrômetros com baixos campos magnéticos ou em análises com pequenos volumes de amostras. A Figura 30 apresenta as componentes reais dos sinais adquiridos com as sequências com AF de π para 20 mL de uma solução de CuSO₄ 10⁻² mol L⁻¹ mensurados em um espectrômetro com um campo magnético de 0,065 T (equivalentes a 2,6 MHz para o ¹H). Nesta figura foi possível observar que a técnica CP-CWFP_{x-x} é a mais vantajosa dentre as três sequências com AF em espectrômetros com baixo campo magnético (0,065 T).

Figura 30-Componente real dos sinais obtidos com as sequências CWFP_{x-x} (linha vermelha), CP-CWFP_{x-x} (linha azul) e CPMG_{90y-y} (linha preta) para uma solução de CuSO₄ 10⁻² mol L⁻¹ em um espectrômetro com frequência de 2,6 MHz para o ¹H, com $T_p=300 \mu s$ e em ressonância.

A presença de longas oscilações no sinal experimental apresentado na Figura 30, se deve ao longo valor de T_2^* (11ms), característico de baixos campos magnéticos, e por sinal estar fora de ressonância em aproximadamente 50 Hz (Figura 31). Isto ocorre em virtude de que em espectrômetros com campos muito baixo, neste caso 0,065 T, é difícil centrar a frequência de *offset* em 0 Hz (em ressonância). A Figura 31 apresenta uma comparação entre as oscilações do sinal experimental (preto) e do simulado (vermelho) com T_2^* de 11 ms e com a frequência fora de ressonância em 55 Hz. Nesta figura encontramos uma boa concordância entre sinal experimental (preto) e simulado (vermelho), confirmando que o sinal experimental está fora de ressonância em aproximadamente 55 Hz.

Figura 31 – Sinal experimental (preto) e simulado (vermelho) obtido pela sequência $CWFP_{x-x}$ em 2,6 MHz para uma solução de $CuSO_4$ 10^{-2} mol L^{-1} . Para a simulação foi utilizado um sinal assimétrico fora de ressonância em 55 Hz.

5.5 APLICAÇÕES

As sequências $CWFP_{x-x}$, $CP-CWFP_{x-x}$ e $CPMG_{90y-y}$, podem ser aplicadas em diversas áreas assim com a $CWFP$ e $CP-CWFP$. Ainda, a sequência $CP-CWFP_{x-x}$ apresenta uma maior aplicabilidade com relação às outras sequências de onda contínua devido à elevada faixa dinâmica da componente real do seu sinal, conforme apresentado anteriormente. Nesta seção serão apresentadas algumas aplicações das novas sequências propostas utilizando o espectrômetro Minispec operando na frequência de 19,9 MHz 1H .

5.5.1 Sementes

Uma das aplicações das sequências CWFP_{x-x}, CP-CWFP_{x-x} e CPMG_{90y-y}, propostas neste estudo, foi na análise óleo de sementes oleaginosas intactas. Para isso, foram utilizadas sementes de mamona, linhaça, amendoim, pinhão manso, macaúba e macadâmia. Neste estudo foi feita uma análise comparativa entre as informações que podem ser obtidas, referente ao óleo contido em sementes, pelos sinais obtidos com método CPMG com relação aos sinais adquiridos com as técnicas com AF de π . A determinação da constante de tempo T_2 , para as quatro sequências foi realizada através de *fittings* biexponenciais (T_2 (1)) e (T_2 (2)), que são normalmente observados em ácidos graxos puros de sementes oleaginosas.³⁴

Na Figura 32 são apresentados os sinais obtidos com a sequência CPMG para as sementes estudadas. Conforme já relatado por Prestes et al. (2007), o decaimento do sinal CPMG é dependente da viscosidade do óleo das sementes. Assim, quanto maior for a viscosidade do óleo, mais rápido é o decaimento do sinal, e consequentemente menor é o valor de T_2 .³ Desta forma, na Figura 32, a semente de linhaça (linha azul claro) que contém óleo de menor viscosidade, devido a sua alta concentração de ácidos graxos poli-insaturados (~50% de ácido linolênico), apresenta um decaimento longo ($T_2(1) = 0,090 \pm 0,001$ s e $T_2(2) = 0,339 \pm 0,010$ s). Já a semente de mamona (linha azul escuro), que apresentam alta concentração de óleo viscoso (~80% ricinoleico), apresenta um sinal que decai rapidamente ($T_2(1) = 0,018 \pm 0,001$ s e $T_2(2) = 0,057 \pm 0,001$ s). Assim, para estas duas sementes (mamona e linhaça) foi possível distinguir facilmente através dos sinais obtidos pela técnica CPMG as diferença de viscosidade do conjunto de óleo que as compõe.

Por outro lado, os óleos presentes nas outras sementes analisadas (amendoim, macaúba, macadâmia e pinhão manso) apresentaram sinais de CPMG com decaimentos muito próximos entre si, dificultando a diferenciação destes. Entretanto, como os valores da constante de tempo T_2 tem uma correlação linear negativa com a viscosidade, estes auxiliam na identificação da diferença de viscosidade entre os óleos presentes nas sementes. Como por exemplo, no caso das sementes de macaúba e macadâmia, que apresentam decaimentos do sinal CPMG muito próximo. Os valores de T_2 para ambos os conjuntos de óleo destas sementes indicam que, os óleos contidos na macaúba ($T_2(1) = 0,070 \pm 0,001$ s e $T_2(2) = 0,204 \pm 0,003$ s), são menos viscosos que os presentes na macadâmia, ($T_2(1) = 0,064 \pm 0,001$ s e $T_2(2) = 0,194 \pm 0,001$ s). Os valores de T_2 obtidos pelo método CPMG para as outras sementes são apresentados na Tabela 1. Além disso, nesta tabela foi possível observar para os

dois valores de T_2 ($T_2(1)$ e $T_2(2)$) obtido pelo método CPMG indicam que viscosidade dos óleos da semente de linhaça > pinhão manso > amendoim > macaúba > macadâmia > mamona.

Figura 32 – Sinais obtidos por CPMG para as sementes de amendoim (linha preta), linhaça (linha azul claro), macadâmia (linha vermelha), macaúba (linha verde claro), pinhão manso (linha rosa) e mamona (linha azul escuro).

Assim como a técnica CPMG, as sequências $CWFP_{x-x}$, $CP-CWFP_{x-x}$ e $CPMG_{90y-y}$, também possibilitam a determinação da constante de tempo T_2 e desta forma podem ser utilizada para analisar a viscosidade dos óleos que compõem as sementes. Na Tabela 1 são apresentados os valores das constantes de tempo T_2 obtidas pelas sequências $CWFP_{x-x}$, $CP-CWFP_{x-x}$ e $CPMG_{90y-y}$ para as sementes estudadas. Nesta tabela é possível observar que, apesar das três sequências com AF de π possibilitarem a determinação de T_2 , os valores de T_2 mensurados pela técnica $CP-CWFP_{x-x}$ (linha (C) - destacada na tabela 1) apresentaram uma melhor correlação com os T_2 obtido pela sequência CPMG, conforme é demonstrado na Figura 33. Nesta figura é mostrado que os valores de T_2 ($T_2(1)$ e $T_2(2)$) das sementes em questão, obtidas pela técnica CPMG apresentam uma correlação linear com as constantes $T_2(1)$ e $T_2(2)$ obtidas pela sequência $CP-CWFP_{x-x}$. Sendo o coeficiente de correlação (R) entre os T_2 (1) de 0,991 e para o T_2 (2) 0,999.

Figura 33 - Correlação linear entre os valores da constante de tempo T_2 obtidas pela técnica CPMG com relação aos adquiridos pela sequência CP-CWFP_{x-x} para as sementes de linhaça, macadâmia, macaúba, pinhão manso, amendoim e mamona: (●) T_2 (1) e (■) T_2 (2).

Ainda na tabela 1, pôde-se observar que a técnica CP-CWFP_{x-x} (linha (C) - destacada na tabela 1) apresentou uma correlação linear inversa entre o T_2 e a viscosidade muito próxima à encontrada pela técnica CPMG. Ou seja, para a técnica CP-CWFP_{x-x} com relação aos valores T_2 (1) a viscosidade da linhaça > pinhão manso > amendoim = macaúba > macadâmia > mamona e com relação à T_2 (2) a viscosidade da linhaça > pinhão manso > amendoim > macaúba > macadâmia > mamona.

Tabela 1- Constantes de tempo T_2 obtidas pelas sequências CPMG (A), CPMG_{90y-y} (B), CP-CWFP_{x-x} (C) e CWFP_{x-x} (D) para as sementes de linhaça, macadâmia, macaúba, pinhão manso, amendoim e mamona.

		<i>Linhaça</i>	<i>Macadâmia</i>	<i>Macaúba</i>	<i>Pinhão manso</i>	<i>Amendoim</i>	<i>Mamona</i>
T_2 (1)	A	0,090 ± 0,002	0,064 ± 0	0,07 ± 0,001	0,075 ± 0	0,071 ± 0,001	0,018 ± 0
	B	0,078 ± 0,001	0,066 ± 0,001	0,065 ± 0,001	0,068 ± 0,001	0,065 ± 0,001	0,017 ± 0,001
	C	0,091 ± 0,002	0,071 ± 0,001	0,072 ± 0,001	0,08 ± 0,001	0,072 ± 0,001	0,019 ± 0,001
	D	0,075 ± 0,001	0,066 ± 0,001	0,069 ± 0,001	0,065 ± 0,001	0,066 ± 0,002	0,018 ± 0,001
T_2 (2)	A	0,339 ± 0,01	0,194 ± 0,001	0,204 ± 0,003	0,248 ± 0	0,235 ± 0,001	0,057 ± 0,001
	B	0,290 ± 0,001	0,191 ± 0,001	0,179 ± 0,001	0,217 ± 0,001	0,205 ± 0,001	0,05 ± 0,001
	C	0,318 ± 0,003	0,199 ± 0,001	0,19 ± 0,001	0,234 ± 0,001	0,217 ± 0,001	0,052 ± 0,001
	D	0,328 ± 0,006	0,209 ± 0,002	0,224 ± 0,010	0,227 ± 0,004	0,232 ± 0,006	0,052 ± 0,003

Além disso, as sequências CWFP_{x-x}, CP-CWFP_{x-x} e CPMG_{90y-y} também possibilitam a análise da viscosidade através do T^* . Na Figura 35 são apresentadas as componentes reais dos sinais CP-CWFP_{x-x} para as sementes analisadas. Nesta figura é possível observar que sementes compostas por óleos mais viscosos, como é o caso da mamona (linha azul escuro),

atingem o EE mais rapidamente. Ou seja, o T^* , assim como o T_2 , apresenta uma correlação linear inversa com a viscosidade. A Figura 34 apresenta uma correlação do T^* obtidos pelas sequências CP-CWFP_{x-x} com o T_2 obtido pela técnica CPMG, mostrando que estas se correlacionam linearmente. Resultados similares são obtidos da correlação do T^* obtidos pela ssequências CWFP_{x-x} e CPMG_{90y-y} com o T_2 obtido pela técnica CPMG, logo, não foram apresentados aqui.

Figura 34 – Correlação linear entre as constantes de tempo T_2 e T^* obtidos através da técnica CP-CWFP_{x-x} para as sementes de linhaça, macadâmia, macaúba, pinhão manso, amendoim e mamona: (●) T_2 (1) e (■) T_2 (2).

Por outro lado, para os óleos das outras sementes, diferentemente da mamona, foi difícil realizar uma distinção visual dos diferentes T^* , conforme indicado na Figura 35. A dificuldade de diferenciação visual entre os diferentes T^* das sementes analisadas ocorre porque além dos óleos presentes nestas sementes terem viscosidades similares, eles também apresentam diferentes M_{EE} . Entretanto, assim como para a constante de tempo T_2 , os valores de T^* pode ser determinada através de um *fitting* exponencial, e desta forma as diferenças de viscosidade podem ser atribuídas. Neste caso, da mesma forma que para T_2 também encontramos dois T^* (T^* (1) e T^* (2)). Assim, analisando as viscosidades dos óleos das sementes através do T^* , encontramos para as sequências CP-CWFP_{x-x} e CPMG_{90y-y} que os valores do T^* (1) e do T^* (2) apresentam a mesma correlação linear inversa com a viscosidade obtida pela técnica CPMG através do T_2 (1) e T_2 (2). Isto é, para ambos os T^* foi encontrado que a viscosidade da semente de linhaça > pinhão manso > amendoim > macaúba > macadâmia > mamona. Já para a CWFP_{x-x}, para T^* (1) e do T^* (2) essa correlação se divergem um pouco da obtida através de ambos os T_2 da sequência CPMG, já que, para a

CWFP_{x-x} foi encontrado que a semente amendoim é mais viscosa que a de pinhão manso. A maior concordância encontrada dos resultados da sequência CPMG com relação aos adquiridos pelas técnicas CP-CWFP_{x-x} e CPMG_{90y-y} é devido ao fato de que óleos geralmente apresentarem $T_1 > T_2$. Nesses casos, as sequências CP-CWFP_{x-x} e CPMG_{90y-y} fornecem resultados mais confiáveis, conforme já apresentado anteriormente.

Figura 35– Componente real dos sinais obtidos pela técnica CP-CWFP_{x-x} para as sementes de amendoim (linha preta), linhaça (linha azul claro), macadâmia (linha vermelha), macaúba (linha verde claro), pinhão manso (linha rosa) e mamona (linha azul escuro).

5.5.2 Banana e geleia

Neste estudo também foi proposto a aplicação das técnicas CWFP_{x-x}, CP-CWFP_{x-x} e CPMG_{90y-y} em análise de alimentos. Para isto foi utilizado bananas, em diferentes estágios de maturação e geleia tradicional e zero açúcar. Os resultados obtidos com os sinais das sequências com AF de π foram comparados com os resultados adquiridos pela técnica CPMG.

A Figura 36 apresenta os sinais obtidos pelas sequências CPMG, CWFP_{x-x}, CP-CWFP_{x-x} e CPMG_{90y-y}. Nesta figura, os sinais em (A e C) foram obtidos com banana verde e madura e os sinais em (B e D) com geleia tradicional e zero açúcar. Na Figura 36 (A) foi observado que o decaimento do sinal da sequência CPMG para ambas as bananas não são muito diferentes quando comparados com os sinais obtidos pelas técnicas CWFP (Figura 36 (C)). O sinal CPMG da banana verde decai levemente mais rápido do que o da banana

madura, por conter maior quantidade de amido. Quando a banana amadurece o amido se transforma em sacarose e a banana fica mais macia, o que torna o T_2 mais longo.³⁵

Figura 36 - Sinais obtidos com as sequências CPMG, CWFP_{x-x}, CP-CWFP_{x-x} e CP-CWFP_{y-y} para bananas verde e madura (A e C) e para geleias tradicional e com açúcar (B e D).

No caso das sequências de onda contínua com AF de π (Figura 36 (C)), apesar dos T^* serem similar entre a banana madura ($0,342 \pm 0,029$ s) e verde ($0,348 \pm 0,111$ s), grandes diferenças foram observadas entre os sinais das bananas, principalmente na amplitude da magnitude do sinal no EE (M_{EE}). O fato de a M_{EE} da banana verde ($0,097 \pm 0,002$) e madura ($0,237 \pm 0,001$) apresentarem elevada diferença, indica que a maior distinção entre os diferentes estágios de maturação das bananas está relacionando com o T_1 ou com a razão T_1/T_2 . Já que, a M_{EE}/M_0 é dependente da razão T_1/T_2 (equação 12 e Figura 37), e não houve muita diferença com relação ao T_2 , conforme apresentado anteriormente (Figura 36 (A)). Desta forma, pelos valores de M_{EE} foi possível observar que a banana verde tem maior razão T_1/T_2 do que a banana madura, já que a M_{EE} é inversamente proporcional a razão T_1/T_2 , (Figura 37). Estes dados indicam que a banana verde tem $T_1 \gg T_2$ e a banana madura $T_1 > T_2$.

Figura 37 - Variação da razão M_{EE}/M_0 em função da razão T_1/T_2 .

Resultados similares também foram observados para a análise de geleia. Na Figura 36 (B) foi observada a distinção entre os sinais CPMG para os diferentes tipos de geleias. A geleia tradicional que apresenta 40% de carboidratos decaiu mais rapidamente que a zero açúcar que contém 1% de carboidratos (0% de sacarose). Esta diferença relacionada à concentração de sacarose também foi observada nas sequências $CWFP_{x-x}$, $CP-CWFP_{x-x}$ e $CPMG_{90y-y}$ (Figura 36 (D)). O T^* e M_{EE} para a geleia tradicional foram de $0,064 \pm 0,004$ s e $0,363 \pm 0,001$ e para a zero açúcar $0,230 \pm 0,028$ s e $0,209 \pm 0,004$. Conforme Figura 37, altos valores de M_{EE} indicam $T_1/T_2 \sim 1$. Assim a M_{EE} indica que a geleia tradicional tem característica de $T_1 \sim T_2$ e a zero açúcar $T_1 > T_2$.

Na Figura 38 são apresentados os sinais reais obtidos com as sequências $CWFP_{x-x}$ (linha vermelha), $CP-CWFP_{x-x}$ (linha azul) e $CPMG_{90y-y}$ (linha preta), para a banana verde e madura em (A) e para a geleia tradicional e zero açúcar em (B). Nesta figura, ainda foi possível observar que a componente real do sinal $CP-CWFP_{x-x}$ apresentou uma faixa dinâmica superior ao sinal da $CWFP_{x-x}$ para condição $T_1 > T_2$ (Figura 38 (A) – banana madura e verde (B) – geleia tradicional e sem açúcar) e similar para $T_1 \gg T_2$ (Figura 38 (A) – banana verde). A componente real dos sinais para a sequência $CPMG_{90y-y}$, (Figura 38) assim como a magnitude destes (Figura 36), apresentaram faixas dinâmicas inferiores a componente real do sinal da $CP-CWFP_{x-x}$. Novamente foi possível observar que a sequência $CP-CWFP_{x-x}$ é a melhor dentre as sequências de onda contínua com e sem AF de π , já que além de poder ser utilizadas em amostras com $T_1 \sim T_2$ e $T_1 > T_2$ ela também pode ser aplicada em amostras cujo $T_1 \gg T_2$.

Figura 38 – Componente real dos sinais obtidos com as sequências $CWFP_{x-x}$ (linha vermelha), $CP-CWFP_{x-x}$ (linha azul) e $CPMG_{90y-y}$ (linha preta) para a banana verde e madura (A) e para a geleia tradicional e zero açúcar (B).

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com o estudo das sequências com AF de π foi possível comprovar, que a principal diferença destas com relação à CWFP e CP-CWFP é a fase como que o FID e o eco são formados no EE. Uma vez que, nas sequências com AF de π FID e eco têm mesma fase e na CWFP e CP-CWFP estes se encontram defasados 180° . Esta característica garante que as técnicas com alternância de fase na condição de ressonância não necessitem o deslocamento da frequência de *offset* e sejam independentes do valor do T_p , para $T_p < T_2^*$.

Com relação à magnitude dos sinais adquiridos com a sequência CWFP_{x-x}, foi observado que estes são similares aos obtidos pela CWFP, e a magnitude dos sinais obtidos com as sequências CP-CWFP_{x-x} e CPMG_{90y-y} são parecidos aos adquiridos com a CP-CWFP. Através da comparação entre sinais experimentais e simulados, também foi confirmado que os sinais experimentais, adquiridos com as sequências com AF de π seguem o que prevê a teoria.

Além disso, os sinais obtidos com a técnica CWFP_{x-x}, tanto no modo magnitude quanto a componente real deste, assim como a CWFP, são mais indicados na condição $T_1 > T_2$. Já para as sequências CP-CWFP_{x-x} e CPMG_{90y-y}, quando o sinal estiver no modo magnitude, assim como a CP-CWFP, é recomendando utilizá-las em amostras cujo $T_1 \sim T_2$. A componente imaginária do sinal da sequência CPMG_{90y-y} não apresenta notáveis vantagens com relação a magnitude. Em contrapartida, a componente real do sinal CP-CWFP_{x-x} confere uma grande vantagem a esta sequências, que a difere das outras, que é o aumento da faixa dinâmica entre o EQE ao EE do sinal. Esta característica permite, que esta sequência seja utilizada em ambas as condições, $T_1 \sim T_2$, e $T_1 > T_2$, e até mesmo quando $T_1 \gg T_2$.

Ainda, os tempos de relaxação longitudinal e transversal (T_1 e T_2), mensurados pelas sequências CWFP_{x-x}, CP-CWFP_{x-x} e CPMG_{90y-y}, praticamente não apresentaram variações, quando comparadas com estas mesmas constantes de tempo obtidas com as técnicas convencionais (IR e CPMG) e pela sequências CWFP e CP-CWFP. Contudo, a CP-CWFP_{x-x} é a mais indicada para determinação simultânea das constantes de tempo T_1 e T_2 , devido à componente real do sinal obtido com esta sequência pode ser utilizada em qualquer razão T_1/T_2 .

Por fim, as sequências CWFP_{x-x}, CP-CWFP_{x-x} e CPMG_{90y-y}, podem ser aplicadas em diversas áreas, assim como a CP-CWFP e CWFP. Entretanto, a CP-CWFP_{x-x} apresenta uma gama maior de aplicações, em razão da sua elevada faixa dinâmica da componente real do

Considerações Finais

sinal. Esta característica possibilita que esta sequência forneça bons resultados para matrizes complexas e até mesmo em casos onde razão sinal/ruído é baixa.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 MEIBOOM, S.; GILL, D. Modified spin-echo method for measuring nuclear relaxation times. **Review of Scientific Instruments**, v. 29, n. 8, p. 688-691, 1958.
- 2 CORREA, C. C.; FORATO, L. A.; COLNAGO, L. A. High-throughput non-destructive nuclear magnetic resonance method to measure intramuscular fat content in beef. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 393, n. 4, p. 1357-1360, 2009.
- 3 PRESTES, R. A.; COLNAGO, L. A.; FORATO, L. A.; VIZZOTTO, L.; NOVOTNY, E. H.; CARRILHO, E. A rapid and automated low resolution NMR method to analyze oil quality in intact oilseeds. **Analytica Chimica Acta**, v. 596, n. 2, p. 325-329, 2007.
- 4 MITCHELL, J.; HURLIMANN, M. D.; FORDHAM, E. J. A rapid measurement of T_1/T_2 : the DECPMG sequence. **Journal of Magnetic Resonance**, v. 200, n. 2, p. 198-206, 2009.
- 5 DENG, F.; XIAO, L.; CHEN, W.; LIU, H.; LIAO, G.; WANG, M.; XIE, Q. Rapid determination of fluid viscosity using low-field two-dimensional NMR. **Journal of Magnetic Resonance**, v. 247, p. 1-8, 2014a.
- 6 DENG, F.; XIAO, L.; LIAO, G.; ZONG, F.; CHEN, W. A New Approach of two-dimensional the NMR relaxation measurement in flowing fluid. **Applied Magnetic Resonance**, v. 45, n. 2, p. 179-192, 2014b.
- 7 FRYDMAN, L.; SCHERF, T.; LUPULESCU, A. The acquisition of multidimensional NMR spectra within a single scan. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 25, p. 15858-15862, 2002.
- 8 AHOLA, S.; TELKKI, V.-V. Ultrafast two-dimensional NMR relaxometry for investigating molecular processes in real time. **Chemphyschem**, v. 15, n. 8, p. 1687-1692, 2014.
- 9 VENANCIO, 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, n. 1, p. 34-39, 2005.
- 10 DE ANDRADE, F. D.; MARCHI NETTO, A.; COLNAGO, L. A. Use of Carr-Purcell pulse sequence with low refocusing flip angle to measure T_1 and T_2 in a single experiment. **Journal of Magnetic Resonance**, v. 214, p. 184-188, 2012.

- 11 ANDRADE, F. D. **Desenvolvimento de sequências de pulsos de eco de spin de baixa potência para RMN on-line**. 2011. 97 f. Tese (Doutorado em Química Analítica) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2015.
- 12 BRADFORD, R.; CLAY, C.; STRICK, E. A steady-state transient technique in nuclear induction. **Physical Review**, v. 84, n. 1, p. 157-158, 1951.
- 13 CARR, H. Y. Steady-State free precession in nuclear magnetic resonance. **Physical Review Letters**, v. 1, n. 11, p. 429-430, 1958.
- 14 FREEMAN, R.; HILL, H. D. W. Phase and intensity anomalies in fourier transform nmr. **Journal of Magnetic Resonance**, v. 4, n. 3, p. 366-383, 1971.
- 15 ERNST, R. R.; ANDERSON, W. A. Application of fourier transform spectroscopy to magnetic resonance. **Review of Scientific Instruments**, v. 37, n. 1, p. 93-102, 1966.
- 16 AZEREDO, R. B. D.; COLNAGO, L. A.; ENGELSBERG, M. Quantitative analysis using steady-state free precession nuclear magnetic resonance. **Analytical Chemistry**, v. 72, n. 11, p. 2401-2405, 2000.
- 17 AZEREDO, R. B. V.; COLNAGO, L. A.; SOUZA, A. A.; ENGELSBERG, M. Continuous wave free precession - Practical analytical tool for low-resolution nuclear magnetic resonance measurements. **Analytica Chimica Acta**, v. 478, n. 2, p. 313-320, 2003.
- 18 KRONENBITTER, J.; SCHWENK, A. New technique for measuring relaxation-times t_1 and t_2 and equilibrium magnetization m_0 of slowly relaxing systems with weak nmr signals. **Journal of Magnetic Resonance**, v. 25, n. 1, p. 147-165, 1977.
- 19 SCHWENK, A. Steady-state techniques for low sensitivity and slowly relaxing nuclei. **Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy**, v. 17, p. 69-140, 1985.
- 20 COLNAGO, L. A.; MORAES, T. B.; MONARETTO, T.; ANDRADE, F. D. Rapid determination of food quality using steady state free precession sequences in TD-NMR spectroscopy. In: CAPOZZI, F. L. L., BELTON, P. S. (Ed.). **Magnetic resonance in food science : defining food by magnetic resonance**. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 2015. p. 1-12.

- 21 COLNAGO, L. A.; AZEREDO, R. B. V.; MARCHI NETTO, A.; ANDRADE, F. D.; VENÂNCIO, T. Rapid analyses of oil and fat content in agri-food products using continuous wave free precession time domain NMR. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 49, p. 113-120, 2011.
- 22 COLNAGO, L. A.; ENGELSBERG, M.; SOUZA, A. A.; BARBOSA, L. L. High-throughput, non-destructive determination of oil content in intact seeds by continuous wave-free precession NMR. **Analytical Chemistry**, v. 79, n. 3, p. 1271-1274, 2007.
- 23 COLNAGO, L. ANDRADE, F. D.; SOUZA, A. A.; AZEREDO, R. B. V.; LIMA, A. A.; CERIONI, L. M.; OSÁN, T. M.; PUSIOL, D. J. Why is inline NMR rarely used as industrial sensor? challenges and opportunities. **Chemical Engineering & Technology**, v. 37, n. 2, p. 191-203, 2014.
- 24 DE ANDRADE, F. D.; COLNAGO, L. A. Use of NMR as an online sensor in industrial processes. **Quimica Nova**, v. 35, n. 10, p. 2019-2024, 2012.
- 25 VENANCIO, T.; COLNAGO, L. A. Simultaneous measurements of T_1 and T_2 during fast polymerization reaction using continuous wave-free precession NMR method. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 50, n. 8, p. 534-538, 2012.
- 26 PEREIRA, F. M. V.; PFLANZER, S. B.; GOMIG, T.; GOMES, L. C.; DE FELICIO, E. P.; COLNAGO, L. A. Fast determination of beef quality parameters with time-domain nuclear magnetic resonance spectroscopy and chemometrics. **Talanta**, v. 108, p. 88-91, 2013.
- 27 SANTOS, P. M.; CORRÊA, C. C.; FORATO, L. A.; TULLIO, R. R.; CRUZ, G. M.; COLNAGO, L. A. A fast and non-destructive method to discriminate beef samples using TD-NMR. **Food Control**, v. 38, p. 204-208, 2014.
- 28 KOCK, F. V. C.; COLNAGO, L. A. Rapid and simultaneous relaxometric methods to study paramagnetic ions complexes in solution: An alternative to spectrophotometry. **Microchemical Journal**, v. 122, p. 144-148, 2015.
- 29 VOLD, R. L.; WAUGH, J. S.; KLEIN, M. P.; PHELPS, D. E. Measurement of spin relaxation in complex systems. **Journal of Chemical Physics**, v. 48, n. 8, p. 3831-3832, 1968.
- 30 DE ANDRADE, F. D.; MARCHI NETTO, A.; COLNAGO, L. A. Qualitative analysis by online nuclear magnetic resonance using Carr-Purcell-Meiboom-Gill sequence with low refocusing flip angles. **Talanta**, v. 84, n. 1, p. 84-88, 2011.

- 31 MORAES, T. B.; COLNAGO, L. A. Simulation of NMR signals through the Bloch equations. **Química Nova**, v. 37, n. 8, p. 1410-1416, 2014.
- 32 ROBERTS, J. D. The Bloch equations. How to have fun calculating what happens in NMR experiments with a personal computer. **Concepts in Magnetic Resonance**, v. 3, p. 27-45, 1991.
- 33 HARGREAVES, B. **Bloch equation simulation**. 2015. Disponível em: <<http://mrsrl.stanford.edu/~brian/bloch/>>. Acesso em: 15 abr. 2015.
- 34 BERMAN, P. ; MEIRI, N.; COLNAGO, L. A.; MORAES, T. B; LINDER, C.; LEVI, O.; PARMET, Y.; SAUNDERS, M.; WIESMAN, Z. Study of liquid-phase molecular packing interactions and morphology of fatty acid methyl esters (biodiesel). **Biotechnology for Biofuels**, v. 8, p. 1-16, 2015.
- 35 RIBEIRO, F. Z.; MARCONCINI, L. V.; DE TOLEDO, I. B.; AZEREDO, R. B. V.; BARBOSA, L. L.; COLNAGO, L. A. Nuclear magnetic resonance water relaxation time changes in bananas during ripening: a new mechanism. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 90, n. 12, p. 2052-2057, 2010.