Desenvolvimento de Metodologia de Supressão de Solvente por Espectroscopia Localizada por RMN (^{1}H *MRS*) Utilizando Pulsos de RF Adiabáticos com Aplicação em Medidas de Açúcares em Frutas

Rogério Ferreira Xavier

Tese apresentada ao Instituto de Física de São Carlos, da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências: Física Aplicada.

Orientador: Prof. Dr. Alberto Tannús

São Carlos – São Paulo
2005

USP/IFSC/SBI

8-2-001741

IFSC-USP SERVIÇO DE BIBLIOTECA INFORMAÇÃO

IFSC - SBI
CLASS.....
CUTTER.....
TOMBO.....

Xavier, Rogério Ferreira

"Desenvolvimento de Metodologia de Supressão de Solvente por Espectroscopia Localizada por RMN (^{1}H *MRS*) Utilizando Pulsos de RF Adiabáticos com Aplicação em Medidas de Açúcares em Frutas"
Rogério Ferreira Xavier – São Carlos, 2005

Tese (Doutorado) – Área de Física Aplicada do Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo
2005 - Páginas: 138

Orientador: Prof. Dr. Alberto Tannús
1. Ressonância Magnética Nuclear; 2. Espectroscopia Localizada; 3. Pulsos Adiabáticos

I. Título

UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO
Instituto de Física de São Carlos

Av. Trabalhador São-carlense, 400 - CEP 13566-590
Caixa Postal 369 - CEP 13560-970
São Carlos - SP - BRASIL

MEMBROS DA COMISSÃO JULGADORA DA TESE DE DOUTORADO DE **ROGÉRIO FERREIRA XAVIER**, APRESENTADA AO INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS, UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, EM 05/12/2005.

COMISSÃO JULGADORA:

Prof. Dr. Alberto Tannús (Orientador e Presidente)

Prof. Dr. José Daniel Figueroa Villar (IME)

Dr. Luiz Alberto Colnago (EMBRAPA)

Prof. Dr. Otávio Henrique Thiemann (IFSC / USP)

Prof. Dr. Tito José Bonagamba (IFSC / USP)

IFSC-USP SERVIÇO DE BIBLIOTECA INFORMAÇÃO

Ao Infante

Senhor, a obra fica e o homem passa.
Mas a obra é o homem. Só estas canções
No fundo incerto e oceânico da raça
E anónimos, longes corações.
Em torno a mim, se de mim mesmo corro
O som ruído da onda e as praias toco
Do Largo no abismo do meu ser,
Pairam as naus perdidas que encontraram
O por-achar e em mares se abismaram
Para além do Regresso e do Esquecer.

Parte quem fica quando a Alma manda.
Em mil naus a Vossa alma reviveu
E no universo, de uma a outra banda
Do que se achou e que se conheceu,
Vossa Presença Eterna violou
As portas de ouro com que Deus fechou
O oriente de luz e o ocaso morto...
Vosso espírito ainda nos consuma
E obre as novas naus em nós a suma
Vitória de não quererem nunca o porto.

Fernando Pessoa

Entre Amigos

É belo calar-se juntos,
Mais belo rir juntos,
Sob a ternura de um céu de seda,
Encostados no musgo da faia,
Rir afetuosamente com amigos, riso claro,
E mostrar-se mutuamente dentes brancos.
Se faço bem, calaremos;
Se faço mal – riremos,
E de mais a mais faremos mal,
Mais mal faremos, mais mal riremos,
Tanto que desceremos ao fosso.
Amigo! Sim! Assim deve ser?
Amém! E até logo!

Nietzsche

"Ubi dubium, ibi libertas"

IFSC-USP SERVIÇO DE BIBLIOTECA INFORMAÇÃO

"Onde há dúvida, há liberdade"

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Horácio Carlos Panepucci (*in memoriam*), por ter me recebido de braços abertos quando "quis fazer ressonância!". Pelo incentivo e apoio nos meus primeiros anos como pesquisador e pela sabedoria e amizade compatilhada no seu último ano como professor.

Ao Prof. Dr. Alberto Tannús, pela orientação e amizade nestes longos anos que se passaram. Pelas discussões e ensinamentos partilhados e por me dar a noção correta e prática de ser um físico experimental. Por ter tido a extrema paciência e dado a independência necessária àquele que quer seguir o próprio caminho, acertando ou errando, mas tentando.

Ao Engenheiro Dr. Edson Luiz Géa Vidoto e ao Dr. Bernd Foerster, pela orientação, amizade, incentivo, ajuda e disposição dispensadas a todo momento nas atividades de pesquisa. Pelas informações e dicas partilhadas ao longo de todos estes anos, tendo isso acrescentado enormemente na minha formação profissional e pessoal.

Aos professores Dr. Máximo Siu Li e Dr. José Fabian Schneider, pela oportunidade única que foi trabalhar como monitor dos Laboratórios de Física Avançada durante 3 anos, dando-me a dimensão correta sobre o ensino e a humildade em afirmar que o aprendizado é eterno.

Aos técnicos dos Laboratórios de Ensino, Antenor, Bretas, Marcão e Amaury, pela presteza e companheirismo nas atividades de ensino e pela amizade e descontração no dia-a-dia do IFSC nestes longos anos.

À secretária do Grupo, Isabel Aparecida Possatto, pela amizade, dedicação e respeito durante estes últimos anos, sempre pronta a ajudar e muitas vezes resolver todas as questões burocráticas que estamos irremediavelmente atados.

Aos funcionários dos diversos setores do IFSC-USP, da Oficina Mecânica, da Oficina de Criogenia, da CPG, do Setor de Compras, que direta ou indiretamente contribuíram para este trabalho.

Ao Prof. Dr. Tomaz Catunda, pelo empréstimo da sua câmera digital, com a qual foram obtidas as fotos que estão presentes neste trabalho.

À técnica do Grupo de Biofísica, Bel, que forneceu ou emprestou todas as soluções químicas, tubos e utensílios químicos que foram utilizados neste trabalho, sempre prestativa e com enorme zelo.

Ao Dr. Clóvis Isberto Biscegli, da EMBRAPA Instrumentação Agropecuária/São Carlos-SP, por permitir a utilização do Laboratório de RMN para que fossem realizados alguns testes com as novas seqüências apresentadas neste trabalho, no período em que o nosso equipamento esteve fora de operação e ao Marcelo Simões que auxiliou-me durante todo o período em que estive na EMBRAPA, além de emprestarem o refratômetro portátil que foi utilizado neste trabalho.

Aos companheiros do Grupo de longa data, Engenheiro Dr. Mateus José Martins e os técnicos José Carlos Gazziro, João Gomes da Silva e Odir Adolfo Canevarollo, pelo apoio e presteza nas mais diversas tarefas solicitadas e, com certeza, pelos laços de amizade que ficam pra toda uma vida.

Aos Professores do Grupo, Dr. Rene Ayres Carvalho, Dr. Cláudio José Magon, Dr. Tito José Bonagamba, Dr.ª Cristina Terrile e Dr. José Pedro Donoso, pelos ensinamentos e amizade partilhados.

Aos colegas/amigos do Grupo de Ressonância, José Fernando de Lima, Fernando F. Paiva, João Teles de C. Neto, (Prof. Dr.) Eduardo de A. Ribeiro, (Prof. Dr.) Roberto W. de A. Franco, Carlos E. G. Salmon, Rômulo F. De Abreu, Daniel Papoti, Ronny Ribeiro, Alessandro A. de C. Sá, Fábio Bonk, Leandro Lopes, pela amizade, apoio e compreensão. Aos colegas/amigos do IFSC, Rodrigo Portugal, Alexandre (Bumbum), Tiago, André, Wânius, João, Alexandre (Alf), (Prof. Dr.) Peko, Leonardo (Tchê) e a todos que, por causa da minha ingratidão atestada, tenha me esquecido, valeu muito a força e amizade, e nas oportunidades de lazer, pela alegria e bom humor e pelos bate-papos sérios ou descontraídos. E a todos os amigos, dos quais não me atrevo a mencionar todos os nomes, pela enorme compreensão e amizade, por entenderem que a minha ausência muitas vezes fazia sentido e que de uma forma ou de outra me apoiaram, estando próximos ou não.

A minha família, que sem dúvida nenhuma é a minha base, a minha referência. Aos meu pais, irmãos e sobrinhos, pelo amor e amizade sinceros, que verdadeiramente vão além dos laços forjados pelo destino.

À minha companheira nesses últimos 3 anos, Nara, que sempre foi meu porto seguro, minha terra firme, que nunca mediu esforços em apoiar-me e auxiliar-me, mesmo sabendo que o meu retorno estava muito distante da altura de suas ações.

Por fim, às agências financiadoras CNPq, CAPES, FAPESP e ao IFSC-USP, por terem-me disponibilizado os recursos e os meios para que fosse possível a realização deste trabalho.

Índice

Agradecimentos 3
Lista de figuras 8
Lista de tabelas 14
Lista de abreviaturas 15

RESUMO 16

***ABSTRACT* 17**

INTRODUÇÃO 18

CAP. I - PRINCÍPIOS DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (*NMR*) 20

I.1 Propriedades do núcleo atômico 20
I.2 Sistema girante de coordenadas e pulsos de radiofreqüência 25
I.3 O sinal de *NMR* 29
I.4 A equação de Bloch 30
I.5 Relaxação 30

CAP. II - PRINCÍPIOS DE ESPECTROSCOPIA LOCALIZADA (^{1}H *MRS*) E IMAGENS POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA (*MRI*) 33

II.1 A codificação da posição por gradientes de campo magnético 33
II.2 Seleção de planos 34
II.3 Eco de *spins* 37
II.4 Codificação de freqüência: imagem unidimensional 39
II.5 Codificação de fase: imagem em mais de uma dimensão 42
II.6 Seqüências convencionais de imagens bidimensionais 47
II.7 Contraste em *NMR*: efeitos de T_1 e T_2 47
II.8 Deslocamento químico (*chemical shift*) 49
II.9 Acoplamento-J 51

CAP. III - PULSOS ADIABÁTICOS 52

III.1 Aspectos gerais 52
III.2 Princípios de pulsos adiabáticos 52
III.2.1 Sistemas girantes *FM* e de B_{eff} 54
III.3 A função secante hiperbólica 56

CAP. IV - TÉCNICAS DE ESPECTROSCOPIA LOCALIZADA (^{1}H *MRS*) 58

IV.1 Os principais métodos 58
IV.1.1 A seqüência *PRESS* 59
IV.1.2 A seqüência *STEAM* 60

IV.2 Supressão de solvente 61
IV.2.1 A seqüência *MEGA* 61
IV.3 Seqüências híbridas 64
IV.3.1 Seqüência híbrida *MEGA-PRESS* 65
IV.3.2 Seqüência híbrida *MEGA-STEAM* 65

CAP. V - ESPECTROSCOPIA LOCALIZADA (^{1}H *MRS*) EM FRUTAS 66

V.1 O sinal de *NMR* em frutas 68
V.2 Primórdios da ^{1}H *MRS* em frutas 68
V.3 Problemas devidos às diferenças de suscetibilidade magnética 71
V.4 Estudos recentes 73
V.5 Os açúcares 73

CAP. VI - EQUIPAMENTOS UTILIZADOS 76

VI.1 O magneto 76
VI.2 O espectrômetro 77
VI.3 O sistema de *shimming* 78
VI.4 As bobinas de gradientes 78
VI.5 O sistema de refrigeração 79
VI.6 As bobinas de *RF* 79
VI.7 Os *phantoms* 80
VI.8 O refratômetro portátil (BRIX) 81

CAP. VII - RESULTADOS 83

VII.1 Pulsos adiabáticos assimétricos de inversão 83
VII.1.1 Funções de modulação dos pulsos adiabáticos assimétricos 84
VII.1.2 Os perfis de inversão da magnetização (simulados e medidos) 89
VII.1.3 Os perfis de inversão da magnetização dos pulsos utilizados 94
VII.1.4 Verificação da seletividade em freqüência 96
VII.2 Verificação da seletividade volumétrica 97
VII.2.1 Varredura na direção-Z 98
VII.2.2 Varredura na direção-X 98
VII.2.3 Varredura na direção-Y 99
VII.3 Verificação da supressão do sinal da água em algumas soluções 100
VII.3.1 Primeiro teste: solução de iodo metano 100
VII.3.2 Simulações e resultados experimentais dos espectros das soluções de açúcares 100
VII.3.2.1 Glicose 101
VII.3.2.2 Frutose 104
VII.3.2.3 Sacarose 105

VII.4 Aplicação em diversas frutas 107
VII.5 Aplicação em estágios de maturação de algumas variedades de uva 124
VII.6 Considerações finais 129

CONCLUSÕES 131

REFERÊNCIAS 132

Lista de figuras

Fig. I.1 : Precessão de um núcleo em um campo magnético uniforme $\boldsymbol{B_0}$. 20
Fig. I.2 : Diagrama do nível de energia para um sistema de spin ½. As transições entre os dois estados podem ser induzidas por uma energia eletromagnética de freqüência ν dada por $\nu=(\gamma/2\pi)B_0$. 22
Fig. I.3 : É previsto um excesso de *spins* no estado de mais baixa energia quando expostos a um campo magnético, resultando numa magnetização longitudinal $\boldsymbol{M_0}$ paralela a este campo.23
Fig. I.4 : Decomposição de um campo linearmente polarizado, oscilante, em duas componentes de campo circularmente polarizadas, girando inversamente uma em relação a outra. 25
Fig. I.5 : Sistema girante de coordenadas. Neste sistema os momentos magnéticos parecerão estáticos, já que o novo sistema gira na mesma freqüência dos momentos **(a)**; e com a aplicação de um novo campo, B_1, no eixo-x', os momentos precessionarão ao redor deste eixo, na mesma freqüência angular deste campo aplicado (γB_1) **(b)**. 27
Fig. I.6 : Aqui é possível visualizar como a magnetização resultante, $\boldsymbol{M}$, evolui no tempo durante a aplicação de um campo magnético estático $\boldsymbol{B_0}$ e um campo de *RF*, $\boldsymbol{B_1}$, no sistema de laboratório **(esquerda)** e no sistema girante de coordenadas **(direita)** para : um pulso de 15° **(a)**, um pulso de 90° **(b)** e um pulso de 180° **(c)**. 28
Fig. I.7 : O conjunto de bobinas de excitação e recepção do sinal envolvem a amostra **(a)**, gerando a f.e.m. que é captada na forma de um *FID* (*Free Induction Decay*) **(b)**, devido ao processo de precessão acompanhado da relaxação **(c)**, retornando a magnetização a sua condição de equilíbrio. 29
Fig. I.8 : Os processos de relaxação longitudinal e transversal, após serem excitados por um pulso $\pi/2$, até voltarem a sua condição de equilíbrio. 31
Fig. II.1 : Perfis dos campos de gradientes: G_x **(a)**, G_y **(b)** e G_z **(c)**. 34
Fig. II.2 : Experiência dos três tubinhos: excitação seletiva. Os tubos possuem diferentes quantidades de água e estão posicionados ao longo de uma coordenada **(a)**. Cada um dos tubos respondem a excitação com *FIDs* distintos, podendo ser observadas duas coisas: a diferença da amplitude do sinal, evidenciando a densidade de núcleos, e a diferença de freqüência, que distingue as diferentes posições dos tubos **(b)**. A representação da densidade de *spins* de acordo com a posição **(c)**. Os espectros de freqüência de um pulso seletivo a direita e um não seletivo a esquerda **(d)** onde se observa como a amostra respondeu as duas excitações **(e)**. 35
Fig. II.3 : O pulso seletivo tipo sinc truncado **(a)**, e seu espectro de freqüências, centrado na freqüência de ressonância ω_0 **(b)**. 36
Fig. II.4 : A defasagem dos *spins* durante o pulso de *RF* é compensada com o gradiente de refocalização. A área do gradiente de refocalização deve ser a metade da área do gradiente de seleção. 37
Fig. II.5 : Obtenção do sinal de um eco. 38
Fig. II.6 : Formação de um eco: após ser aplicado um pulso de 90° **(a)**, os *spins* se espalham no plano transversal **(b)**, em seguida é aplicado um pulso de inversão (180°) **(c)**, refocalizando os *spins* no lado oposto **(d)**, e novamente os *spins* se espalham, em sentido contrário **(e)**. 38
Fig. II.7 : A variação espacial do gradiente de campo magnético permite que seja feita a codificação unidimensional do objeto. 39
Fig. II.8 : A "*Point Spread Function* ", que determina a resolução da imagem. 41

IFSC-USP SERVIÇO DE BIBLIOTECA INFORMAÇÃO

Fig. II.9 : A seqüência de pulsos utilizada na aquisição de sinais da fatia de um objeto para que seja feita a sua imagem **(a)**, mostrando a trajetória da magnetização dos *spins* no espaço-*k* **(b)**. Abaixo são mostradas as três etapas da aquisição: com o pulso seletivo de RF e a aplicação do gradiente G_z **(c)**, o gradiente de codificação de fase G_y **(d)** e o gradiente de codificação de freqüência G_x **(e)**. 44
Fig. II.10 : Considerando o exemplo dos três tubinhos apresentados na **Fig. II.2**, a imagem bidimensional deles, codificando em freqüência (direção x) e fase(direção y) , sem gradiente de seleção: matriz de dados adquiridos no tempo **(a)**, a matriz depois da *Transformada de Fourier* na direção da codificação de freqüência **(b)** e a matriz depois das duas transformadas **(c)** e a imagem em tons de cinza (negativo) **(d)**. 46
Fig. II.11 : Seqüência de pulsos da técnica de *"Spin Echo" (SE)*. 47
Fig. II.12 : Os processos de relaxação de duas amostras, através dos quais são obtidas as diferenças nos contrastes por: T_1 **(a)** e T_2 **(b)**. 49
Fig. II.13 : Comportamento do deslocamento químico devido a aplicação de dois campos magnéticos com intensidades distintas. 50
Fig. III.1 : Funções de modulação para pulsos adiabáticos tipo a) *Adiabatic Half Passage (AHP)* e b) *Adiabatic Full Passage (AFP)*. 53
Fig. III.2 : Sistemas referenciais girantes a) *FM*; b) B_{eff}. 54
Fig. III.3 : Modulação do pulso secante hiperbólica de 15ms, com PB=1,6KHz e sem assimetria, na seqüência de cima para baixo são apresentadas as modulações: AM, FM e PM. 57
Fig. IV.1 : Diagrama da seqüência *PRESS*. 60
Fig. IV.2 : Diagrama da seqüência *STEAM*. 61
Fig. IV.3 : Diagrama da seqüência *MEGA* inserida numa *SE* convencional. 62
Fig. IV.4 : Sensibilidade aos erros de ângulo de *flip* para *Watergate*, *Excitation Sculpting* e *MEGA*. 64
Fig. IV.5 : Diagrama da seqüência híbrida *MEGA-PRESS*. 65
Fig. IV.6 : Diagrama da seqüência híbrida *MEGA-STEAM*. 65
Fig. V.1 : Espectros de sucos[80] adquiridos por *Spin-Echo*, com "Controle Seletivo de Solvente", através da adição de 200μM $MnCl_2$. Esquerda: Laranja. Direita: Maçã. (A) Espectro inteiro; (B) Expansão da região dos carbohidratos; (C) Expansão da região de ácidos orgânicos. A expansão vertical foi de 15x. 69
Fig. V.2 : Espectros de melão (*muskmelon*)[81] adquiridos por *Invertion-Recovery*, com diferentes tempos de *delay*, τ_2. (A) 1.2s; (B) 1.0s; (C) 0.9s. 70
Fig. V.3 : Espectros de diferentes tecidos de frutas[82] adquiridos usando *MAS* e supressão do pico da água, em 200MHz. (A) maçã (4 médias); (B) banana (4 médias); (C) uva (16 médias). 71
Fig. V.4 : Espectros adquiridos sem *MAS*[82], com amostras de diferentes tecidos de frutas, intactos, numa forma cilíndrica dentro de um tubo paralelo ao campo magnético, em 200MHz. (A) maçã; (B) banana; (C) uva. 72
Fig. V.5 : Dependência da largura de linha dos hidrogênios da água com a intensidade de campo, em espectros de ^1H *NMR*[82]. Pontos da largura a meia altura. Campo/freqüência (14.1T/600MHz, 11.75T/500MHz, 7.05T/300MHz, 4.7T/200MHz e 1.41T/60MHz) 73
Fig. V.6 : Espectro[94] de suco de laranja em 500MHz ^1H *NMR*. (A) Espectro inteiro dividido em três regiões; (B) A região dos açúcares expandida. 74
Fig. V.7 : Estrutura da glicose (A), da frutose (B) e da sacarose (C). 75
Fig. VI.1 : Diagrama de blocos simplificado do espectrômetro *TecMag*. 76
Fig. VI.2 : Magneto *OXFORD* 2.0 *Tesla*. 77

Fig. VI.3 : O espectrômetro *APOLLO*, desenvolvido pela *Tecmag HOUSTON, TX*, executado por um *PC* com sistema operacional *Windows 2000*. 77
Fig. VI.4 : Planilha da seqüência *MSSE*, programada com auxílio parcial do *software NTNMR*, da TecMag. 78
Fig. VI.5 : Bobinas de RF utilizadas: *Birdcage* (esquerda) e uma tipo Sela Cruzada (direita).79
Fig. VI.6 : Mapa de B_1 simulados (acima) e medidos (abaixo) das duas bobinas de RF utilizadas no trabalho: a *birdcage* (esquerda) e a tipo sela cruzada (direita). 80
Fig. VI.7 : *Phantom* com pequenos cilindros de 5cmx5cm (diam. x comp.) no seu interior.81
Fig. VI.8 : Refratômetro portátil RT 30 ATC, escala 0-32% BRIX. 82
Fig. VI.9 : Esquema de um refratômetro portátil, com um exemplo de escala, aqui de 0-15% BRIX. 82
Fig. VII.1 : Planilha do programa de simulação *BlochLab*, mostrando o perfil de inversão em ressonância de M_z em função da potência de RF aplicada, expressa em intensidade de B_1.84
Fig. VII.2 : Seqüência *PProfile*, desenvolvida para a observação experimental dos perfis de magnetização estimulados pelos pulsos adiabáticos. 84
Fig. VII.3 : Modulação do pulso de 10ms, com PB=1,6KHz e assimetria 0.1, na seqüência de cima para baixo são apresentadas as modulações: AM, FM e PM. 85
Fig. VII.4 : Modulação do pulso de 15ms, com PB=1,6KHz e assimetria 0.2, na seqüência de cima para baixo são apresentadas as modulações: AM, FM e PM. 86
Fig. VII.5 : Modulação do pulso de 20ms, com PB=1,6KHz e assimetria 0.1, na seqüência de cima para baixo são apresentadas as modulações: AM, FM e PM. 87
Fig. VII.6 : Pulso 10ms, com PB=1,6KHz e assimetria 0.1: ineficaz, baixa potência e temporização ótima. 88
Fig. VII.7 : Pulso 15ms, com PB=1,6KHz e assimetria 0.2: : eficaz, alta potência e temporização boa. 88
Fig. VII.8 : Pulso 20ms, com PB=1,6KHz e assimetria 0.1: : eficaz, baixa potência e temporização ruim. 89
Fig. VII.9 : Pulso 10ms, com BW=1,6KHz e assimetria 0.1, com borda de 183Hz. 90
Fig. VII.10 : Pulso 15ms, com PB=1,6KHz e assimetria 0.2, com borda de 100Hz. 90
Fig. VII.11 : Pulso 20ms, com PB=1,6KHz e assimetria 0.1, com borda de 110Hz. 90
Fig. VII.12 : Perfil de magnetização do pulso 10ms, com PB=1,6KHz e assimetria 0.1, com borda simulada de 183 Hz. 91
Fig. VII.13 : Perfil de magnetização do pulso 15ms, com PB=1,6KHz e assimetria 0.2, com borda simulada de 100Hz. 92
Fig. VII.14 : Perfil de magnetização do pulso 20ms, com PB=1,6KHz e assimetria 0.1, com borda simulada de 110Hz. 92
Fig. VII.15 : Zoom do perfil de magnetização do pulso 10ms, com borda medida de aproximadamente 300Hz. 93
Fig. VII.16 : Zoom do perfil de magnetização do pulso 15ms, com borda medida de aproximadamente 225Hz.. 93
Fig. VII.17 : Zoom do perfil de magnetização do pulso 20ms, com borda medida de aproximadamente 230Hz.. 94
Fig. VII.18 : Um perfil do *phantom* com pequenos cilindros espaçados, mostrando a região central . 95
Fig. VII.19 : Um pulso *sinc* usado para: excitação, 90° (esquerda), e um pulso de inversão,180° (direita). 95
Fig. VII.20 : O perfil de magnetização do pulso secante hiperbólico utilizado, no qual se realiza um ajuste de *offset* (15ms, com PB=1,6KHz e assimetria 0.2). 96

Fig. VII.21 : A varredura de *offset* realizada para suprimir o sinal da água, com passos de 20Hz, onde a posição dos picos com informação dos açúcares está marcada pela linha verde.97
Fig. VII.22 : Imagens das cinco fatias do *Phanton* cilíndrico com seus diversos compartimentos cilíndricos. As direções de varredura da seleção volumétrica estão indicadas. 98
Fig. VII.23 : Distâncias em relação ao centro variando na direção-Z: A:1,5mm; B:3,5mm; C:5,5mm; D:7,5mm; E:9,5mm; F:11mm; G:11,5mm; H:12mm; I:13,5mm; J:15,5mm. 98
Fig. VII.24 : Distâncias em relação ao centro variando na direção-X: A:1mm; B:3mm; C:5mm; D:7mm; E:9mm; F:9.5mm; G:10mm; H:11mm; I:13mm; J:15mm. 99
Fig. VII.25 : Distâncias em relação ao centro variando na direção-Y: A:1mm; B:3mm; C:5mm; D:7mm; E:9mm; F:10mm; G:10,5mm; H:11mm; I:13mm; J:15mm. 99
Fig. VII.26 : Primeira verificação da supressão do sinal da água, utilizando uma amostra de Iodo Metano. Um dos picos é localizado em –94Hz e o outro em -252Hz. 100
Fig. VII.27 : Imagem mostrando o contraste entre as soluções de sacarose, glicose, frutose e $CuSO_4 \bullet 5H_2O$. 101
Fig. VII.28 : Espectro simulado da glicose em 400MHz, com *LW*=0,1Hz. Os diversos deslocamentos químicos são apresentados e seus respectivos prótons estão enumerados na estrutura. 102
Fig. VII.29 : Espectros simulado da glicose em 85MHz, com *LW*=8,5Hz (0.1ppm), esquerda, e 42.5Hz (0.5ppm), direita. 102
Fig. VII.30 : Espectro experimental de uma solução de glicose (90mg/mL), indicando a intensidade do pico da água (direita), sua *LW*=0.068ppm (centro) e indicando a posição do pico relativo a glicose (esquerda). 103
Fig. VII.31 : Espectro experimental de uma solução de glicose (90mg/mL), indicando a posição do pico relativo a glicose, com a região aproximada (direita) e o mesmo obtido após a supressão, com 100 médias (esquerda). 103
Fig. VII.32 : Espectro simulado da frutose em 400MHz, com *LW*=0,1Hz. Os diversos deslocamentos químicos são apresentados e seus respectivos prótons estão enumerados na estrutura. 104
Fig. VII.33 : Espectros simulado da frutose em 85MHz, com *LW*=8,5Hz (esquerda), e 42.5Hz (direita). 104
Fig. VII.34 : Espectro experimental de uma solução de frutose (250mg/mL), indicando a região dos picos relativo a frutose (direita) e o mesmo obtido após a supressão, com 100 médias (esquerda). 105
Fig. VII.35 : Espectro simulado da sacarose em 400MHz, com *LW*=0,1Hz. Os diversos deslocamentos químicos são apresentados e seus respectivos prótons estão enumerados na estrutura. 105
Fig. VII.36 : Espectros simulado da sacarose em 85MHz, com *LW*=8,5Hz (esquerda), e 42.5Hz (direita). 106
Fig. VII.37 : Espectro experimental de uma solução de sacarose (170mg/mL), com os picos da sacarose já evidenciado (direita) e com 100 médias outros aparecem (esquerda). 106
Fig. VII.38 : Espectro experimental de uma solução de sacarose (170mg/mL) após ser realizada uma supressão do sinal da água. 107
Fig. VII.39 : Espectro simulado das três estruturas de açúcares mais encontradas em frutas: glicose, frutose e sacarose, em 85MHz, com *LW*=8,5Hz. 107
Fig. VII.40 : Imagem posicionadora e uma foto da fruta do conde. 109
Fig. VII.41 : Espectro com supressão do sinal da água na fruta do conde. *MEGA-STEAM* (direita) e *MEGA-PRESS* (esquerda), com a identificação de açúcares e de óleo. 110

Fig. VII.42 : Espectro ilustrando as diferenças de intensidades entre as seqüências *MEGA-STEAM* (direita) e *MEGA-PRESS* (esquerda), do sinal da água na fruta do conde. 110
Fig. VII.43 : Imagem posicionadora e uma foto de uma ameixa. 111
Fig. VII.44 : Espectro sem supressão do sinal da água na ameixa. O volume ficou centrado no caroço, obtendo o intenso sinal de óleo. Há um *offset* no espectro de 0.1ppm para à direita. 111
Fig. VII.45 Espectro com supressão do sinal da água na ameixa, com a identificação de açúcares e de óleo. 112
Fig. VII.46 : Imagem posicionadora e uma foto de uma maçã. 112
Fig. VII.47 : Espectro com supressão do sinal da água de uma maçã, da parte central. 113
Fig. VII.48 : Espectro com supressão do sinal da água de uma maçã, distante +15mm na direção-X. 113
Fig. VII.49 : Espectro com supressão do sinal da água de uma maçã, distante -15mm na direção-Y, com 1000 médias. 114
Fig. VII.50 : Imagem posicionadora e uma foto de um maracujá doce. 114
Fig. VII.51 : Espectro com supressão do sinal da água de um maracujá doce, distante -15mm na direção-Y. 115
Fig. VII.52 : Espectro com supressão do sinal da água de uma manga, distante -30mm na direção-Y. 115
Fig. VII.53 : Imagem posicionadora e uma foto de uma pêra. 116
Fig. VII.54 : Espectro com supressão do sinal da água de uma pêra, no centro. 116
Fig. VII.55 : Espectro com supressão do sinal da água de uma pêra, , distante -15mm na direção-Z. 117
Fig. VII.56 : Espectro com supressão do sinal da água de uma pêra, , obtido com a bobina menor, da mesma região (parte inferior da imagem) que o espectro obtido na **Fig.VII.55**.1 17
Fig. VII.57 : Espectro com supressão do sinal da água de uma pêra, , obtido com a bobina menor (parte superior da imagem). 118
Fig. VII.58 : Imagem posicionadora e uma foto de um pêssego. 118
Fig. VII.59 : E spectro sem supressão do sinal da água de um pêssego. O volume ficou centrado no caroço, obtendo o intenso sinal de óleo. 119
Fig. VII.60 : Espectro com supressão do sinal da água de um pêssego, distante +15mm na direção-Y. 119
Fig. VII.61 : Espectro com supressão do sinal da água de um pêssego, obtido com a bobina menor (parte superior da imagem). 119
Fig. VII.62 : Imagem posicionadora e uma foto de um kiwi. 120
Fig. VII.63 : Espectro com supressão do sinal da água de um kiwi, na região central. 121
Fig. VII.64 : Espectro com supressão do sinal da água de um kiwi, distante +15mm na direção-X. 121
Fig. VII.65 : Espectro com supressão do sinal da água de um kiwi, obtido com a bobina menor (parte inferior da imagem). 121
Fig. VII.66 : Imagem posicionadora e uma foto de um banana. 122
Fig. VII.67 : Espectro com supressão do sinal da água de uma banana, da região central. 123
Fig. VII.68 : O alargamento de linha espectral para algumas das frutas estudas. 124
Fig. VII.69 : Os quatro tipos de uva estudados: (A) Itália, (B) Red Globe, (C) Thompson e (D) Rubi. 125
Fig. VII.70 : Os espectros obtidos para os três estágios de maturação da uva do tipo Itália, verde (esquerda), intermediário (centro) e madura (direita). 125
Fig. VII.71 : Os espectros obtidos para os três estágios de maturação da uva do tipo Red Globe, verde (esquerda), intermediário (centro) e madura (direita). 126

Fig. VII.72 : Os espectros obtidos para os três estágios de maturação da uva do tipo Rubi, verde (esquerda), intermediário (centro) e madura (direita). 126
Fig. VII.73 : Os espectros obtidos para os três estágios de maturação da uva do tipo Thompson, verde (esquerda), intermediário (centro) e madura (direita).. 127
Fig. VII.74 : Os espectros obtidos para os tipos de uva: (A) Itália, (B) Red Globe, (C) Rubi e (D) Thompson, no seu estágio de maturação plena. 128
Fig. VII.75 : Os espectros obtidos para os tipos de uva: (A) Itália, (B) Red Globe, (C) Rubi e (D) Thompson, no seu estágio de maturação verde. 129
Fig. VII.76 : As seqüências implementadas, captadas da saída do amplificador de RF, por um osciloscópio TekTronix TDS380: (A) *MEGA-STEAM* e (B) *MEGA-PRESS.* 130

Lista de tabelas

Tab. I.1 _____ 15

Lista de abreviaturas

Adiabatic Full Passage ____ *AFP*
Adiabatic Half Passage ____ *AHP*
Amplitude Modulation ____ *AM*
Chemical-Shift Selective Excitation ____ *CHESS*
Chemical-Shift Imaging ____ *CSI*
Fast Fourier Transform ____ *FFT*
Free Induction Decay ____ *FID*
Frequency Modulation ____ *FM*
Field Of View ____ *FOV*
Fourier Transform ____ *FT*
Image Selected in vivo Spectroscopy ____ *ISIS*
Magnetic Resonance Imaging ____ *MRI*
Magnetic Resonance Spectroscopy ____ *MRS*
Multi Slice Spin Echo ____ *MSSE*
Point Resolved Spectroscopy ____ *PRESS*
Point Spread Function ____ *PSF*
Radio Frequency ____ *RF*
Region Of Interest ____ *ROI*
Spin Echo ____ *SE*
Stimulated Acquisition Mode ____ *STEAM*
Tempo ao Eco ____ TE
Tempo de Mistura ____ TM
Tetrametilsilano, $SI(CH_3)_4$ ____ *TMS*
Tempo de Repetição ____ TR
Radiofreqüência ____ RF
Region Of Interest ____ *ROI*
Spin Echo ____ *SE*

Resumo

Novas seqüências para supressão de contribuições indesejadas em Imagens e Espectroscopia por Ressonância Magnética Nuclear, tais como as provenientes da água, um solvente que sempre resulta num sinal muito intenso em sistemas biológicos, são motivos de estudo e desenvolvimento com diversas aplicações atuais. O método que estamos propondo aqui, uma versão adiabática de *MEGA* incorporada nas seqüências *PRESS* e *STEAM*, visa a supressão do sinal da água presente no espectro de um volume localizado em uma amostra intacta. Para o campo magnético desse estudo (2.0Tesla) e pelas características do magneto usado nesses experimentos, o pico do solvente tem o inconveniente de apresentar uma linha espectral muito larga quando comparado com a extensão do deslocamento químico das frações de açúcar. O resultado indesejado é a sobreposição pelas suas vertentes, das diversas outras linhas espectrais, cujo interesse é de extrema importância, como a de alguns sólidos solúveis de açúcares. O principal problema encontrado é que a separação entre os picos da água e dos açúcares próximos é da ordem de 1 ppm.

A metodologia proposta consiste na aplicação de pulsos de gradiente de campo magnético intensos em conjunto com uma seqüência de pulsos de *RF* adiabáticos e convencionais, seletivos em freqüência e espacialmente, para suprimir o pico da água em uma região espectral muito específica, sem nenhum dano a linearidade de fase do espectro restante. Esse procedimento, aliado a uma localização espacial muito eficiente, aumenta ainda mais o poder de análise desta ferramenta, a ^{1}H *MRS*.

Os resultados obtidos em campo de 2.0Tesla (85Hz/ppm) mostraram que as seqüências híbridas adiabáticas *MEGA-PRESS* e *MEGA-STEAM* são bem eficazes na supressão do pico da água, como era esperado. Além disso, sua aplicação no monitoramento do grau de maturação de frutas intactas através do seu teor de açúcar, se mostrou muito bom dadas as condições experimentais extremamente limiares apresentadas pelo espectrômetro.

Abstract

New sequences for suppression of undesirable contributions in Magnetic Resonance Imaging and Spectroscopy, such as water, a solvent that always represent a very strong peak in biological systems, are object of recent development for several different applications. The method proposed here, an adiabatic version of *MEGA* incorporated within *PRESS* and *STEAM*, aims the suppression of the water peak present on volume selected spectra of intact specimens. For the magnetic field of this study (2.0Tesla) and for the characteristics of the magnet used in the experiments, the solvent peak has the inconvenience of having a large width as compared to the spread in chemical shift of the sugar fractions. The undesirable result is the superposition on its tail with several spectral lines, whose interest is of extreme importance, such as some sugar solid solutes. The main problem encountered is that the separation between the water peak and the nearest sugar peaks is of the order of 1 ppm.

The proposed methodology consists on the application of intense gradient pulses along with a sequence of adiabatic and conventional RF pulses, both frequency and spatially selective, to suppress the water peak in a very specific spectral region, without any disturbance of the phase linearity of the remaining part of the spectrum. This procedure, allied to a very efficient spatial localization, enhances the power of the very well known tool, the ^{1}H *MRS*.

Results obtained at 2.0Tesla (85 Hz/ppm) show that the hybrid adiabatic sequences *MEGA-PRESS* and *MEGA-STEAM* are efficient on suppressing the water peak, as expected. Also, their application on monitoring the degree of ripeness of intact fruits through their sugar content, has shown very good results, considering the extremely limiar experimental conditions presented by the spectrometer.

Introdução

Nossa proposta consiste em observar metabólitos de açúcares por ^{1}H *MRS*, em condições extremamente limiares, por vários motivos, a constar: o campo magnético de 2.0 Tesla está no limite inferior para a realização de experimentos de espectroscopia. Além disso, espera-se obter espectros de volume localizado em sistemas cujas dimensões (por exemplo, uma manga) são da ordem do volume homogêneo do magneto utilizado. Um outro fato é a extrema proximidade das frações (pequeno deslocamento químico relativo) que se pretende observar, colocando-as muito próximas à intensa linha do solvente (água), literalmente na sua "cauda". Estes fatos, se considerados no conjunto, exigem o desenho de um experimento que reúna características especiais de localização de pequenos volumes que possam ser posicionados em regiões da amostra que se pretende observar o espectro. Isto, aliado a um método eficiente de supressão de solvente, que permita utilizar a dinâmica do sistema de aquisição para a observação das frações de interesse, eliminando do espectro a contribuição do sinal da água. Além disso, todo o trabalho de aquisição tem que ser precedido por um tedioso processo de correção de campo (*shimming*), que tem que ser com base no volume a ser observado, pois o método de localização pode introduzir imperfeições dinâmicas (devido à presença de eddy currents residuais), e estas têm que ser corrigidas caso a caso.

Este trabalho está composto de 7 capítulos, e pode ser dividido em 3 partes: os 3 primeiros capítulos tratam da fundamentação teórica necessária para o entendimento das implementações e aplicações. Trata dos princípios: no primeiro, da *NMR* (Ressonância Magnética Nuclear); no segundo, da *MRS* (Espectroscopia por Ressonância Magnética) e *MRI* (Imagens por Ressonância Magnética) e no terceiro, dos fundamentos dos pulsos adiabáticos.

Os próximos 2 capítulos tratam de uma revisão bibliográfica, mas também trazem fundamentos que são necessários para explicar a motivação e dificuldades do trabalho: no quarto, as seqüências de espectroscopia de volume localizado e suas implementações, e no

quinto, um histórico, com as dificuldades e motivações de se fazer ^{1}H *MRS* em frutas intactas.

Os últimos 2 capítulos tratam da instrumentação e dos resultados obtidos.

Cap. I - Princípios de Ressonância Magnética Nuclear (*NMR*)

Para o entendimento da formação de espectros e imagens é necessário introduzir os elementos básicos da técnica de Ressonância Magnética Nuclear — RMN (*Nuclear Magnetic Resonance — NMR*).

I.1 Propriedades do núcleo atômico

A Ressonância Magnética é um fenômeno encontrado em sistemas magnéticos que possuem tanto momento magnético como momento angular. Ela é caracterizada pela precessão do momento magnético nuclear em um campo magnético estático externo aplicado, devido à sintonia em uma freqüência natural deste sistema magnético, conforme a **FIG.I.1**.

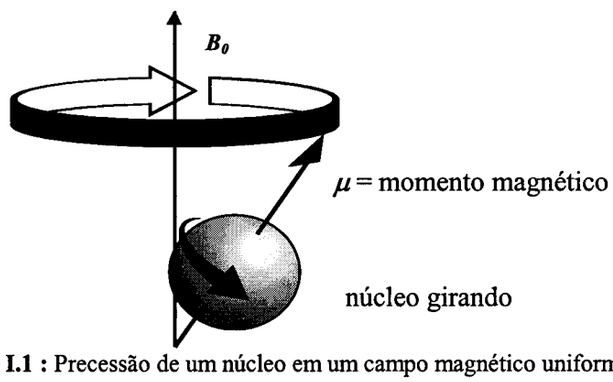

Fig. I.1 : Precessão de um núcleo em um campo magnético uniforme B_0.

O momento angular intrínseco, ou spin, é uma propriedade da matéria no nível de partículas elementares. Se estas partículas (prótons, nêutrons) são agrupadas para formar o núcleo, seus respectivos *spins* se adicionarão (vetorialmente) e o núcleo terá um spin nuclear resultante. Uma regra geral é que núcleos com números pares de prótons e nêutrons terão spin resultante zero. Agora para núcleos que possuem números ímpares de prótons e nêutrons o valor de spin resultante é inteiro, enquanto que núcleos que possuem número

ímpar de prótons e par de nêutrons, e vice-versa, terão um valor de spin resultante semi-inteiro, que interessam a *NMR*. Alguns estão representados na tabela abaixo, **TAB.I.1**.

Tab. I.1 : Alguns núcleos e suas características importantes para *NMR*[1]

Núcleo	*Spin* (*I*)	Razão Magnetogírica (10^7 rad T^{-1} s^{-1})	Abundância Natural (%)
^{1}H	1/2	26,75222	99,989
^{13}C	1/2	6,7283	1,07
^{14}N	1	1,9338	99,632
^{15}N	1/2	-2,7126	0,368
^{19}F	1/2	25,1623	100
^{29}Si	1/2	-5,3190	4,6832
^{17}O	5/2	-3,6280	0,038
^{31}P	1/2	10,8394	100
^{43}Ca	7/2	-1,8030	0,14

O spin nuclear intrínseco é o momento angular quantizado ($\hbar I$), onde o momento magnético (μ) é relacionado da forma mostrada pela expressão

$$\mu = \gamma \hbar I, \qquad [1]$$

onde γ é a razão magnetogírica, característica de cada átomo, e $\hbar$ é a constante de Planck dividida por 2π.

Com a aplicação de um campo magnético $\boldsymbol{B_0}$, é gerada uma energia de interação com o núcleo, no valor de $-\mu \cdot \boldsymbol{B_0}$. O operador Hamiltoniano, $\mathcal{H}$, resultante desta interação tem a forma

$$\mathcal{H} = -\mu \cdot \boldsymbol{B_0}. \qquad [2]$$

Considerando o campo $\boldsymbol{B_0}$, como estático, ao longo da direção-z, obtêm-se:

$$\mathcal{H} = -\gamma \hbar B_0 I_z. \qquad [3]$$

Estes Hamiltonianos são chamados de Hamiltonianos de Interação Zeeman, **Eqs.** *[2]* e *[3]*.

Os autovalores deste Hamiltoniano são simples, sendo apenas múltiplos dos autovalores de I_z. Sendo assim, as energias permitidas são:

$$E = -\gamma \hbar B_0 m \; ; \quad m = I, I-1, \ldots, -I \; . \qquad [4]$$

Isto mostra que os valores de energia permitidos ficam definidos pela interação do momento magnético nuclear com o campo aplicado, o que caracteriza o efeito Zeeman, **FIG.I.2**.

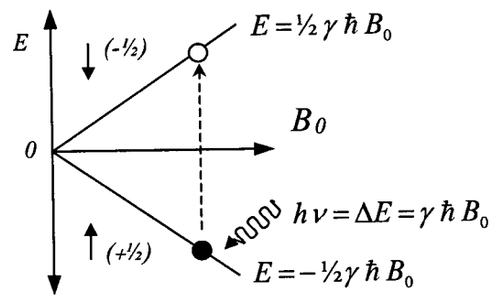

Fig. I.2 : Diagrama do nível de energia para um sistema de spin ½. As transições entre os dois estados podem ser induzidas por uma energia eletromagnética de freqüência ν dada por $\nu=(\gamma/2\pi)B_0$.

Uma outra interação que possa causar transições entre os níveis deve possuir uma energia característica dada por:

$$\Delta E = \gamma \hbar B_0 . \qquad [5]$$

Uma maneira de causar transições entre os níveis é irradiando no sistema energia eletromagnética numa freqüência angular ω_0:

$$\hbar \omega_0 = \Delta E = \gamma \hbar B_0 , \qquad [6]$$

onde a freqüência deve ser:

$$\omega_0 = \gamma B_0 , \qquad [7]$$

que é a condição de ressonância para uma espécie de átomo num campo magnético aplicado. Pode-se observar que nesta expressão fundamental da *NMR*, **Eq.** *[7]*, a constante de Planck desapareceu. O que sugere que podemos abordar este resultado através de uma descrição clássica.

As energias envolvidas nas transições são baixas, mesmo envolvendo um imenso número de núcleos. E para dificultar ainda mais, está abaixo da energia de agitação térmica.

Ou seja, para um sistema com *spins* nucleares ½ num campo B_0, teremos dois estados possíveis, um paralelo ao campo ($m = +½$) e outro anti-paralelo ($m = -½$). A estatística de Boltzmann prevê um excesso para *spins* paralelos ao campo (de baixa energia), mas devido a agitação térmica, este excesso é muito baixo, como está ilustrado na **FIG.I.3**.

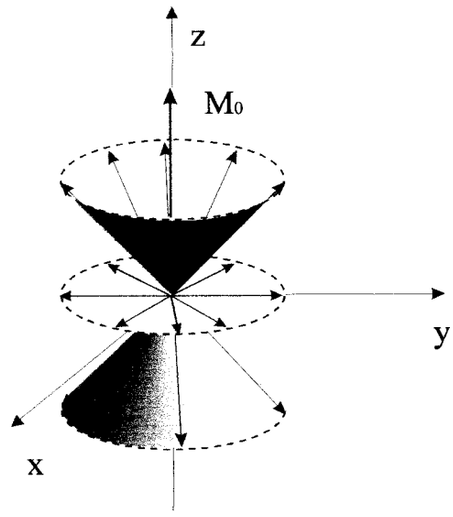

Fig. I.3 : É previsto um excesso de *spins* no estado de mais baixa energia quando expostos a um campo magnético, resultando numa magnetização longitudinal M_0 paralela a este campo.

Visualizando quantitativamente pela estatística de Boltzmann, em um equilíbrio dinâmico, através da expressão:

$$\frac{N_P}{N_A} = \exp[\Delta E / k_B T], \qquad [8]$$

onde N_P é o número de núcleos com *spins* paralelos ao campo e N_A é o número de núcleos com *spins* anti-paralelos; k_B é a constante de Boltzmann e T é a temperatura do sistema.

Da **Eq.** ***[6]***:

$$\frac{N_P}{N_A} = \exp[(\gamma\hbar B_0)/k_B T] \approx 1 + \gamma\hbar B_0 / k_B T. \qquad [9]$$

Onde podemos associar uma magnetização resultante ao longo do campo B_0, dado por:

$$M_0 = \sum \gamma\hbar m \frac{N_P}{N_A}, \qquad [10]$$

onde para os valores $(\Delta E/k_B T) = 6{,}58\text{x}10^{-6}$ para uma temperatura de 310 K, de um corpo humano normal, em um campo de $B_0 = 1\ T$, resulta em $(N_P/N_A) = 1{,}00000658$, ou seja, o sinal é adquirido de uma parcela extremamente pequena do número total de spins!

Como já foi constatado da **Eq.** *[7]* que se pode trabalhar com um modelo clássico para a interação do momento magnético e o campo magnético aplicado, onde os resultados apresentados pela mecânica quântica se ajustam à interpretação clássica.

Considerando primeiramente um caso hipotético de um conjunto de spins não interagindo entre si, colocados num campo magnético, onde o spin nuclear é um momento angular. Como se sabe, o torque é a medida da taxa de variação temporal do momento:

$$\frac{d\boldsymbol{S}}{dt} = Torque, \qquad [11]$$

onde, para o caso do spin nuclear, este momento angular de spin é:

$$\boldsymbol{S} = \hbar \boldsymbol{I}. \qquad [12]$$

Como também se sabe que o torque é expresso pela interação do momento magnético de spin e o campo externo aplicado:

$$Torque = \boldsymbol{\mu} \times \boldsymbol{B_0}. \qquad [13]$$

Fazendo a substituição das **Eq.** *[12]* e *[13]* em *[11]*,

$$\frac{d(\hbar \boldsymbol{I})}{dt} = \boldsymbol{\mu} \times \boldsymbol{B_0}. \qquad [14]$$

Da **Eq.** *[1]*:

$$\frac{d\boldsymbol{\mu}}{dt} = \gamma\, \boldsymbol{\mu} \times \boldsymbol{B_0} = \boldsymbol{\mu} \times \gamma \boldsymbol{B_0} = \boldsymbol{\mu} \times \boldsymbol{\omega_0}. \qquad [15]$$

Onde esta equação representa o movimento de precessão uniforme do momento magnético nuclear $\boldsymbol{\mu}$ ao redor do campo $\boldsymbol{B_0}$ com velocidade angular

$$\omega_0 = \gamma \boldsymbol{B_0}, \qquad [16]$$

conhecida como freqüência de Larmor.

Como se pode observar, a descrição clássica do comportamento dos *spins* permite visualizar de maneira satisfatória o fenômeno de *NMR*, com a qual será tratada toda a discussão a respeito da obtenção de imagens (*MRI*) e espectros (*MRS*) no **CAP.II**.

Voltando à **Eq.** *[15]*, observa-se que os momentos magnéticos estão sendo tratados isoladamente, precessionando devido ao campo aplicado $\boldsymbol{B_0}$, paralela ou anti-paralelamente. É previsto um predomínio da quantidade de momentos magnéticos que giram paralelamente ao campo (de mais baixa energia, como visto na **Eq.** *[10]*), originando assim uma componente longitudinal da magnetização resultante da soma destes momentos (a componente perpendicular ao campo é nula), **FIG.I.3**:

$$\boldsymbol{M_0} = \sum_i \boldsymbol{\mu}_i \,. \qquad [17]$$

I.2 Sistema girante de coordenadas e pulsos de radiofreqüência

Para obter informação desta magnetização resultante é necessária a aplicação de um outro campo magnético de magnitude constante. Só que este é um campo magnético alternado, na faixa de radiofreqüência (*RF*) linearmente polarizado. Isto pode ser visualizado como a decomposição deste campo oscilante em duas componentes circularmente polarizadas de amplitude B_1 e com sentidos horário e anti-horário, de acordo com a **FIG.I.4**.

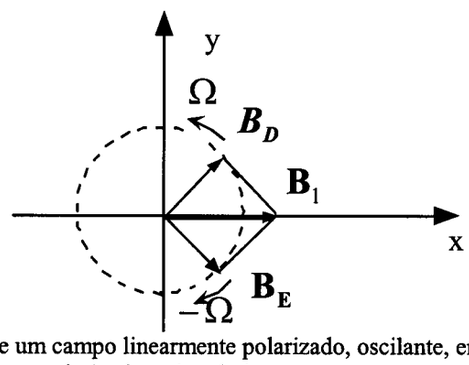

Fig. I.4 : Decomposição de um campo linearmente polarizado, oscilante, em duas componentes de campo circularmente polarizadas, girando inversamente uma em relação a outra.

Onde estes campos são expressos da forma:

$$\begin{aligned} \boldsymbol{B_D} &= B_1(\boldsymbol{i}\cos\Omega t + \boldsymbol{j}sen\Omega t) \\ \boldsymbol{B_E} &= B_1(\boldsymbol{i}\cos\Omega t - \boldsymbol{j}sen\Omega t) \end{aligned} \qquad [18]$$

Nota-se que o que difere os dois campos é o sentido da precessão, $+\Omega$ ou $-\Omega$. Como uma componente irá girar no mesmo sentido dos momentos magnéticos e a outra no sentido oposto, esta última pode ser desconsiderada sem perdas para o entendimento desta interação, introduzindo apenas contribuições de ordem 2 e superiores.

Mantendo o campo como $\boldsymbol{B_1} = \boldsymbol{B_D}$, podemos agora expressar a equação do movimento de um *spin*, considerando o efeito deste campo em conjunto com o campo estático $\boldsymbol{B_0}$:

$$\frac{d\boldsymbol{M}}{dt} = \boldsymbol{M} \times \gamma[\boldsymbol{B_0} + \boldsymbol{B_1}(t)]. \qquad [19]$$

E para facilitar a investigação do movimento da magnetização é necessário tornar $\boldsymbol{B_1}$ estático, acompanhando a precessão. Considerando um sistema de coordenadas girante, onde o eixo de rotação coincida com a direção de $\boldsymbol{B_0}$, mantendo-o estático, e para isso a freqüência de rotação deve ser igual à freqüência de Larmor, eliminando assim a dependência temporal de $\boldsymbol{B_1}$, tornando-o estático, como na **FIG.I.5(a)**. De forma que a **Eq.** *[19]* pode ser reescrita:

$$\frac{\partial \boldsymbol{M}}{\partial t} = \boldsymbol{M} \times \gamma(\boldsymbol{k}' B_0 + \boldsymbol{i}' B_1) - \boldsymbol{M} \times \boldsymbol{\Omega}. \qquad [20]$$

Onde $\boldsymbol{B_1}$ é considerado como sendo aplicado no eixo-x.

Na condição de ressonância $\boldsymbol{\Omega} = \gamma\, \boldsymbol{k} B_0$, onde o sistema estaria numa situação em que $\gamma B_0 - \Omega \cong 0$, e pode ser declarado que:

$$\frac{\partial \boldsymbol{M}}{\partial t} = \boldsymbol{M} \times \gamma\left[\left(B_0 - \frac{\Omega}{\gamma}\right)\boldsymbol{k}' + B_1 \boldsymbol{i}'\right] = \boldsymbol{M} \times \gamma \boldsymbol{B}_{ef}, \qquad [21]$$

onde $\boldsymbol{B}_{ef} = \left(B_0 - \Omega/\gamma\right)\boldsymbol{k}' + B_1 \boldsymbol{i}'$.

Isto pode ser entendido que, no sistema girante de coordenadas, a magnetização percebe a ação de um campo magnético estático $\boldsymbol{B}_{ef}$, precessionando num cone de ângulo fixo em relação à direção deste campo efetivo, com uma freqüência angular de γB_{ef}.

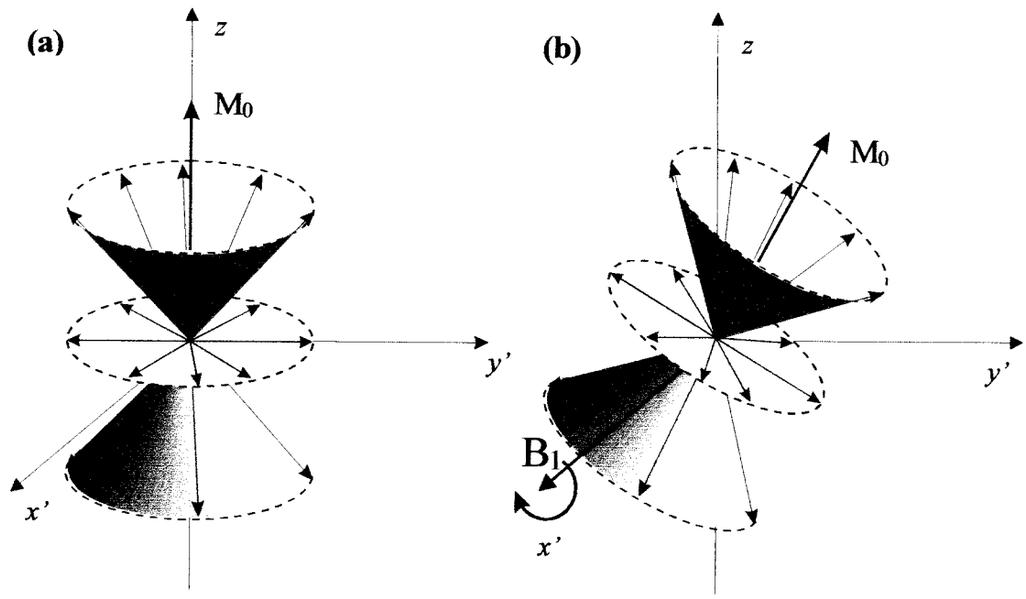

Fig. I.5 : Sistema girante de coordenadas. Neste sistema os momentos magnéticos parecerão estáticos, já que o novo sistema gira na mesma freqüência dos momentos **(a)**; e com a aplicação de um novo campo, B_1, no eixo-x', os momentos precessionarão ao redor deste eixo, na mesma freqüência angular deste campo aplicado (γB_1) **(b)**.

Da **Eq.** ***[21]***, sendo satisfeita a condição de ressonância, o campo efetivo será $\boldsymbol{B_{ef}} = B_1\boldsymbol{i'}$, e os momentos magnéticos precessionarão ao redor do campo B_1 com uma freqüência de γB_1, como na **FIG.I.5(b)**. E o ângulo com relação a B_1 será determinado por:

$$\theta = \gamma \int_0^{t_p} B_1(t)\,dt, \qquad \textit{[22a]}$$

onde t_p é o tempo em que o pulso de RF é aplicado. Considerando que B_1 permaneça constante durante este tempo, a **Eq.** ***[22a]*** pode ser reescrita da forma:

$$\theta = \gamma B_1 t_p\,. \qquad \textit{[22b]}$$

Assim fica determinado que, com o ajuste da amplitude de B_1 e do tempo de aplicação deste, t_p, pode-se especificar o ângulo de excitação desejado. Por exemplo, um pulso de $\theta = \pi/2$ gira os momentos magnéticos de 90° de z' para y', levando a magnetização para o plano transversal, enquanto que um pulso $\theta = \pi$ gira de 180° os momentos, de z' para $-z'$, deixando a magnetização invertida, como pode ser visualizado na **FIG.I.6**.

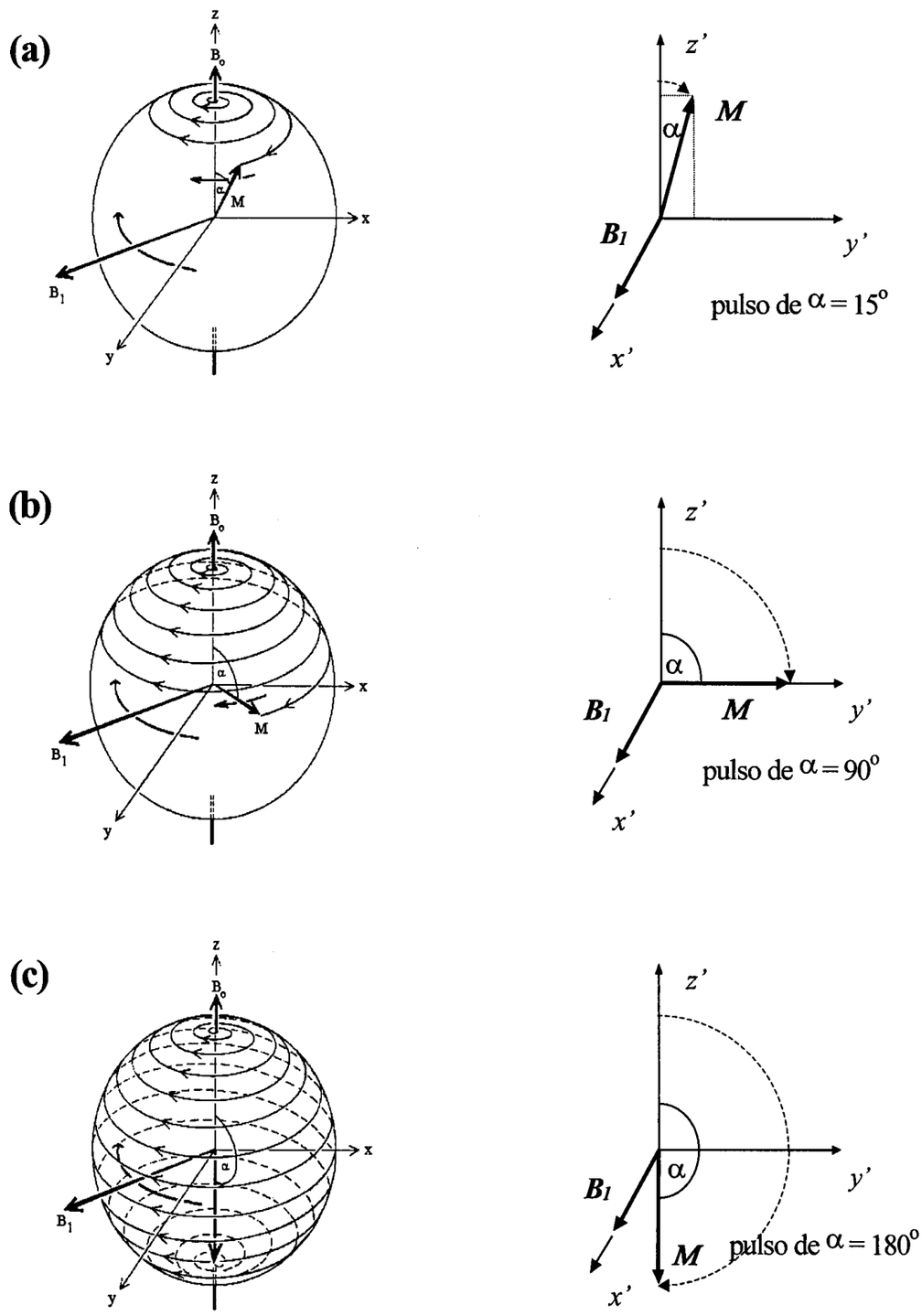

Fig. I.6 : Aqui é possível visualizar como a magnetização resultante, ***M***, evolui no tempo durante a aplicação de um campo magnético estático $\boldsymbol{B_0}$ e um campo de *RF*, $\boldsymbol{B_1}$, no sistema de laboratório **(esquerda)** e no sistema girante de coordenadas **(direita)** para : um pulso de 15° **(a)**, um pulso de 90° **(b)** e um pulso de 180° **(c)**.

I.3 O sinal de *NMR*

Após a aplicação do pulso de *RF*, os momentos magnéticos dos núcleos excitados presentes na amostra respondem a esta perturbação, gerando o sinal de *NMR* que podemos captar. Existe um contratempo muito importante que deve ser considerado, a inomogeneidade do campo estático aplicado $\boldsymbol{B_0}$.

Supondo um pulso de *RF* de 90° neste campo estático $\boldsymbol{B_0}$. Ele tem a propriedade de girar toda a magnetização paralela ao campo $\boldsymbol{B_0}$, se for intenso o suficiente, para o plano transversal a este. Devido às inomogeneidades de campo esses vetores magnetização começarão a experimentar diferentes campos em pontos diferentes, e iniciarão a precessão em sua freqüência de Larmor característica. Algumas componentes da magnetização precessionarão mais rapidamente que outras, resultando em diferentes contribuições para a magnetização total, devido à defasagem gerada pela inomogeneidade do campo, como está mostrado na **FIG.I.7(c)**.

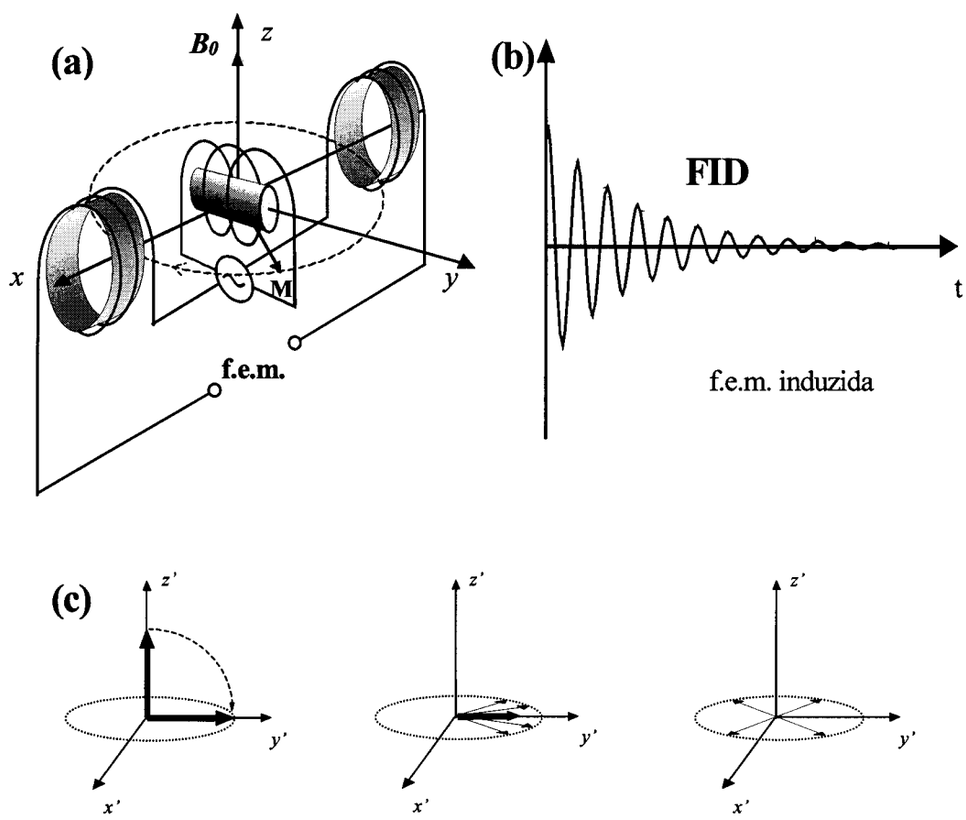

Fig. I.7 : O conjunto de bobinas de excitação e recepção do sinal envolvem a amostra **(a)**, gerando a f.e.m. que é captada na forma de um *FID* (*Free Induction Decay*) **(b)**, devido ao processo de precessão acompanhado da relaxação **(c)**, retornando a magnetização a sua condição de equilíbrio.

Cada pequeno volume da amostra que experimenta um campo homogêneo aplicado é chamado de isocromata, pois todos os momentos magnéticos contidos ali estão girando numa mesma freqüência, sendo a magnetização total resultante da contribuição destas várias isocromatas.

Após a aplicação do pulso de *RF*, a magnetização tende a retornar para a sua condição de equilíbrio, paralela ao campo estático B_0, e durante este retorno é captado um sinal, característico, chamado *"Free Induction Decay"* (*FID*).

I.4 A equação de Bloch

Uma descrição fenomenológica da dependência no tempo da magnetização nuclear $\boldsymbol{M}(t)$, na presença de um campo magnético aplicado $\boldsymbol{B}(t)$, é representada pela *equação de Bloch*:

$$\frac{d\boldsymbol{M}}{dt} = \gamma \boldsymbol{M} \times \boldsymbol{B} - \frac{(M_x \boldsymbol{i} + M_y \boldsymbol{j})}{T_2} - \frac{(M_z - M_0)\boldsymbol{k}}{T_1}. \qquad [23]$$

Esta magnetização nuclear $\boldsymbol{M}(t)$ induzida na amostra é a soma de toda a magnetização experimentada pelos núcleos, como podemos lembrar da **Eq.** *[17]*.

O sistema de coordenadas está aqui representado no eixo de referência de *laboratório*. Onde, por convenção, o campo magnético estático está na direção-*z*, chamada de *direção longitudinal*, sendo as direções-*x* e *y* definidas como *direções transversais*. Um estudo mais profundo das equações de Bloch é encontrado no artigo de Hinshaw[2] e no trabalho de Bonagamba[3].

I.5 Relaxação

Após um pulso de 90° ($\pi/2$), por exemplo, a magnetização de equilíbrio $M_0\boldsymbol{k}$ sofre dois importantes processos enquanto retorna à orientação de equilíbrio: a relaxação da componente transversal $\boldsymbol{M_T} = M_x\boldsymbol{i} + M_y\boldsymbol{j}$, chamada *relaxação transversal* (com tempo característico T_2), e a relaxação da componente longitudinal $\boldsymbol{M_L} = M_z\boldsymbol{k}$, chamada *relaxação longitudinal* (com tempo característico T_1).

A constante T_1, também chamada de *tempo de relaxação "spin-rede"*, é quem governa a evolução de $\boldsymbol{M_L}$ de volta ao valor de equilíbrio M_0. O processo físico envolvido nesta relaxação é a dissipação de energia do conjunto de núcleos, o *"sistema de spins"*, no meio atômico e molecular do núcleo, a *"rede"*.

A constante T_2, também chamada de *tempo de relaxação "spin-spin"*, é quem governa a evolução de M_T, levando de volta ao seu valor de equilíbrio zero. Os processos físicos que ocorrem neste caso são devidos ao acoplamento magnético entre os núcleos vizinhos, além daqueles que ocorrem na relaxação longitudinal. A **FIG.I.8** é bem ilustrativa na representação dessas relaxações ao mostrar como se comportam os momentos magnéticos após serem excitados, passo a passo, até voltarem a condição de equilíbrio.

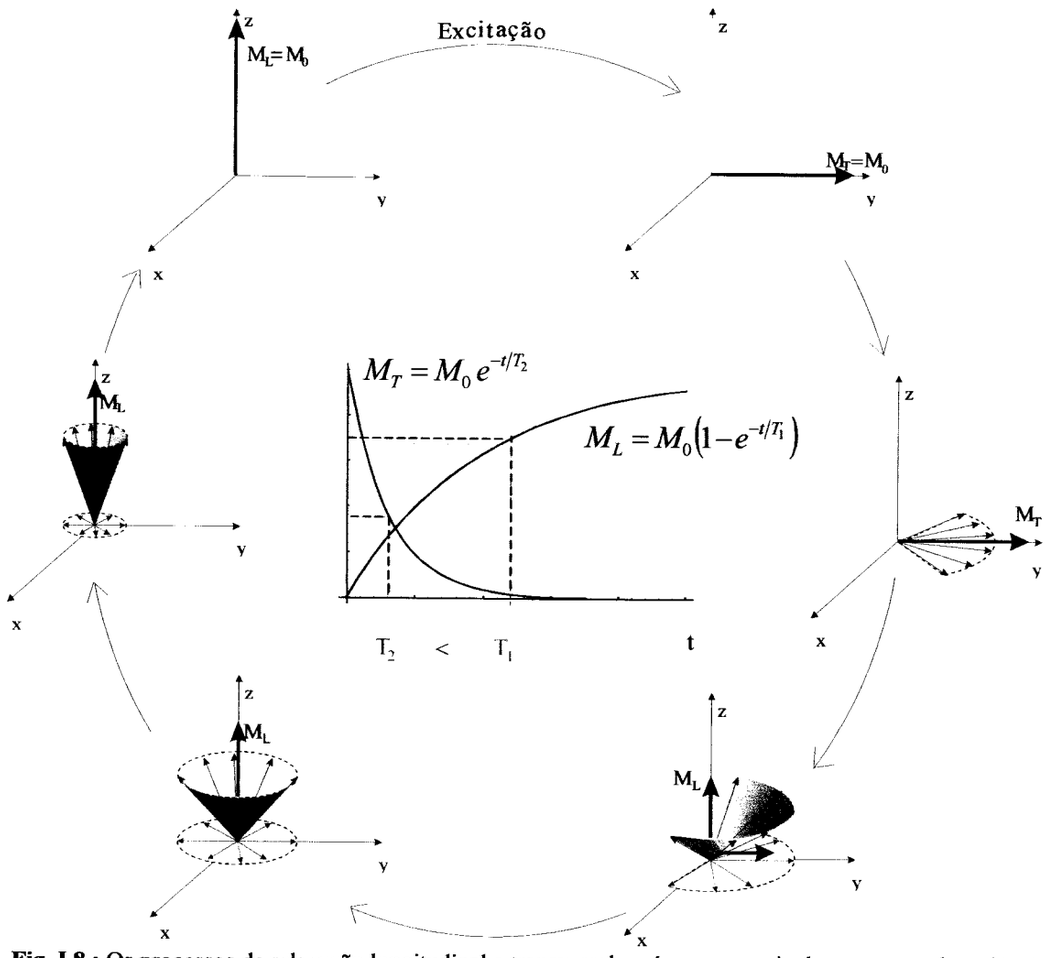

Fig. I.8 : Os processos de relaxação longitudinal e transversal, após serem excitados por um pulso $\pi/2$, até voltarem a sua condição de equilíbrio.

O assunto de *NMR* está muito bem discutido em vários livros e trabalhos publicados. Para os interessados no assunto que desejarem iniciar sua formação nesta área, algumas publicações servem como introdução ao assunto[4, 5]. Já os que buscam os procedimentos mais rigorosos e desejam se aprofundar na literatura, as publicações de Slichter[6] e Abragam[7] são básicos nos fundamentos de *NMR*, as de Morris[8] e Mansfield[9] , mais

voltados para a aplicação em imagens por *NMR* (*MRI*) e Callagham[10], mais atual e com aplicação em micro-imagens por *NMR* (*μMRI*). Para a parte de instrumentação em *NMR* a publicação de Fukushima[11] é uma excelente introdução, e uma outra publicação mais recente, de Jin[12], tratando da análise e *design* de bobinas de *RF* e de gradientes. Algumas outras referências sobre diversas aplicações[3, 13-25] das técnicas de *NMR*, realizadas pelo Grupo de Imagens por RMN do IFSC-USP, também estão relacionadas para mostrar a multidisciplinaridade e importância da ressonância magnética nuclear como área de estudo.

Cap. II - Princípios de Espectroscopia Localizada (^{1}H *MRS*) e Imagens por Ressonância Magnética (*MRI*)

Este capítulo completa, juntamente com o anterior, a parte básica necessária para o entendimento da obtenção e geração de espectroscopia localizada e imagens por ressonância magnética.

II.1 A codificação da posição por gradientes de campo magnético

Como já foi visto anteriormente na equação de Larmor, o núcleo possui uma dependência direta entre a sua freqüência de precessão e o campo magnético. Caso o campo magnético aplicado na amostra varie de uma posição para a outra, obteremos também uma variação local da freqüência de precessão, que é a chave para se fazer a codificação espacial dos núcleos nas imagens por *NMR*, como representado pela expressão:

$$\omega(\boldsymbol{r},t) = \gamma(B_0 + \boldsymbol{G}\cdot\boldsymbol{r}). \qquad [24]$$

Assim, superpondo ao campo estático $\boldsymbol{B_0}$ outros campos magnéticos, na mesma direção de $\boldsymbol{B_0}$, mas variando linearmente de uma posição para outra no espaço, isto é, um gradiente de campo magnético. As amplitudes constantes destes gradientes de campo nas direções-*x*, -*y* e -*z* são dadas por:

$$G_x = \frac{\partial B_z}{\partial x} \;;\; G_y = \frac{\partial B_z}{\partial y} \;\; e \;\; G_z = \frac{\partial B_z}{\partial z}. \qquad [25]$$

Fazendo com que o campo resultante tenha a dependência desejada:

$$B(\boldsymbol{r}) = B_0 + \boldsymbol{G}\cdot\boldsymbol{r}. \qquad [26]$$

Os perfis de campo desejados nas três direções estão ilustrados na **FIG.II.1**.

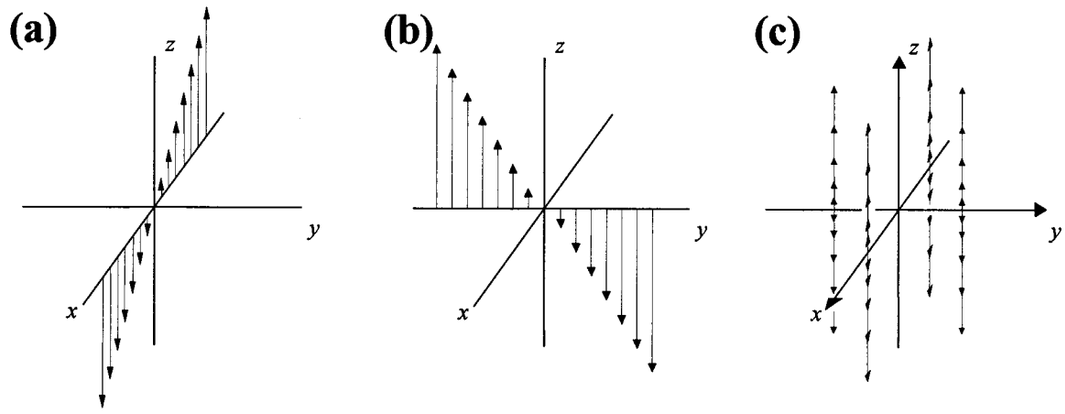

Fig. II.1 : Perfis dos campos de gradientes: G_x **(a)**, G_y **(b)** e G_z **(c)**.

Na espectroscopia convencional o que se obtém é a informação espectral, não havendo a necessidade de aplicação de gradientes, salvo em alguns casos, como por exemplo a supressão de solvente. Já na espectroscopia localizada a aplicação deste conjunto de gradientes se torna imprescindível, pois torna-se necessário a localização espacial. Neste caso, assim como é utilizada em *MRI*, é realizada uma variação espacial da freqüência de ressonância, permitindo assim excitar seletivamente uma região limitada da amostra.

II.2 Seleção de planos

A aquisição de volumes por espectroscopia localizada utiliza-se de técnicas de excitação seletiva. O método de excitação seletiva consiste no alargamento da linha de absorção dos *spins* nucleares devido ao gradiente de campo magnético e na aplicação em conjunto de um pulso de *RF* de largura espectral mais estreita que a largura de linha de absorção, dividindo assim o objeto em fatias. Nos casos não seletivos a largura espectral do pulso de *RF* é mais larga que a linha de absorção.

Um exemplo clássico é o de três tubinhos localizados ao longo do eixo-*z* mostrado na **FIG.II.2**, onde cada um deles está relacionado a uma freqüência característica de acordo com a sua posição, mostrando os casos seletivo e não seletivo.

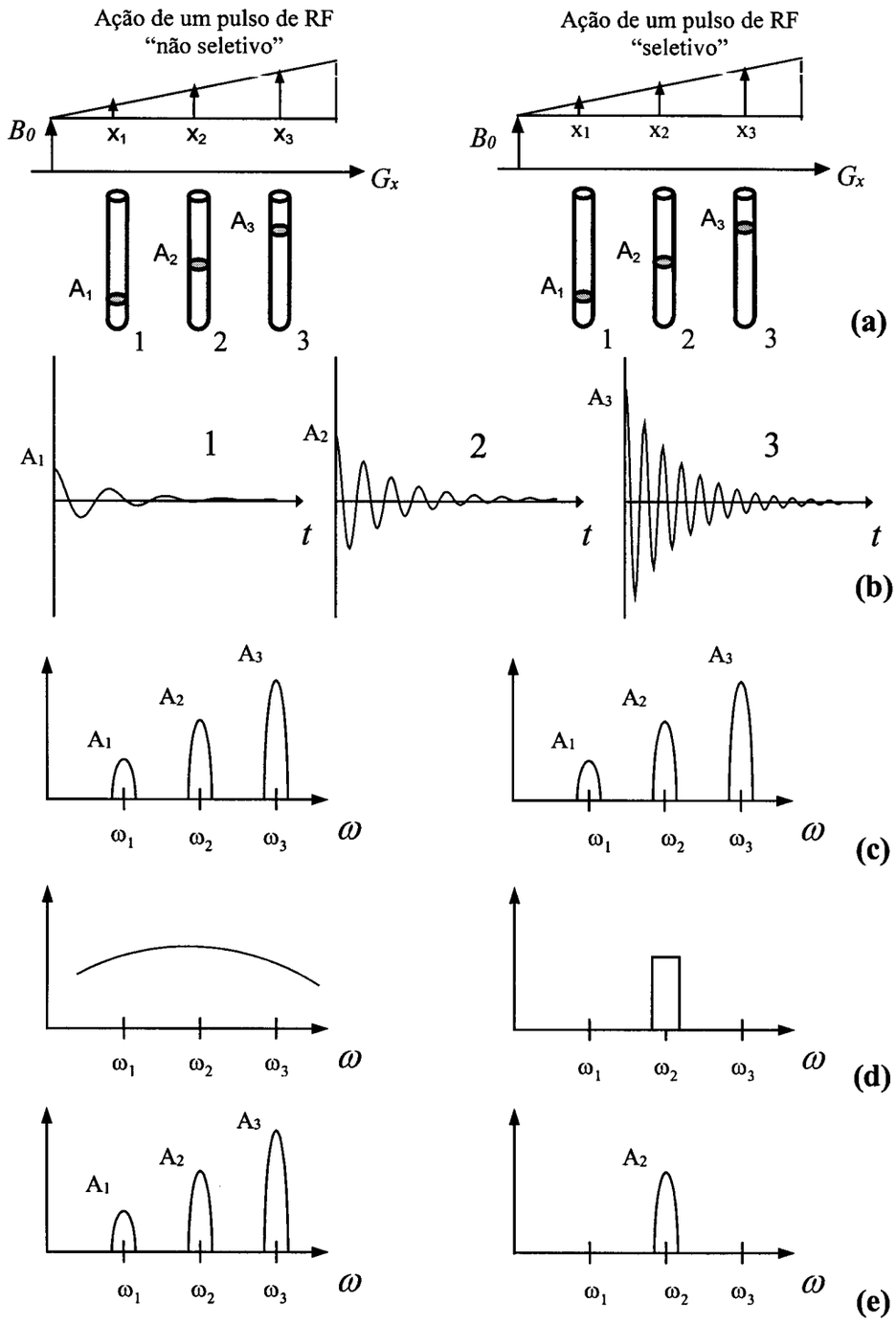

Fig. II.2 : Experiência dos três tubinhos: excitação seletiva. Os tubos possuem diferentes quantidades de água e estão posicionados ao longo de uma coordenada **(a)**. Cada um dos tubos respondem a excitação com *FIDs* distintos, podendo ser observadas duas coisas: a diferença da amplitude do sinal, evidenciando a densidade de núcleos, e a diferença de freqüência, que distingue as diferentes posições dos tubos **(b)**. A representação da densidade de *spins* de acordo com a posição **(c)**. Os espectros de freqüência de um pulso seletivo a direita e um não seletivo a esquerda **(d)** onde se observa como a amostra respondeu as duas excitações **(e)**.

Com a aplicação de um pulso de *RF* modulado em amplitude, apenas os *spins* cuja freqüência de precessão esteja contida nesta região do espectro serão excitados. As imperfeições que ocorrem no perfil de excitação estão relacionadas a efeitos de não linearidade dos *spins* e a escolhas de funções de truncamento inadequadas na modulação do pulso de *RF*, podendo ser toleradas, mas limitam a excitação. No **CAP.III** serão discutidas vantagens da aplicação de pulsos de *RF* adiabáticos, que são modulados em amplitude e freqüência e que foram utilizados neste trabalho.

Uma função muito usada na modulação de *RF* é a *sinc* (sin(x)/x) truncada, mostrada na **FIG.II.3**, onde a forma do perfil de excitação – pulso de 90° – (ou inversão – pulso de180° –) é relacionado à *Transformada de Fourier* (*TF*) desta função (obviamente não levando-se em conta o papel da resposta não-linear dos *spins*, descartado aqui por motivos de simplificação). A largura do plano selecionado é definida pela largura à meia altura do perfil de excitação (ou inversão; levando-se em conta a não linearidade essas duas larguras serão diferentes entre si).

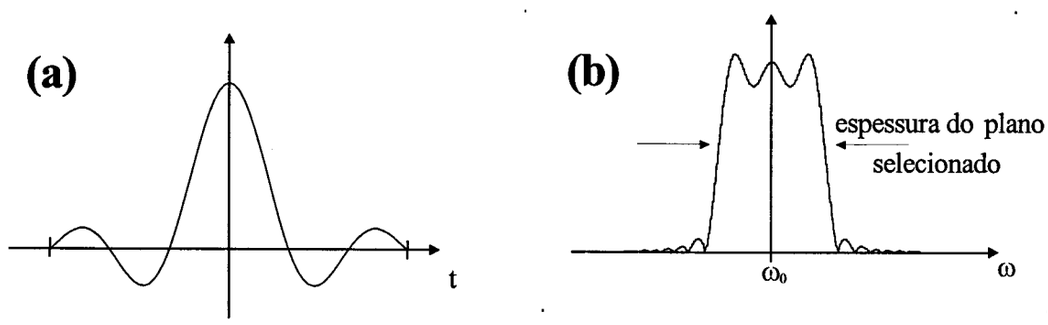

Fig. II.3 : O pulso seletivo tipo sinc truncado **(a)**, e seu espectro de freqüências, centrado na freqüência de ressonância ω_0 **(b)**.

A espessura do plano selecionado da imagem é expressa por:

$$\Delta z = \frac{\Delta\omega_p}{\gamma G_z}, \qquad [27]$$

onde $\Delta\omega_p$ é a largura da banda de excitação (inversão) do pulso de *RF* e Δz é a largura do plano excitado (ou invertido), mostrando que esta depende tanto da intensidade do gradiente, como da largura da banda do pulso de *RF*.

Como o tempo t_p do pulso de excitação de *RF* é longo, os *spins* começam a se espalhar na presença do gradiente de seleção antes de alcançarem o plano transversal, havendo um acúmulo de fase geralmente proporcional à metade da área da forma de onda do

pulso de gradiente e com isso levando a perda de sinal. Isto pode ser corrigido com a aplicação de um segundo gradiente, invertido e com metade da área do primeiro, chamado de gradiente de refocalização, que deve ser aplicado logo após o pulso de excitação, como visto na **FIG.II.4**. Este mesmo procedimento não é necessário na inversão. Observando que toda essa argumentação se invalida se for considerado o estado de movimento dos *spins*, na forma de fluxo ou difusão. Neste caso, o acúmulo de fase não pode ser recuperado simplesmente com o argumento da área sob a forma de onda dos gradientes.

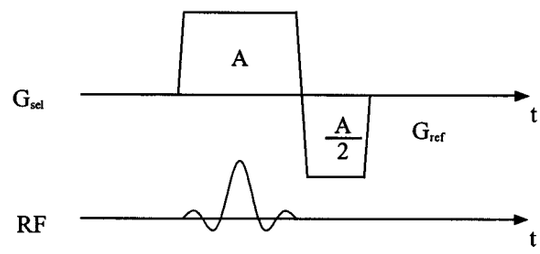

Fig. II.4 : A defasagem dos *spins* durante o pulso de *RF* é compensada com o gradiente de refocalização. A área do gradiente de refocalização deve ser a metade da área do gradiente de seleção.

Convém lembrar novamente que o perfil do pulso de excitação e inversão diferem devido à não linearidade da resposta do sistema de *spins*, como é indicado nas equações de Bloch.

Em espectroscopia de volume localizado são aplicados três pulsos seletivos, numa combinação de pulsos de excitação e de inversão, dependendo da técnica utilizada. Isso será mais detalhadamente discutido no **CAP.IV**.

II.3 Eco de *spins*

O que será mostrado a seguir é o caso convencional de obtenção de um eco de *spins*, que será extrapolado no **CAP.IV** para o caso da espectroscopia localizada. Foi observado até agora o sinal de *FID* dos *spins*, no caso unidimensional. Com a aplicação de um gradiente de preparação (G_{prep}) seguido de um pulso de inversão, observa-se o sinal chamado de eco de *spins*, cuja seqüência de aquisição está mostrada na **FIG.II.5**.

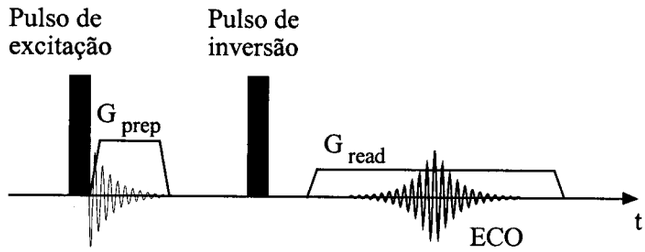

Fig. II.5 : Obtenção do sinal de um eco.

Após a aplicação de um pulso de excitação, a magnetização é conduzida ao eixo-*y'*, seguido da aplicação do gradiente de preparação, espalhando os momentos magnéticos no plano transversal. Com um pulso de π, os *spins* são invertidos em torno do eixo-*x'* sendo refocalizados na direção-(–*y'*) durante a aplicação de um gradiente de leitura, tornando a se espalhar novamente no plano transversal. O sinal obtido desta seqüência descrita acima, que está ilustrada na **FIG.II.6**, tem a forma de um sinal simétrico, contendo a mesma informação do *FID*.

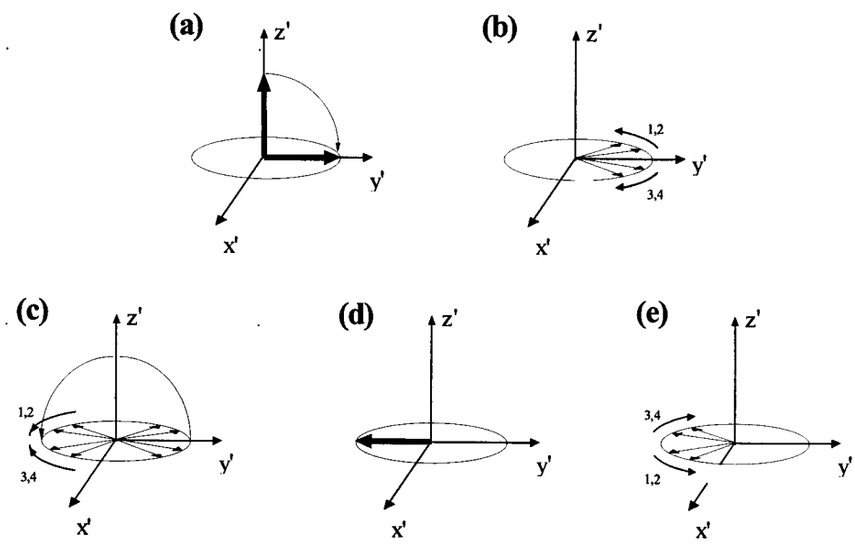

Fig. II.6 : Formação de um eco: após ser aplicado um pulso de 90° **(a)**, os *spins* se espalham no plano transversal **(b)**, em seguida é aplicado um pulso de inversão (180°) **(c)**, refocalizando os *spins* no lado oposto **(d)**, e novamente os *spins* se espalham, em sentido contrário **(e)**.

As três próximas seções explicam como é realizada uma imagem bidimensional, sendo necessária a sua inclusão apenas por terem sido realizadas imagens através da seqüência *MSSE* (*Multi Slice Spin-Echo*, há uma figura com a planilha desta seqüência no

CAP.VI, FIG.VI.4). Estas imagens serviram como posicionadoras na localização espacial dos volumes, nos quais foram obtidas as informações espectrais.

II.4 Codificação de freqüência: imagem unidimensional

Como foi observado no exemplo da **FIG.II.2**, os três tubinhos tem relacionados a cada posição em que se encontram uma freqüência característica, a de precessão dos *spins* contidos em cada um deles. Da mesma maneira podemos tratar um objeto finito colocado ao longo de um gradiente chamado de gradiente de leitura, como na **FIG.II.7**.

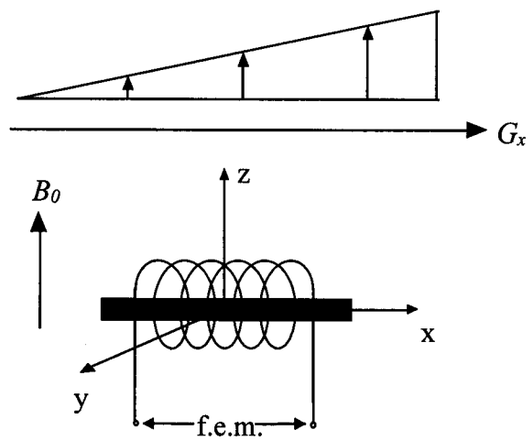

Fig. II.7 : A variação espacial do gradiente de campo magnético permite que seja feita a codificação unidimensional do objeto.

Considerando a sua magnetização de equilíbrio M_0 no eixo-z na presença de um gradiente G_x $\boldsymbol{x}$, ao ser aplicado um pulso de $\pi/2$, esta é deslocada para o plano-$x'y'$ *transversal*, onde os *spins* de um elemento de volume dx localizado em x possuirão uma magnetização transversal dada por:

$$dm = M_o e^{i\omega t} e^{-t/T_2} dx. \qquad [28]$$

O sinal resultante desse elemento de volume, usando a **Eq.** *[24]*, será:

$$M(t) \propto \int_x M_0(x) e^{i\gamma(B_0+G_x x)t} e^{-t/T_2}\, dx. \qquad [29]$$

Considerando a **Eq.** *[29]* no sistema de coordenadas girante, M_0 nulo fora da amostra, o termo constante $e^{i\cdot\gamma B_o t}$ sendo agregado a um fator de proporcionalidade e assim estender os limites de $-\infty$ a $+\infty$, esta pode ser reescrita da forma:

$$M_G(t) \propto \int_{-\infty}^{+\infty} M_0(x) e^{i\gamma G_x x t} e^{-t/T_2}\, dx. \qquad [30]$$

Considerando T_2 constante (independente da posição) podemos retirar da integral o termo que o contém e como estamos interessados na dependência espacial da magnetização, define-se uma nova variável $k(t)= \gamma Gt$, que expressa o espaço do domínio das freqüências espaciais, e neste caso a **Eq.** *[30]* torna-se:

$$M_G(t) \Rightarrow S(k(t)) \propto e^{-k(t)/\gamma G T_2} \int_{-\infty}^{+\infty} M_0(x) e^{ik(t)x}\, dx. \qquad [31]$$

Desprezando os fatores de proporcionalidade, a **Eq.** *[31]* pode ser escrita como o produto de duas funções:

$$W(k(t)) = e^{-\frac{k(t)}{\gamma G T_2}} \;\; ; \;\; G(k(t)) = \int_{-\infty}^{\infty} M_0(x) e^{ik(t)x}\, dx. \qquad [32]$$

Onde $G(k)$ é a *TF* inversa de $M_0(x)$, que é onde está contida a informação desejada. Mas o sinal adquirido é $S(k)$ e para recuperar a informação da magnetização transversal deve-se fazer a *TF* da **Eq.** *[31]* em relação a variável k:

$$\Im\{S(k)\} = \Im\{W(k)\cdot G(k)\} = \Im\{W(k)\} \otimes \Im\{G(k)\}. \qquad [33]$$

Definindo $P(x) = \Im\{W(k)\}$ e sabendo que $M_0(x) = \Im\{G(k)\}$, a expressão para a transformada de $S(k)$ é dada por:

$$\Im\{S(k)\} = P(x) \otimes M_0(x). \qquad [34]$$

Onde a *TF* do sinal é a convolução entre as funções $P(x)$ e $M_0(x)$, onde $M_0(x)$ representa a imagem da distribuição das magnetizações ao longo da amostra. E a *TF* de $W(k)$, $P(x)$, é denominada "*Point Spread Function*"*(PSF)* e causa uma indeterminação no perfil da imagem, devido ao termo e^{-t/T_2} na **Eq.** *[31]*. Como a *TF* de uma função exponencial resulta numa função do tipo Lorentziana, a *PSF* é expressa por:

$$P(x) \propto \frac{1}{1-(\gamma G T_2)^2 x^2} \;\; ; \;\; \Delta x = \frac{1}{\gamma G T_2}, \qquad [35]$$

onde Δx é definida como a largura de linha média.

IFSC-USP SERVIÇO DE BIBLIOTECA INFORMAÇÃO

O tamanho mínimo dos pontos da imagem (*pixels*) é dado por Δx. Este limita a resolução dos perfis da imagem e com isso a perfeição com que o objeto será representado. Por causa das propriedades da *TF*, há uma relação entre o tamanho do *pixel*, ou da distância entre eles, na imagem resultante, δx, e a máxima freqüência espacial contida no sinal amostrado, k_{max}, representada por $\delta x = 1/k_{max}$.

Numa aquisição de imagens onde o valor máximo de k, k_{max}, é determinado pelo tempo máximo de observação, t_{max}, sob a aplicação de um gradiente G como mostra a expressão:

$$\delta x = \frac{1}{k_{máx}} \Rightarrow \delta x = \frac{1}{\gamma G t_{máx}}, \qquad [36]$$

devendo satisfazer a condição:

$$\delta x >> \Delta x \Rightarrow \frac{1}{\gamma G t_{máx}} >> \frac{1}{\gamma G T_2} \Rightarrow t_{máx} << T_2 \qquad [37]$$

onde dois *pixels* serão distinguíveis, como mostrado na **FIG.II.8**, apenas se a separação entre eles, δx, for maior que o seu comprimento, Δx, e para minimizar a influência da *PSF* é necessário que o tempo de aquisição da imagem, t_{max}, seja menor que o tempo de relaxação transversal, T_2, que é chamada de *condição de boa resolução*.

Fig. II.8 : A "*Point Spread Function* ", que determina a resolução da imagem.

Satisfeitas estas condições, a *PSF*, quando comparada a $M_0(x)$, se aproxima de uma função delta, e assim podemos considerar:

$$\begin{aligned} P(x) &\Rightarrow \delta(x) \\ M_0(x) &\Rightarrow \Im\{S(k)\}' \end{aligned} \qquad [38]$$

onde a imagem da magnetização pode ser considerada a *TF* do sinal $S(k)$:

$$M_G(t) \Rightarrow S(k(t)) \cong \int_{-\infty}^{+\infty} M_0(x) e^{ik(t)x}\, dx. \qquad [39]$$

A seguir será feito um breve comentário sobre a amostragem e resolução.

O intervalo de tempo entre duas amostragens é δt ("*dwell time*") e o número de pontos a ser amostrado é:

$$N_t = \frac{t_{máx}}{\delta t}. \qquad [40]$$

A parte da amostra, *FOV* ("*field of view*") — campo de visão, e δx, a resolução máxima permitida, a quantidade de pontos necessária para representar todo o *FOV* é:

$$N_x = \frac{FOV}{\delta x}. \qquad [41]$$

Estabelecendo-se a condição $N_x = N_t = N$, para que o *FOV* seja representado durante $t_{máx}$

$$FOV = N \cdot \delta x = \frac{1}{\gamma G \delta t}, \qquad [42]$$

onde podemos observar que o *FOV* é inversamente proporcional ao "*dwell time*" e a amplitude do gradiente, implicando que uma limitação na amplitude do gradiente, geralmente uma característica da fonte de gradientes, também é uma limitação no *FOV*.

II.5 Codificação de fase: imagem em mais de uma dimensão

Através da excitação seletiva, um plano tomográfico bem definido de uma região de interesse é obtido, onde é aplicada uma codificação das freqüências em uma direção, resultando em uma imagem unidimensional do plano. Assim, para obtermos uma imagem bidimensional é necessário que seja feita mais uma codificação espacial numa outra direção, com a aplicação de outro gradiente, o gradiente de codificação de fase.

A codificação nesta outra dimensão é obtida adicionando uma informação de fase ao sinal antes de codificá-lo em freqüência. Seja a direção-y deste gradiente de fase, após a aplicação por um tempo t_y a fase acumulada pelos *spins* é dada pela expressão:

$$\Phi(y) = \gamma (B_0 + G_y \cdot y) t_y. \qquad [43]$$

O tratamento para mais de uma dimensão é parecido com o que foi discutido na **Seç.II.3**, e será descrito a seguir.

IFSC-USP SERVIÇO DE BIBLIOTECA INFORMAÇÃO

Aplicando um gradiente ***G(t)***, o campo magnético e a freqüência associada numa posição ***r*** da amostra num instante *t* serão:

$$B(\boldsymbol{r},t) = B_0 + \boldsymbol{r}\cdot\boldsymbol{G}(t) \;\; ; \;\; \omega(\boldsymbol{r},t) = \omega_0 + \gamma\boldsymbol{r}\cdot\boldsymbol{G}(t). \qquad [44]$$

Se ***G(t)*** for aplicado durante um intervalo de tempo τ, a fase acumulada pelos spins será:

$$\Phi(\boldsymbol{r},t) = \int_0^{\tau}\omega(\boldsymbol{r},t)\,dt = \omega_0\tau + \gamma\boldsymbol{r}\cdot\int_0^{\tau}\boldsymbol{G}(t)\,dt. \qquad [45]$$

Redefinindo $\boldsymbol{k}(\tau)$ para:

$$\boldsymbol{k}(\tau) = \gamma\int_0^{\tau}\boldsymbol{G}(t)\,dt, \qquad [46]$$

no sistema de coordenadas girante a expressão para a fase acumulada é dada por:

$$\Phi(\boldsymbol{r},t) = \boldsymbol{r}\cdot\boldsymbol{k}(\tau). \qquad [47]$$

Considerando agora todos os passos que foram feitos da **Eq. [29]** a **Eq. [39]**, a expressão para este sinal será da forma:

$$S(\boldsymbol{k}(t)) = \int_V M_0(\boldsymbol{r})e^{i\boldsymbol{k}(t)\cdot\boldsymbol{r}}\,dv, \qquad [48]$$

onde ***S(k)*** e $M_0(\boldsymbol{r})$ estão relacionados por uma *TF*. Se ***S(k)*** for conhecida para pontos discretos do espaço-*k*, então ***M(r)*** também poderá ser conhecida no espaço direto, através de uma inversa da *TF rápida discreta* (*FFT*)[27]. Mas para que isso ocorra, é necessário que o domínio de ***S(k)*** seja varrido uniformemente e que as amostragem de ***S(k)*** sejam registradas num reticulado no espaço-*k*, com pontos igualmente espaçados.

Uma descrição dos eventos que ocorrem durante uma seqüência de aquisição no espaço-*k* é mostrada na **FIG.II.9**, onde o método escolhido é a *Transformada de Fourier Direta Bidimensional do Eco de Spin* (*SE-2DDFT*), cujos passos serão descritos abaixo.

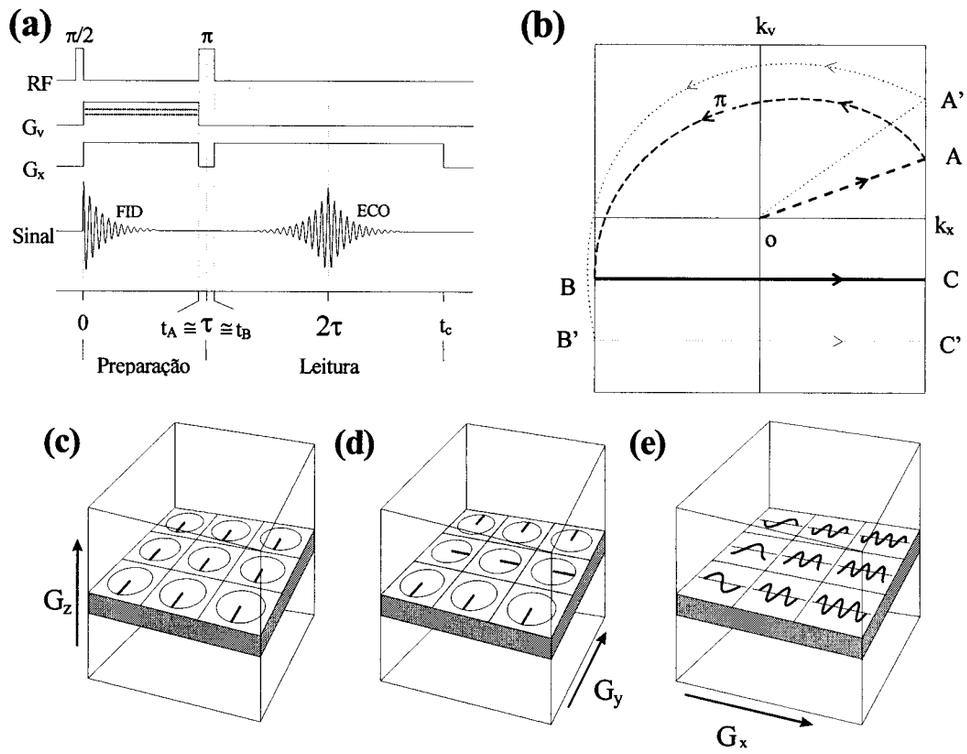

Fig. II.9 : A seqüência de pulsos utilizada na aquisição de sinais da fatia de um objeto para que seja feita a sua imagem **(a)**, mostrando a trajetória da magnetização dos *spins* no espaço-*k* **(b)**. Abaixo são mostradas as três etapas da aquisição: com o pulso seletivo de RF e a aplicação do gradiente G_z **(c)**, o gradiente de codificação de fase G_y **(d)** e o gradiente de codificação de freqüência G_x **(e)**.

Seja um plano do objeto que se queira fazer a imagem, o pulso seletivo de *RF* excitará somente esta região. Seguindo os passos:

A) O pulso de π/2 leva a magnetização da fatia selecionada para o plano transversal, onde os *spins* estarão em máxima coerência de fase, o que equivale a origem no espaço-*k*, como ilustrado na **FIG.II.9(b)**.

B) Em seguida ao pulso de *RF* são aplicados os gradientes de codificação de freqüência, G_x e de codificação de fase, G_y, fazendo com que a magnetização evolua sob a presença deles, percorrendo a trajetória $\overline{0A}$ no espaço-*k*, mostrada na **FIG.II.9(b)**, determinando qual linha será amostrada.

$$k_x = \gamma G_x \tau \;\; ; \;\; k_y = \gamma G_y \tau , \qquad [49]$$

acumulando uma fase durante este período dada por:

$$\boldsymbol{r} \cdot \boldsymbol{k}_A = \gamma y G_y \tau + \gamma x G_x \tau . \qquad [50]$$

C) Em seguida, um pulso de π inverte as componentes da magnetização, o que equivale a percorrer a trajetória $\overline{AB}$ no espaço-*k*.

$$k_x = -\gamma G_x \tau \;\; ; \;\; k_y = -\gamma G_y \tau . \qquad [51]$$

Após o pulso de π, a fase acumulada é dada por:

$$\boldsymbol{r} \cdot \boldsymbol{k}_B = -\gamma y G_y \tau - \gamma x G_x \tau . \qquad [52]$$

Nesse instante, a magnetização possui uma fase acumulada na direção-($-x$) e ($-y$), que depende da amplitude dos gradientes G_x e G_y e da duração τ. Essa fase acumulada representa a fase inicial para a codificação de fase.

D) Em $t = t_B$, sob a presença do gradiente de leitura, G_x, é feita simultaneamente a aquisição do sinal. Durante esta evolução, somente k_x dependerá do tempo, visto que não há gradiente aplicado na direção-y.

$$k_x(t) = -\gamma G_x \tau + \gamma G_x (t - \tau) \;\; ; \;\; k_y = -\gamma G_y \tau . \qquad [53]$$

A fase acumulada em um instante t é então dada por:

$$\Phi = -\gamma y G_y \tau - \gamma x G_x \tau + \gamma x G_x (t - \tau) . \qquad [54]$$

O sinal de *NMR* resultante é:

$$S(t) = \int_{x,y} M_T(x,y) e^{i[-\gamma y G_y \tau - \gamma x G_x \tau + \gamma x G_x (t-\tau)]} \, dxdy . \qquad [55]$$

Observa-se que o sinal de eco de spins tem um máximo em $t=2\tau$, onde estará com uma fase acumulada de $\gamma y G_y \tau$.

Deslocando a origem do tempo para o centro do eco, de modo que $t_x = t - 2\tau$, a fase acumulada escrita na **Eq.** *[54]* será dada por:

$$\Phi = -\gamma y G_y \tau + \gamma x G_x t_x \qquad -t_x < t < t_x \qquad [56]$$

Na aquisição deste eco é varrida uma linha do *espaço-k*, a trajetória $\overline{BC}$ mostrada na **FIG.II.9(b)**. Entretanto, a posição desta linha no eixo k_y é definida pela fase acumulada $\gamma y G_y \tau$, assim, se G_y variar outras linhas serão lidas, como mostrado na trajetória $\overline{0A'B'C'}$ da **FIG.II.9(b)**. Variando G_y em passos regulares num intervalo [$-G_{ymáx}$, $G_{ymáx}$], no espaço-k, obtém-se o sinal bidimensional da região amostrada, como está representado na expressão:

$$S(k_x, k_y) = \iint M(x,y) e^{i\gamma x G_x t_x - i\gamma y G_y \tau} \, dxdy = \iint M(x,y) e^{ixk_x - iyk_y} \, dxdy \qquad [57]$$

Fazendo a inversa da *TF* da **Eq.** *[57]* obtém-se a distribuição bidimensional da magnetização, *M(x,y)*, como está mostrado na **FIG.II.10**. Um detalhamento mais rigoroso de todo esse modelo apresentado nas últimas seções pode ser encontrado no trabalho de Tannús[13], onde é tratada a resolução e a influência do ruído no sinal, além de discussões sobre diversas técnicas de aquisição e reconstrução de imagens.

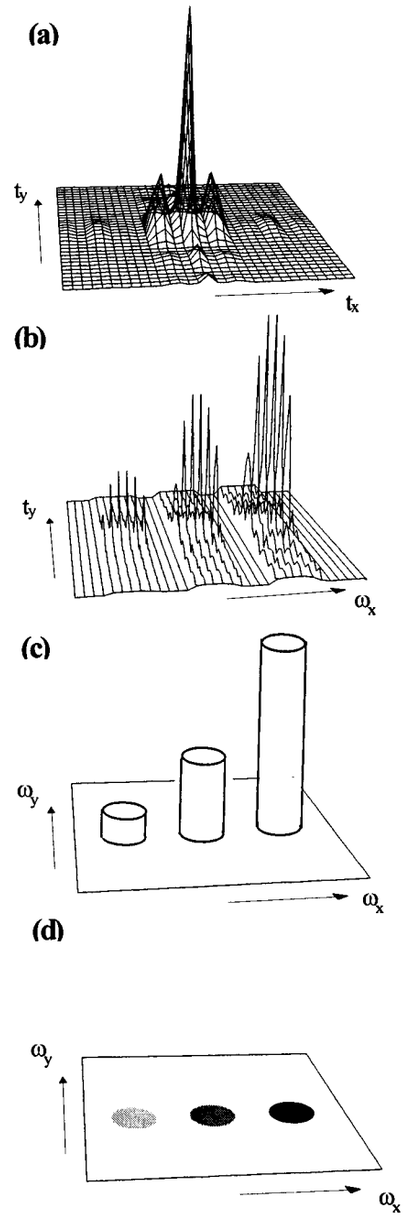

Fig. II.10 : Considerando o exemplo dos três tubinhos apresentados na **Fig. II.2**, a imagem bidimensional deles, codificando em freqüência (direção x) e fase(direção y) , sem gradiente de seleção: matriz de dados adquiridos no tempo **(a)**, a matriz depois da *Transformada de Fourier* na direção da codificação de freqüência **(b)** e a matriz depois das duas transformadas **(c)** e a imagem em tons de cinza (negativo) **(d)**.

II.6 Seqüências convencionais de imagens bidimensionais

Como foi observado na **Seç.II.5**, a obtenção de imagens é cercada de vários eventos que possuem uma ordem bem estabelecida e dependente do tempo, ou seja, são as chamadas "*seqüências*" que determinam como serão chaveados (disparados) os pulsos de *RF*, como serão aplicados os gradientes e quais deles, etc.

Uma seqüência muito usada é a chamada *Spin Echo (SE)*, que consiste de uma excitação seletiva seguida da codificação em fase e em freqüência. O diagrama desta seqüência está mostrado na **FIG.II.11**. Os tempos característicos desta seqüência são: o tempo entre a excitação e o pico do eco de *spins*, chamado de *tempo ao eco* (*TE*), e o tempo entre duas excitações consecutivas, chamado de *tempo de repetição* (*TR*).

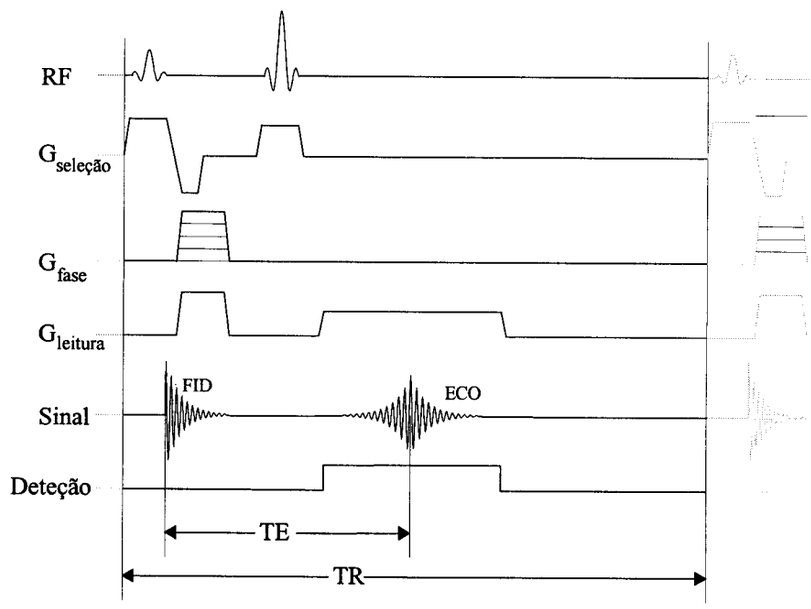

Fig. II.11 : Seqüência de pulsos da técnica de *"Spin Echo"* (*SE*).

II.7 Contraste em *NMR*: efeitos de T_1 e T_2

As imagens por *NMR* além de mapear as densidades de determinados núcleos atômicos numa amostra também possuem outros fatores que fazem com que estes sejam diferenciados sob determinadas circunstâncias, de acordo com alterações na sua estrutura química no momento da imagem. Isto se deve ao fato de que diferentes estruturas possuem uma distinção significativa dos valores dos tempo de relaxação T_1 e T_2, e no caso de

patologias, nos tecidos do corpo humano, de animais e de frutas e vegetais estes valores são longamente modificados. Isso provoca grandes contrastes na imagem, bem visíveis quando comparamos um tecido normal com outro que sofre de alguma patologia ou função. Essa diferença no contraste depende da seqüência que é utilizada e dos tempos utilizados nos parâmetros (*TE* e *TR*). Nas explicações desses processos[4] que seguem logo abaixo foi utilizada a seqüência *SE*.

O contraste por T_1 é obtido da forma: se os *spins* nas duas regiões da amostra possuem tempos de T_1 diferenciados, $T_{1A} > T_{1B}$, e se utiliza um *tempo de repetição* muito longo ($TR > T_{1A}$ e T_{1B}), a magnetização de ambas regiões terão tempo de recuperar e voltar a sua posição de equilíbrio, e parecerão iguais a cada aquisição, não apresentando contraste na imagem. Mas se reduzirmos o TR, de maneira que este seja mais curto que T_{1A} mas que continue longo em relação a T_{1B} ($T_{1A} > TR > T_{1B}$), obteremos um grande sinal da magnetização na região **B** e muito pouco na região **A**, isto porque a *magnetização longitudinal* M_L não teve tempo de recuperar o seu valor de equilíbrio e por isso a redução no brilho na imagem da região **A**.

O contraste por T_2 é bem parecido: novamente considerando-se as duas regiões anteriores da amostra, com tempos de T_2 diferenciados, $T_{2A} > T_{2B}$, e utilizando um tempo TR longo o suficiente para que ambos recuperem M_L totalmente entre cada excitação. Se utilizar um *tempo ao eco* mais curto que ambos ($TE < T_{2A}$ e T_{2B}), as contribuições das duas regiões será a mesmo porque a *magnetização transversal* M_T teve pouco tempo para decair. Mas se ajustarmos TE tal que seja mais curto que T_{2B} e mais longo que T_{2B} ($T_{2A} > TE > T_{2B}$), então o sinal da M_T da região **B** já terá decaído e enquanto o sinal da região **A** ainda prevalece, reduzindo o brilho da região **B**. Os dois exemplos estão ilustrados na **FIG.II.12**.

No contraste por densidade, procura-se minimizar os efeitos de T_1 e T_2 na amplitude do sinal, que é alcançado fazendo o tempo de repetição longo e o tempo ao eco curto. Um estudo detalhado sobre o contraste em *MRI* pode ser encontrado no trabalho de Foerster[15] e em outros dois artigos bem atuais na aplicação em frutas e em soluções de açúcares[28, 29].

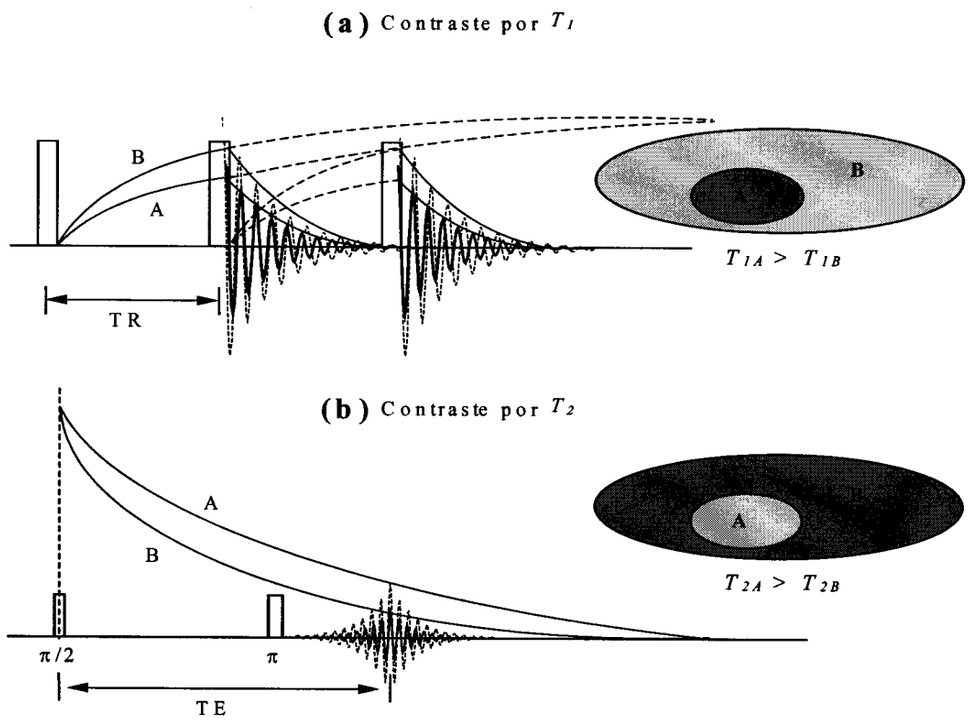

Fig. II.12 : Os processos de relaxação de duas amostras, através dos quais são obtidas as diferenças nos contrastes por: T_1 **(a)** e T_2 **(b)**.

II.8 Deslocamento químico (*chemical shift*)

A freqüência de ressonância de um núcleo é determinada não só pela intensidade do campo magnético externo aplicado, mas pelo campo "local" experimentado pelo núcleo em nível atômico. Núcleos atômicos de diferentes tecidos possuem diferentes freqüências de ressonância, dependendo da natureza da molécula na qual eles se encontram.

O fenômeno ocorre da seguinte forma: ao expor a molécula à um campo magnético, os elétrons das camadas mais externas circulam de tal forma que geram um campo magnético secundário induzido. Este campo magnético induzido pode se opor (ou reforçar) ao campo aplicado, diminuindo (ou aumentando) assim este último:

$$B = B_0 - \sigma B_0 = (1-\sigma) B_0 \quad , \qquad [58]$$

onde σ (um tensor) é a constante de blindagem.

Como o núcleo experimenta um campo local menor (ou maior) é dito que ele está "blindado" (ou "desblindado"). É esta diferença entre freqüências dos núcleos que se dá o nome de deslocamento químico:

$$\omega = (1-\sigma)\, \gamma B_0 \, , \qquad [59]$$

Como a magnitude do deslocamento químico será proporcional ao campo externo aplicado, ele pode ser expresso como uma fração deste campo. E uma maneira conveniente de se expressar o deslocamento químico é através de uma constante independente da intensidade do campo magnético e do campo de *RF* aplicados. Assim, dividindo por uma freqüência de uma substância que tomamos como sendo a referência (ω_o), obtemos:

$$\delta = (\omega_o - \omega) / \omega_o \text{ [ppm]}, \qquad [60]$$

que é da ordem de grandeza de 10^{-6}, ou seja, de ppm, **FIG.II.13**. Este deslocamento químico pode ser expresso em termos de Hertz ou ppm (partes por milhão), o que significa que para um campo magnético alto (B_0) teremos espectros mais resolvidos, ou seja, com sinais mais afastados uns dos outros, do que para baixos campos — e mais estreitos, caso uma ótima homogeneização do campo magnético B_0 for alcançada. Neste trabalho que está sendo apresentado, o campo magnético utilizado foi de 2 Tesla, com ressonância do ^{1}H de 85 MHz (1 ppm = 85 Hz), e comparando com outros campos: 0.5 T, 21.25 MHz (1 ppm = 21.25 Hz); 1 T, 42.5 MHz (1 ppm = 42.5 Hz); 4T, 170 MHz (1 ppm = 170 Hz); 7 T, 297.5 MHz (1 ppm = 297.5 Hz); 9.4 T, 399.5 MHz (1 ppm = 399.5 Hz). Lembrando ainda que para cada núcleo em específico, ou situação (*in vivo* ou *in vitro*), é costume utilizar um solvente apropriado como referência. Neste trabalho de ^{1}H *MRS* em frutas, utiliza-se o próprio sinal da água como referência, como apresentado no **CAP. VII** dos resultados, por uma imposição do instrumental, mas são apresentados como na literatura (por exemplo, com o *TMS* como referência, ficando a água em 4,7ppm).

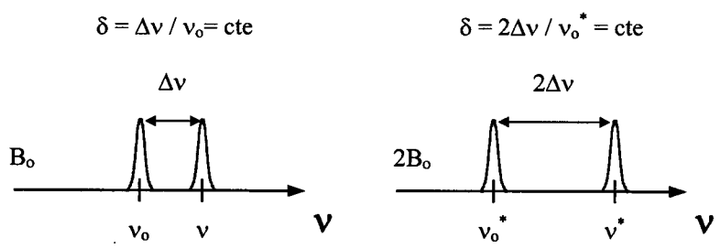

Fig. II.13 : Comportamento do deslocamento químico devido a aplicação de dois campos magnéticos com intensidades distintas.

Há ainda outros efeitos que podem influenciar a freqüência de ressonância: o acoplamento dipolar, a interação quadrupolar e o acoplamento spin-spin, que estão bem descritos em livros[6, 30]. Será comentado com mais detalhes na próxima seção o último efeito, também conhecido como acoplamento-J, por ser relevante para este trabalho.

II.9 Acoplamento-J

Este efeito é também conhecido como acoplamento *spin-spin* ou acoplamento escalar, observável em campo magnético alto. A ele se refere a interação de dois *spins* nucleares de uma mesma molécula por meio de "distorções" em suas respectivas nuvens de elétrons. A interação de acoplamento-J é a responsável pelo surgimento desta estrutura fina, que causa o desdobramento da linha espectral (em dubletos, ..., multipletos), observados em compostos químicos em espectroscopia de alta resolução por *NMR*. O acoplamento-J indiretamente modula o sinal de *NMR* de muitas macromoléculas, sendo este efeito enfatizado quando se utiliza *TE* muito maiores que 30ms.

Cap. III - Pulsos Adiabáticos

Neste capítulo serão introduzido os princípios de pulsos adiabáticos, que serão utilizados na implementação das seqüências híbridas de espectroscopia localizada, assunto do próximo capítulo.

III.1 Aspectos gerais

Pulsos de *RF* com modulação em amplitude e freqüência, chamados pulsos adiabáticos, encontraram ampla aplicação em imagens e espectroscopia de alta resolução por *NMR*. Muitos anos após a proposição inicial do fenômeno de Ressonância Magnética Nuclear[26, 31], contudo, a forma como esses pulsos atuam no sistema de *spins* ainda está por ser totalmente compreendida. Um desses problemas consistia na análise da resposta da magnetização a pulsos de *RF* de banda larga, aplicados na presença de gradientes de campo magnético estáticos, cujas tentativas de solução utilizando-se pulsos compostos (*composite pulses*, seqüências de pulsos retangulares e estreitos, com amplitude e fase moduladas) haviam sido propostas[32-34] desde 1983, sem muito sucesso. Esse problema, entre outros, foi abordado por pesquisadores de nosso grupo e colaboradores, e culminou com o desenvolvimento dos pulsos com adiabaticidade independente do *offset* de freqüência (*Offset Independent Adiabaticity - OIA pulses*), cuja teoria e primeiras aplicações encontram-se descritos no trabalho de Tannús[35]. Este trabalho abriu várias perspectivas de aplicação de pulsos adiabáticos em novas metodologias de imagens e espectroscopia de *NMR*. Alguns dessas propostas[36-41] já se encontram parcialmente testadas.

III.2 Princípios de pulsos adiabáticos

Serão desenvolvidos aqui alguns dos princípios básicos e o formalismo utilizado na descrição dos pulsos de *RF* adiabáticos.

Uma descrição clássica desse fenômeno pode ser entendida considerando-se as componentes dos campos magnéticos e da magnetização $\boldsymbol{M}$ num referencial que gira com freqüência igual à freqüência instantânea do pulso de *RF*, $\omega_{RF}(t)$. Este sistema de referência é por convenção chamado de sistema de freqüência modulada (*FM frame*), com eixos x', y' e z'. Nesse sistema de referência, a direção do vetor campo magnético de *RF* $\boldsymbol{B}_1(t)$ permanece fixa durante um pulso adiabático (consideramos aqui o caso em que a passagem adiabática rápida é feita mediante a variação da freqüência da *RF*, e não do campo magnético principal).

Quando a freqüência do pulso é diferente da freqüência de Larmor ω_0, uma componente de campo magnético aparece ao longo do eixo longitudinal z', com amplitude $\Delta\omega/\gamma$, onde $\Delta\omega = \omega_0 - \omega_{RF}$. Exemplos de funções de modulação de amplitude, $B_1(t)$, e freqüência, $\Delta\omega(t)$, para passagens adiabáticas podem ser vistas na **FIG.III.1** (*adiabatic half passage, AHP* e *adiabatic full passage, AFP*), e na **Seç.III.2.2** trataremos da função secante hiperbólica. .

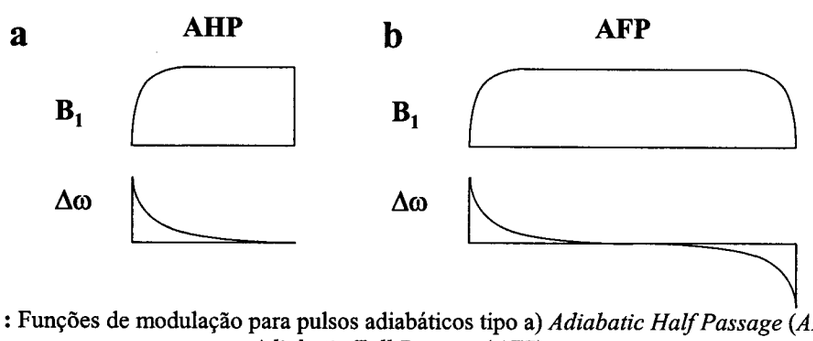

Fig. III.1 : Funções de modulação para pulsos adiabáticos tipo a) *Adiabatic Half Passage* (*AHP*) e b) *Adiabatic Full Passage* (*AFP*).

No sistema *FM* visto na **FIG.III.2(a)**, o campo efetivo $\boldsymbol{B}_{eff}(t)$ instantâneo é a soma vetorial das componentes de campo longitudinal e transversal, $\Delta\omega/\gamma$ e $\boldsymbol{B}_1(t)$. Num pulso adiabático, ω_{RF} depende do tempo, e portanto $\boldsymbol{B}_{eff}(t)$ muda de orientação com uma velocidade angular instantânea dada por $d\alpha/dt$, onde

$$\alpha(t) = \arctan\left[\frac{\gamma B_1(t)}{\Delta\omega(t)}\right] \qquad [61]$$

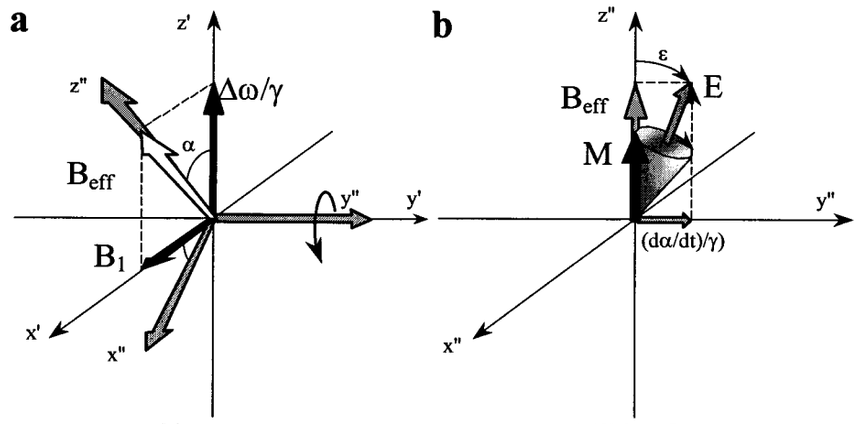

Fig. III.2 : Sistemas referenciais girantes a) *FM*; b) B_{eff}.

No início do pulso, $\omega_{RF} << \omega_0$, e $\Delta\omega$ está em seu valor máximo ($\Delta\omega_{max}$). Nessa condição, $\Delta\omega/\gamma$ é muito maior que B_1; segue portanto, que a orientação inicial de $\boldsymbol{B}_{eff}$ é aproximadamente paralela a z'. À medida que $\omega_{RF}(t)$ aumenta, $\Delta\omega(t)$ diminui para zero e $\boldsymbol{B}_{eff}$ tomba para o plano transversal. Quando $\omega_{RF}(t) = \omega_0$, $\boldsymbol{B}_{eff}$ coincide com $\boldsymbol{B}_1$. Esse ponto equivale ao fim de uma *AHP* (pulso de 90°). Uma *AFP* é conseguida se continuarmos a variar a freqüência através da condição de ressonância, na direção de $-\Delta\omega_{max}$, fazendo com que, no final, a orientação de $\boldsymbol{B}_{eff}$ se dá ao longo de -z'. Durante o pulso adiabático, $\boldsymbol{M}$ segue $\boldsymbol{B}_{eff}(t)$, desde que a condição de adiabaticidade, $|\gamma B_{eff}(t)| >> |d\alpha/dt|$, seja satisfeita para todos os tempos durante o pulso.

III.2.1 Sistemas girantes *FM* e de B_{eff}

Não é possível entender porque $\boldsymbol{M}$ segue $\boldsymbol{B}_{eff}(t)$ durante um pulso adiabático, restringindo a análise apenas ao referencial de *FM*. Introduzimos aqui um segundo sistema de referência que gira solidário a $\boldsymbol{B}_{eff}(t)$, chamado "sistema B_{eff}" (ou segundo sistema referencial girante), com eixos definidos como x", y" e z". A **FIG.III.2(a)** mostra a relação entre os sistemas girantes de *FM* e de B_{eff} durante um pulso adiabático. Inicialmente, os dois sistemas estão superpostos. Durante o pulso, o sistema B_{eff} muda sua orientação com relação ao sistema *FM* com uma freqüência $d\alpha/dt$, e $\boldsymbol{B}_{eff}$ permanece paralelo a z". Ao fim do pulso, os dois sistemas estão relacionados por um ângulo que é o ângulo total de excursão de $\boldsymbol{B}_{eff}$ (efetivamente o ângulo de *flip*). Na **FIG.III.2(b)** podemos observar a relação entre $\boldsymbol{M}$ e as componentes do campo magnético no sistema B_{eff}. A rotação de B_{eff} em torno do eixo y' resulta numa componente de campo magnético com intensidade instantânea $(d\alpha/dt)/\gamma$ ao

longo de y". Assim, no sistema B_{eff}, o campo magnético resultante $\boldsymbol{E}(t)$ será dado pela soma vetorial das componentes $\boldsymbol{B}_{eff}(t)$ e $\gamma^{-1}(d\alpha/dt)\,\hat{\mathbf{y}}''$. Façamos por simplicidade que $B_1(t)$ e $\Delta\omega(t)$ sejam funções que variam de forma a manter B_{eff} e $d\alpha/dt$ constantes. Neste caso, a evolução de $\boldsymbol{M}$ é simples, na forma de uma precessão em torno de $\boldsymbol{E}$ formando um cone com ângulo de vértice ε. Como se observa em **FIG.III.2(b)**, M nunca excursiona além de um ângulo 2ε de $\boldsymbol{B}_{eff}$, e portanto sua evolução fica restrita a um ângulo 2ε com $\boldsymbol{B}_{eff}$, no sistema FM. Quando a condição de adiabaticidade é plenamente satisfeita, ε é pequeno e $\boldsymbol{E}(t) \approx \boldsymbol{B}_{eff}(t)$. Além disso, para as componentes de $\boldsymbol{M}$ que eram inicialmente perpendiculares a $\boldsymbol{B}_{eff}(0)$, o ângulo entre essas componentes e $\boldsymbol{B}_{eff}(t)$ permanece dentro do intervalo 90°±ε (ou seja, essas componentes permanecem aproximadamente perpendiculares a $\boldsymbol{B}_{eff}(t)$).

O pulso clássico de *AFP* é insensível a variações espaciais na intensidade de B_1 apenas quando o ângulo total de rotação da magnetização é um múltiplo de 90°, desde que a orientação final de $\boldsymbol{B}_{eff}$ é insensível a variações de B_1 apenas quando o valor final de $|\Delta\omega(t)|$ é zero (como na *AHP*) ou é muito grande comparado ao valor final de $B_1(t)$ (como na *AFP*). Além do mais, pulsos adiabáticos são muito úteis apenas para a rotação de uma dada componente de $\boldsymbol{M}$ de uma orientação para outra, e não proporciona "rotações planas" como requerido por muitos experimentos. Por exemplo, para gerar um bom sinal de *spin echo*, o pulso de refocalização numa seqüência *SE* precisa girar as componentes de $\boldsymbol{M}$ no plano transversal em torno de um eixo de forma que seja invariante frente a mudanças em amplitude de ω_0 e B_1.

Apesar de uma *AFP* produzir em alguns casos um eco observável, as aplicações que a utilizam dão normalmente resultados ruins pelo fato de que a fase da magnetização resultante varia em função da amplitude de ω_0 e B_1. Como solução, foram criados pulsos compostos, que incorporam mudanças discretas de orientação de B_{eff} capazes de produzir rotações planas[42-48]. Além desses, pulsos que incorporam também mudanças de fase discretas e ajustáveis, entre os segmentos que os compõem, são capazes de produzir transformações na magnetização com qualquer ângulo de rotação, enquanto mantêm a insensibilidade a mudanças espaciais de B_1[45-47, 49]. Este último tipo de pulso é convenientemente chamado de "girador universal", fazendo com que qualquer componente de $\boldsymbol{M}$ perpendicular a um dado eixo de rotação seja girada do mesmo ângulo de *flip*, ajustável (rotação plana).

III.3 A função secante hiperbólica

Os pulsos adiabáticos são caracterizados por funções específicas de modulação em amplitude do campo magnético de *RF*, $B_1(t)$, e em freqüência, $\Delta\omega(t)$, da acordo com:

$$B_1(t) = B_{1\max} f_B(t)$$
$$\Delta\omega(t) = \Delta\omega_{\max} f_\omega(t) \qquad [62]$$

onde f_B e f_ω são funções de modulação unitárias e normalizadas. B_{1max} e $\Delta\omega_{max}$ são as amplitudes de modulação máximas de B_1 e $\Delta\omega$, respectivamente. A **FIG.III.3** mostra as modulações de $B_1(t)$ e $\Delta\omega(t)$ por f_B (t) = sech[β((2t/T)-1)] e f_ω (t) = tanh[β((2t/T)-1)], com t variando de 0 a T e β definindo os pontos de corte para as funções infinitas sech e tanh, onde este último também é escolhido tipicamente como sech(β) = 0,01 (1% de nível de corte). Esse par de funções de modulação definem um dos mais conhecidos pulsos adiabáticos, o pulso secante hiperbólica[32, 50, 51].

Os pulsos adiabáticos também podem ser implementados com a modulação em amplitude e fase, como é feito neste trabalho. A fase de B_1, ϕ(t), é calculada através da integral da modulação em freqüência da forma:

$$\phi(t) = \int_0^t \Delta\omega(t')dt' \qquad [63]$$

A modulação em fase do pulso secante hiperbólica também está mostrada na **FIG.III.3**.

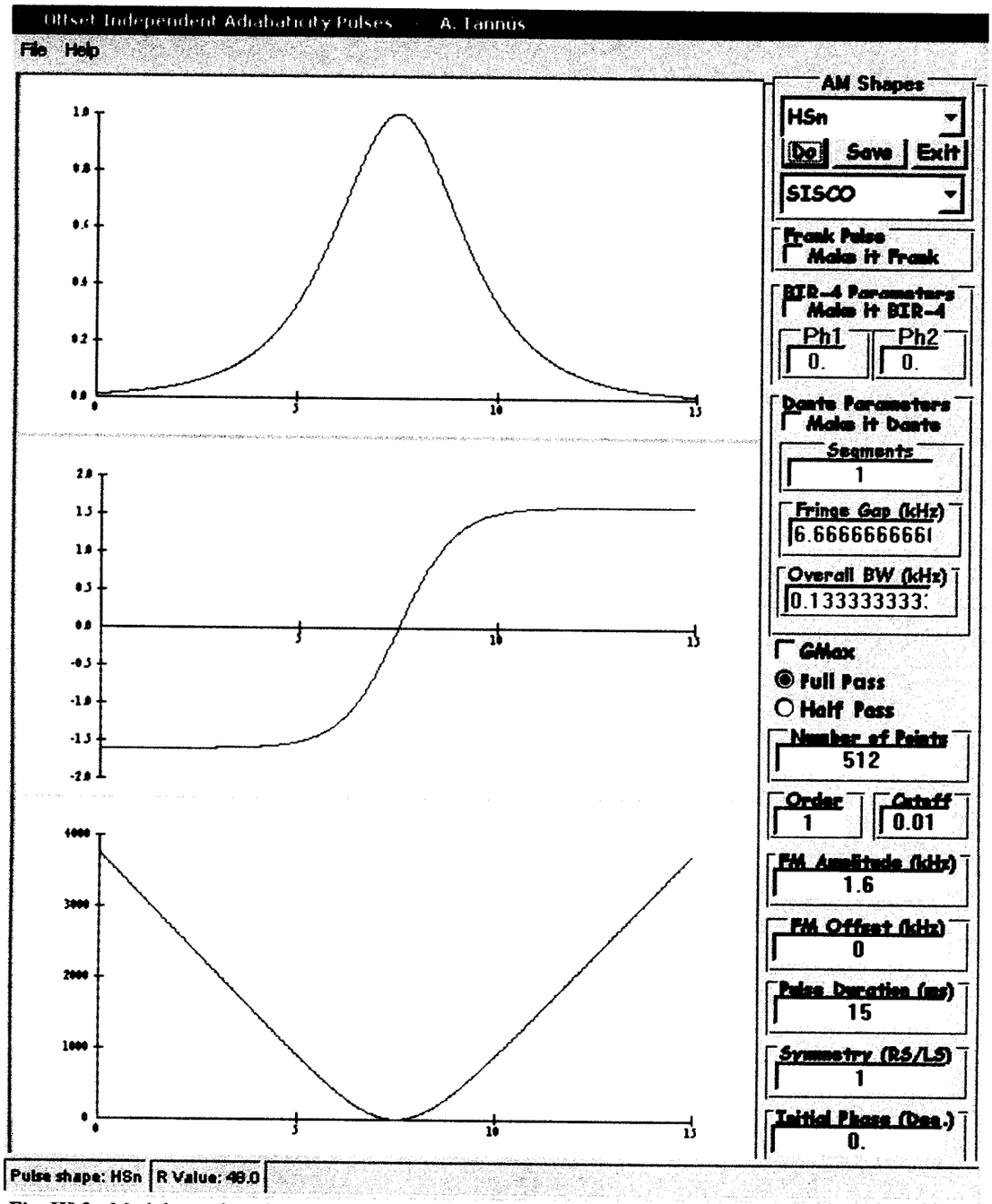

Fig. III.3 : Modulação do pulso secante hiperbólica de 15ms, com PB=1,6KHz e sem assimetria, na seqüência de cima para baixo são apresentadas as modulações: AM, FM e PM.

Cap. IV - Técnicas de Espectroscopia Localizada (^{1}H *MRS*)

Neste capítulo será feita uma exposição de algumas técnicas de espectroscopia localizada, restringindo às mais conhecidas e utilizadas (*PRESS* e *STEAM*). Serão discutidas quais as principais características de cada uma delas e em seguida será apresentada a metodologia *MEGA*, que será utilizada na supressão do sinal da água. Por fim é apresentado o diagrama das seqüências implementadas neste trabalho, mesclando as técnicas de localização e supressão, com esta última implementada com pulsos adiabáticos.

IV.1 Os principais métodos

A idéia por trás das aplicações de *MRS* é adquirir um espectro de deslocamento químico de um volume bem definido (*voxel*) localizado na amostra. Há duas classes de técnicas de localização que são bem distintas. Uma utiliza-se de gradientes em B_0 e a outra em B_1. As técnicas de localização fazem uso do princípio fundamental de que a rotação da magnetização $\boldsymbol{M}$ é proporcional à amplitude do campo magnético que atua sobre ela. As técnicas de localização baseadas em B_0 são as mais utilizadas, por serem mais fáceis de implementar. As baseadas em B_1 utilizam o perfil de sensibilidade das bobinas de *RF* para definir volumes, mas o controle da forma e do tamanho dos mesmos fica a cargo do próprio desenho da bobina, perdendo flexibilidade para os métodos de gradiente de B_0. As técnicas mais utilizadas dessa classe são a *PRESS*, *STEAM* e *ISIS*[52-60]. Nada será discutido aqui a respeito das técnicas que fazem uso de gradientes em B_1, mas suas bases estão bem estabelecidas na literatura[61-64].

Os métodos que permitem a aquisição de um espectro de um volume localizado são denominados na literatura de "métodos de um único *voxel*" (*"single voxel methods"*). São métodos baseados na bem conhecida técnica de seleção de fatia, apresentada no **CAP.II**, desenvolvida inicialmente para aplicações em *MRI*[65, 66]. Como anteriormente foi dito, a seleção de fatia é realizada com a aplicação de um pulso de *RF* na presença de um gradiente

de campo magnético em B_0, que codifica as freqüências de precessão ao longo do eixo espacial em que é aplicado. Este pulso de *RF* gera uma resposta apenas daqueles *spins* que estão dentro da sua banda de freqüências. Desta forma, o volume de um cubo é adquirido pela aplicação de três pulsos seletivos em freqüência (foram usados pulsos *sinc*) na presença de gradientes aplicados nas três diferentes orientações (x, y e z). Portanto, este método adquire um volume, que resulta de um sinal coerente, gerado apenas pelos *spins* que experimentaram os três pulsos, ou seja, os *spins* que se encontram na intersecção das três fatias selecionadas. A seguir serão discutidas as técnicas mais utilizadas dessa classe.

IV.1.1 A seqüência *PRESS*

A técnica de ***point resolved spectroscopy*** [52-56], mais conhecida pelo seu acrônimo *PRESS*, é apresentada no diagrama da **FIG.IV.1**. A *PRESS* é caracterizada pela presença de dois ecos de *spin*, devido a aplicação de dois pulsos de inversão (180°), sendo o primeiro eco formado pela aplicação de um pulso seletivo de 90°, excitando os *spins* de certa fatia em uma direção, seguido de um pulso seletivo de 180°, numa outra direção ortogonal à primeira, refocalizando-os. Nota-se que, até aqui, o sinal provêm da intersecção dos dois planos. Assim, para a localização de um volume é necessária a aplicação de um terceiro pulso seletivo de 180°, numa direção ortogonal às duas primeiras. Finalmente, apenas os *spins* que sofreram ação das três excitações é que contribuirão para o sinal.

Sinais espúrios, que podem aparecer devidos às três excitações, são tratados como uma contaminação do sinal do volume localizado e devem ser suprimidos. Para que isso ocorra são necessárias as aplicações de pulsos de gradientes (*spoilers*), colocados simetricamente e flanqueados aos gradientes usados na seleção de fatias pelos pulsos de inversão (180°), e devem também possuir áreas iguais. Há uma perda de coerência de fase durante a aplicação do primeiro *spoiler* e logo após a inversão, há um ganho de coerência de fase pelo conjunto de *spins* invertidos selecionados, suprimindo assim os sinais indesejados. Assim, qualquer *FID* provocado por um ou dois pulsos de *RF* serão destruídos, e como foi dito anteriormente, somente o sinal do volume selecionado que resulta da aplicação dos três pulsos de *RF* é adquirido.

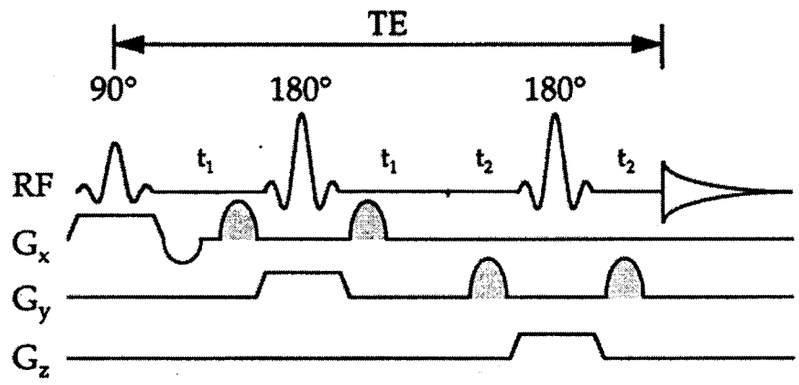

Fig. IV.1 : Diagrama da seqüência *PRESS*.

IV.1.2 A seqüência *STEAM*

Discutindo agora a técnica de ***stimulated echo acquisition mode***[57, 58], cujo acrônimo é conhecido por *STEAM*, mostrando seu diagrama na **FIG.IV.2**, na forma geral como é utilizada em espectroscopia de volume localizado. A *STEAM* é caracterizada pela formação de um eco de *spin* estimulado, devido à aplicação de três pulsos de seleção (90°) nas três direções ortogonais (x, y e z). O primeiro pulso seletivo de 90° excita os *spins* de certa fatia em uma direção, levando a magnetização ao plano transversal durante um tempo TE/2. O segundo pulso seletivo de 90°, numa outra direção ortogonal à primeira, retorna a magnetização transversal à direção longitudinal, permanecendo assim durante um tempo de mistura, TM. Por fim, o terceiro pulso seletivo de 90°, numa direção ortogonal às duas primeiras, que gera o eco estimulado após um intervalo de tempo TE/2.

Novamente temos a presença de sinais espúrios, que aparecem devidos às três excitações, contaminando o sinal do volume localizado, que devem ser suprimidos. Assim, são aplicados nas três direções pulsos de gradientes (*spoilers*) durante os intervalos de tempo TE/2 e TM. No primeiro intervalo de tempo TE/2, os *spoilers* servem para preparar a magnetização de forma que o sinal do eco estimulado seja refocalizado para a aquisição. No segundo intervalo de tempo TE/2, os *spoilers* servem para eliminar o *FID* do último pulso de RF. Os conjuntos de *spoilers* nas duas partes devem possuir áreas iguais. A aplicação de três *spoilers* longos no intervalo de tempo TM, serve para eliminar ecos de *spins* que podem ser gerados pelo segundo e terceiro pulso de *RF*.

Com relação as intensidades adquiridas nas mesmas condições, a *PRESS* teoricamente[67] alcança um valor duas vezes maior que a *STEAM*, por esta adquirir um eco

estimulado, mas essa diferença não deve ser totalmente alcançada por causa dos perfis de excitação e inversão serem diferentes, onde o perfil de inversão é ligeiramente menor que o de excitação.

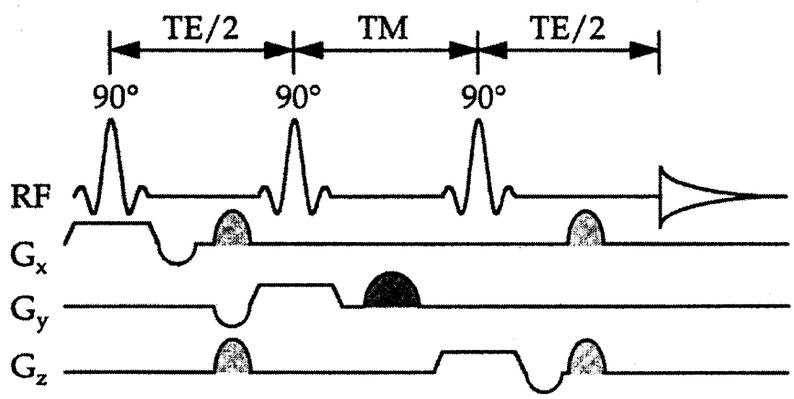

Fig. IV.2 : Diagrama da seqüência *STEAM*.

IV.2 Supressão de solvente

Várias metodologias de supressão de solvente têm sido desenvolvidas e apresentadas na literatura[37, 68-76]. Na tentativa de observar sinais extremamente fracos (da ordem de 10^5 vezes menores) e próximos do pico da água (~1 ppm) é necessário realizar uma supressão eficiente deste sinal indesejado, ou pelo menos reduzir a amplitude ao mesmo nível do sinal dos metabólitos de interesse. Aqui também podemos dividir em duas classes as metodologias de supressão: aquelas que utilizam pulsos seletivos em freqüência[37, 74-76] e aquelas que destroem a magnetização longitudinal da água antes da excitação da amostra[68-73]. Aqui podemos citar como as mais conhecidas do primeiro grupo a *WATERGATE*[74, 75], *MEGA*[37] e *Excitation Sculpting*[76], e do segundo grupo, a mais conhecida e aplicada é a *CHESS*[68, 69]. A seguir será apresentada a metodologia *MEGA*.

IV.2.1 A seqüência *MEGA*

A técnica chamada *MEGA*[37] está na categoria de pulsos seletivos em freqüência, refocalizantes, flanqueados por pulsos de gradientes que defasam magnetizações transversais indesejadas, isto é, não as refocalizando. A vantagem da *MEGA* com relação às outras técnicas semelhantes, por exemplo, a *excitation sculpting*, é que os sinais fora da banda de supressão são refocalizados com apenas um único pulso, ou seja, os sinais de interesse são

refocalizados com um único eco. Esta é uma técnica que pode ser inserida em qualquer seqüência que apresente um eco de spin, como a *PRESS*, ou um eco estimulado, como a *STEAM*. O diagrama da *MEGA* inserida numa seqüência de *Spin-Echo* é mostrado na **FIG.IV.3**. A análise da técnica *MEGA* será apresentada logo abaixo, mas agora será necessário utilizar o formalismo quântico, deixado de lado no **CAP.I**.

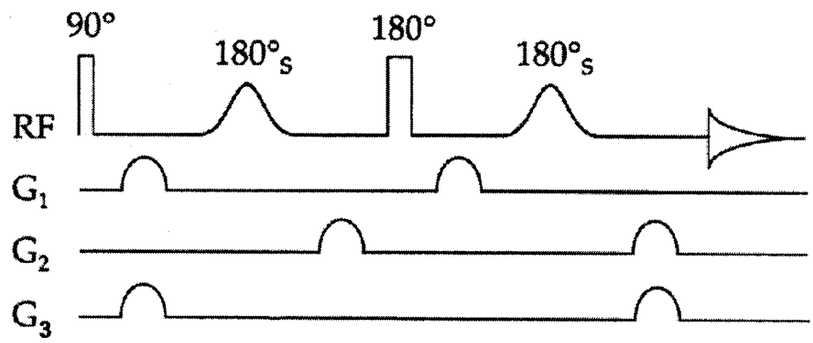

Fig. IV.3 : Diagrama da seqüência *MEGA* inserida numa *SE* convencional.

Representando por S a transformação unitária causada por qualquer seqüência de pulsos:

$$S = \exp(-i\beta I_Z)\exp(-i\theta I_Y)\exp(-i\alpha I_X)\exp(i\theta I_Y)\exp(i\beta I_Z), \qquad [64]$$

onde α é o ângulo de *flip* resultante sobre um eixo efetivo de rotação descrito pelo ângulo de fase β e o ângulo azimutal θ. O deslocamento de fase, com dependência espacial, induzido por um gradiente pode ser descrito por

$$G_j = \exp(-i\phi_j I_Z), \qquad [65]$$

onde o índice j (j = 1,2,3) especifica um dos eixos de gradiente ortogonais. Para a melhor performance, *MEGA* requer gradientes em três eixos, mas poderia funcionar com apenas um ou dois. O propagador completo que descreve a seqüência logo após ser aplicado um pulso de 90° é

$$U = G_X S_S G_Y G_Z S_{NS} G_Z G_X S_S G_Y, \qquad [66]$$

onde S_s e S_{ns} representam pulsos seletivos e não seletivos, respectivamente. A magnetização final pode então ser calculada por

$$M_v = \left(\frac{1}{2\pi}\right)^3 \iiint_{2\pi} Tr\{I_v U\sigma(0)U^*\} d\phi_x d\phi_y d\phi_z \qquad [67]$$

IFSC-USP SERVIÇO DE BIBLIOTECA INFORMAÇÃO

onde $\nu = x$, y ou z e a matriz densidade $\sigma(0) = \boldsymbol{m}\cdot\boldsymbol{I}$ representa a magnetização em $t = 0$, imediatamente após ser aplicado um pulso de 90°. A integração da equação anterior resulta nos elementos necessários para se construir a matriz rotação 3X3

$$R = \begin{bmatrix} ab\cos(2\beta_{ns}) & ab\sin(2\beta_{ns}) & 0 \\ ab\sin(2\beta_{ns}) & -ab\cos(2\beta_{ns}) & 0 \\ 0 & 0 & cd \end{bmatrix} \qquad [68]$$

onde

$$\begin{aligned} a &= 1/4\left[1+\cos(\alpha_s)\cos^2(\theta_s)+\sin^2(\theta_s)\right]^2 = \left[1-\cos^2(\theta_s)\sin^2(\alpha_s/2)\right]^2 \\ b &= 1/2\left[1-\cos(\alpha_{ns})\cos^2(\theta_{ns})-\sin^2(\theta_{ns})\right]^2 = \cos^2(\theta_{ns})\sin^2(\alpha_{ns}/2) \\ c &= \left(\cos(\alpha_s)\cos^2(\theta_s)+\sin^2(\theta_s)\right)^2 \\ d &= \cos(\alpha_{ns})\cos^2(\theta_{ns})+\sin^2(\theta_{ns}) \end{aligned} \qquad [69]$$

A matriz **R** descreve a transformação do vetor magnetização inicial $\boldsymbol{m}$ para o vetor final $\boldsymbol{M}$ de acordo com $\boldsymbol{M} = \mathbf{R}\ \boldsymbol{m}$. Quando a fase do pulso não seletivo (β_{ns}) é constante, **R** é diagonalizada por um deslocamento de fase final de $-2\beta_{ns}$, que pode ser alcançado como parte de uma correção de fase de ordem zero usual, aplicada ao espectro. Alternativamente, quando $\beta_{ns} = 0°$, **R** é simplificada em

$$R = \begin{bmatrix} ab & 0 & 0 \\ 0 & -ab & 0 \\ 0 & 0 & cd \end{bmatrix} \qquad [70]$$

Visualizando assim, observamos que *MEGA* evita qualquer interconexão entre a magnetização longitudinal e transversal, e a fase da magnetização transversal permanece invariante, apesar de mudanças no *offset* de ressonância e nos ângulos de *flip*.

O perfil de supressão da *MEGA* é determinado pelos perfis de inversão dos pulsos de RF na seqüência. Quando um pulso de RF é flanqueado por pulsos de gradiente, o perfil de inversão é dado pelo elemento de matriz

$$T(3,3) = \cos(\alpha)\cos^2(\theta)+\sin^2(\theta) \qquad [71]$$

Da equação anterior, a probabilidade de inversão é

$$\begin{aligned} P &= 1/2\left[1-\cos(\alpha)\cos^2(\theta)-\sin^2(\theta)\right] = \\ &= \cos^2(\theta)\sin^2(\alpha/2) \end{aligned} \qquad [72]$$

ou de outra forma, a probabilidade de que a magnetização longitudinal não seja afetada pelo pulso é

$$Q = 1/2\left[1 + \cos(\alpha)\cos^2(\theta) + \sin^2(\theta)\right] = \\ = 1 - \cos^2(\theta)\sin^2(\alpha/2) \qquad [73]$$

Substituindo todas as equações (6), (9) e (10) na equação (7), resulta em

$$R = \begin{bmatrix} P_{ns}Q_s^2 & 0 & 0 \\ 0 & -P_{ns}Q_s^2 & 0 \\ 0 & 0 & (1-2P_{ns})(1-2Q_s)^2 \end{bmatrix} \qquad [74]$$

O que mostra que o perfil de supressão da *MEGA* é unicamente dependente dos perfis de inversão dos pulsos seletivos e não seletivos. Supondo que o pulso não seletivo é ideal, a última equação, (11), prediz um sinal residual não suprimido proporcional a $\cos^4(\alpha_s/2)$, o que mostra uma alta tolerância a erros de ângulo de *flip*. A **FIG.IV.4** mostra sensibilidade aos erros de ângulo de *flip* dos pulsos seletivos, para *Watergate*, *Excitation Sculpting* e *MEGA*.

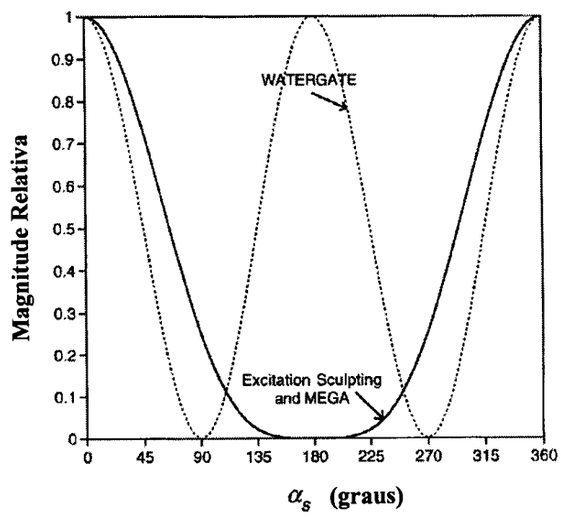

Fig. IV.4 : Sensibilidade aos erros de ângulo de *flip* para *Watergate*, *Excitation Sculpting* e *MEGA*.

IV.3 Seqüências híbridas

Nas seqüências *PRESS* e *STEAM* é inserida a metodologia de supressão de solvente *MEGA*[77], implementada com a utilização de pulsos adiabáticos assimétricos (a questão da assimetria está explicada mais adiante, na pg. 83), seletivos em freqüência (são os pulsos de inversão seletivos, 180^o_S, nos diagramas).

IV.3.1 Seqüência híbrida *MEGA-PRESS*

Como foi mencionado anteriormente na discussão sobre a metodologia *MEGA,* esta é uma técnica que pode ser inserida em qualquer seqüência que apresente um eco de spin, como a *PRESS.* O diagrama da *MEGA* inserida numa seqüência *PRESS* é mostrado na **FIG.IV.5**.

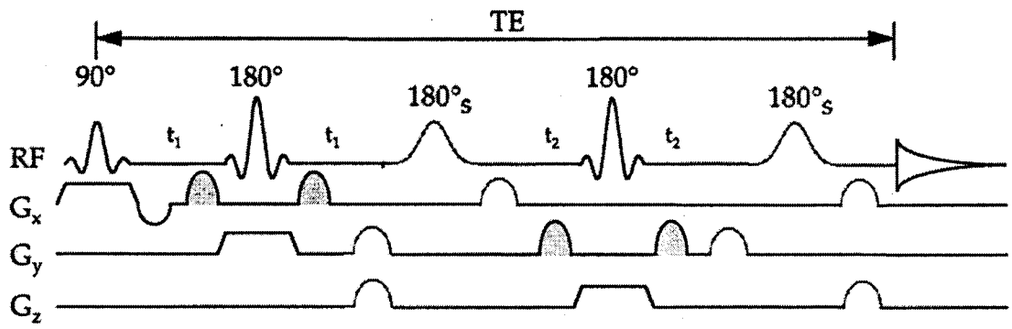

Fig. IV.5 : Diagrama da seqüência híbrida *MEGA-PRESS.*

IV.3.2 Seqüência híbrida *MEGA-STEAM*

Da mesma forma, a seqüência *MEGA* é inserida numa seqüência que apresenta um eco estimulado, como a *STEAM.* O diagrama da *MEGA* inserida numa seqüência *STEAM* é mostrado na **FIG.IV.6**.

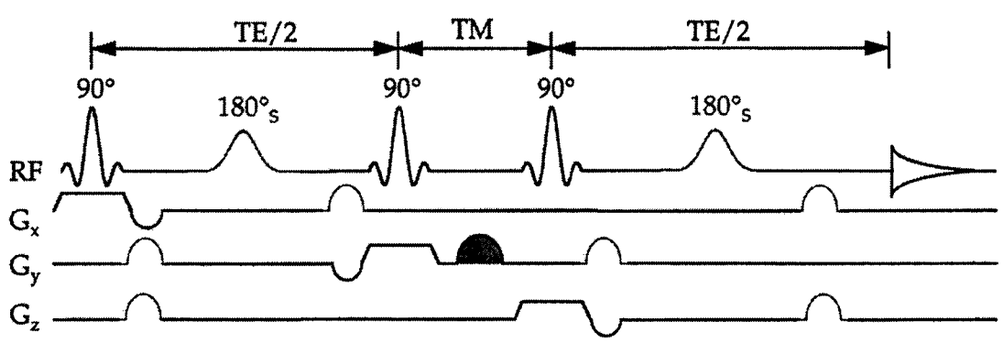

Fig. IV.6 : Diagrama da seqüência híbrida *MEGA-STEAM.*

Cap. V - Espectroscopia Localizada (^{1}H *MRS*) em Frutas

As aplicações da *NMR* em sistemas biológicos já possui um histórico extenso na literatura. Por se tratar de uma ferramenta de análise não invasiva, as aplicações da *NMR* em pessoas e animais são altamente indicadas e por isso são extremamente familiares. Contudo, por se tratar de um equipamento tão versátil, muitas outras de suas aplicações não são tão familiares, como a sua aplicação em muitos outros sistemas, como em plantas e frutas. Mesmo já com uma extensa literatura sobre o assunto, muito ainda é acrescentado em desenvolvimento e pesquisa em *NMR* na aplicação em vegetais, como por exemplo: as medidas das concentrações de metabólitos importantes no metabolismo vegetal, a identificação de componentes celulares, verificação de injúrias internas não visíveis ao olho nu, etc... e assim acumulando cada vez mais novos conhecimentos a respeito da fisiologia e histologia vegetal.

Desta forma, ainda que esses organismos sejam tratados pelos mesmos métodos que os utilizados em *NMR in vivo*, novas informações são extraídas destes novos estudos. A variedade de espécies — de diferentes formas e tamanhos, de habitat próprios, de processos metabólicos distintos e de alta sensibilidade quanto a pequenas alterações climáticas —, tornam-nas elementos de grande desafio científico no que se refere à profunda compreensão de todas essas nuances e de um potencial campo de estudo para as aplicações da *NMR*.

Sendo possível a utilização das diversas técnicas de *NMR* no estudo da fisiologia e da histologia das frutas, alguns inconvenientes muitas vezes estão presentes quando aplicada à espectroscopia por *NMR*. Primeiramente pode-se citar a baixa quantidade de água em algumas plantas e frutas, fato não tão problemático nestas últimas e em muitos casos, pelo contrário, escondendo uma quantidade enorme de material estrutural de possível interesse. Vale citar a existência de minúsculos espaços preenchidos com ar, que causam problemas, devidos as diferenças de suscetibilidade magnética, com a geração de gradientes magnéticos intensos nessas interfaces, como será mais discutido adiante, degradando o sinal de *NMR*. Também deve se prestar atenção para a atividade celular, com a existência de grandes

vacúolos centrais, que leva a uma baixa quantidade de proteínas e baixa atividade metabólica, destruindo em sua maioria possíveis sinais de metabólicos de grande interesse. Lembrando que, neste último caso, há uma demanda por um *hardware* mais apropriado para espectroscopia de altíssima resolução no estudo da citologia vegetal.

Aqui nesta revisão não serão comentadas algumas áreas de aplicação da *NMR* em vegetais, tais como a determinação estrutural de macromoléculas, a investigação qualitativa de anatomias por imagens por *NMR* (*MRI*) e nem a caracterização estrutural de subprodutos derivados das frutas e suas sínteses (compotas, sucos, geléias, doces, ...). Fica assim este trabalho focado nos estudos que têm por objetivo a tentativa de se observar frações de metabólitos de açúcares, que são extremamente importantes no processo fisiológico, ou seja, no metabolismo que causa a maturação das frutas.

A medida da concentração de sólidos solúveis de açúcares em frutas é considerado um atributo relacionado à qualidade das frutas, sendo, portanto, objeto de extensa pesquisa devido ao movimentado — em termos de capitais e produtos — e exigente mercado de horticulturas. Mensurar o que é qualidade pode ser algo um pouco abstrato, mas pode-se tentar padronizar certos parâmetros, tidos como relevantes para pessoas normais, de escolha de seu melhor produto. Uma pessoa faz uso de seus sentidos, e bom senso, no momento de escolher um fruto fresco e saudável tais como: seu aspecto, cheiro, paladar, toque e até pelo som, ou seja, ela promove uma integração destes sentidos no que se refere a encontrar um produto com a melhor aparência, aroma, sabor, maturação e firmeza. Instrumentos não-destrutivos que relacionam estes atributos de qualidade com a percepção sensorial das pessoas já são usados no auxílio dos produtores[78], e entre eles a *NMR* tem se firmado como uma ótima ferramenta para isso. As aplicações da *NMR* em horticulturas vão desde a verificação de distúrbios que envolvem a distribuição de água — via *MRS* ou *MRI* (acúmulo de água, injúrias por calor e por impacto, apodrecimento e presença de larvas ou ovos de insetos, ruptura das estruturas internas da fruta devido ao armazenamento por período superior ao indicado naturalmente para a fruta, ...) até a própria mensuração de seus constituintes — via *MRS* (em processos fisiológicos, como o metabolismo).

Neste caso, um processo extremamente relevante no metabolismo da fruta é a maturação, que deve indicar qual o melhor ponto para a colheita, quais as melhores condições para o seu armazenamento e, enfim, o melhor aspecto externo e interno para o seu consumo final.

V.1 O sinal de *NMR* em frutas

Como foi apresentado nos **CAP.I** e **CAP.II**, onde é comentado sobre os processos de relaxação, os sinais adquiridos dos tecidos das frutas são estudados considerando os mesmos parâmetros, seus tempos de relaxação característicos (T_1 e T_2)[28, 29]. O contratempo aqui é estabelecer qual o equipamento correto para o que se busca, neste caso, o estudo em frutas intactas de médio e pequeno porte. O equipamento disponível para este trabalho foi um magneto de 2T, com volume útil para a amostra de 8cm de diâmetro, por 10cm de comprimento. Maiores informações sobre toda instrumentação utilizada estão descritas no **CAP.VI**. As limitações encontradas serão discutidas no **CAP.VII** e nas **Conclusões**.

Como é o sinal de núcleos de hidrogênios, presentes na composição de substâncias, que é observado por ^{1}H *MRS* no estudo de vegetais (plantas, frutas, sementes, ...), este é detectado e resolvido espectralmente, indicando qual a composição molecular presente (lipídios, óleos aromáticos, solutos de açúcares e outros carbohidratos* em solução aquosa). Porém, há limitações e otimizações já conhecidas, e outras para serem desenvolvidas, a se considerar em todas as partes que compõe a *NMR*, como a instrumentação e o experimento em si: o *hardware*, os protocolos de aquisição na seqüência, a quantidade de cada substância e como elas estão deslocadas quimicamente; para que determinados sistemas possam ser estudados com sucesso por um experimento de ^{1}H *MRS*.

V.2 Primórdios da ^{1}H *MRS* em frutas

Ao longo do tempo as medidas de teores de açúcares foram realizadas de acordo com as técnicas disponíveis e suas implementações. Veja, por exemplo, um caso interessante na espectroscopia de alta resolução, que utilizou uma eficiente supressão denominada "controle seletivo" do solvente, no caso a água, (realizada em 270 MHz)[80], em que se baseia na adição de reagentes paramagnéticos ($MnCl_2$) em sucos (maçã e laranja) e leite, afetando o tempo de relaxação transversal (T_2) da água, como mostra a **FIG.V.1**.

---

* Reproduzido da revista eletrônica do Departamento de Química da UFSC[79]: "Os dicionários da língua portuguesa, tal como o Aurélio, escrevem "carboidratos", sem o "h". O editor do QMCWEB achou a forma "carbohidrato" mais correta, pois o nome vem da combinação "hidrato" + "carbono". O "h", neste caso, tem a mesma função desempenhada em palavras como "hidráulico" ou "hidroginástica". O "h", embora não pronunciado, denota a presença de um elemento químico - o hidrogênio. Para o editor do QMCWEB, os dicionários é que estão equivocados. Ainda, o termo em

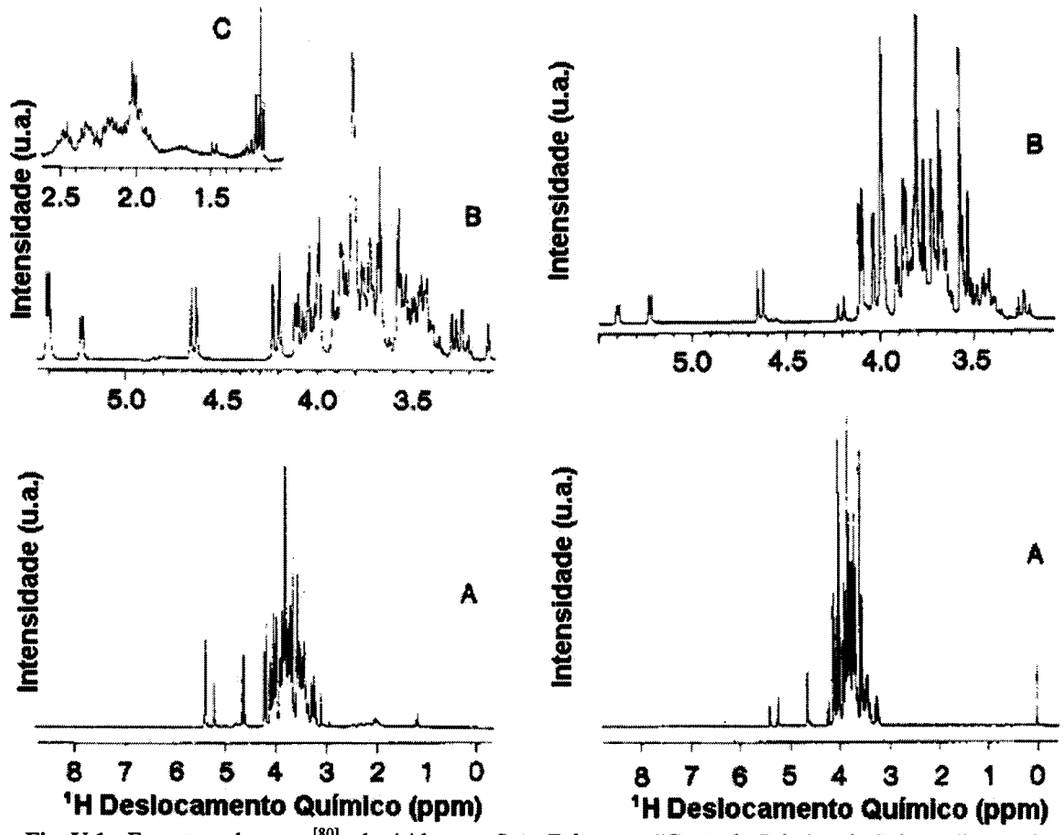

Fig. V.1 : Espectros de sucos[80] adquiridos por *Spin-Echo*, com "Controle Seletivo de Solvente", através da adição de 200μM $MnCl_2$. Esquerda: Laranja. Direita: Maçã. (A) Espectro inteiro; (B) Expansão da região dos carbohidratos; (C) Expansão da região de ácidos orgânicos. A expansão vertical foi de 15x.

Em outro experimento de alta resolução, realizado por Cho *et al.*[81], foi utilizada a supressão de solvente através da técnica de Inversão-Recuperação (*IR*) (em 200MHz), onde foram observados os picos dos açúcares de um melão (muskmelon), utilizando-se da diferença entre os tempos de relaxação longitudinal (T_1) do pico da água e o dos sólidos solúveis de açúcar, como mostra a **FIG.V.2**. A técnica de *IR* consiste na inversão da magnetização da amostra como um todo, mas como o tempo de relaxação da água livre difere do tempo de relaxação daquela com açúcares dissolvidos, adquire-se o sinal quando a contribuição devida ao sinal da água livre se encontra no plano transversal (ponto de nulo). Obtêm-se assim um sinal devido quase que exclusivamente a outra contribuição, neste caso, dos açúcares solúveis.

---

inglês é "carbohydrate". Este não é o único exemplo de termo científico "erronemente traduzido" para o português...".

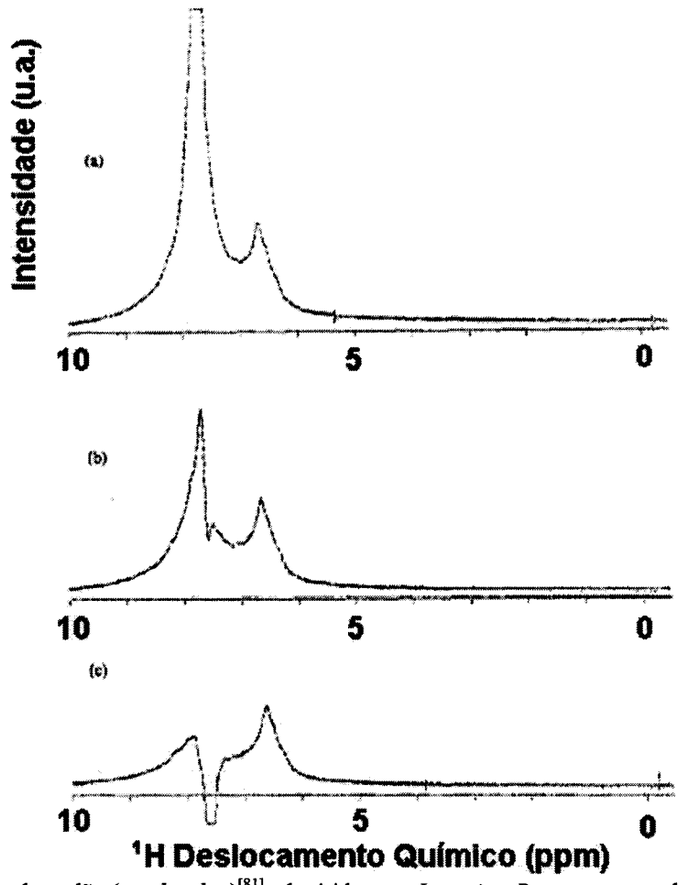

Fig. V.2 : Espectros de melão (*muskmelon*)[81] adquiridos por *Invertion-Recovery*, com diferentes tempos de *delay*, τ_2. (A) 1.2s; (B) 1.0s; (C) 0.9s.

Em outros artigos[82-84], os autores utilizaram a rotação em ângulo mágico, *MAS* (*Magical Angle Spinning*), em baixa velocidade (poucas centenas de Hz) para eliminar os efeitos de suscetibilidade magnética, devido à estrutura heterogênea da fruta e permeada de ar em alguns casos (200MHz). Foram alcançadas melhorias na resolução, deslocamentos químicos mais precisos e aumento na relação sinal-ruído, como mostra a **FIG.V.3**. O ângulo "mágico", 54,7°, é o ângulo no qual interações de efeitos de orientações não promediadas são reduzidas a um mínimo. Neste caso, efeitos da estrutura heterogênea permeada de ar no tecido das frutas.

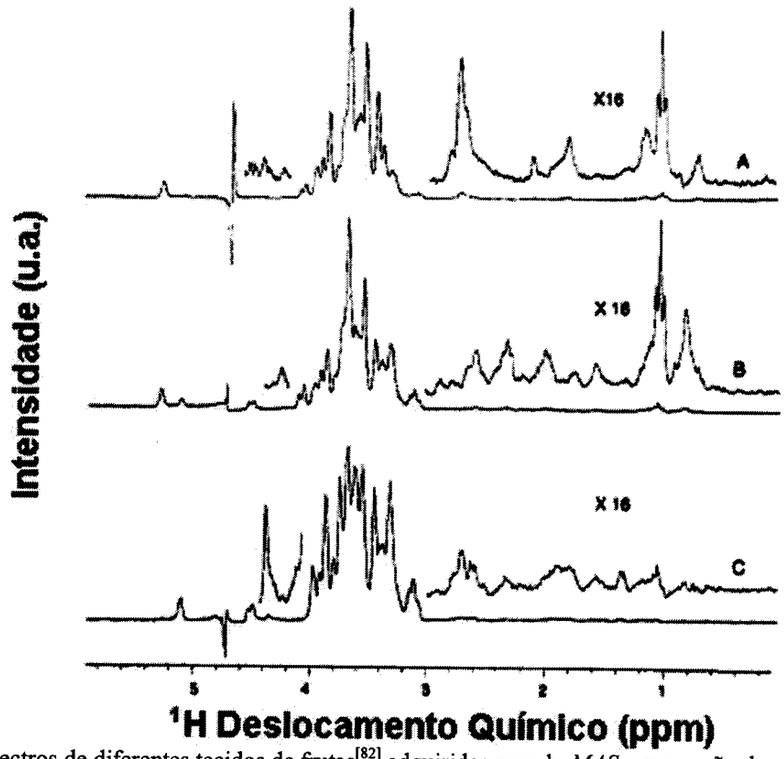

Fig. V.3 : Espectros de diferentes tecidos de frutas[82] adquiridos usando *MAS* e supressão do pico da água, em 200MHz. (A) maçã (4 médias); (B) banana (4 médias); (C) uva (16 médias).

V.3 Problemas devidos às diferenças de suscetibilidade magnética

Nas interfaces entre as superfícies de qualquer tecido da amostra com o ar haverá grandes diferenças de suscetibilidade magnética. Em frutas isso não é diferente, sendo até pior, em muitos casos. Em alguns casos podem alcançar gradientes locais de aproximadamente $20Tm^{-1}$ no interior do talo de *Pelargonium Graveolus* (da referência 15 do artigo de Chudek[85]) e de $0{,}089Tm^{-1}$, em 100MHz, numa maçã madura (da referência Lian et al., 1994 do artigo de Clark[86]), causando distorções no espectro com a redução da resolução e o mais problemático, alargamento na linha espectral. Isso acontece devido à heterogeneidade do material contido na fruta, contendo vacúolos e grânulos de vários tipos, paredes celulares, câmaras de ar, etc... Assim, cada tipo de tecido, imerso em um campo magnético intenso, será magnetizado diferentemente devido às diferenças de suscetibilidade magnética, características de cada meio. Isto produz "domínios" magnetizados levando a variações de campo magnético dependentes da posição. Deste modo a teoria sugere que grandes heterogeneidades microestruturais da amostra levam a grandes alargamentos da

linha espectral[82], como é comprovado pelas estruturas de algumas frutas (maçã, banana > uva), como mostra a **FIG.V.4**. Isso também será mostrado perto do fim do **CAP.VII**.

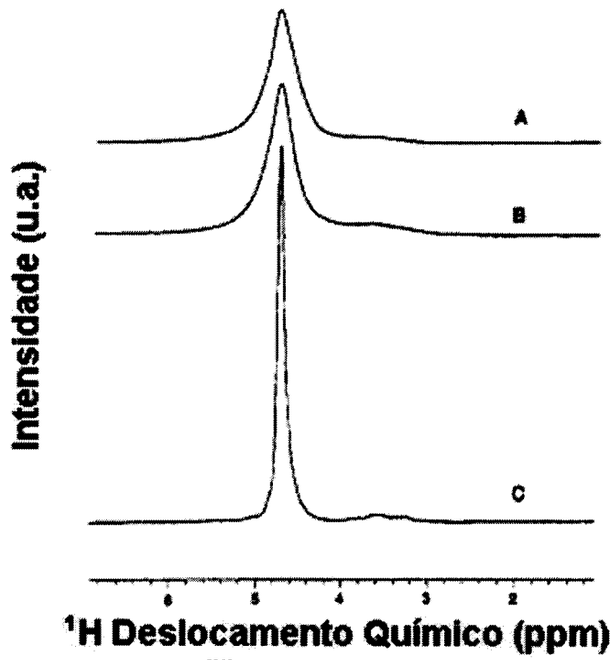

Fig. V.4 : Espectros adquiridos sem *MAS*[82], com amostras de diferentes tecidos de frutas, intactos, numa forma cilíndrica dentro de um tubo paralelo ao campo magnético, em 200MHz. (A) maçã; (B) banana; (C) uva.

Para o caso mais simples, onde uma fina casca líquida envolve uma partícula esférica, o alargamento devido à suscetibilidade pode ser aproximado por[82]:

$$\Delta\nu_\chi = (8\pi/3)\ \gamma B_0\ \Delta\chi, \qquad [75]$$

onde $\Delta\chi$ é a diferença entre as suscetibilidades (adimensional) da partícula e do líquido, γ é a razão magnetogírica (Hz/T) do núcleo observado, e B_0 é a intensidade de campo magnético (em T). A suscetibilidade também é linearmente proporcional à intensidade de campo. Uma estimativa experimental de $\Delta\nu_\chi$, mostrada na **FIG.V.5**, através da diferença entre as larguras de espectros, adquiridos em diferentes intensidades de campo, com e sem a utilização de *MAS*[82].

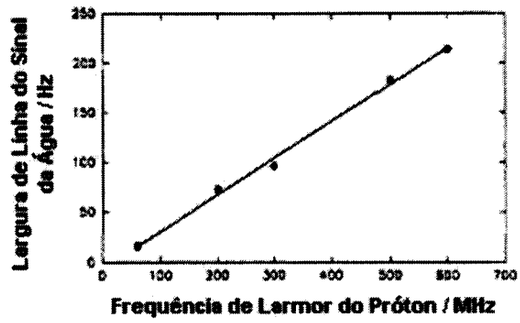

Fig. V.5 : Dependência da largura de linha dos hidrogênios da água com a intensidade de campo, em espectros de ^{1}H *NMR*[82]. Pontos da largura a meia altura. Campo/freqüência (14.1T/600MHz, 11.75T/500MHz, 7.05T/300MHz, 4.7T/200MHz e 1.41T/60MHz)

V.4 Estudos recentes

As aplicações mais recentes ainda buscam verificar alterações nas quantidades de sólidos solúveis de açúcares presentes na polpa das frutas[87, 88]. Mas o que se tem observado na literatura é que o instrumental utilizado também é o mais avançado, e por isso caro, ficando assim restritos a grandes instituições de pesquisa. Ao dizer avançado entende-se por magnetos com elevada intensidade de campo (4.7 – 11.7T), utilizando de recursos como *MAS* e avançadas metodologias de aquisição, que requerem também um *hardware* mais robusto (*HR-MAS*). Equipamentos como estes são atualmente comercializados com preços da ordem de dois milhões de dólares americanos, devido à sua peculiar configuração e à pequena demanda. Muito tem sido feito com MRI na verificação de injúrias nos tecidos e com *CSI* , imagens de um determinado deslocamento químico (em sua maioria óleo – CH, seguido de açúcares e ácidos orgânicos)[86, 89-93]. Com relação a este trabalho, o desafio é aplicar novas metodologias de supressão de solvente (a água) e tentar obter informações sobre os metabólitos de açúcares, que estão "escondidos" sobre o intenso pico da água, em um campo com intensidade de 2T (85.5 MHz).

V.5 Os açúcares

A região espectral onde estão localizados os picos dos açúcares é mostrado na figura abaixo, **FIG.V.6**, retirada de um típico espectro de alta resolução por ^{1}H *MRS* de frutas[94] (neste caso, suco de laranja).

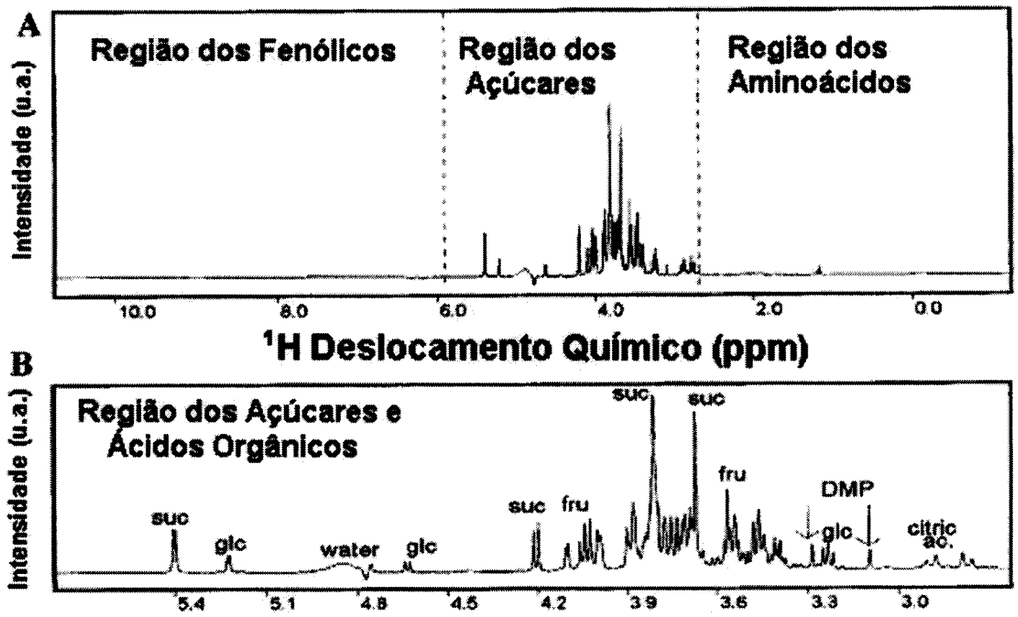

Fig. V.6 : Espectro[94] de suco de laranja em 500MHz ^{1}H *NMR*. (A) Espectro inteiro dividido em três regiões; (B) A região dos açúcares expandida.

Os açúcares pertencem a uma classe de compostos orgânicos chamada carbohidratos, que são provavelmente os compostos orgânicos mais abundantes nos organismos vivos[79]. Podem ser divididos em quatro grupos: monossacarídeos, dissacarídeos, oligossacarídeos e polissacarídeos. Os monossacarídeos são os mais simples e é deste grupo que fazem parte a glicose e a frutose, que são encontradas nas frutas. A estrutura destes dois monossacarídeos é mostrada na **FIG.V.7**. Embora tenham a mesma fórmula molecular, as duas moléculas possuem diferenças estruturais, são os chamados isômeros. Quando duas moléculas de açúcar simples se unem, elas formam um dissacarídeo e é deste grupo que a sacarose faz parte. Ela é formada por uma molécula de glicose mais uma de frutose. A sua estrutura é mostrada na **FIG.V.7**.

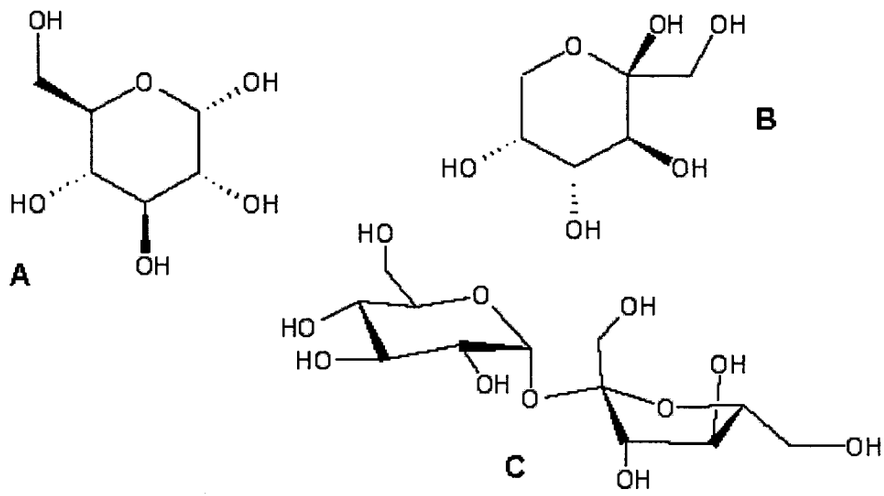

Fig. V.7 : Estrutura da glicose (A), da frutose (B) e da sacarose (C).

Cap. VI - Equipamentos Utilizados

O sistema de imagens e espectroscopia utilizado neste trabalho será descrito a seguir, parte a parte, pois se trata de um equipamento híbrido, em grande parte implementado com equipamentos desenvolvidos e construídos no próprio laboratório, apesar de se basear em um equipamento comercial. Trata-se portanto de um espectrômetro que era praticamente um protótipo, no momento que foi adquirido, e que foi constantemente aperfeiçoado ao logo destes anos, e de um magneto supercondutor horizontal de 2T com todos os seus subsistemas de gradiente e de *RF* construídos no laboratório. Um diagrama de blocos do espectrômetro *TecMag* é apresentado na **FIG.VI.1**.

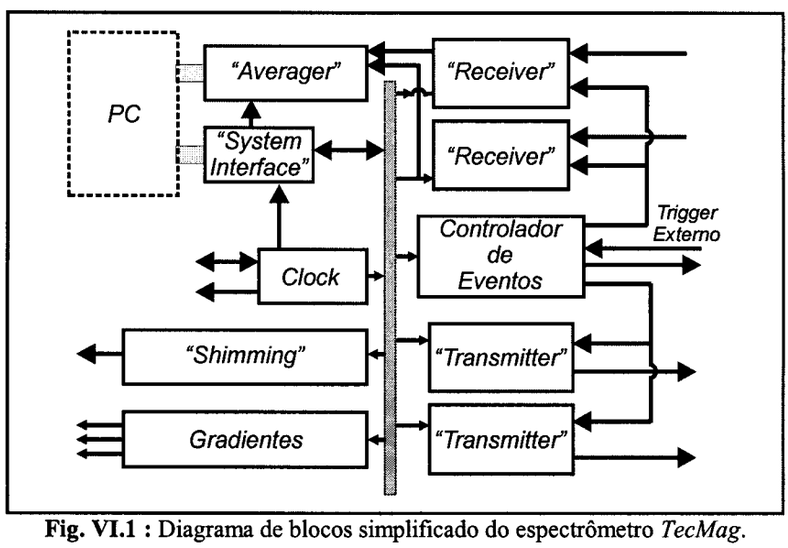

Fig. VI.1 : Diagrama de blocos simplificado do espectrômetro *TecMag*.

VI.1 O magneto

O magneto supercondutor horizontal, com campo estático de 2T, é da marca *Oxford Instruments* (85-310 HR), **FIG.VI.2**. Esse magneto foi completamente recondicionado, evacuado, esfriado e posto em operação no início de 2003, desde então tem sido utilizado na implementação e testes de novas metodologias de imagens e espectroscopia, bem como no

desenvolvimento e construção de *hardware* para imagens por *NMR*, nas mais diversas aplicações e estudos realizados pelos estudantes e pesquisadores do laboratório.

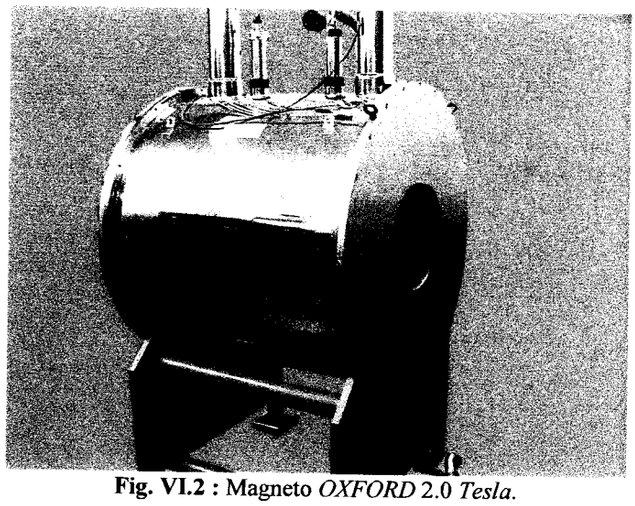

Fig. VI.2 : Magneto *OXFORD* 2.0 *Tesla.*

VI.2 O espectrômetro

O espectrômetro utilizado é um *APOLLO*, controlado pelo *software NTNMR*, desenvolvidos pela *Tecmag HOUSTON, TX*, que é executado por um computador (*PC* com sistema operacional *Windows 2000*), **FIG.VI.3**. O espectrômetro possui dois canais independentes de transmissão e dois de recepção. As seqüências são programadas no *software NTNMR* em modo gráfico, **FIG.VI.4**.

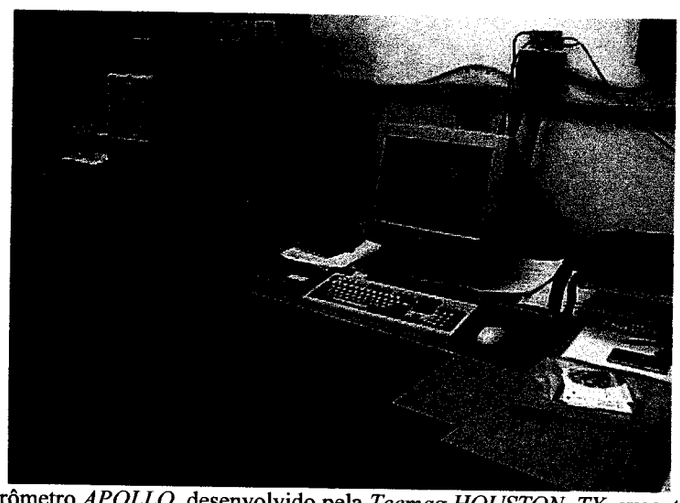

Fig. VI.3 : O espectrômetro *APOLLO*, desenvolvido pela *Tecmag HOUSTON, TX*, executado por um *PC* com sistema operacional *Windows 2000.*

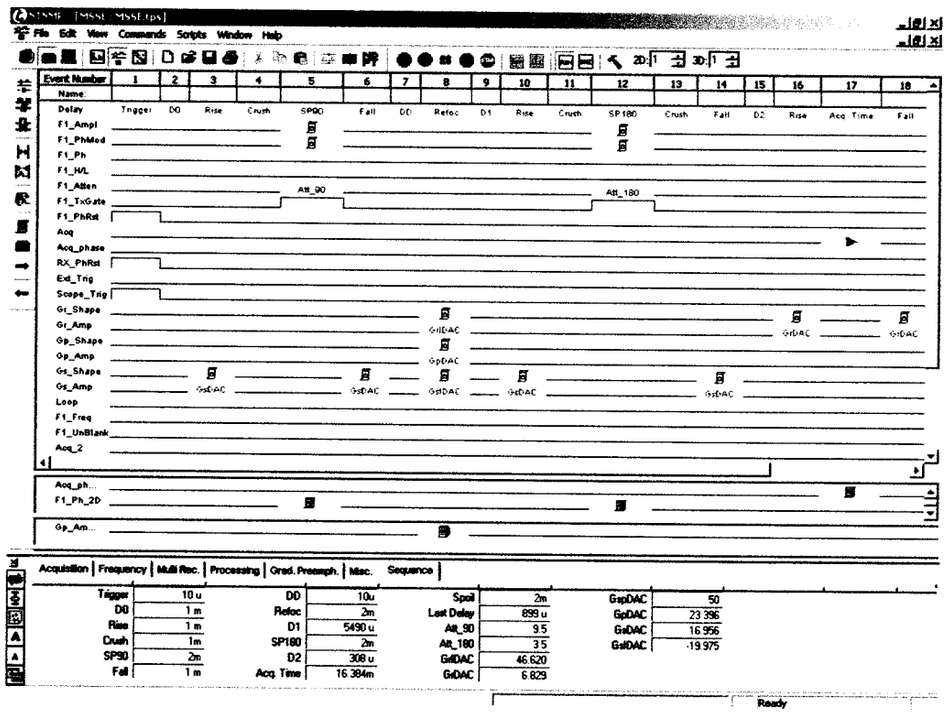

Fig. VI.4 : Planilha da seqüência *MSSE*, programada com auxílio parcial do *software NTNMR*, da TecMag.

As seqüências são implementadas e abertas por uma interface em *Visual Basic* (*VB*), que dispõe ao usuário uma planilha com os parâmetros manipuláveis (TR, TE, tempo de pulsos de excitação e inversão, ...). Assim, todos os cálculos são realizados por esse programa, que faz a interface entre o *NTNMR* e o usuário, acertando os parâmetros necessários à execução das seqüências implementadas.

VI.3 O sistema de *shimming*

O sistema de *shimming* utilizado pelo espectrômetro é controlado pelo próprio *APOLLO*, que permite até 24 canais sendo que 15 são utilizados. Já os algoritmos utilizados para *shimming* foram desenvolvidos localmente e são baseados na otimização das componentes a serem ajustadas por aproximações pelo método "*Steepest Descent*"[95].

VI.4 As bobinas de gradientes

As bobinas de gradientes utilizadas atualmente foram construídas no próprio grupo (trabalho de mestrado[22]), onde este sistema opera como uma bobina de gradientes ativamente blindada[96, 97] capaz de fornecer até 16G/cm em um cilindro regular com 10cm

de diâmetro da base e comprimento. As blindagens nas bobinas de gradientes são necessárias, pois reduzem consideravelmente as correntes induzidas — "*eddy currents*" — em estruturas condutoras internas do magneto. Essas correntes causam degradação temporal e espacial dos gradientes de campo. O sistema de gradientes é alimentado por um conjunto de amplificadores *Techron*, modelo 8607.

VI.5 O sistema de refrigeração

Ambas as bobinas de *shimming* e de gradientes são refrigeradas por um sistema de refrigeração *Cool Flow Liquid/Liquid Recirculator System II* da Neslab. O sistema possui 2 circuitos independentes de circulação forçada de água, evitando assim que as bobinas sofram um sobreaquecimento indesejável.

VI.6 As bobinas de *RF*

Neste trabalho foram utilizadas duas bobinas, uma do tipo *birdcage* (diâmetro x comprimento: 8x12cm^2) e outra do tipo sela cruzada (4x7cm^2), para transmissão e recepção, **FIG.VI.5**. As duas bobinas foram desenvolvidas localmente. Na etapa de transmissão o sistema possui, antes da bobina de *RF*, um amplificador de potência Analogic, AN8063, de 2kW.

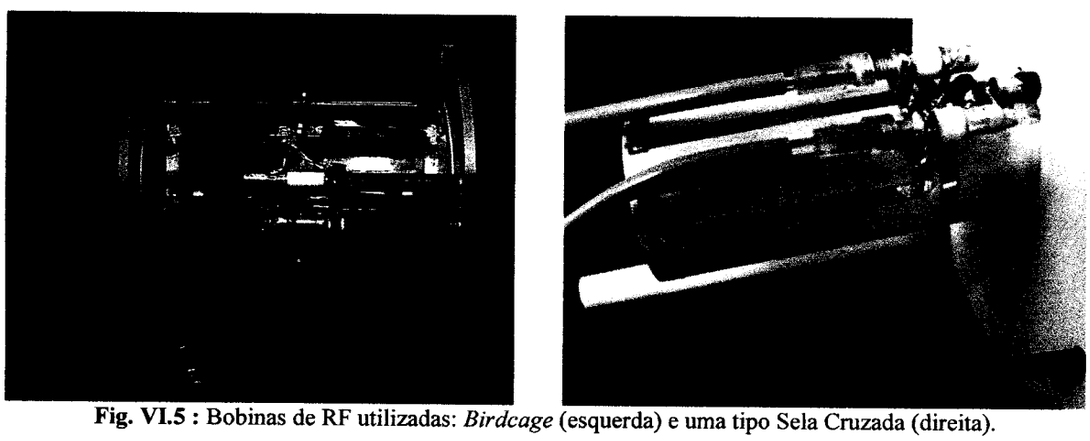

Fig. VI.5 : Bobinas de RF utilizadas: *Birdcage* (esquerda) e uma tipo Sela Cruzada (direita).

A seguir é apresentada uma simulação do campo gerado por estas bobinas e o mapa de B_1, **FIG.VI.6**. Como se percebe no mapa da *birdcage*, há uma forte inomogeneidade de campo na sua lateral direita, já no mapa da do tipo sela cruzada, o campo é altamente

homogêneo (os mapas de simulação em MathLab foram cedidos pelo estudante de Mestrado Daniel Papoti).

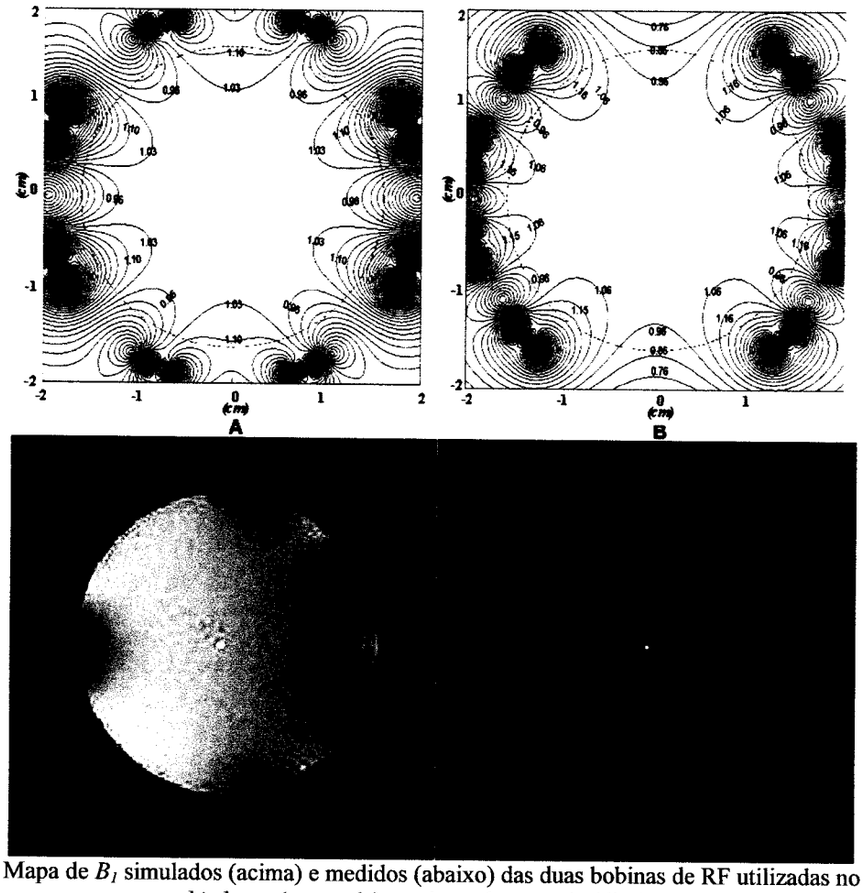

Fig. VI.6 : Mapa de B_1 simulados (acima) e medidos (abaixo) das duas bobinas de RF utilizadas no trabalho: a *birdcage* (esquerda) e a tipo sela cruzada (direita).

Para facilitar o posicionamento da própria bobina no isocentro do magneto, bem como a posição da amostra no centro da bobina, foi desenvolvido um posicionador com ajustes nas três direções ortogonais.

VI.7 Os *phantoms*

Os *phantoms* foram largamente utilizados neste trabalho, seja no processo de *shimming* ou na verificação da seletividade das seqüências. Foram utilizados no processo de *shimming* três diferentes *phantoms* esféricos, de PVC, com raios de: 35mm, 22mm e 15mm; a escolha dependia da bobina que seria utilizada ou da amostra. Todos eles estavam preenchidos com solução aquosa de 5mM de $CuSO_4 \bullet 5\ H_2O$.

Além destes três foi construído um *phantom* cilíndrico, em acrílico, de 35mm de diâmetro e 40mm de comprimento, **FIG.VI.7**. Como mostram as figuras abaixo, ele foi construído com o intuito de se verificar a seleção espacial, pois cada lamina (5 delas, ao todo 7, de espessura 5mm) possui pequenos cilindros de 5mm de diâmetro e de comprimento, que são espaçados, radialmente e axialmente, uns dos outros de 10mm, centro a centro.

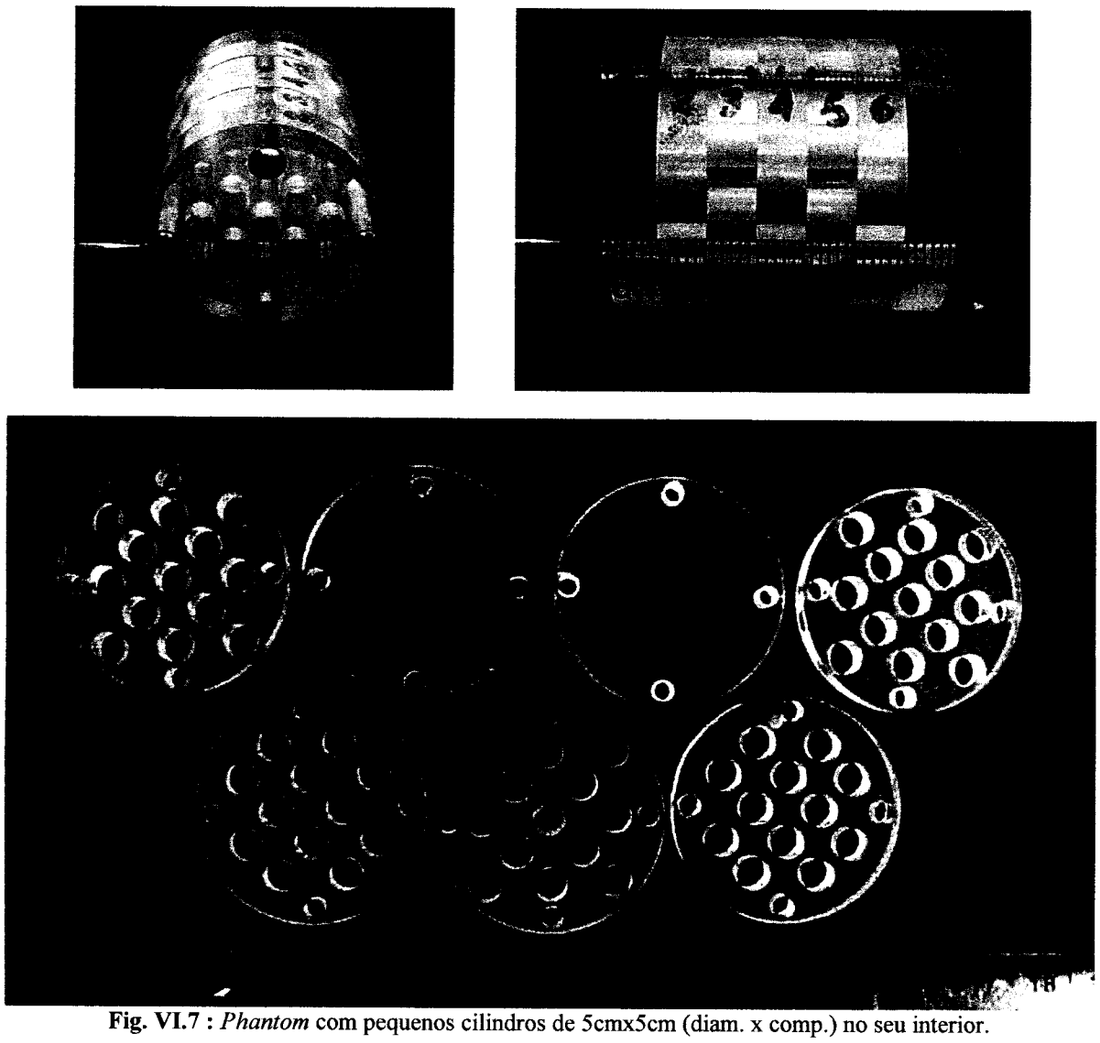

Fig. VI.7 : *Phantom* com pequenos cilindros de 5cmx5cm (diam. x comp.) no seu interior.

VI.8 O refratômetro portátil (BRIX)

O refratômetro portátil usado foi um RT 30 ATC, com escala de 0-32% BRIX, **FIG.VI.8** e **FIG.VI.9**. Este aparelho faz a medida dos sólidos solúveis totais (SST) do líquido em análise, no caso, o teor de açúcar presente (Aparelho cedido pelo pesquisador Dr. Clóvis Isberto Biscegli, da EMBRAPA Instrumentação Agropecuária – São Carlos – SP). É

necessário apenas colocar algumas gotas da polpa da fruta em cima do prisma (3 ou 4 gotas), para obter a concentração de SST presente.

Fig. VI.8 : Refratômetro portátil RT 30 ATC, escala 0-32% BRIX.

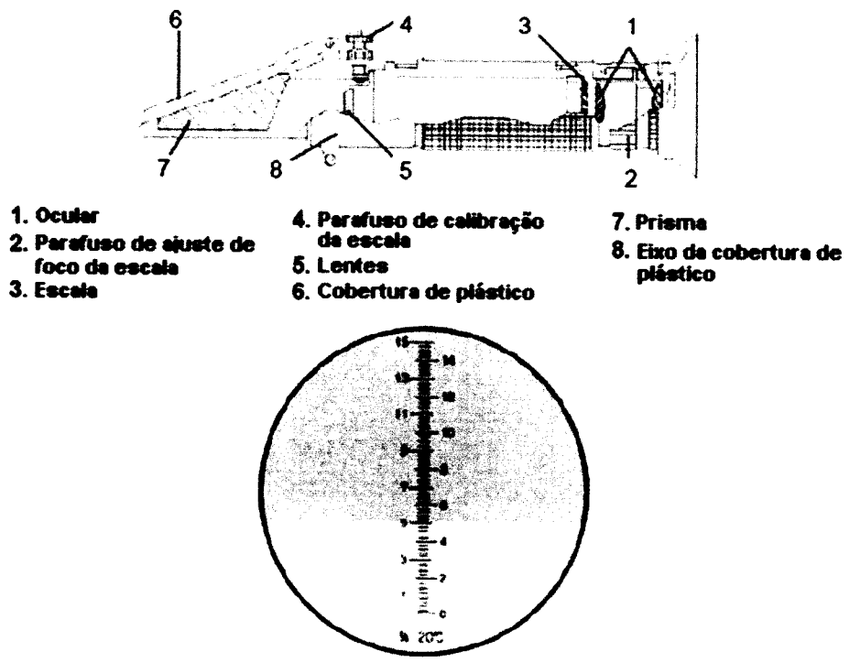

Fig. VI.9 : Esquema de um refratômetro portátil, com um exemplo de escala, aqui de 0-15% BRIX.

Cap. VII - Resultados

Neste capítulo serão apresentadas todas as simulações e dados experimentais obtidos durante este trabalho, que culminaram na verificação das seqüências implementadas *MEGA-STEAM* e *MEGA-PRESS*. Várias frutas foram utilizadas na tentativa de se observar qualitativamente os níveis de açúcares, em um campo magnético de 2.0T (85MHz).

VII.1 Pulsos adiabáticos assimétricos de inversão

Na implementação das seqüências de espectroscopia localizada — *STEAM* e *PRESS*, com a inclusão da metodologia de supressão de solvente — *MEGA*, foram utilizados pulsos adiabáticos de inversão com a função de suprimir o sinal da água. Sendo de extrema importância a eficiência deste pulso de inversão, já que a sua função nesta metodologia é extinguir um sinal espectral indesejado e que uma baixa eficiência significa o aparecimento de sinais espúrios na região de interesse.

A seguir serão apresentados os resultados das simulações de alguns dos diversos pulsos testados e suas verificações experimentais, analisando os perfis da magnetização invertida. A simulação, visualização e geração das tabelas (de amplitudes e freqüências) destes pulsos foram realizadas pelo programa, desenvolvido localmente e escrito em *Visual Basic*, chamado *BlochLab*, **FIG.VII.1**. Na verificação experimental, do quão eficiente são os pulsos de inversão e quão estreitas são as bordas dos perfis de magnetização gerados pelos pulsos adiabáticos assimétricos, foi utilizada a seqüência denominada *PProfile*, **FIG.VII.2**, também escrita em *Visual Basic* para o espectrômetro *APOLLO TecMag*[25].

IFSC-USP SERVIÇO DE BIBLIOTECA INFORMAÇÃO

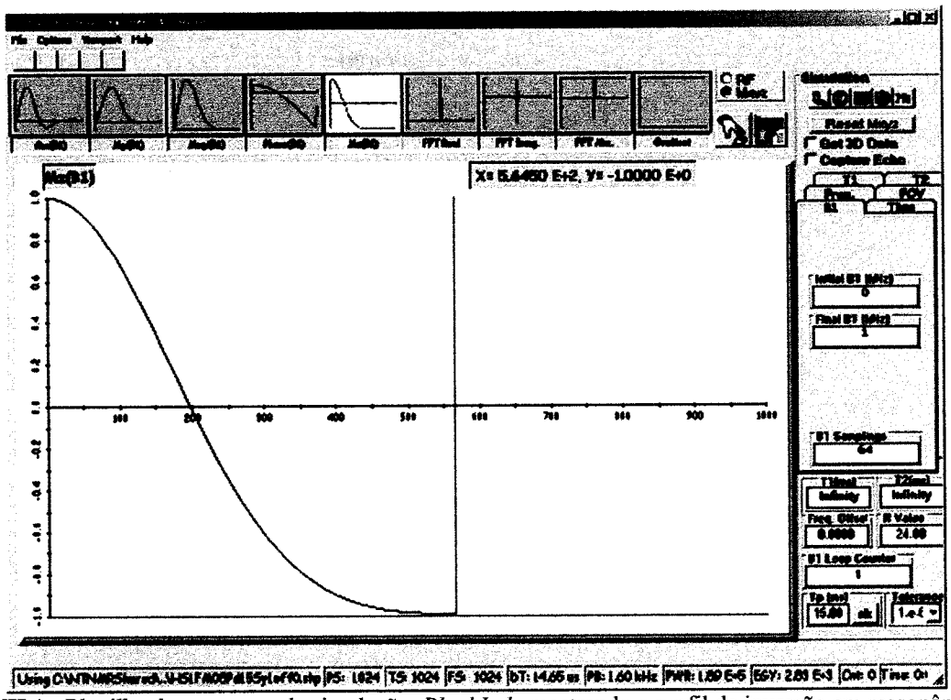

Fig. VII.1 : Planilha do programa de simulação *BlochLab*, mostrando o perfil de inversão em ressonância de M_z em função da potência de RF aplicada, expressa em intensidade de B_1.

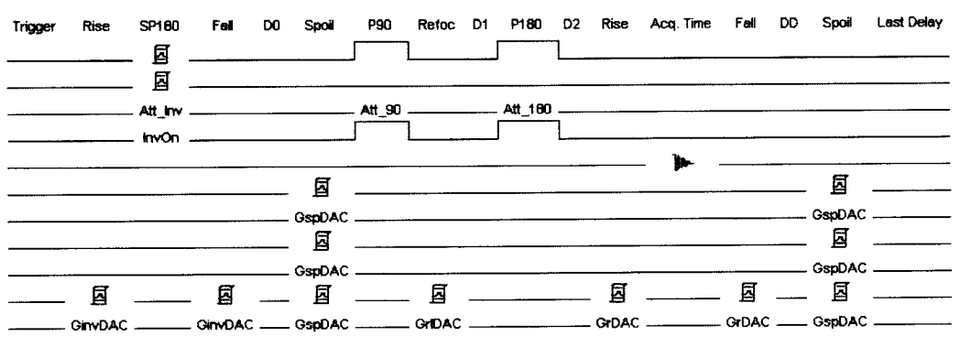

Fig. VII.2 : Seqüência *PProfile*, desenvolvida para a observação experimental dos perfis de magnetização estimulados pelos pulsos adiabáticos.

VII.1.1 Funções de modulação dos pulsos adiabáticos assimétricos

O pulso adiabático utilizado foi o de *secante hiperbólica* (HS1), que é um dos mais conhecidos na literatura[32, 50, 51]. Como comentado anteriormente, o pulso secante hiperbólica, como o próprio nome indica, possui uma modulação em amplitude da forma secante hiperbólica e uma modulação em freqüência da forma tangente hiperbólica. Relembrando aqui rapidamente, uma das características dos pulsos adiabáticos é o fato de possuírem modulação em amplitude e freqüência (ou fase).

Primeiramente foi feita a tentativa (via simulação) de obter um pulso o mais curto possível no tempo. Assim, foram simulados pulsos com 5ms, 8ms, 10ms, 13ms, 15ms e 20ms. A seguir, serão apresentadas algumas simulações da modulação de alguns pulsos, onde o estudo ficará restrito aos tempos de 10ms (onde não se alcança uma inversão adiabática eficaz), **FIG.VII.3**, 15ms (a temporização mais curta e eficaz, como será mostrado), **FIG.VII.4**, e 20ms (eficaz, mas de temporização longa), **FIG.VII.5**.

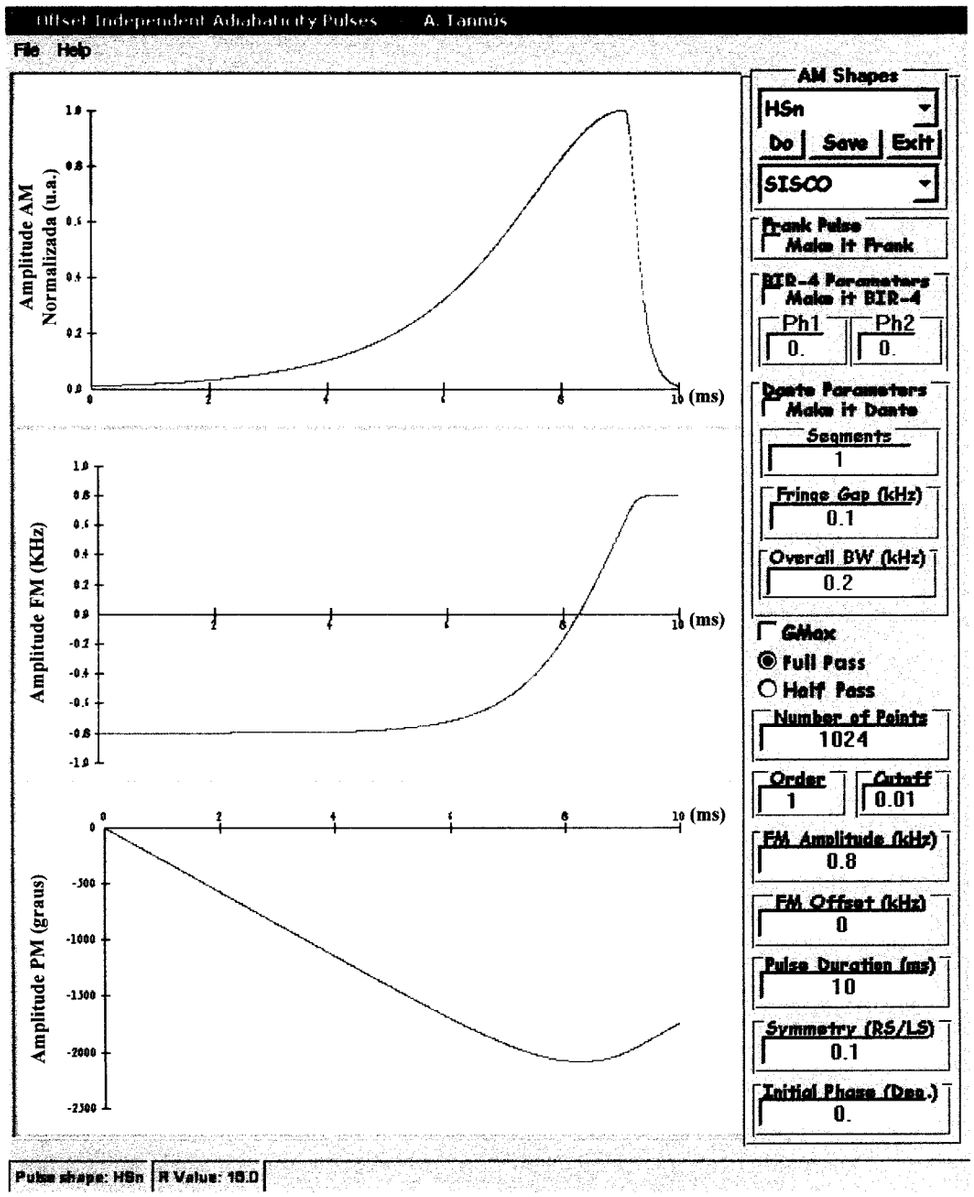

Fig. VII.3 : Modulação do pulso de 10ms, com PB=1,6KHz e assimetria 0.1, na seqüência de cima para baixo são apresentadas as modulações: AM, FM e PM.

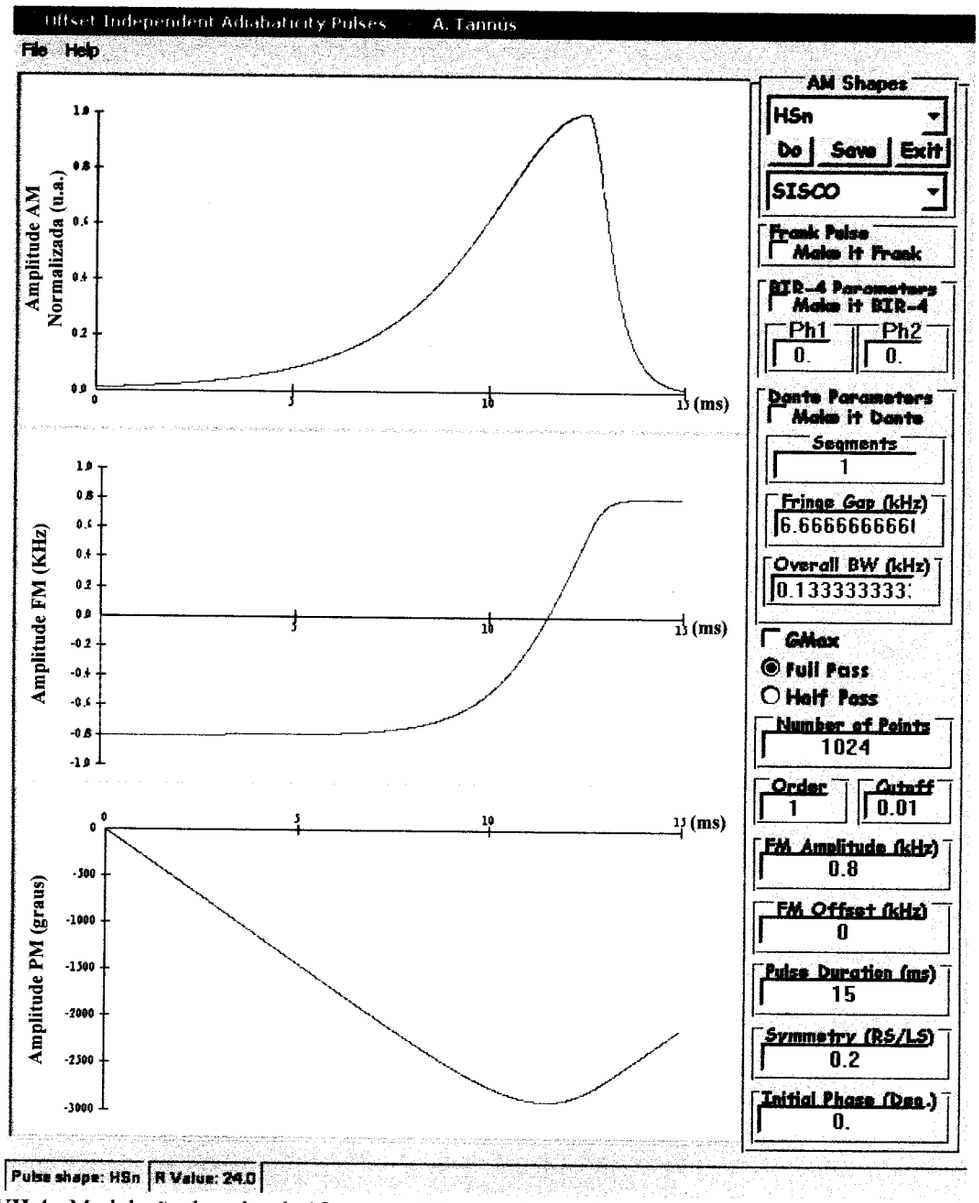

Fig. VII.4 : Modulação do pulso de 15ms, com PB=1,6KHz e assimetria 0.2, na seqüência de cima para baixo são apresentadas as modulações: AM, FM e PM.

Os parâmetros variados nos diversos pulsos analisados, além do tempo, foram a largura de banda de ação deste pulso e a porcentagem de assimetria do mesmo. Esta porcentagem de assimetria representa um "desequilíbrio", na demanda de tempo e potência, na construção de cada borda, ou seja, se no parâmetro é colocado 0.2 de simetria, então uma das bordas é construída em 80% do tempo (borda mais suave) enquanto a outra é construída em 20% (borda mais aguda). Este procedimento apresenta uma solução paliativa para o compromisso entre a eficiência de inversão de um perfil de magnetização e a rapidez de

variação da sua borda (*sharpness*). A parte de duração mais longa do pulso cuida exatamente da construção mais elaborada da borda do perfil de magnetização que fica próximo às frações observáveis, e sua contraparte mais curta cuida da construção da outra borda, para além da freqüência do solvente (e incluindo o mesmo).

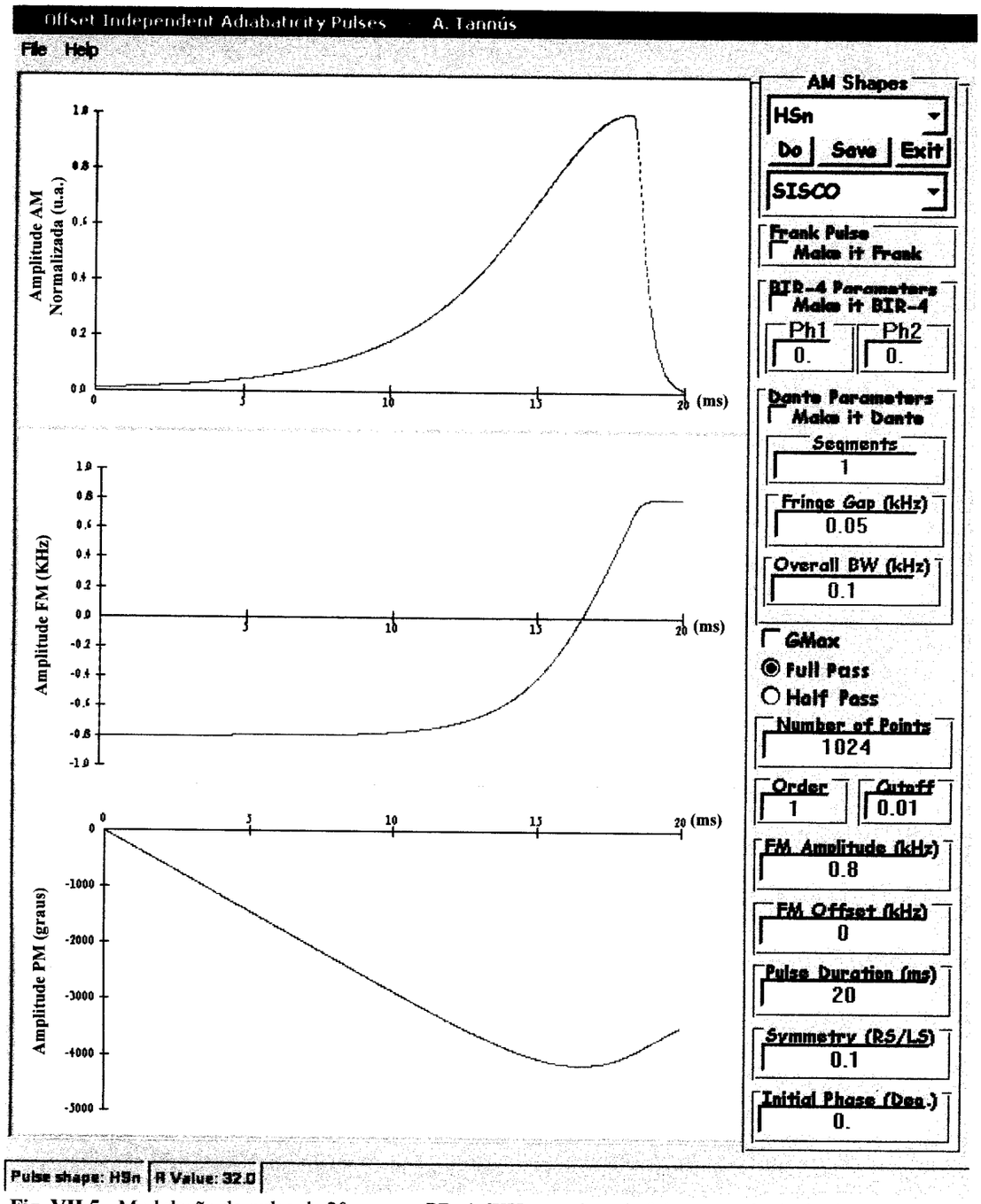

Fig. VII.5 : Modulação do pulso de 20ms, com PB=1,6KHz e assimetria 0.1, na seqüência de cima para baixo são apresentadas as modulações: AM, FM e PM.

Assim, garante-se que o método *MEGA* seja eficiente para observar as linhas de apenas um lado do solvente, sendo o outro lado comprometido pela não-adiabaticidade da porção correspondente do pulso.

A seguir são apresentadas as simulações da inversão adiabática, que deve ser o mais suave e completa possível. Nas figuras abaixo mostra-se qual a amplitude de campo magnético que deve ser aplicado pela bobina de RF, expresso em Hz no eixo horizontal, para que a magnetização longitudinal percorra suavemente o caminho de inversão. Para o pulso de 10ms, **FIG.VII.6**, não acontece uma inversão completa, ou seja, este pulso apesar da ótima temporização é ineficaz na inversão, deixando resíduos da magnetização indesejada. Para o pulso de 15ms, **FIG.VII.7**, a inversão é suavemente completada já em torno de um valor de B_1 de 900Hz, sendo este pulso eficiente e de boa temporização.

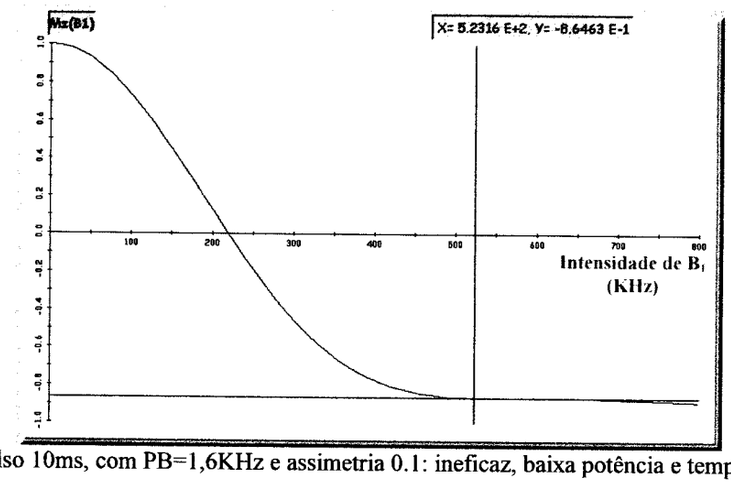

Fig. VII.6 : Pulso 10ms, com PB=1,6KHz e assimetria 0.1: ineficaz, baixa potência e temporização ótima.

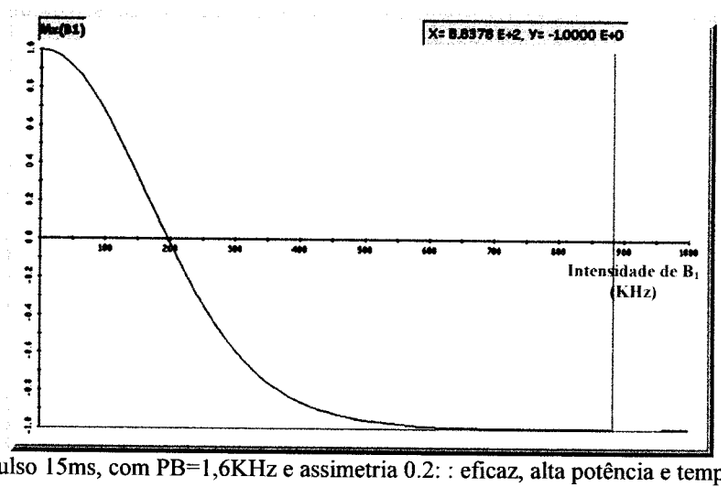

Fig. VII.7 : Pulso 15ms, com PB=1,6KHz e assimetria 0.2: : eficaz, alta potência e temporização boa.

IFSC-USP SERVIÇO DE BIBLIOTECA INFORMAÇÃO

Por fim o pulso de 20ms, **FIG.VII.8**, que apresenta uma inversão eficaz e em torno de 500Hz, que representa uma baixa potência aplicada à bobina em relação aos pulsos anteriores, mas sua inserção nas seqüências fica comprometida pela temporização considerada ruim. Lembrando que a duração total da etapa de supressão se dá após a geração da coerência transversal, portanto uma etapa longa pode comprometer aquelas frações do espectro com pequenos valores de T_2.

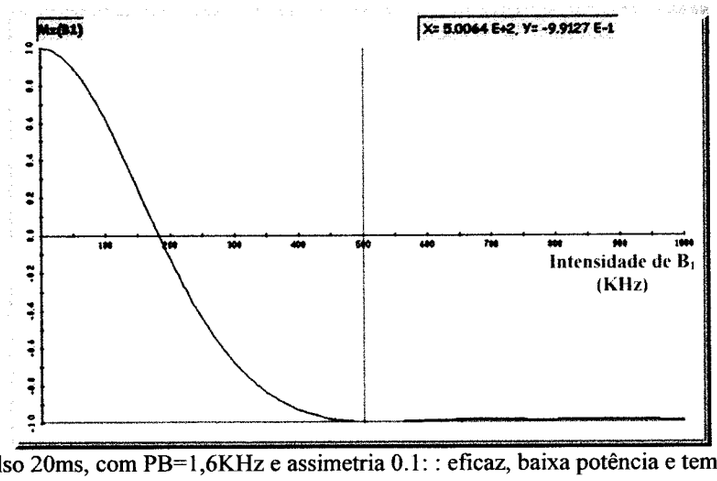

Fig. VII.8 : Pulso 20ms, com PB=1,6KHz e assimetria 0.1: : eficaz, baixa potência e temporização ruim.

VII.1.2 Os perfis de inversão da magnetização (simulados e medidos)

Após ser analisada a eficiência da inversão adiabática numa grande quantidade de pulsos, o passo seguinte é simular o perfil de inversão da magnetização. Aqui ainda foram observados pulsos de várias temporizações e larguras de banda, mas novamente a otimização recaiu sobre os pulsos de 15ms e mais longos, com pequenas variações em outros parâmetros (tais como largura de banda e porcentagem da assimetria). A seguir são apresentadas as simulações com os pulsos de 10ms, **FIG.VII.9**, 15ms, **FIG.VII.10**, e 20ms, **FIG.VII.11**. A busca aqui é por uma ótima inversão na borda mais aguda, pois é ela que ficará na interface entre os picos da água e dos metabólitos de açúcar. Como a separação entre estes picos é de aproximadamente 85Hz (1ppm), ela deve ser próxima deste valor, pois corre-se o risco de não atenuar suficientemente o sinal da água ou atenuar demasiadamente os sinais dos metabólitos.

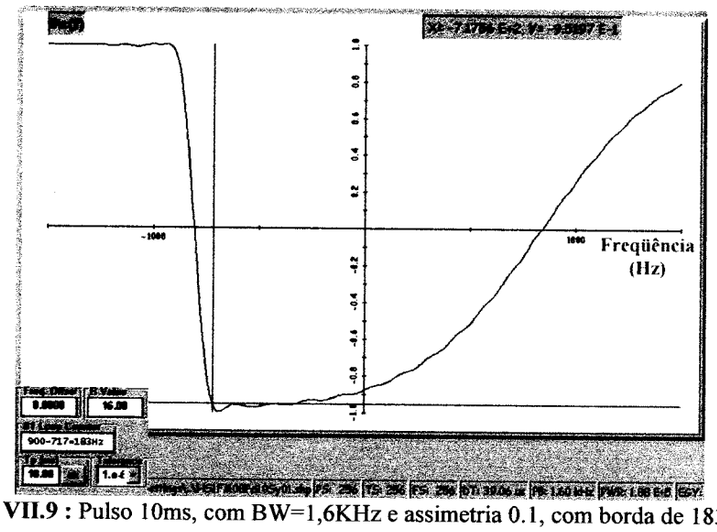

Fig. VII.9 : Pulso 10ms, com BW=1,6KHz e assimetria 0.1, com borda de 183Hz.

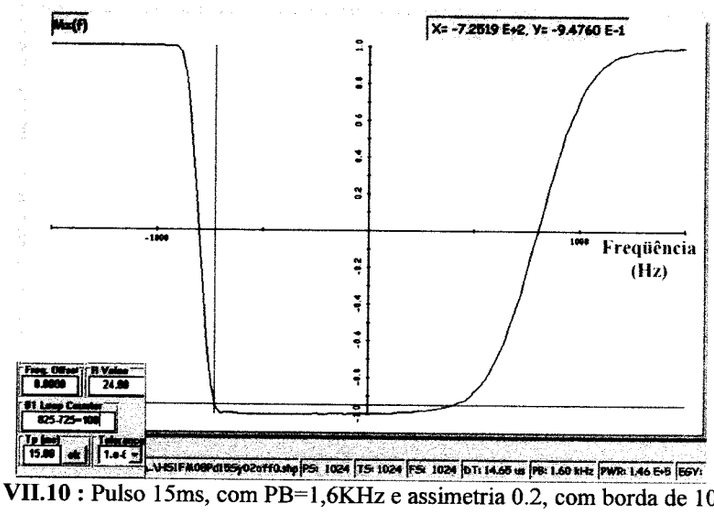

Fig. VII.10 : Pulso 15ms, com PB=1,6KHz e assimetria 0.2, com borda de 100Hz.

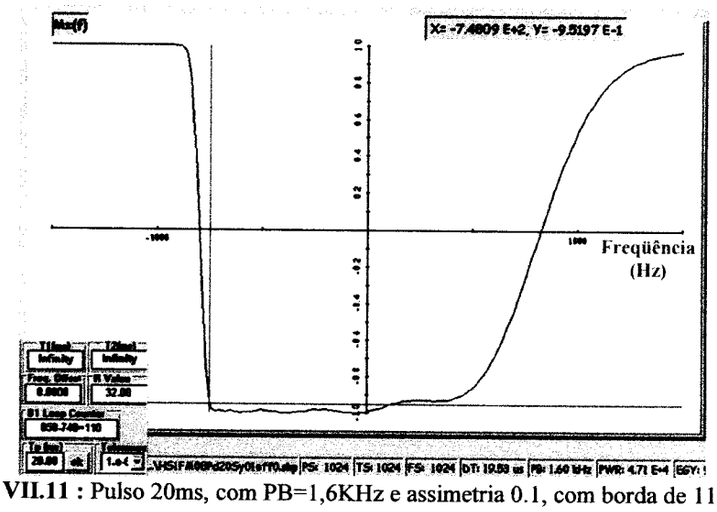

Fig. VII.11 : Pulso 20ms, com PB=1,6KHz e assimetria 0.1, com borda de 110Hz.

A análise destes perfis de magnetização simulados permite que se possa inferir se na prática será obtido uma inversão eficaz do plano selecionado, ou como é o intuito do trabalho, se o pulso está sendo eficiente no intervalo de freqüências desejado para que solvente seja eliminado. A seguir são apresentados os perfis experimentais dos três pulsos anteriores (10ms, **FIG.VII.12**, 15ms, **FIG.VII.13**, e 20ms, **FIG.VII.14**). As bordas experimentais ficaram aquém do esperado, verificando valores correspondentes ao dobro do simulado, mas ainda assim o pulso de 15ms manteve-se como a melhor borda aguda. Aqui vale lembrar que o pulso está sendo usado como um pulso espacialmente seletivo, e sua performance avaliada com perspectiva de utilização como pulso espectralmente seletivo. Possíveis discrepâncias entre os perfis simulados e obtidos experimentalmente são devidas à dificuldade da implementação física daqueles pulsos, como por exemplo eventuais não-linearidades do sistema de geração, modulação e amplificação de RF. Um zoom da região de inversão também é mostrado, dos três pulsos anteriores, respectivamente (10ms, **FIG.VII.15**, 15ms, **FIG.VII.16**, e 20ms, **FIG.VII.17**).

O contorno em vermelho mostra a componente real do sinal, o verde mostra a componente complexa e o contorno em azul mostra a magnitude do sinal.

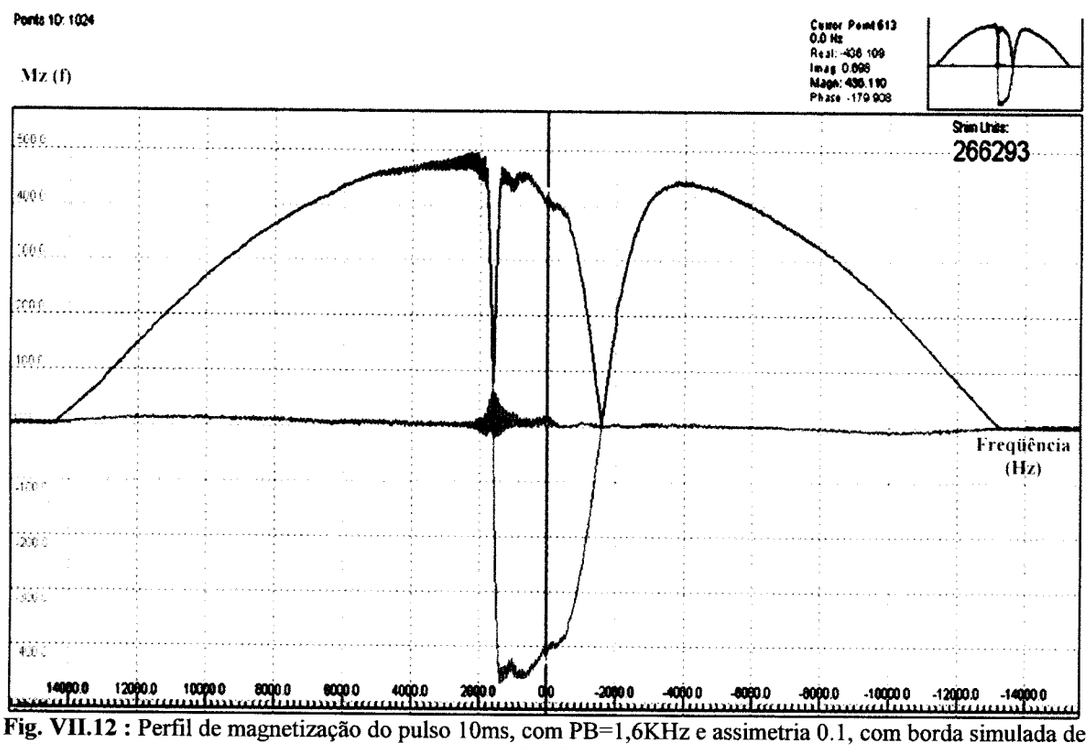

Fig. VII.12 : Perfil de magnetização do pulso 10ms, com PB=1,6KHz e assimetria 0.1, com borda simulada de 183 Hz.

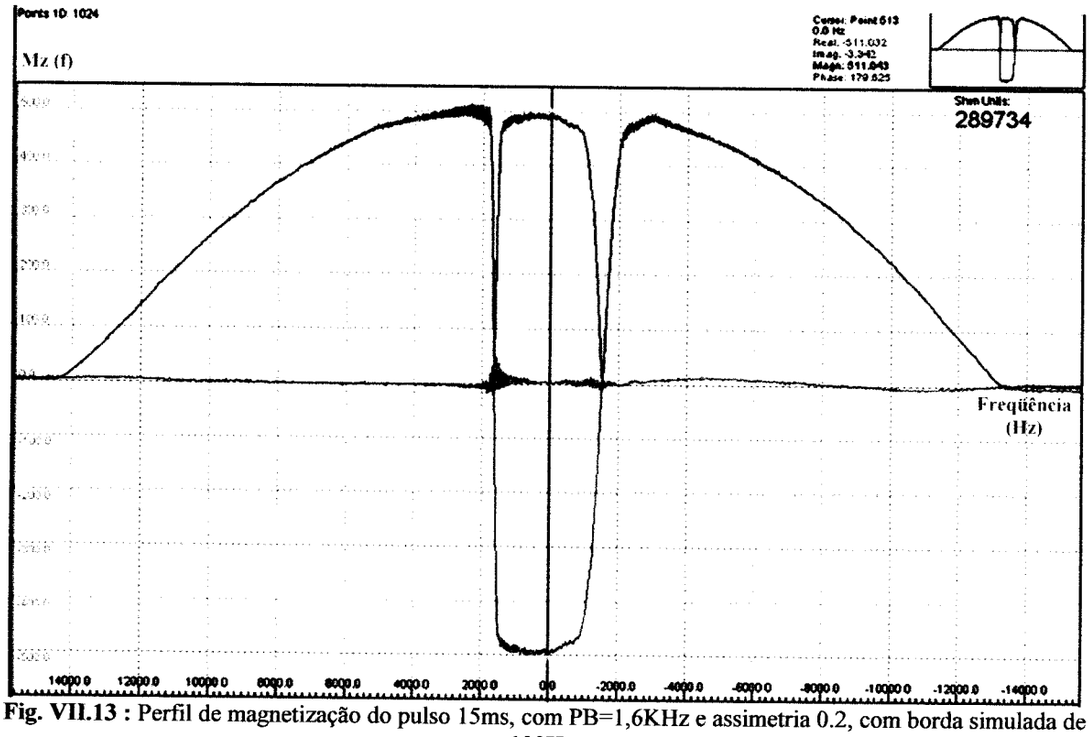

Fig. VII.13 : Perfil de magnetização do pulso 15ms, com PB=1,6KHz e assimetria 0.2, com borda simulada de 100Hz.

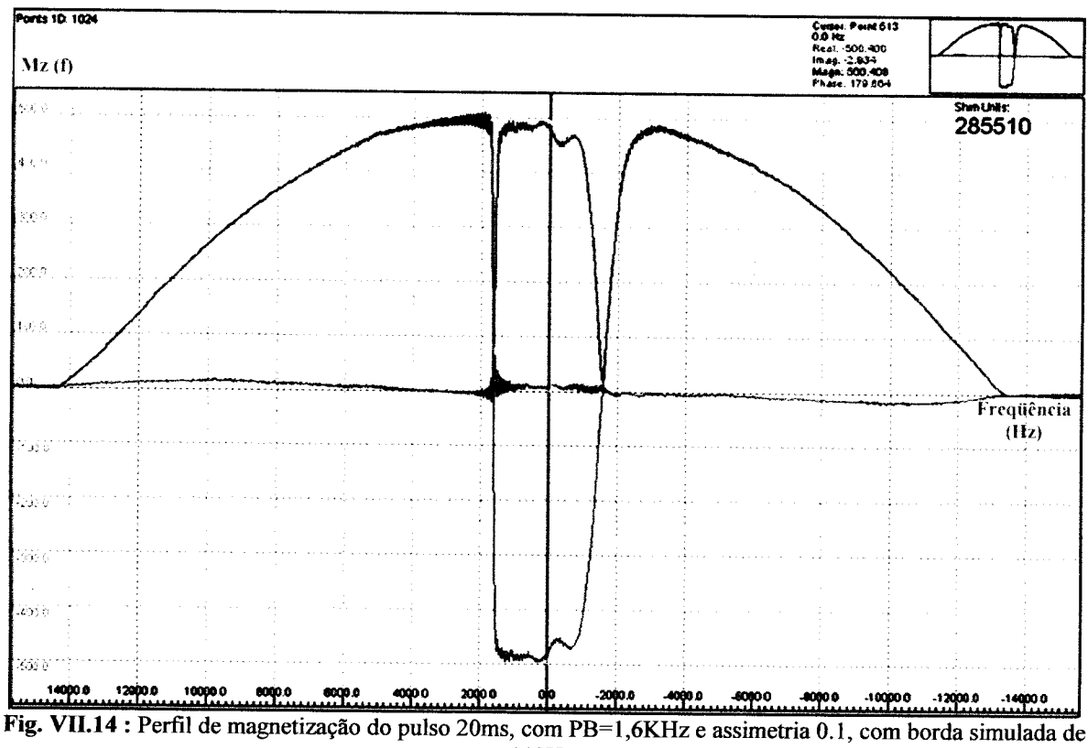

Fig. VII.14 : Perfil de magnetização do pulso 20ms, com PB=1,6KHz e assimetria 0.1, com borda simulada de 110Hz.

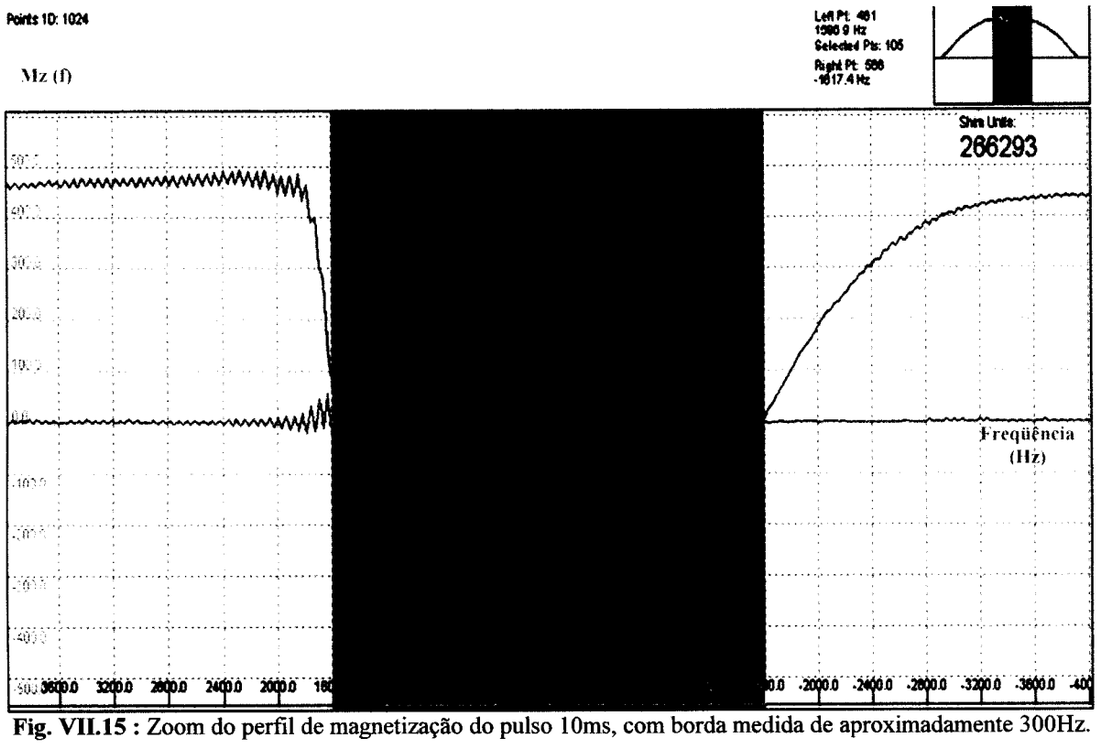

Fig. VII.15 : Zoom do perfil de magnetização do pulso 10ms, com borda medida de aproximadamente 300Hz.

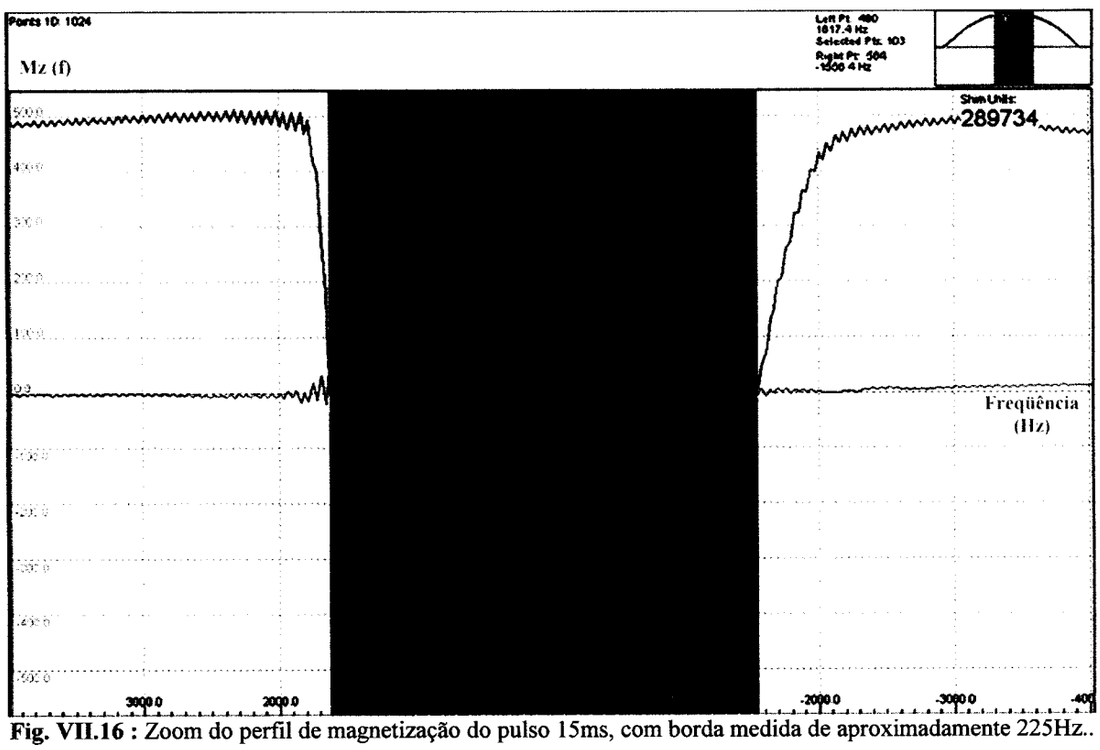

Fig. VII.16 : Zoom do perfil de magnetização do pulso 15ms, com borda medida de aproximadamente 225Hz..

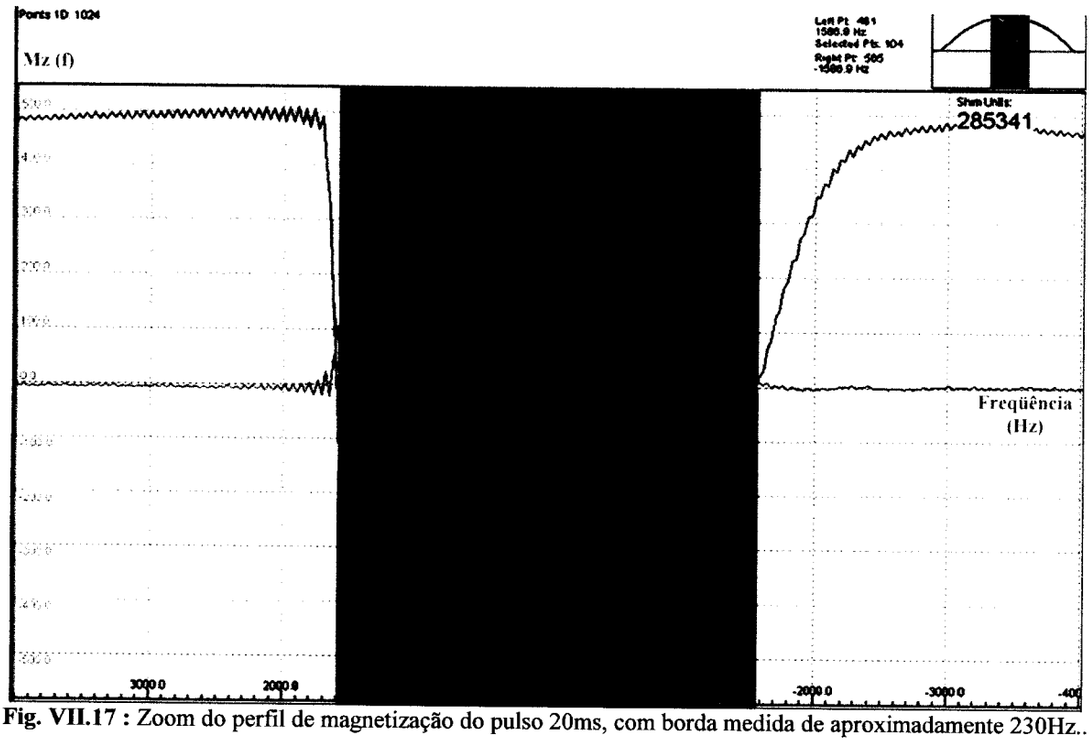

Fig. VII.17 : Zoom do perfil de magnetização do pulso 20ms, com borda medida de aproximadamente 230Hz..

VII.1.3 Os perfis de inversão da magnetização dos pulsos utilizados

A seguir são apresentados alguns dos perfis de excitação e inversão dos pulsos comumente usados nas seqüências de rotina e o pulso adiabático assimétrico tal como foi utilizado. Nas figuras abaixo são mostrados os perfis do *phantom* com pequenos cilindros espaçados, **FIG. VII.18,** conforme visto no **CAP. VI**, onde são aplicados pulsos do tipo *sinc* na seleção de uma fatia de 5mm, seja no modo de excitação ou de inversão, **FIG. VII.19**. Como cada cilindro possui diâmetro e comprimento ambos de 5mm, é notado que o pulso realmente está atuando como desejado, ou seja, a sua seletividade espacial está de acordo com os parâmetros da seqüência e realizando o esperado.

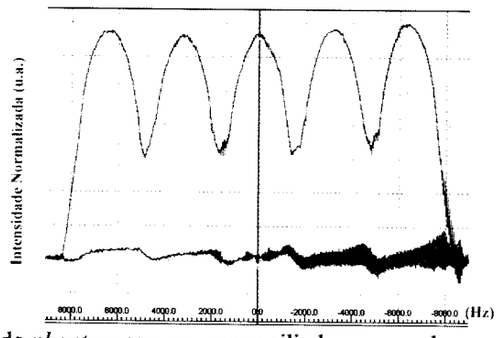

Fig. VII.18 : Um perfil do *phantom* com pequenos cilindros espaçados, mostrando a região central .

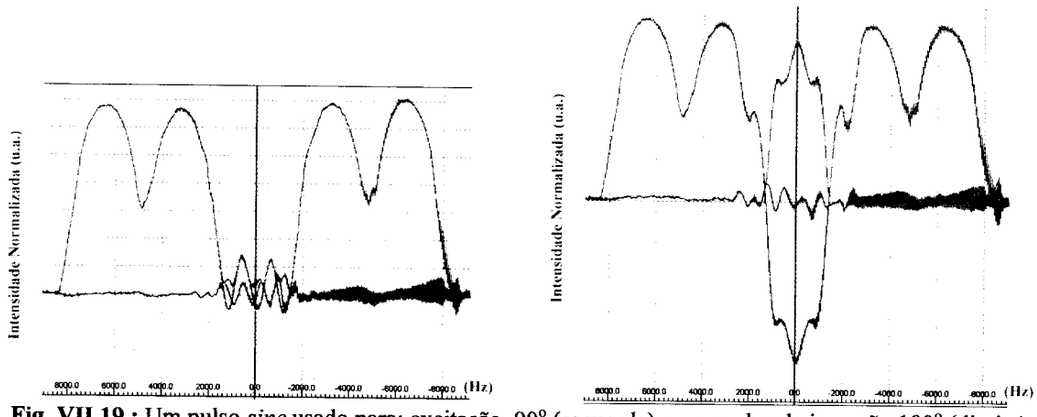

Fig. VII.19 : Um pulso *sinc* usado para: excitação, 90° (esquerda), e um pulso de inversão,180° (direita).

Como já foi extensamente discutido, o pulso adiabático assimétrico utilizado foi um secante hiperbólica, cujo perfil de inversão está mostrado na **FIG.VII.20**, onde previamente ao início de sua aplicação é ajustado o *offset* de sua borda mais estreita, para que fique na melhor posição em que seja possível visualizar os picos relacionados aos açúcares. Dos picos de açúcares que estamos interessados em ver, só serão possíveis aqueles que se encontram a direita do pico da água, já que tudo que estiver embaixo do pulso de supressão, dentro da banda de 1600Hz, será suprimido ou sofrerá forte perda de coerência.

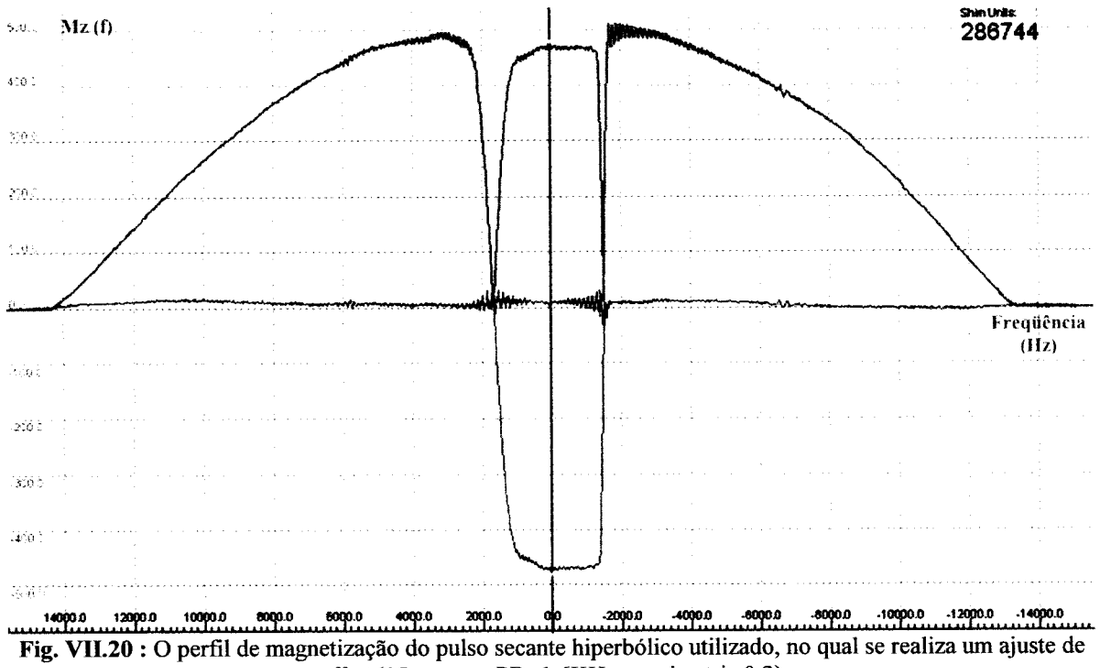

Fig. VII.20 : O perfil de magnetização do pulso secante hiperbólico utilizado, no qual se realiza um ajuste de *offset* (15ms, com PB=1,6KHz e assimetria 0.2).

VII.1.4 Verificação da seletividade em freqüência

O teste para a verificação da seletividade em freqüência foi realizado utilizando uma fruta, neste caso uma pêra, onde o volume localizado foi estendido para que fosse possível observar a efetiva supressão do sinal da água em uma seqüência com apenas uma aquisição, **Fig.VII.21**. A varredura foi realizada dando passos de 20Hz na tabela de *offset* da seqüência, representada pelas linhas de cor preta, onde o pico dos açúcares está na posição marcada pela linha verde, na figura é mostrada a sobreposição de todas as 8 aquisições. O contorno vermelho é a componente real do sinal enquanto o azul é a magnitude. É possível observar que a fase da componente real vai declinando suavemente, anulando o sinal da água, mas à medida que a borda do pulso adiabático se aproxima do sinal de interesse, este também começa a ser atenuado, portanto, o ponto ótimo de *offset* é um parâmetro experimental dependente de outros parâmetros e da própria amostra. Na grande maioria dos experimentos apresentados aqui o *offset* se situou entre -30 e -40Hz — 0.35 e 0.47ppm. Esclarecendo que o ponto zero nesse sistema APOLLO TecMag tem o pico da água como referência e que o *offset* zero do pulso adiabático é quando a sua borda mais aguda se encontra neste ponto zero do pico da água. Tomando a **FIG.VII.20** acima como exemplo, se o pulso adiabático

estivesse atuando realmente dentro de seu intervalo de freqüência (1600Hz) e ele estivesse com seu centro no ponto zero das freqüências (sinal da água), seria dito que seu *offset* é de -800Hz.

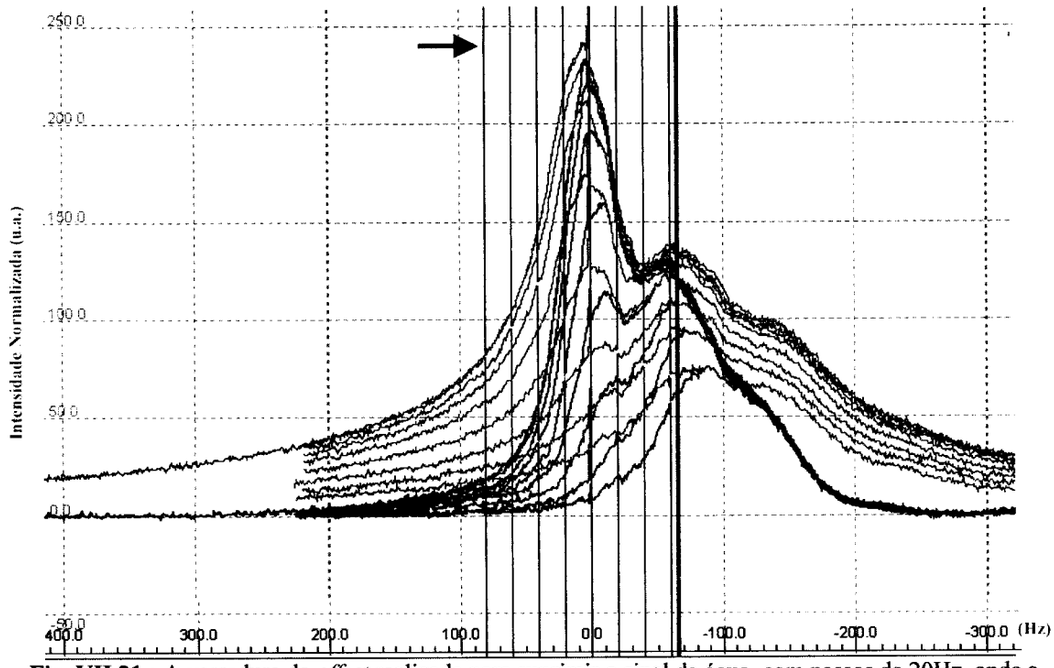

Fig. VII.21 : A varredura de *offset* realizada para suprimir o sinal da água, com passos de 20Hz, onde a posição dos picos com informação dos açúcares está marcada pela linha verde.

VII.2 Verificação da seletividade volumétrica

Os testes para a verificação da seletividade espacial das seqüências foram realizados utilizando o *phantom* cilíndrico (como comentado no **CAP.VI**), que possui em seu interior pequenos cilindros de 5mm de diâmetro e 5mm de comprimento, preenchidos com uma solução aquosa de 5mM de $CuSO_4 \bullet 5\ H_2O$, espaçados de 5mm uns dos outros, axialmente e radialmente.

O primeiro ajuste fino para centralizar o *phantom* , e seus "cilindros" nas fatias, é realizado através da obtenção de imagens (planos transversais) por *MSSE*, das várias fatias (sempre duas a mais, ou seja, sete fatias). Através das imagens se vai ajustando o espaçamento entre fatias para que não seja observada contaminação entre fatias adjacentes. Com isso já se obtém um *offset* na direção-Z. Depois, utilizando alguma das seqüências de localização é iniciada a verificação da seleção de volume, conforme ilustrado na

FIG.VII.22. A seguir são apresentados os resultados da aplicação da seqüência *MEGA-STEAM*.

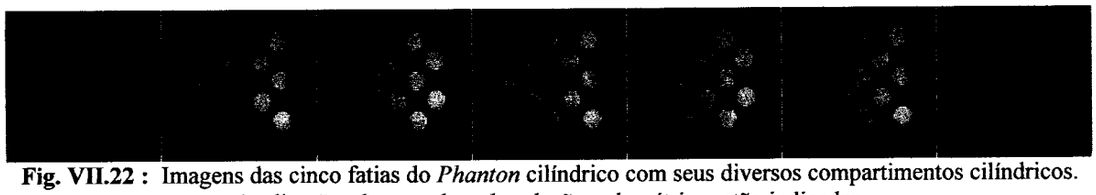

Fig. VII.22 : Imagens das cinco fatias do *Phanton* cilíndrico com seus diversos compartimentos cilíndricos. As direções de varredura da seleção volumétrica estão indicadas.

VII.2.1 Varredura na direção-Z

Como indicado na **FIG. VII.22**, um volume de 3mm é levado a percorrer uma distância do centro até sua borda lateral, na direção-Z. As intensidades do que esse volume encontra pelo caminho são mostradas na seqüência de espectros da **FIG. VII.23**.

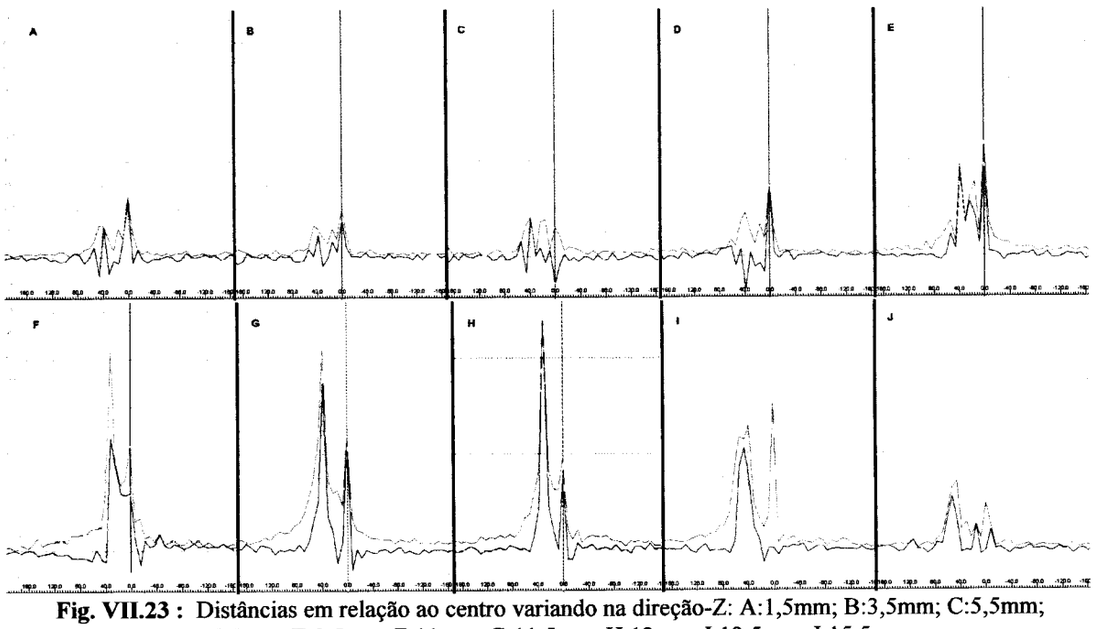

Fig. VII.23 : Distâncias em relação ao centro variando na direção-Z: A:1,5mm; B:3,5mm; C:5,5mm; D:7,5mm; E:9,5mm; F:11mm; G:11,5mm; H:12mm; I:13,5mm; J:15,5mm.

VII.2.2 Varredura na direção-X

Da mesma forma, como ilustrado na **FIG. VII.22**, um volume de 3mm percorre uma distância do centro até sua borda lateral, na direção-X. As intensidades são mostradas na seqüência de espectros da **FIG. VII.24**.

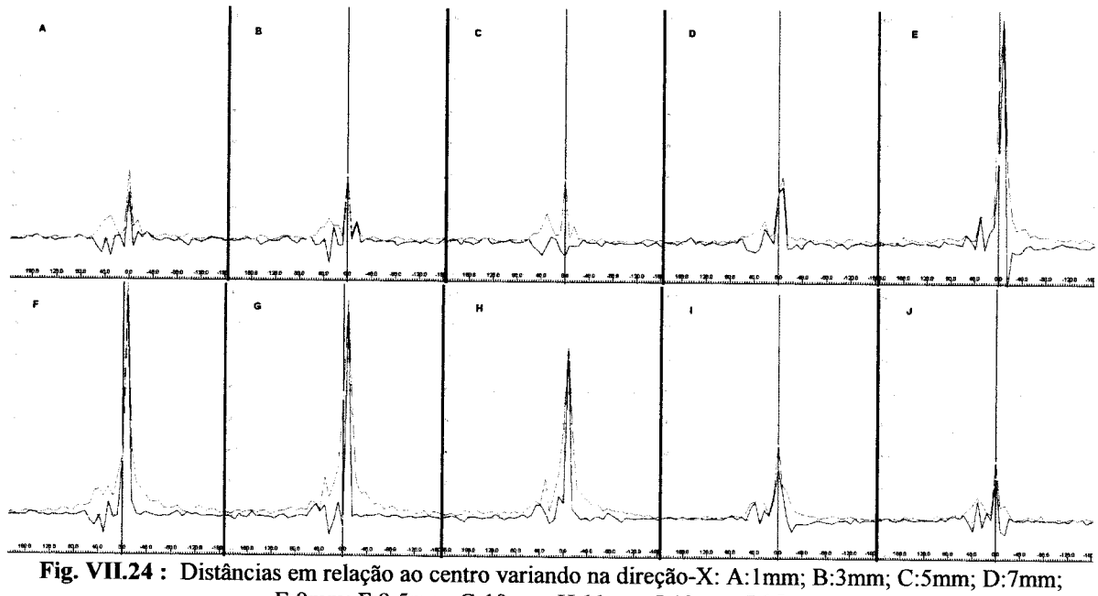

Fig. VII.24 : Distâncias em relação ao centro variando na direção-X: A:1mm; B:3mm; C:5mm; D:7mm; E:9mm; F:9.5mm; G:10mm; H:11mm; I:13mm; J:15mm.

VII.2.3 Varredura na direção-Y

E por último a varredura na direção-Y. Como indicado na **FIG. VII.22**, o volume de 3mm percorre uma distância do centro até sua borda lateral, mas agora quase sem nenhuma contaminação. Por isso as intensidades nesta última varredura são menores que as anteriores, como mostra a **FIG. VII.25**.

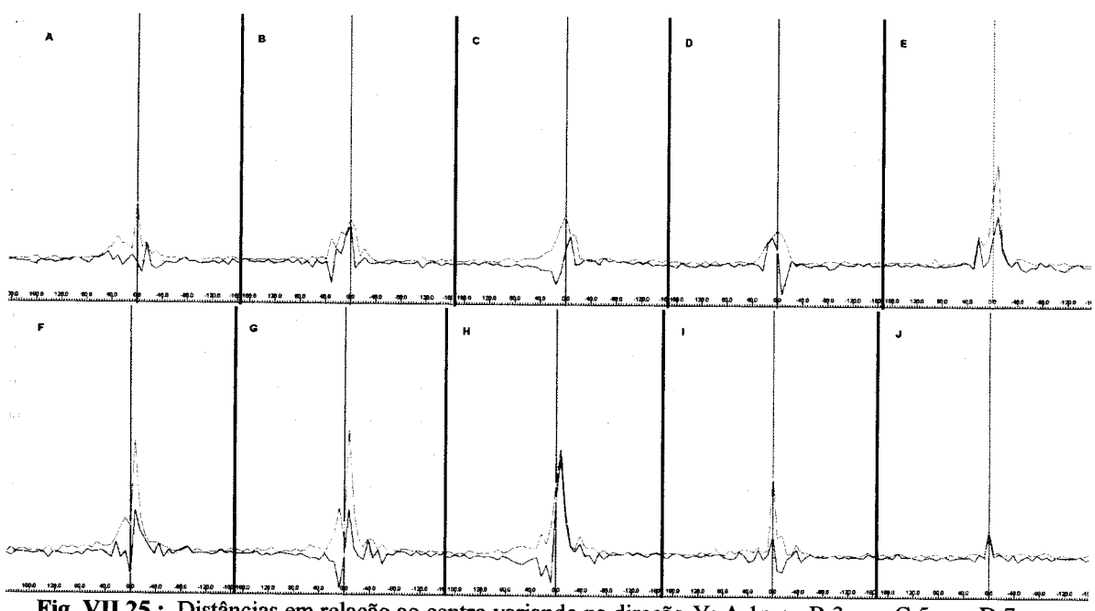

Fig. VII.25 : Distâncias em relação ao centro variando na direção-Y: A:1mm; B:3mm; C:5mm; D:7mm; E:9mm; F:10mm; G:10,5mm; H:11mm; I:13mm; J:15mm.

VII.3 Verificação da supressão do sinal da água em algumas soluções

Foram realizados alguns testes com soluções de iodo, glicose, frutose e sacarose, com intuito de confirmar a supressão do sinal da água e conseqüentemente visualizar alguns dos picos que se encontravam encobertos devido à grande intensidade deste sinal relativa à intensidade dos mesmos.

VII.3.1 Primeiro teste: solução de iodo metano

Vale registrar que nos primeiros testes de verificação da supressão do sinal da água, foi utilizada uma solução de Iodo Metano, a qual possuía dois picos bem distintos e separados de precisamente 160Hz (em 2T). Foi de grande utilidade, pois um dos picos ficava a aproximadamente 1ppm, sempre encoberto pelo sinal da água, enquanto o outro sempre distante por 160Hz e quase sempre visível. Com esta amostra foi possível ter uma idéia mais precisa a respeito de como o sinal era afetado pela aplicação dos gradientes, na forma de *spoilers* (para localização) e *crushers* (para supressão), e pelo ajuste de *offset* do pulso adiabático de supressão. A **FIG.VII.26** mostra a eficiência da supressão do sinal da água, em um volume de $(8mm)^3$.

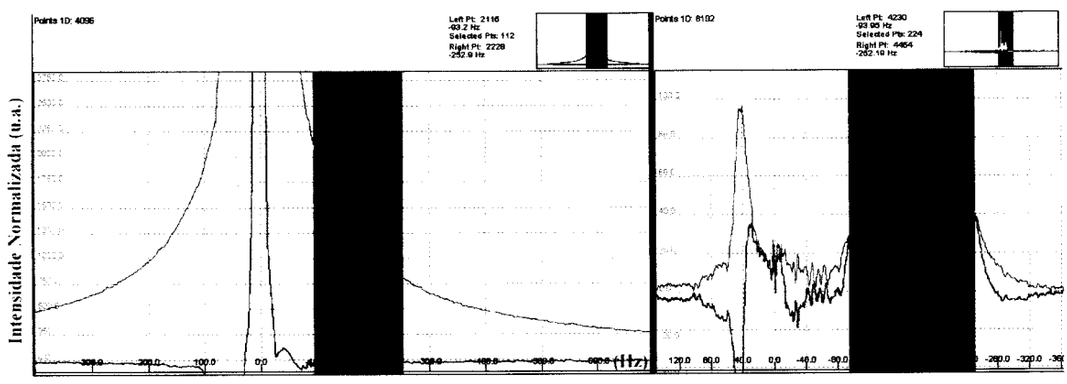

Fig. VII.26 : Primeira verificação da supressão do sinal da água, utilizando uma amostra de Iodo Metano. Um dos picos é localizado em –94Hz e o outro em -252Hz.

VII.3.2 Simulações e resultados experimentais dos espectros das soluções de açúcares

Aqui serão apresentados os espectros dos principais açúcares passíveis de terem alguns de seus picos identificados nas frutas por ^1H *MRS* num campo de 2T. Abaixo é mostrada uma imagem com três soluções de açúcares sempre presentes nas frutas, a sacarose, a glicose e a frutose mais uma solução aquosa de $CuSO_4 \bullet 5H_2O$, **FIG. VII.27**. Fica

bem evidente o contraste entre as soluções. Na imagem abaixo, os tubinhos contendo as soluções de açúcares foram os mesmos utilizados na obtenção dos espectros experimentais, que serão apresentados a seguir.

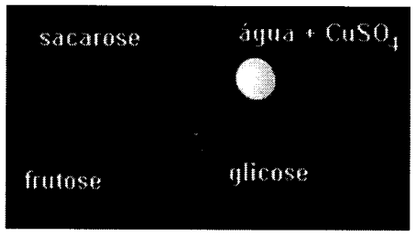

Fig. VII.27 : Imagem mostrando o contraste entre as soluções de sacarose, glicose, frutose e $CuSO_4 \bullet 5H_2O$.

Uma observação deve ser feita para evitar confusão na observação dos espectros. Nos espectros simulados, a disposição dos deslocamentos químicos adotada é a mais utilizada na literatura, com o pico da água ficando em 4,7ppm (um referencial para o zero comumente usado é o TMS). Enquanto que nos espectros experimentais o pico da água fica no zero do referencial, pelo motivo explicado anteriormente.

VII.3.2.1 Glicose

Como os açúcares já foram apresentadas no **CAP. V**, o interesse agora é tentar identificar essas estruturas em um campo de 2T. Foram realizadas simulações utilizando o *software ACD/HNMR Predictor*, onde esboçada a estrutura se obtinha o espectro de ^1H *NMR* da mesma. As simulações realizadas aqui foram obtidas sem nenhuma acuidade com relação a parâmetros realísticos que devem ser considerados (tais como temperatura, pH, quantidade de cada estrutura, etc...). Enfim, o interesse era visualizar as possíveis posições de cada pico e qual átomo de hidrogênio estava relacionado a ele, como está ilustrado na simulação da estrutura da glicose, num espectro de altíssima resolução (0.1Hz de largura de linha) em 400MHz, **FIG.VII.28**.

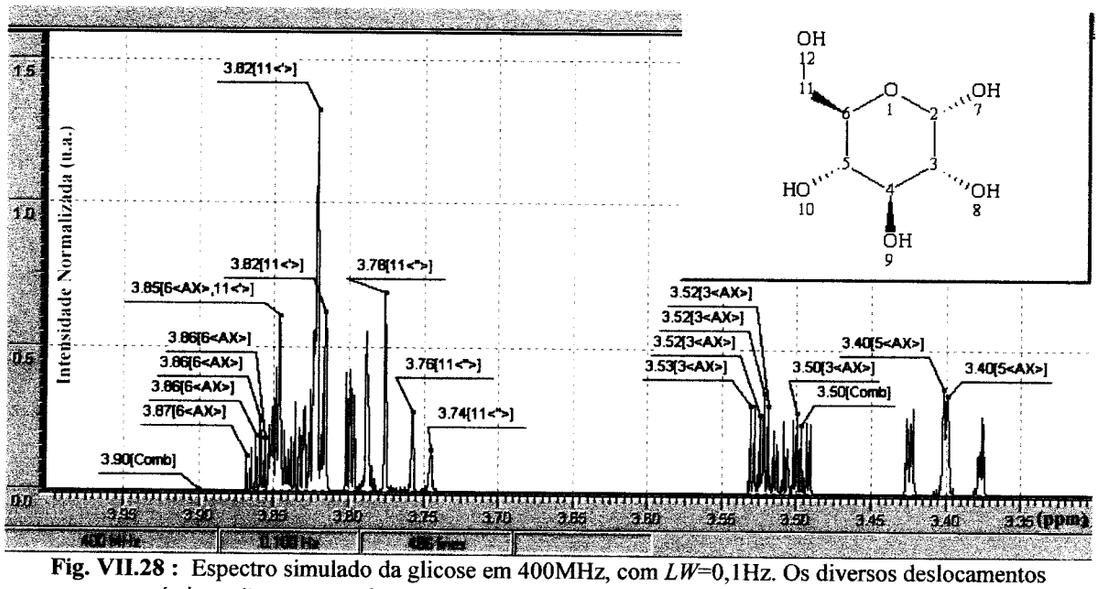

Fig. VII.28 : Espectro simulado da glicose em 400MHz, com *LW*=0,1Hz. Os diversos deslocamentos químicos são apresentados e seus respectivos prótons estão enumerados na estrutura.

Nas simulações em 85MHz, que é a freqüência do aparelho utilizado neste trabalho, o interessante foi observar quão pobre fica o espectro em um campo no qual a largura de linha (*LW, line width*) não é otimizada ao máximo (comentários já foram feitos no **CAP.VI**). As duas simulações abaixo foram obtidas com *LW*=0.1ppm e 0.5ppm, **FIG.VII.29**.

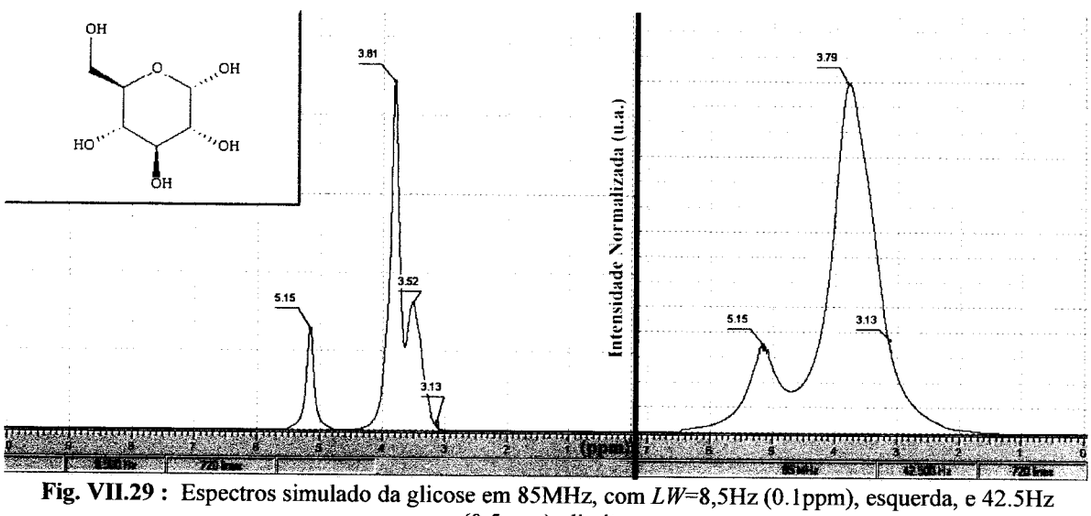

Fig. VII.29 : Espectros simulado da glicose em 85MHz, com *LW*=8,5Hz (0.1ppm), esquerda, e 42.5Hz (0.5ppm), direita.

As figuras abaixo foram obtidas experimentalmente, de uma solução de glicose de concentração 90mg/mL. A **Fig.VII.30** mostra a ótima largura de linha obtida (0.068ppm).

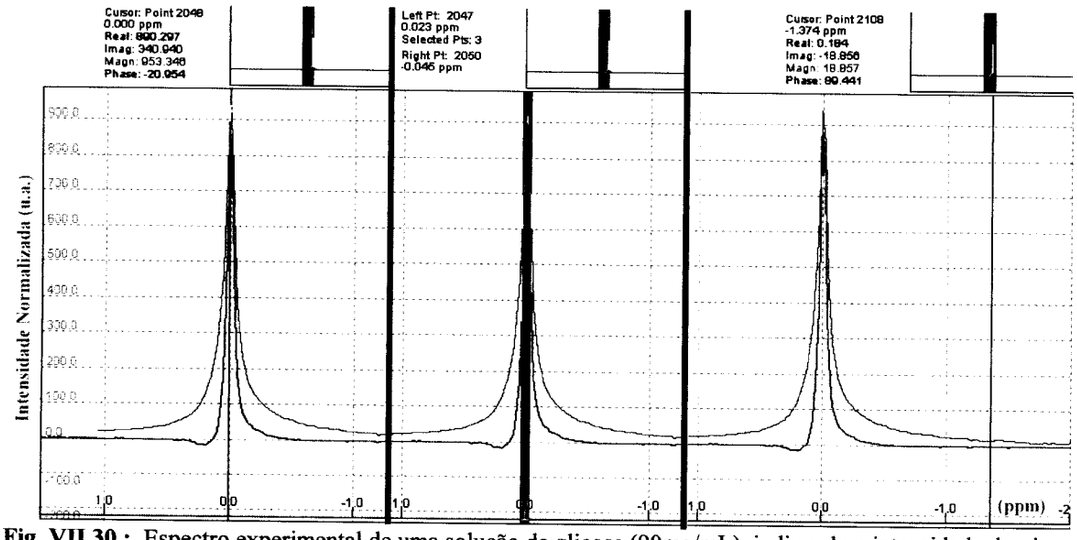

Fig. VII.30 : Espectro experimental de uma solução de glicose (90mg/mL), indicando a intensidade do pico da água (direita), sua *LW*=0.068ppm (centro) e indicando a posição do pico relativo a glicose (esquerda).

Ressaltando que esta largura de linha tão estreita é obtida por se tratar de uma amostra homogênea em um tubo de dimensões muito pequenas (diâmetro de 1cm e comprimento de 4cm) que está em uma região de altíssima homogeneidade de campo magnético. Na **Fig. VII.31** é realizada a supressão do sinal da água com a seqüência *MEGA-PRESS*. Picos próximos de 3,4ppm, 3,9ppm e 3,7ppm estão presentes na simulação.

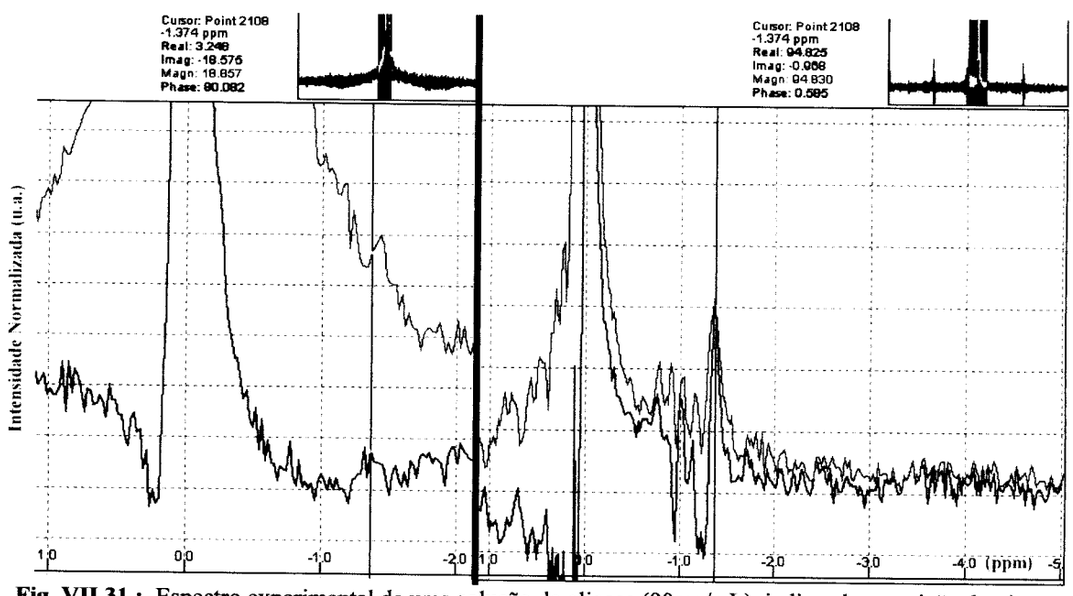

Fig. VII.31 : Espectro experimental de uma solução de glicose (90mg/mL), indicando a posição do pico relativo a glicose, com a região aproximada (direita) e o mesmo obtido após a supressão, com 100 médias (esquerda).

VII.3.2.2 Frutose

O mesmo procedimento foi realizado com a frutose, onde a figura abaixo mostra a simulação de um espectro de alta resolução, dada a estrutura da frutose, em 400MHz, com 0.1Hz de largura de linha, **FIG.VII.32**.

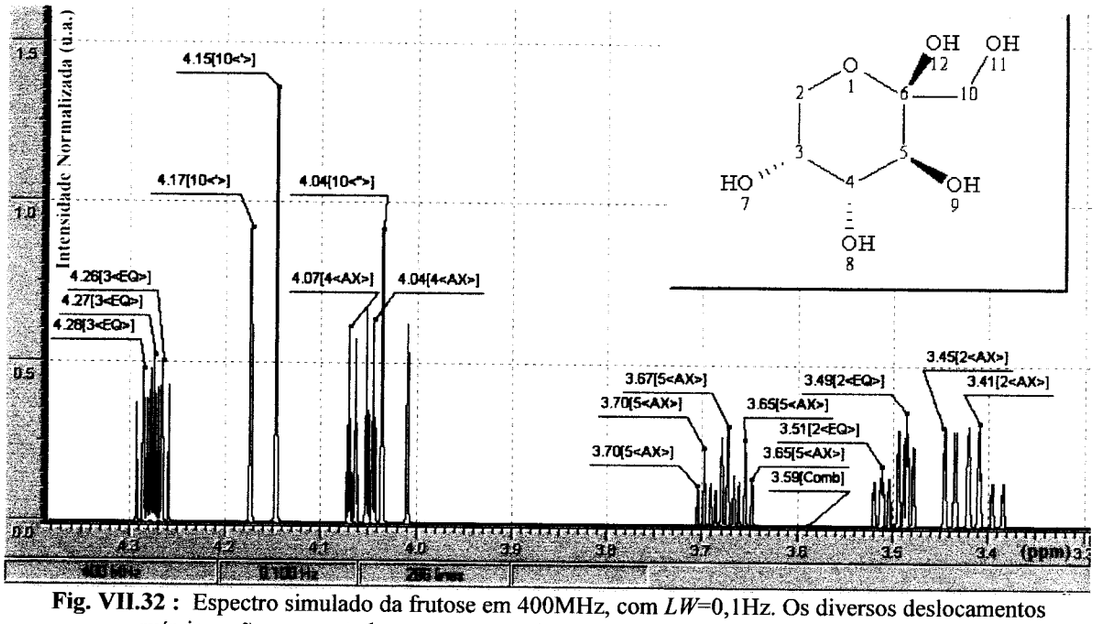

Fig. VII.32 : Espectro simulado da frutose em 400MHz, com *LW*=0,1Hz. Os diversos deslocamentos químicos são apresentados e seus respectivos prótons estão enumerados na estrutura.

Também foram feitas simulações em 85MHz, observando o quanto o espectro perde em definição de sua estrutura com alargamento da linha espectral. As duas simulações abaixo foram obtidas com *LW*=0.1ppm e 0.5ppm, **FIG.VII.33**.

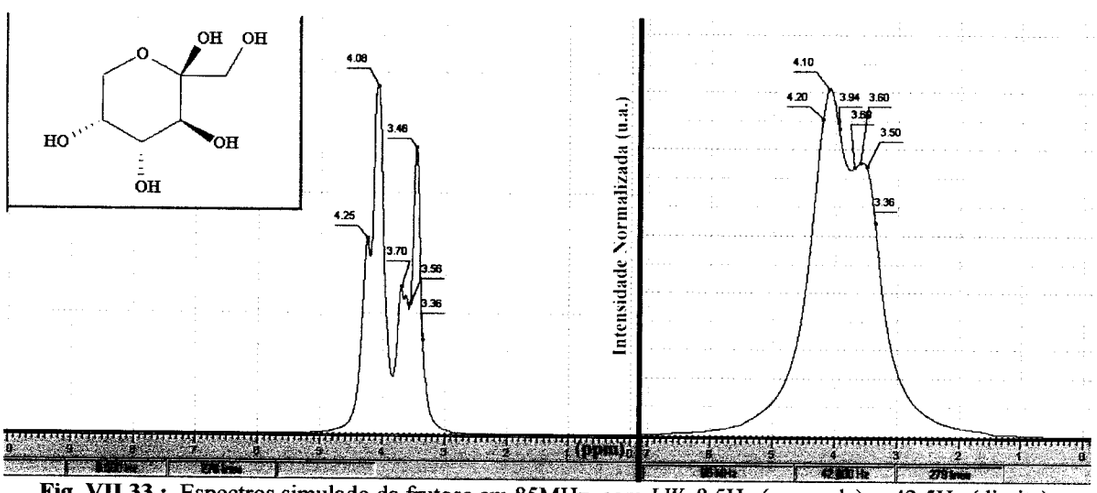

Fig. VII.33 : Espectros simulado da frutose em 85MHz, com *LW*=8,5Hz (esquerda), e 42.5Hz (direita).

As figuras abaixo foram obtidas experimentalmente, de uma solução de frutose de concentração 250mg/mL. A **Fig.VII.34** mostra o espectro com e sem supressão do sinal da água com a seqüência *MEGA-PRESS*. Picos próximos de 3,4ppm, 3,7ppm e 4ppm estão de acordo com alguns encontrados na simulação.

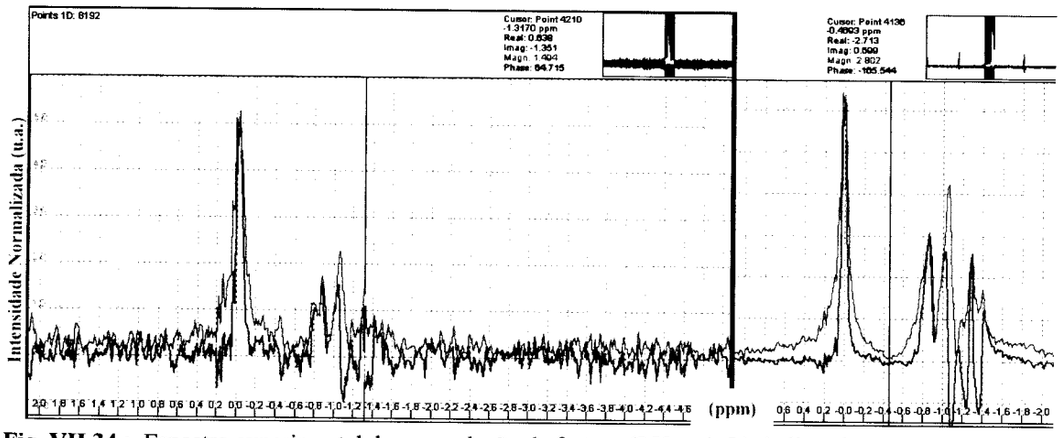

Fig. VII.34 : Espectro experimental de uma solução de frutose (250mg/mL), indicando a região dos picos relativo a frutose (direita) e o mesmo obtido após a supressão, com 100 médias (esquerda).

VII.3.2.3 Sacarose

Por fim a sacarose, mostrada na simulação de um espectro de alta resolução, dada a estrutura da sacarose, em 400MHz, com 0.1Hz de largura de linha, **FIG.VII.35**.

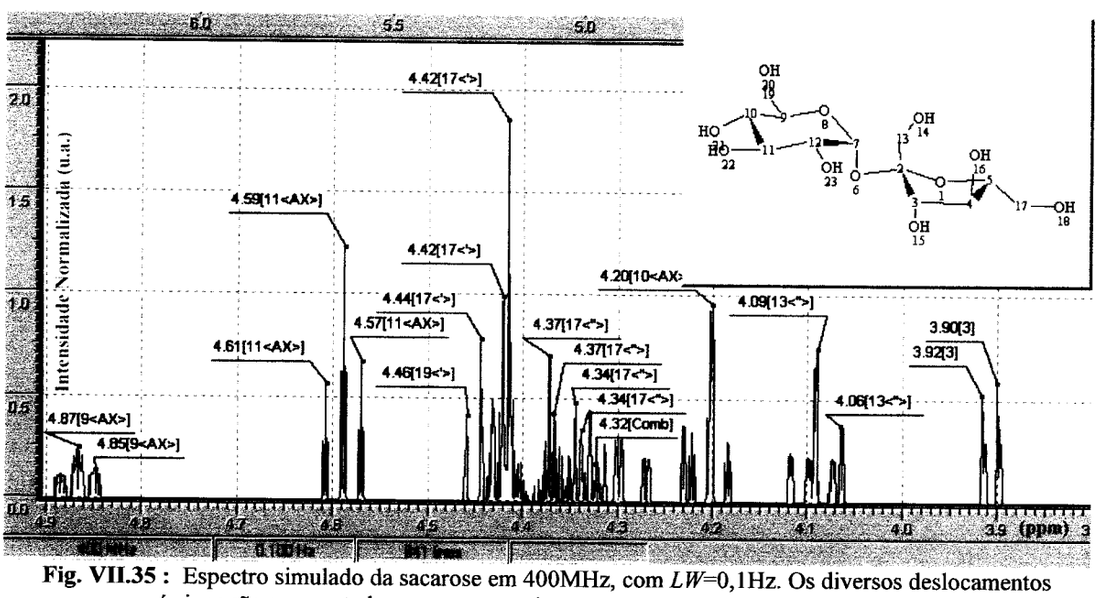

Fig. VII.35 : Espectro simulado da sacarose em 400MHz, com *LW*=0,1Hz. Os diversos deslocamentos químicos são apresentados e seus respectivos prótons estão enumerados na estrutura.

Abaixo estão as simulações em 85MHz, com *LW*=0.1ppm e 0.5ppm, **FIG.VII.36**.

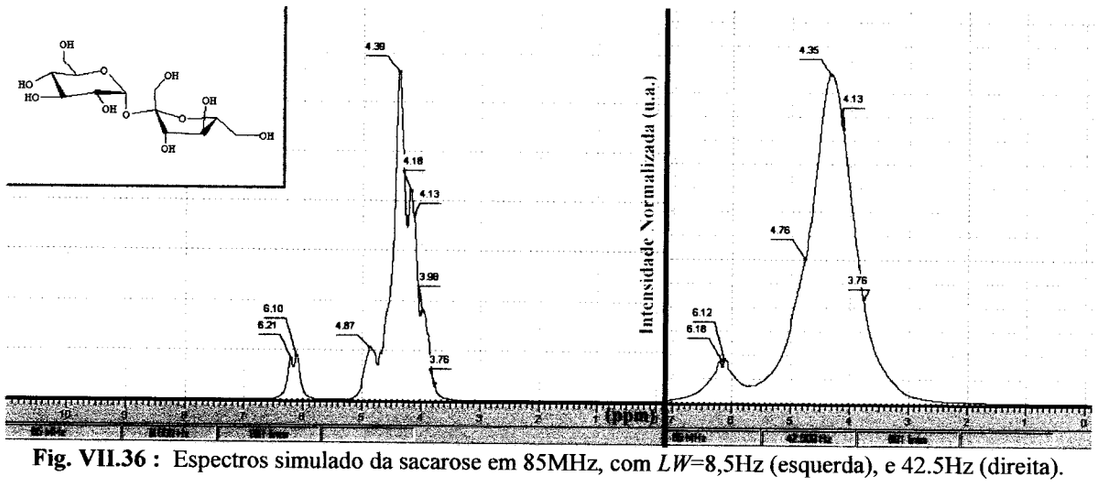

Fig. VII.36 : Espectros simulado da sacarose em 85MHz, com *LW*=8,5Hz (esquerda), e 42.5Hz (direita).

A figura abaixo mostra quão intenso está o sinal da sacarose desta solução, com concentração 170mg/mL., com apenas uma aquisição já estão bastante evidenciados os seus dois picos mais intensos, distantes -1ppm e -1,2ppm do pico da água, que ainda após realizadas 100 médias (sem supressão) começa a evidenciar os outros picos importantes, **FIG.VII.37**. O último espectro, em que se realiza a supressão do sinal da água, é apresentado com o intuito de observar o quanto é atenuado o sinal de interesse, **Fig.VII.38**. Ilustra também que aquele pico extremamente intenso agora está no mesmo patamar e se o campo estiver bem homogêneo, apresentando uma largura de linha bem estreita, é possível evidenciar estruturas de interesse. Picos próximos de 3,7ppm, 4ppm e 4,2ppm concordam com a simulação.

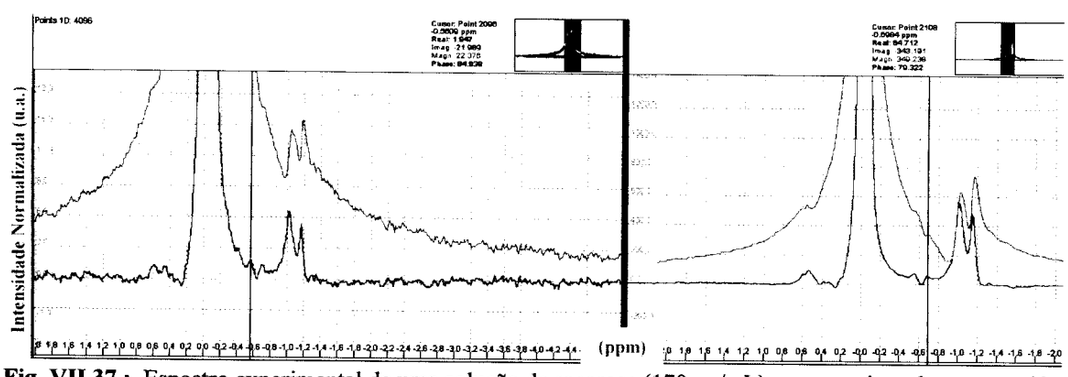

Fig. VII.37 : Espectro experimental de uma solução de sacarose (170mg/mL), com os picos da sacarose já evidenciado (direita) e com 100 médias outros aparecem (esquerda).

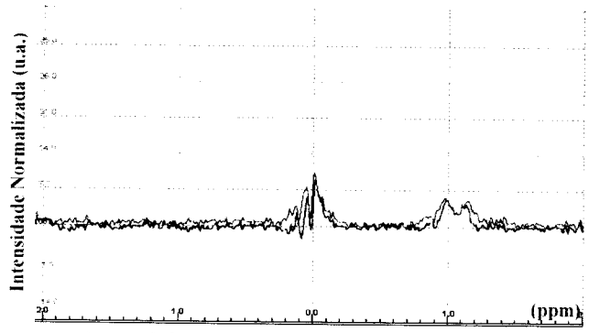

Fig. VII.38 : Espectro experimental de uma solução de sacarose (170mg/mL) após ser realizada uma supressão do sinal da água.

Finalizando com uma simulação dos três metabólitos de açúcar mais encontrados nas frutas: a glicose, a frutose e a sacarose, **FIG.VII.39**.

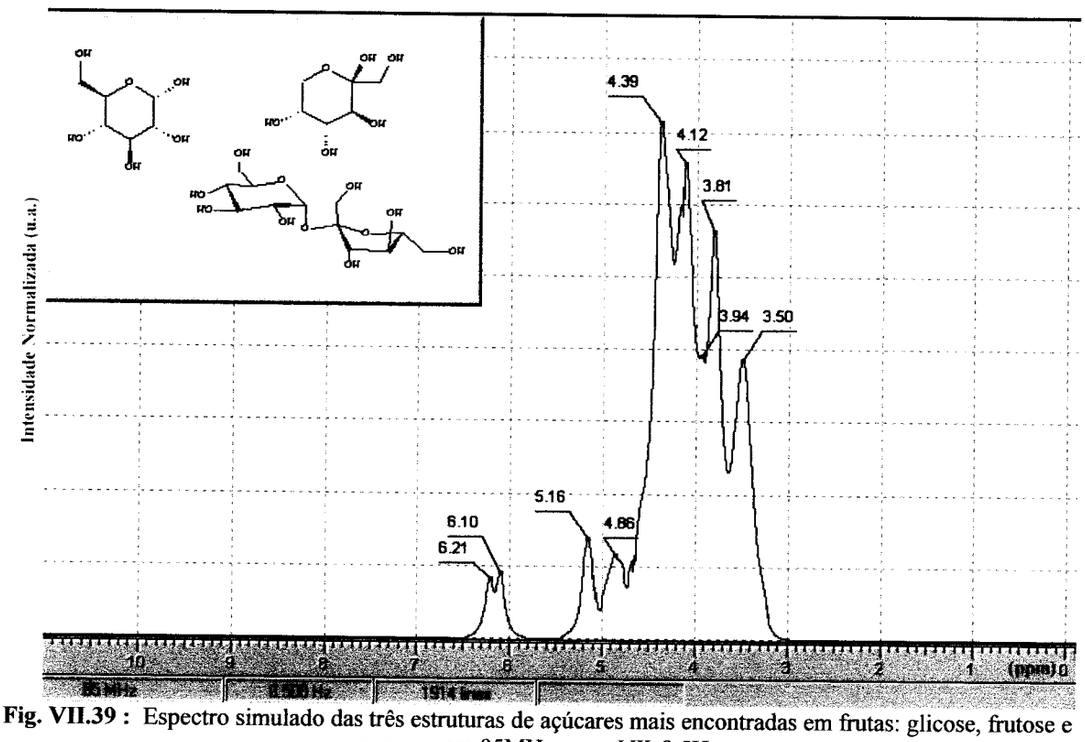

Fig. VII.39 : Espectro simulado das três estruturas de açúcares mais encontradas em frutas: glicose, frutose e sacarose, em 85MHz, com *LW*=8,5Hz.

VII.4 Aplicação em diversas frutas

Foram utilizadas diversas frutas, de diferentes variedades. Aqui serão apresentados os espectros adquiridos pelas seqüências implementadas, onde em alguns casos os problemas devido à suscetibilidade fica notório e em muitos outros é possível identificar picos de determinado açúcar. Vale lembrar que ao serem colocadas dentro do magneto, todo o

posicionamento foi ajustado com a ajuda de um imagem simples adquirida com a seqüência *Multi Slice Spin-Echo*. Com as frutas bem centradas no *FOV* da imagem e na *ROI* do magneto, era possível visualizar a região que estaria dentro do volume localizado e de antemão ter uma idéia de que tipo de tecido estava sendo adquirido o espectro, além é claro de auxiliar na mensuração dos deslocamentos do volume, com mais precisão. Ainda ressaltando que o volume das amostras estavam limitadas a um cilindro de 8cm de diâmetro na bobina maior e de 4cm de diâmetro na bobina menor. Mais limitadas ainda se considerarmos que a região onde a homogeneidade do campo magnético realmente era alta era no máximo do tamanho dos *phantoms* com os quais era realizado o *shimming* do campo. Os *phantoms* utilizados na homogeneização do campo eram: para a bobina maior as esferas de raio 35mm e 22mm, e para a menor a esfera de raio 15mm.

Algumas observações devem ser feitas aqui antes de começar com a apresentação dos resultados. Nesta apresentação dos resultados se fez muito mais uso da seqüência *MEGA-PRESS* do que da *MEGA-STEAM*, o que é explicado pelas próprias características das seqüências, onde a *MEGA-PRESS* apresenta um sinal mais intenso que a *MEGA-STEAM*, conforme discutido no **CAP.IV**. Lembrando que esta última foi bastante utilizada nas seções anteriores deste capítulo, assim quando não for especificada qual a seqüência utilizada, considere-se como sendo a *MEGA-PRESS*. Apenas ilustrando essa questão das intensidades com um exemplo, que é dado na **FIG.VII.42**. Também ressaltando que nos espectros apresentados adiante, onde houver supressão, sempre estará presente uma linha amarela que indica o *offset* da borda mais aguda do pulso adiabático assimétrico de supressão. Como nada do que está à esquerda desta linha terá coerência suficiente, restringiremos a observação e discussão dos resultados à região denominada na literatura de médio campo (3ppm-5,5ppm), mas a partir da direita da linha amarela (*offset*), e alto campo (0-3ppm). Para evitar confusão durante a leitura, fica posto que as especificações de deslocamento químico serão referidos como na literatura comum, com o pico da água em 4,7ppm, que nos gráficos experimentais é escolhido o zero. Assim, sempre que for referido algum deslocamento químico será o comumente usado seguido entre parênteses daquele conforme está na escala do gráfico. Para evitar repetidas explicações na apresentação dos resultados, alguns parâmetros comuns ficam estabelecidos aqui. No que se refere aos volumes localizados, a grande maioria foi de $5x5x5mm^3$, caso contrário será fornecido de imediato qual o volume que está sendo tratado. O número de médias quando não especificado prontamente deve ser considerado como sendo de 100 médias. As especificações dos

parâmetros da seqüência *MEGA-PRESS* foram de TR=310ms, TE=26ms, *crushers*=3,5G/cm (supressão) e *spoilers*=3G/cm (localização), ambos com tempos de atuação de 1,5ms. Ajustes disponíveis no *NTNMR*, tais como correção de fase de ordem zero e de primeira ordem, correção de linha de base e aplicação de *zero filling* (em aquisições de 4096 pontos, com tempo de 256ms, com uma janela de +/- 8000Hz), foram utilizados.

A seguir serão apresentados os resultados obtidos com cada uma das frutas utilizadas neste trabalho.

Fruta do conde

Esta é uma fruta com bastante, e grandes, sementes permeando o seu interior. O interessante aqui foi observar, além dos picos de açúcares, o pico devido ao óleo, presente nas sementes, muito intenso. Abaixo é mostrada uma imagem que foi utilizada para guiar o posicionamento do volume e uma foto da fruta, **FIG.VII.40**.

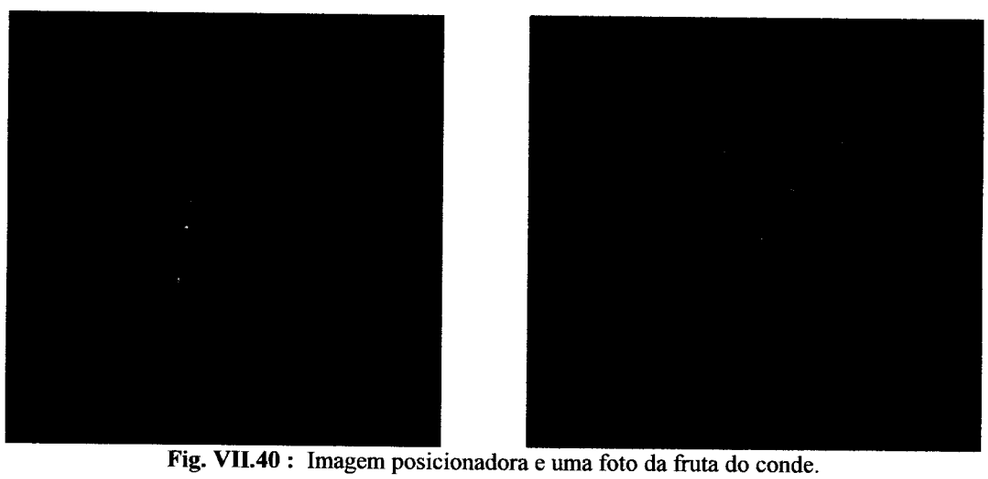

Fig. VII.40 : Imagem posicionadora e uma foto da fruta do conde.

Nos espectros apresentados na figura abaixo, **FIG.VII.41**, podemos identificar o pico referente aos açúcares e um outro pico muito intenso, referente ao óleo presente nas sementes. Como é observado na imagem, a polpa não se encontra no centro e o volume localizado, que neste caso foi de $10x10x10mm^3$, foi deslocado para a ponta da fruta. Aqui são apresentados os espectros obtidos com as seqüências *MEGA-STEAM* e *MEGA-PRESS*, onde é possível observar que a *MEGA-PRESS* apresenta um sinal mais intenso, como dito anteriormente. Na **FIG.VII.42** os espectros obtidos sem nenhuma supressão, ilustra o fato das diferença de intensidades entre as duas seqüências.

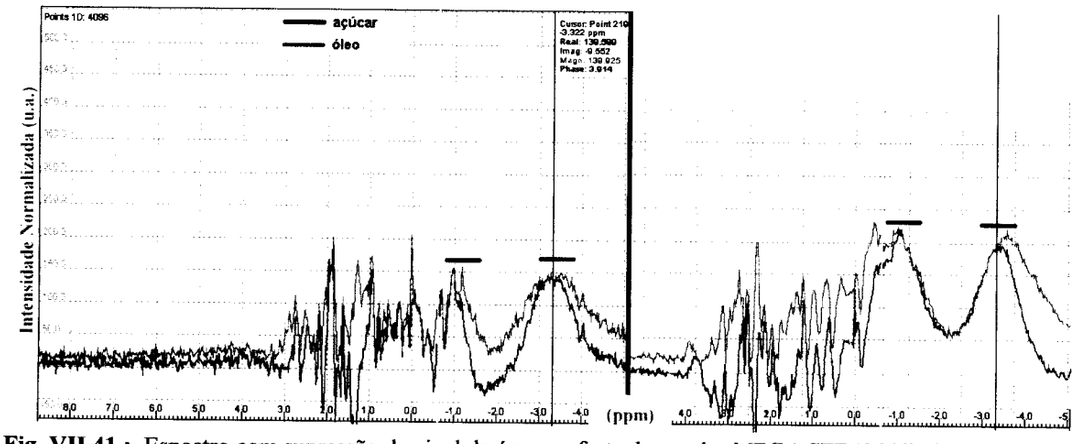

Fig. VII.41 : Espectro com supressão do sinal da água na fruta do conde. *MEGA-STEAM* (direita) e *MEGA-PRESS* (esquerda), com a identificação de açúcares e de óleo.

Aqui ainda é impossível discernir picos de algumas estruturas específicas, apenas a posição clara em 3,7ppm (-1ppm no gráfico), onde vários metabólitos contribuem realmente, e próximo a 1,5ppm (-3.2ppm).

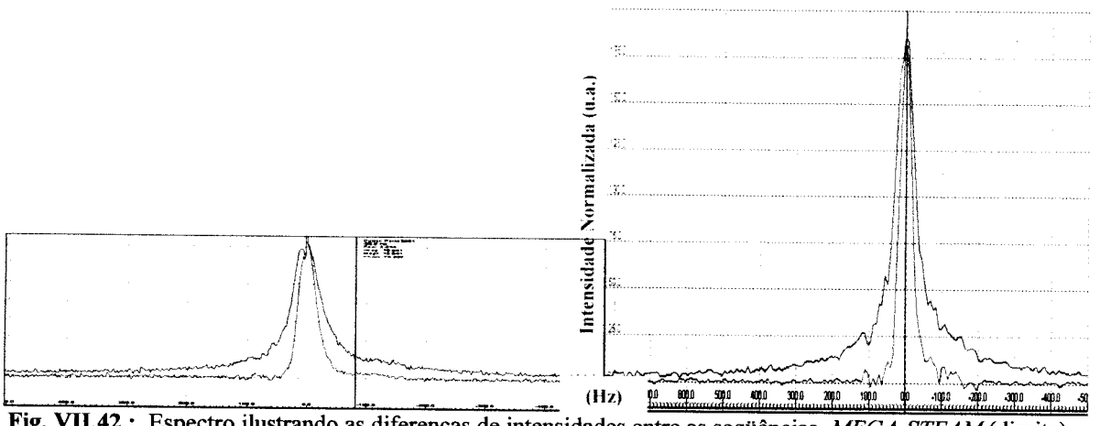

Fig. VII.42 : Espectro ilustrando as diferenças de intensidades entre as seqüências *MEGA-STEAM* (direita) e *MEGA-PRESS* (esquerda), do sinal da água na fruta do conde.

Ameixa

Esta fruta possuí um caroço no centro, de onde é possível observar o sinal intenso do óleo, **FIG.VII.43**. O volume localizado para a observação de açúcares foi deslocado, neste caso, para a lateral da fruta.

IFSC-USP SERVIÇO DE BIBLIOTECA INFORMAÇÃO

Fig. VII.43 : Imagem posicionadora e uma foto de uma ameixa.

Abaixo estão os espectros onde, no primeiro o volume foi localizado bem no centro onde se encontra o caroço, não havendo aplicação de supressão, aparecendo somente o intenso sinal de óleo, em torno de 1,4ppm (-3,3ppm) e sinais extremamente pequenos na região dos açúcares, **FIG.VII.44**. No segundo espectro, o volume foi localizado distante +15mm do centro na direção-X, **FIG.VII.45**. Aqui já há uma ligeira definição de picos em torno de 4.1ppm (-0.6ppm) e 3.8ppm (-0.9ppm), sacarose, e em 3,3ppm (1.5ppm), glicose. Já a frutose, por ter um sinal de intensidade menor, não parece tão evidenciada, em 3,85ppm (-0.75ppm) e em 3.6ppm (-1.1ppm).

Foi feita a medida da porcentagem de sólidos solúveis pelo método BRIX, utilizando o refratômetro portátil, da mesma região do volume localizado (+15mm do centro na direção-X), com o resultado de 21%.

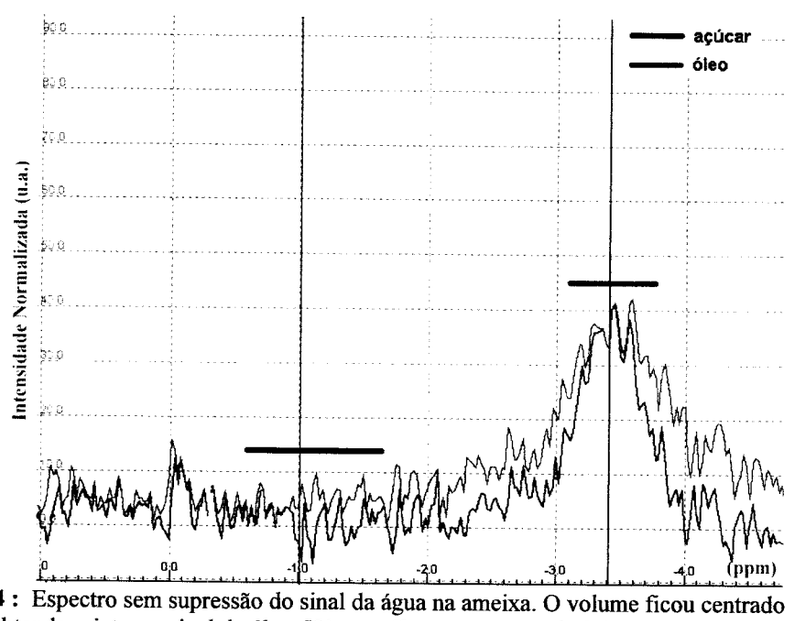

Fig. VII.44 : Espectro sem supressão do sinal da água na ameixa. O volume ficou centrado no caroço, obtendo o intenso sinal de óleo. Há um *offset* no espectro de 0.1ppm para à direita.

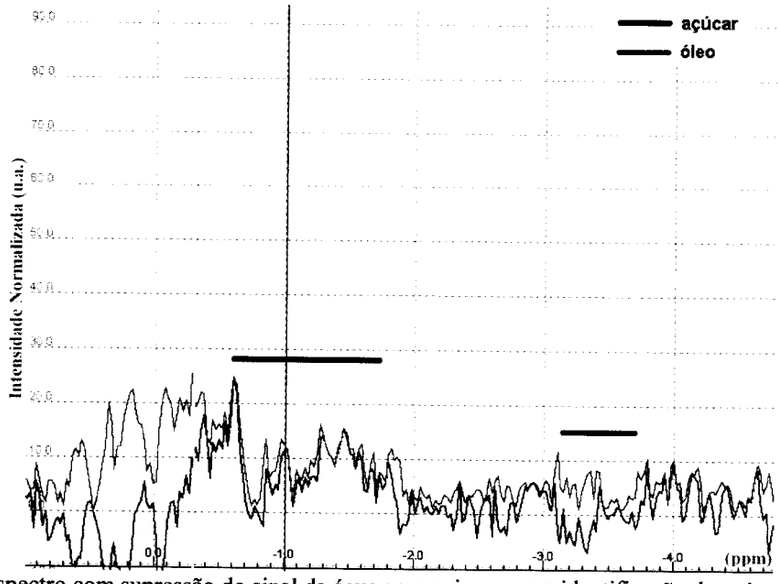

Fig. VII.45 Espectro com supressão do sinal da água na ameixa, com a identificação de açúcares e de óleo.

Maçã

A maçã tem como característica a alta suscetibilidade magnética devido a grande porosidade, que deixa espaços, ou seja, microscópicas bolhas de ar em seu interior, **FIG.VII.46**.

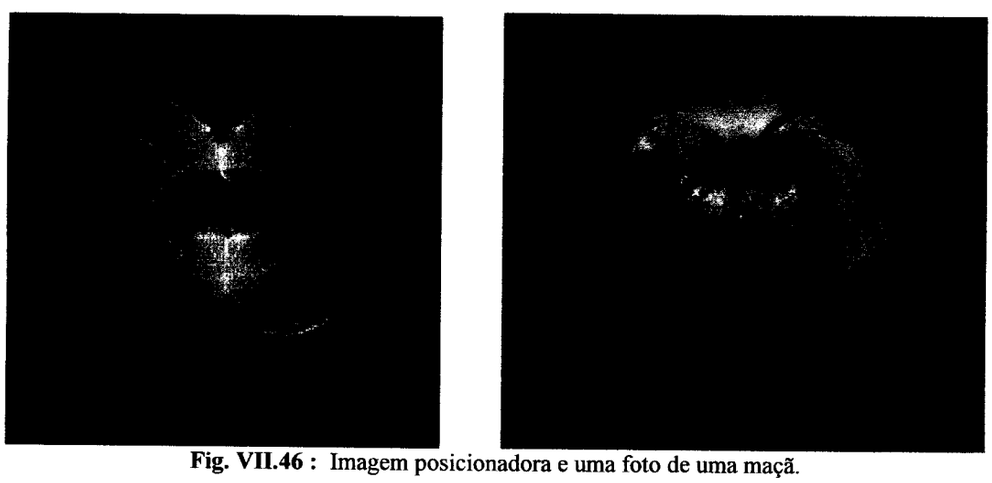
Fig. VII.46 : Imagem posicionadora e uma foto de uma maçã.

O primeiro espectro apresentado abaixo corresponde ao volume localizado no centro, onde estão as sementes e microscópicos "bolsões" de ar, mostrando um espectro sem nenhuma identificação, **FIG.VII.47**. No espectro seguinte o volume é deslocado de +15mm na direção-X, **FIG.VII.48**. No último espectro, o volume é deslocado de -15mm na direção-Y e realizado um número maior de médias (1000), **FIG.VII.49**. Podemos observar aqui uma

contribuição forte entre 4ppm e 3,6ppm (-0,7 e -0,9ppm), uma em 3,7ppm (-1ppm) e outra em 3,5ppm (–1,2ppm).

Foi feita a medida da porcentagem de sólidos solúveis pelo método BRIX, utilizando o refratômetro portátil, da mesma região do volume localizado (+15mm do centro na direção-X), com o resultado de 16,4%.

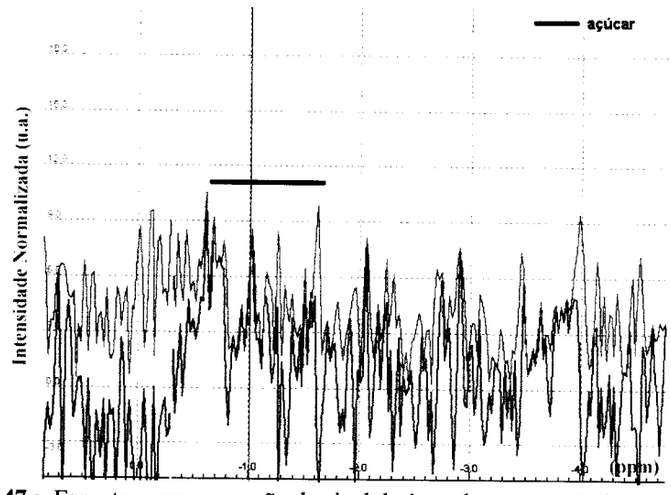

Fig. VII.47 : Espectro com supressão do sinal da água de uma maçã, da parte central.

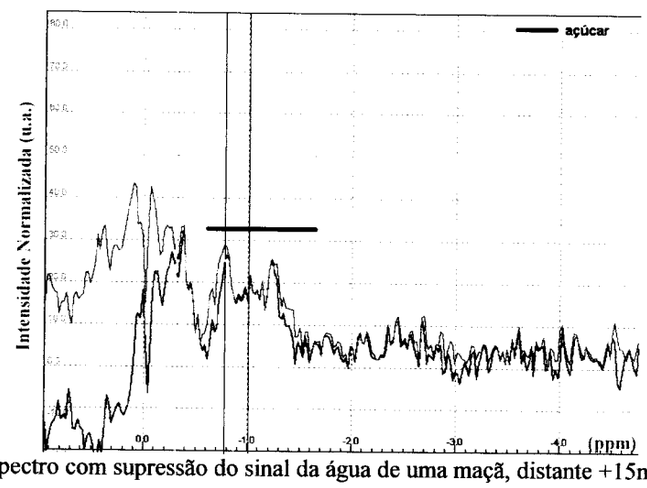

Fig. VII.48 : Espectro com supressão do sinal da água de uma maçã, distante +15mm na direção-X.

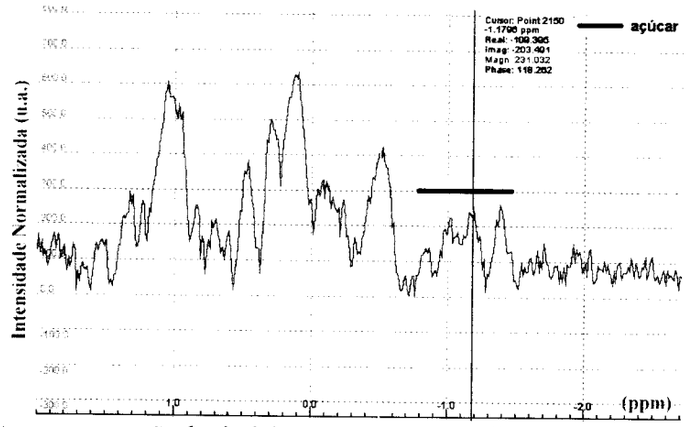

Fig. VII.49 : Espectro com supressão do sinal da água de uma maçã, distante -15mm na direção-Y, com 1000 médias.

Maracujá doce

O maracujá doce possui uma estrutura muito peculiar, pois é aparentemente oco quando maduro e sua polpa engloba a semente ficando praticamente solta, dentro da fruta, **FIG.VII.50**.

Fig. VII.50 : Imagem posicionadora e uma foto de um maracujá doce.

O espectro apresentado pelo maracujá, como mostra a **FIG.VII.51**. Contribuições em 3,7ppm (-1ppm) dos vários açúcares, uma em 3,8ppm (-0,9ppm e), sacarose, 3,6ppm (-1,1ppm), frutose e outra em 3,4ppm (–1,3ppm), glicose. Picos em 3,1ppm e 2,9ppm não foram identificados.

Foi feita a medida da porcentagem de sólidos solúveis pelo método BRIX, utilizando o refratômetro portátil, da mesma região do volume localizado (-15mm do centro na direção-Y), com o resultado de 9,8%.

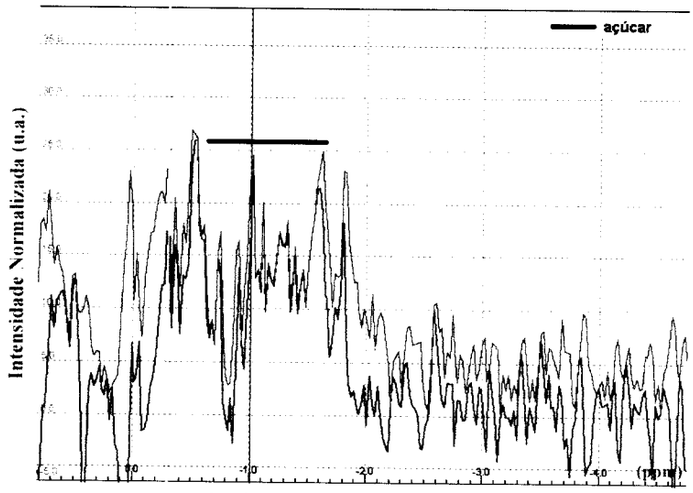

Fig. VII.51 : Espectro com supressão do sinal da água de um maracujá doce, distante -15mm na direção-Y.

Manga

Encontrar mangas que coubessem dentro da bobina de RF foi uma dificuldade inicial, pois o volume médio das mesmas era maior que o volume homogêneo do magneto. A variedade utilizada foi a manga Bourbon, pelo seu perfil adequado a este experimento.

O espectro abaixo mostra um volume localizado a uma distância de -30mm na direção-Y, **FIG.VII.52**. A forte contribuição em torno de 3,7ppm (-1ppm) indica a presença dos vários açúcares, mas sem nenhuma definição individual e o outro pico em torno de 3,2ppm (-1,5ppm) deve ser contribuição forte da glicose.

Foi feita a medida da porcentagem de sólidos solúveis pelo método BRIX, utilizando o refratômetro portátil, da mesma região do volume localizado (-30mm do centro na direção-Y), com o resultado de 13,6%.

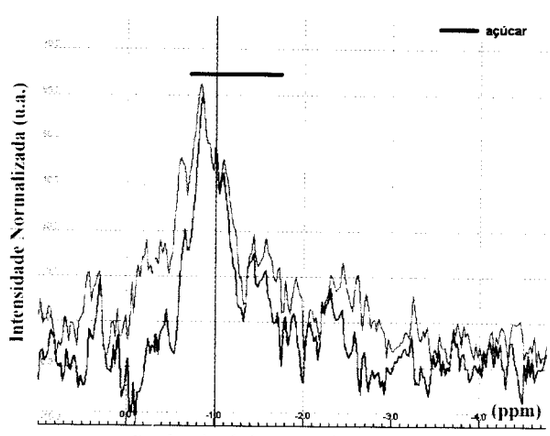

Fig. VII.52 : Espectro com supressão do sinal da água de uma manga, distante -30mm na direção-Y.

Pêra

A pêra por ter uma estrutura de tecido parecida com a maçã, também apresentou problemas com a alta suscetibilidade magnética, devido a presença de bolhas de ar microscópicas em seu interior, **FIG. VII.53**.

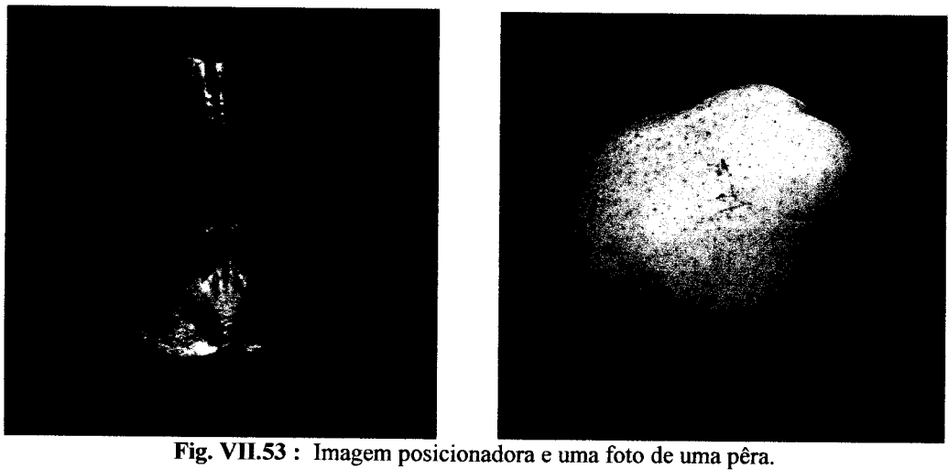

Fig. VII.53 : Imagem posicionadora e uma foto de uma pêra.

O espectro abaixo mostra um volume localizado no centro, e como era de se esperar, está totalmente indefinido, **FIG.VII.53**. Um segundo espectro foi obtido, um pouco melhor, agora a uma distância de –15mm na direção-Z, **FIG.VII.54**.

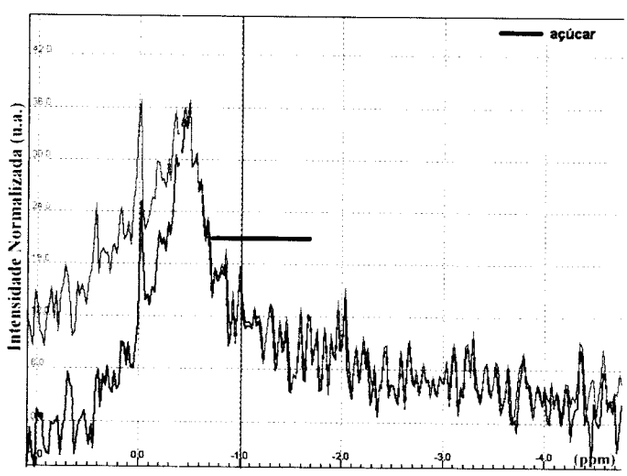

Fig. VII.54 : Espectro com supressão do sinal da água de uma pêra, no centro.

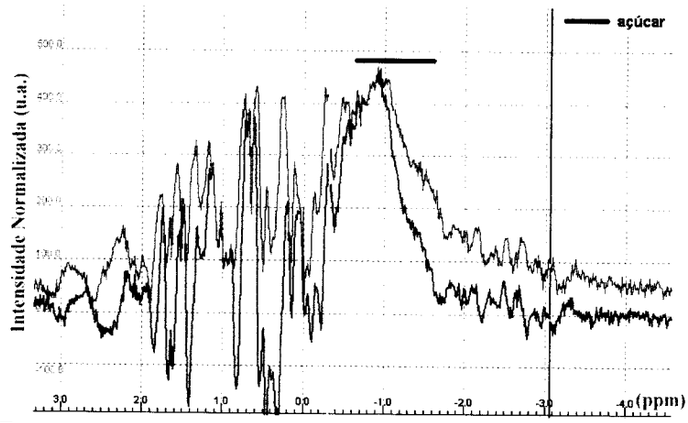

Fig. VII.55 : Espectro com supressão do sinal da água de uma pêra, , distante -15mm na direção-Z.

Devido à indefinição apresentada pelo espectro obtido, decidiu-se retirar parte da fruta e utilizar a bobina menor. Os espectros obtidos estão apresentados abaixo, onde o primeiro, **FIG.VII.56**, foi obtido do tecido retirado da parte inferior (da imagem), da mesma região que foi obtido o espectro apresentado na **FIG.VII.55**, e o segundo, **FIG.VII.57**, da parte superior (da imagem). Podemos observar aqui uma contribuição forte entre 3,7ppm e 3,4ppm (-1 e –1,3ppm) dos vários açúcares, uma em 3,9ppm (-0,8ppm), sacarose, e outra em 3,2ppm (–1,5ppm), glicose.

Foi feita a medida da porcentagem de sólidos solúveis pelo método BRIX, utilizando o refratômetro portátil, dos tecidos retirados e utilizados na medida do volume localizado com os resultados de 18% da parte de superior e 16% da parte inferior.

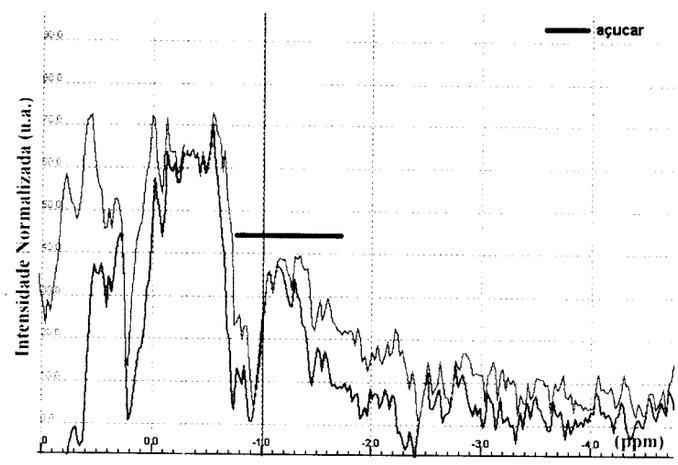

Fig. VII.56 : Espectro com supressão do sinal da água de uma pêra, , obtido com a bobina menor, da mesma região (parte inferior da imagem) que o espectro obtido na **Fig.VII.55**.

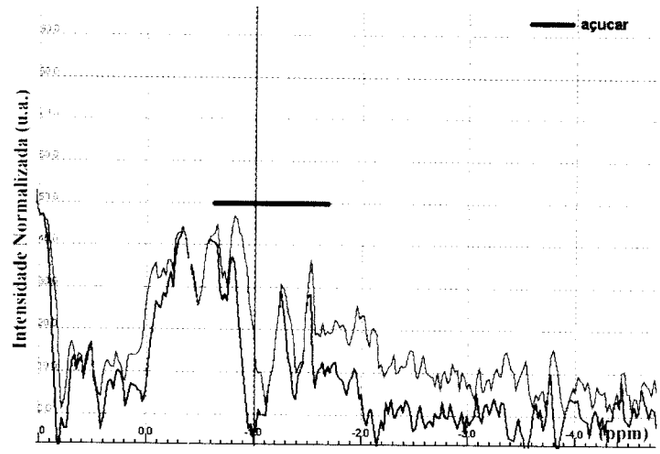

Fig. VII.57 : Espectro com supressão do sinal da água de uma pêra, , obtido com a bobina menor (parte superior da imagem).

Pêssego

O pêssego possui uma estrutura muito parecida com a ameixa. Esta fruta possuí um caroço grande no centro, de onde é possível observar o sinal intenso do óleo, **FIG.VII.58**. O volume localizado para a observação de açúcares foi deslocado, neste caso, para a lateral da fruta.

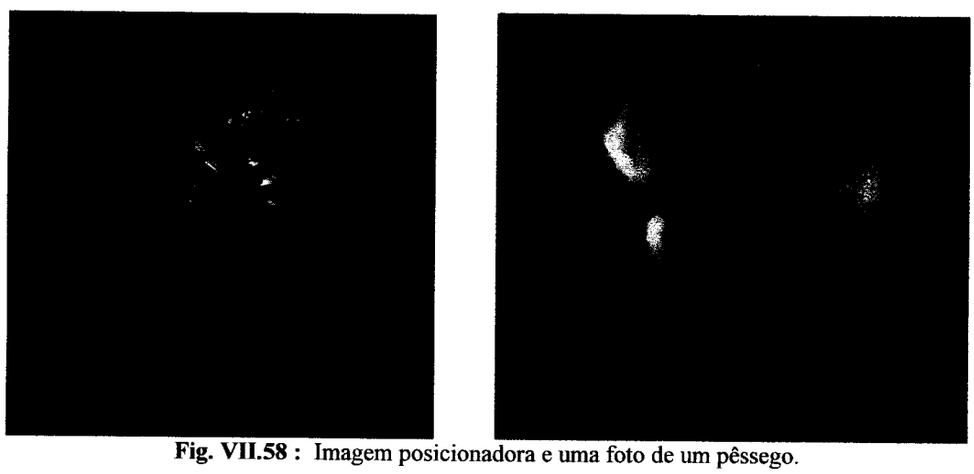

Fig. VII.58 : Imagem posicionadora e uma foto de um pêssego.

Abaixo estão os espectros onde, no primeiro o volume foi localizado bem no centro onde se encontra o caroço, não havendo aplicação de supressão, aparecendo somente o intenso sinal de óleo, em torno de 1,2ppm (-3,5ppm) e sinais extremamente pequenos na região dos açúcares, **FIG.VII.59**. No segundo espectro, o volume foi localizado distante +15mm do centro na direção-Y, **FIG.VII.60**. Aqui já há uma definição de picos em torno de 3.8ppm (-0.9ppm) e 3,6ppm(-1,1ppm), sacarose e frutose, e em 3,3ppm (1.4ppm), glicose.

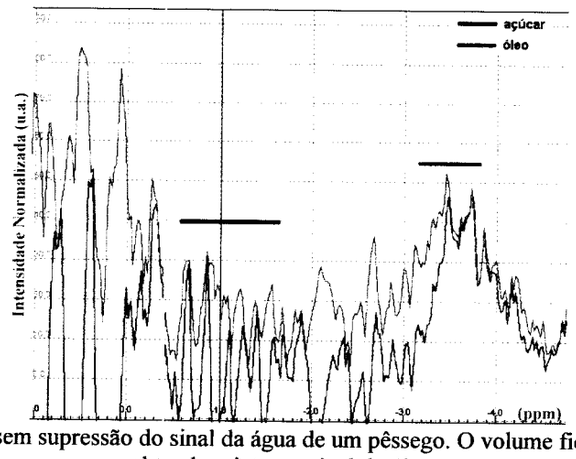

Fig. VII.59 : Espectro sem supressão do sinal da água de um pêssego. O volume ficou centrado no caroço, obtendo o intenso sinal de óleo.

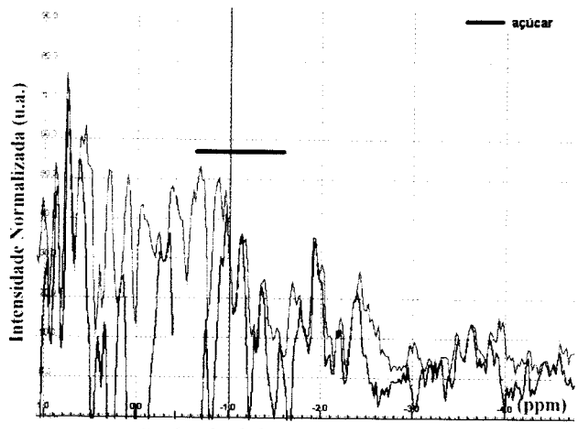

Fig. VII.60 : Espectro com supressão do sinal da água de um pêssego, distante +15mm na direção-Y.

Neste terceiro também se decidiu retirar uma parte do tecido e obter o espectro com a bobina menor, **FIG.VII.61**. Nos espectros do pêssego é possível observar outras estruturas presentes.

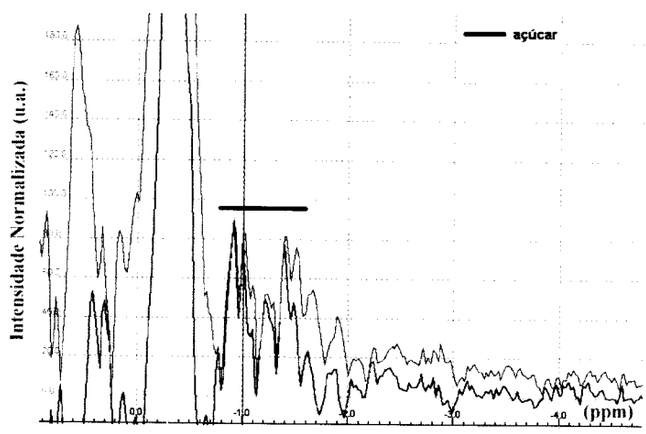

Fig. VII.61 : Espectro com supressão do sinal da água de um pêssego, obtido com a bobina menor (parte superior da imagem).

Foi feita a medida da porcentagem de sólidos solúveis pelo método BRIX, utilizando o refratômetro portátil, da região da fruta inteira e do tecido retirado e utilizado na medida do volume localizado, com os resultados de 12% da região da fruta inteira (+15mm do centro na direção-Y) e 14% da parte retirada e realizada com a bobina menor.

Kiwi

O kiwi também é uma fruta exótica, tanto externa como internamente, como pode ser observado nas figuras abaixo, **FIG. VII.62**. Ele apresenta compartimentações bem definidas de seus tecidos.

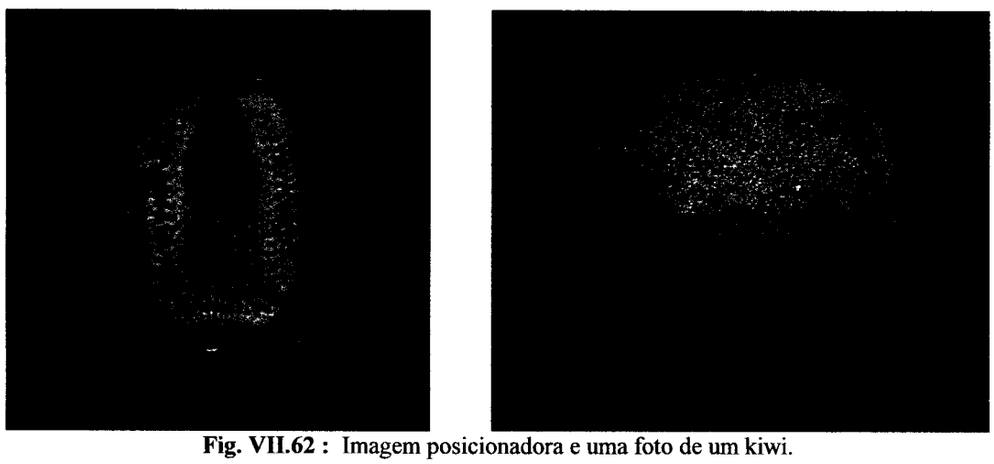

Fig. VII.62 : Imagem posicionadora e uma foto de um kiwi.

O primeiro espectro abaixo é da região central, que é bastante fibrosa, pouco aquosa e cheio de interfaces, por isso a obtenção de um espectro indefinido e ruidoso, **FIG.VII.63**. No segundo, o volume foi deslocado de +15mm na direção-X, em relação ao ponto central, e o espectro adquirido também não mostra nenhuma definição clara dos picos de açúcares, **FIG.VII.64**.

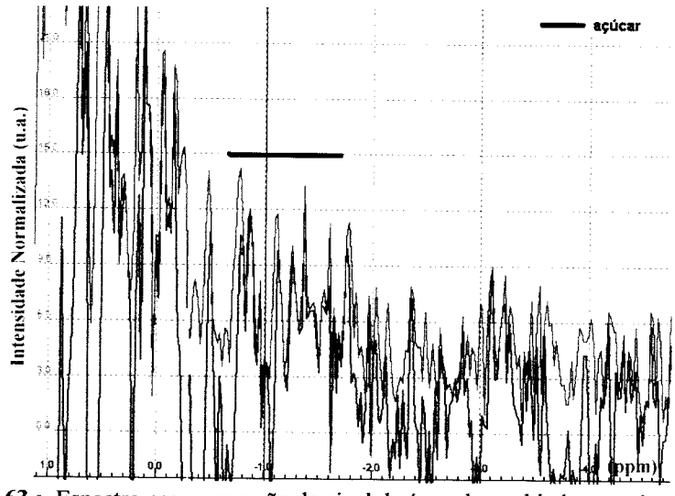

Fig. VII.63 : Espectro com supressão do sinal da água de um kiwi, na região central.

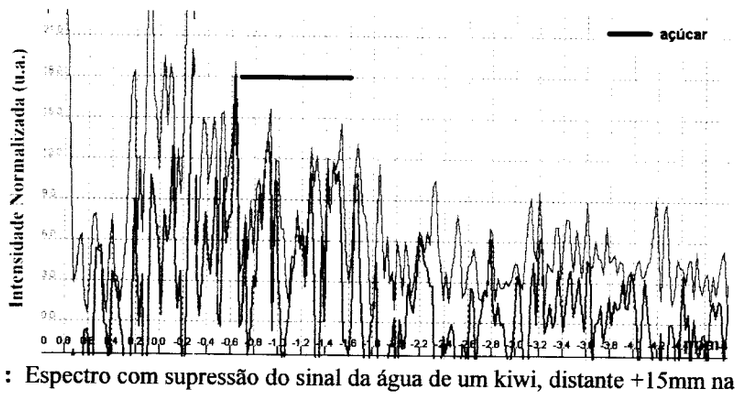

Fig. VII.64 : Espectro com supressão do sinal da água de um kiwi, distante +15mm na direção-X.

Realizando a análise em um pedaço do tecido na bobina menor, **FIG.VII.65**.

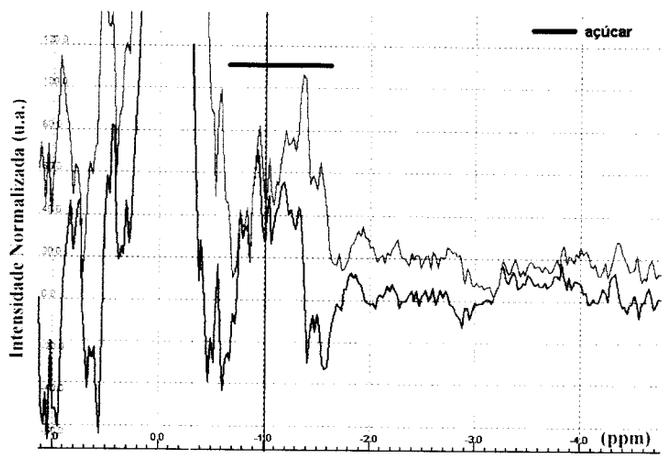

Fig. VII.65 : Espectro com supressão do sinal da água de um kiwi, obtido com a bobina menor (parte inferior da imagem).

Foi feita a medida da porcentagem de sólidos solúveis pelo método BRIX, utilizando o refratômetro portátil, da região da fruta inteira e do tecido retirado e utilizado na medida do volume localizado, com os resultados de 15,8% da região da fruta inteira (+15mm do centro na direção-X) e 16,4% da parte retirada e realizada com a bobina menor.

Banana

Por fim são apresentados os experimentos realizados com a banana, **FIG.VII.66**.

Fig. VII.66 : Imagem posicionadora e uma foto de um banana.

Os espectros apresentados abaixo mostra três estágios de maturação da banana (madura, intermediário e verde), **FIG.VII.67**.

Foi feita a medida da porcentagem de sólidos solúveis pelo método BRIX, utilizando o refratômetro portátil, da região central da banana madura que foi retirada e utilizado na medida do volume localizado, com o resultado de 25,8% da parte retirada e realizada com a bobina menor.

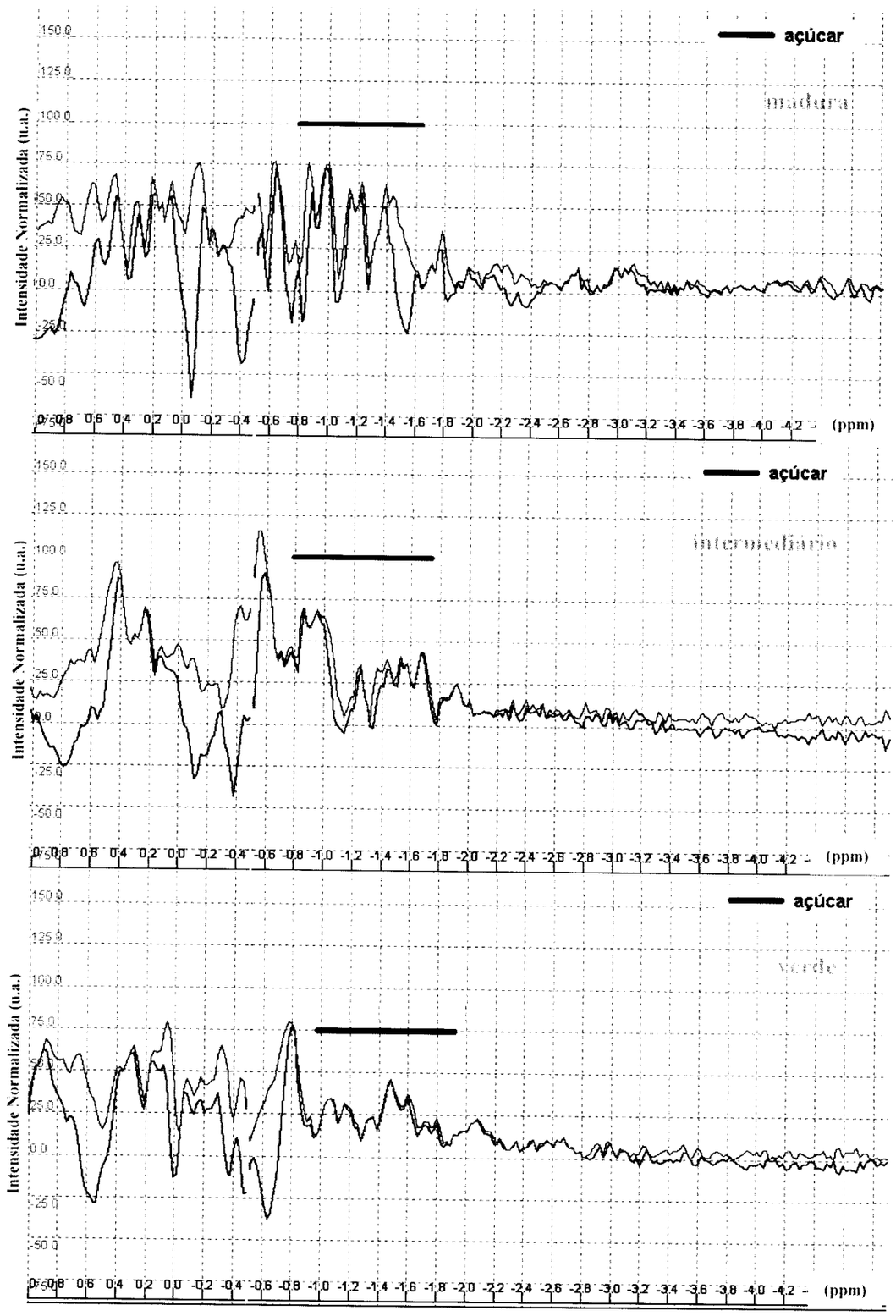

Fig. VII.67 : Espectro com supressão do sinal da água de uma banana, da região central.

O efeito da suscetibilidade magnética na largura de linha das frutas

Mesmo obtendo larguras de linha extremamente satisfatórias após efetuar o processo de *shimming* no campo magnético, como visto no **CAP.VI**, após colocarmos as amostras esta linha sofre terrivelmente com o efeito de suscetibilidade magnética. Nas figuras a seguir fica ilustrado, através de algumas frutas, o alargamento da linha após a inserção da amostra no campo magnético, **FIG.VII.68**. Na figura, todos os picos estão com a sua meia altura na mesma meia altura da laranja (de maior intensidade). Este é um dos muitos desafios ao se tentar fazer espectroscopia localizada em frutas intactas em campos magnéticos altos.

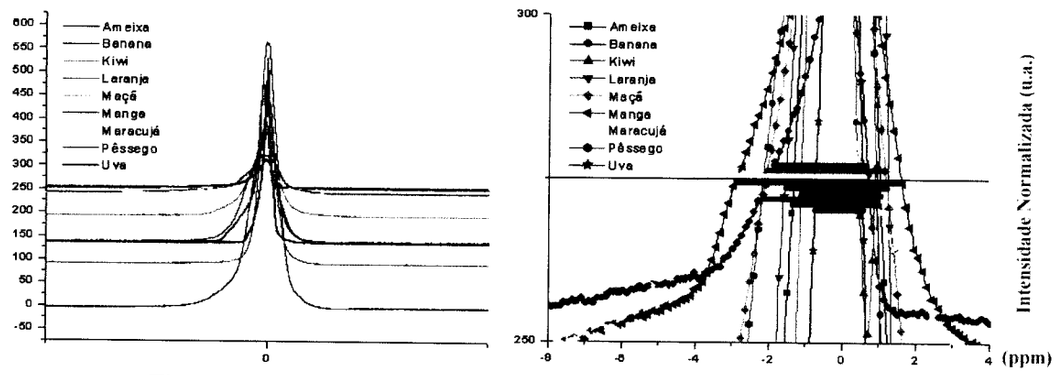

Fig. VII.68 : O alargamento de linha espectral para algumas das frutas estudas.

VII.5 Aplicação em estágios de maturação de algumas variedades de uva

Aqui foram selecionadas algumas uvas das variedades: Itália, Thompson, Rubi e Red Globe, **FIG.VII.69**. Foram dispostas em três grupos: o primeiro, onde eram escolhidas na gôndola as mais verdes possíveis; segundo, onde eram escolhidas as que possivelmente estavam num estágio intermediário ou que foram escolhidas no primeiro grupo, e passados alguns dias já deveriam ter maturado um pouco e por fim, no terceiro grupo, aquelas que realmente estavam bem maduras. O método de controle que foi usado para verificar o grau de maturação foi o BRIX.

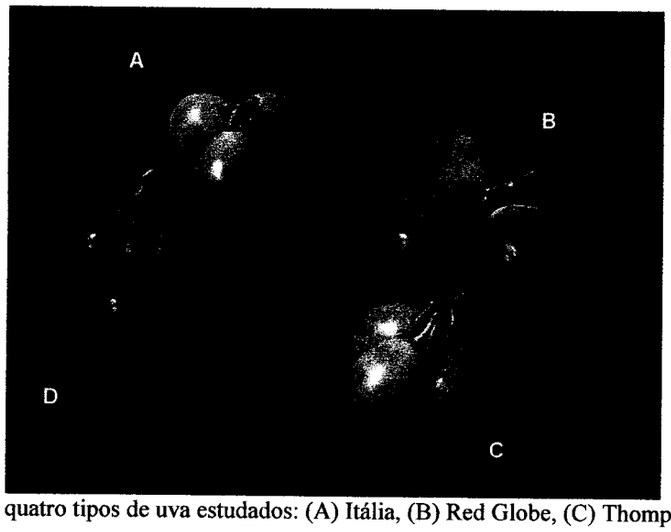

Fig. VII.69 : Os quatro tipos de uva estudados: (A) Itália, (B) Red Globe, (C) Thompson e (D) Rubi.

Uva Itália

No espectro abaixo estão dispostos os três estágios de maturação da variedade de uva Itália, **FIG.VII.70**.

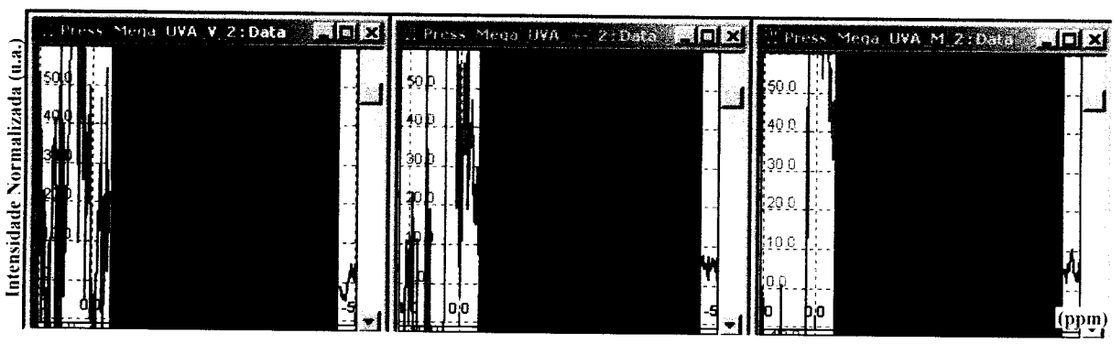

Fig. VII.70 : Os espectros obtidos para os três estágios de maturação da uva do tipo Itália, verde (esquerda), intermediário (centro) e madura (direita).

A medida da porcentagem de sólidos solúveis pelo método BRIX, utilizando o refratômetro portátil, foi utilizada e resultou nos valores: 11,8% (verde), 13,8% (intermediário) e 14,6% (maduro).

Uva Red Globe

No espectro abaixo estão dispostos os três estágios de maturação da variedade de uva Red Globe, **FIG.VII.71**.

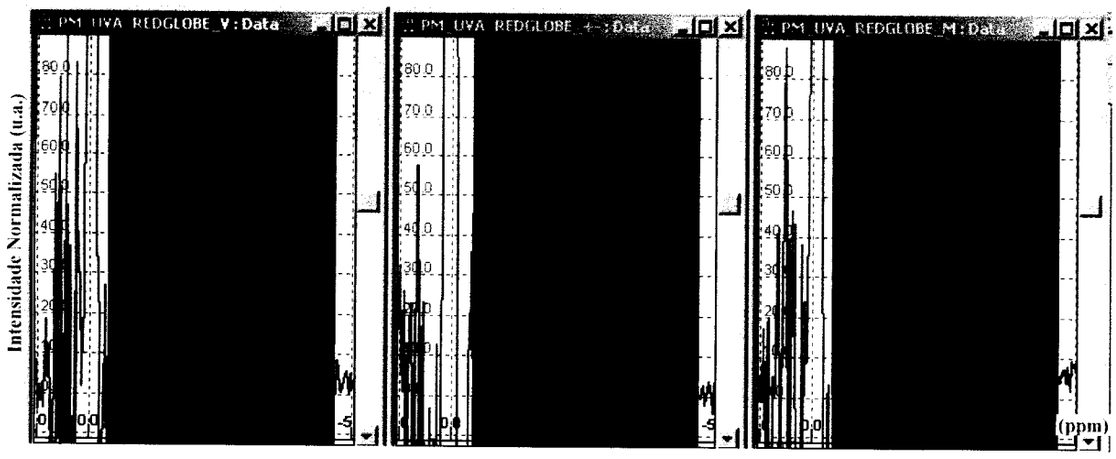

Fig. VII.71 : Os espectros obtidos para os três estágios de maturação da uva do tipo Red Globe, verde (esquerda), intermediário (centro) e madura (direita).

A medida da porcentagem de sólidos solúveis pelo método BRIX, utilizando o refratômetro portátil, foi utilizada e resultou nos valores: 7% (verde), 8,2% (intermediário) e 11% (maduro).

Uva Rubi

No espectro abaixo estão dispostos os três estágios de maturação da variedade de uva Rubi, **FIG.VII.72**.

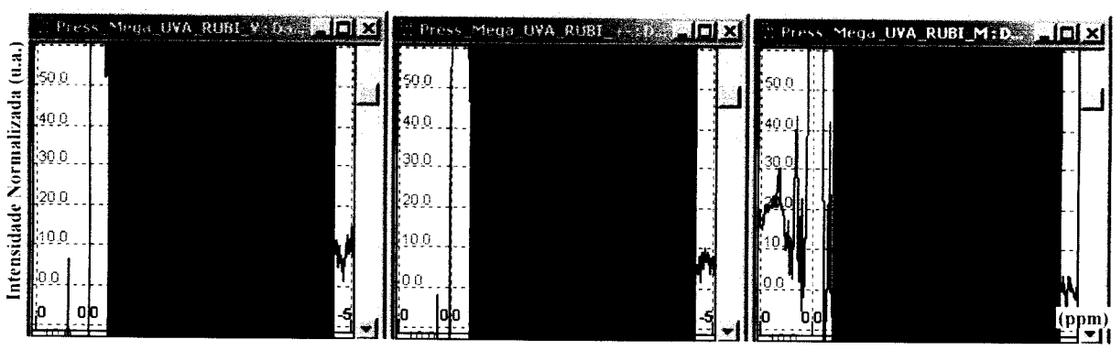

Fig. VII.72 : Os espectros obtidos para os três estágios de maturação da uva do tipo Rubi, verde (esquerda), intermediário (centro) e madura (direita).

A medida da porcentagem de sólidos solúveis pelo método BRIX, utilizando o refratômetro portátil, foi utilizada e resultou nos valores: 13,2% (verde), 14,5% (intermediário) e 17,6% (maduro).

Uva Thompson

No espectro abaixo estão dispostos os três estágios de maturação da variedade de uva Thompson, **FIG.VII.73**.

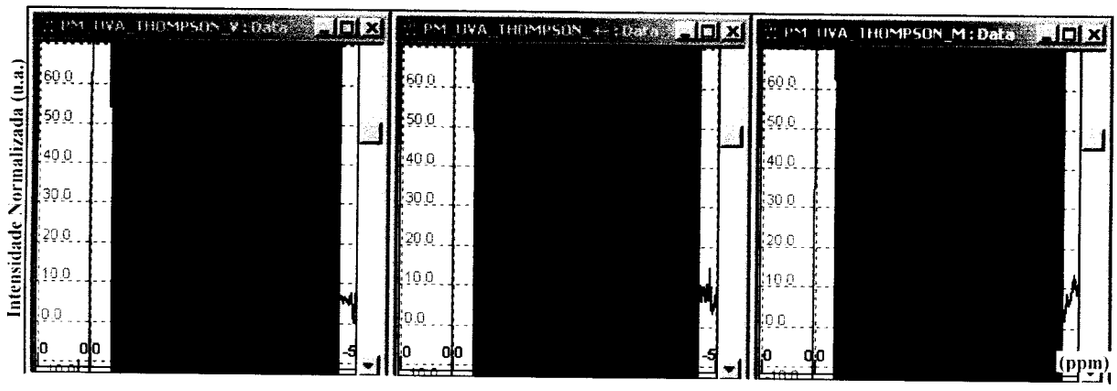

Fig. VII.73 : Os espectros obtidos para os três estágios de maturação da uva do tipo Thompson, verde (esquerda), intermediário (centro) e madura (direita)..

A medida da porcentagem de sólidos solúveis pelo método BRIX, utilizando o refratômetro portátil, foi utilizada e resultou nos valores: 19,2% (verde), 20,4% (intermediário) e 21% (maduro).

Uma comparação qualitativa

Por fim, aqui são colocadas lado a lado as quatro variedades de uva estudadas, na primeira figura estão todas as maduras, **FIG.VII.74,** e na segunda estão todas as verdes, **FIG.VII.75**.

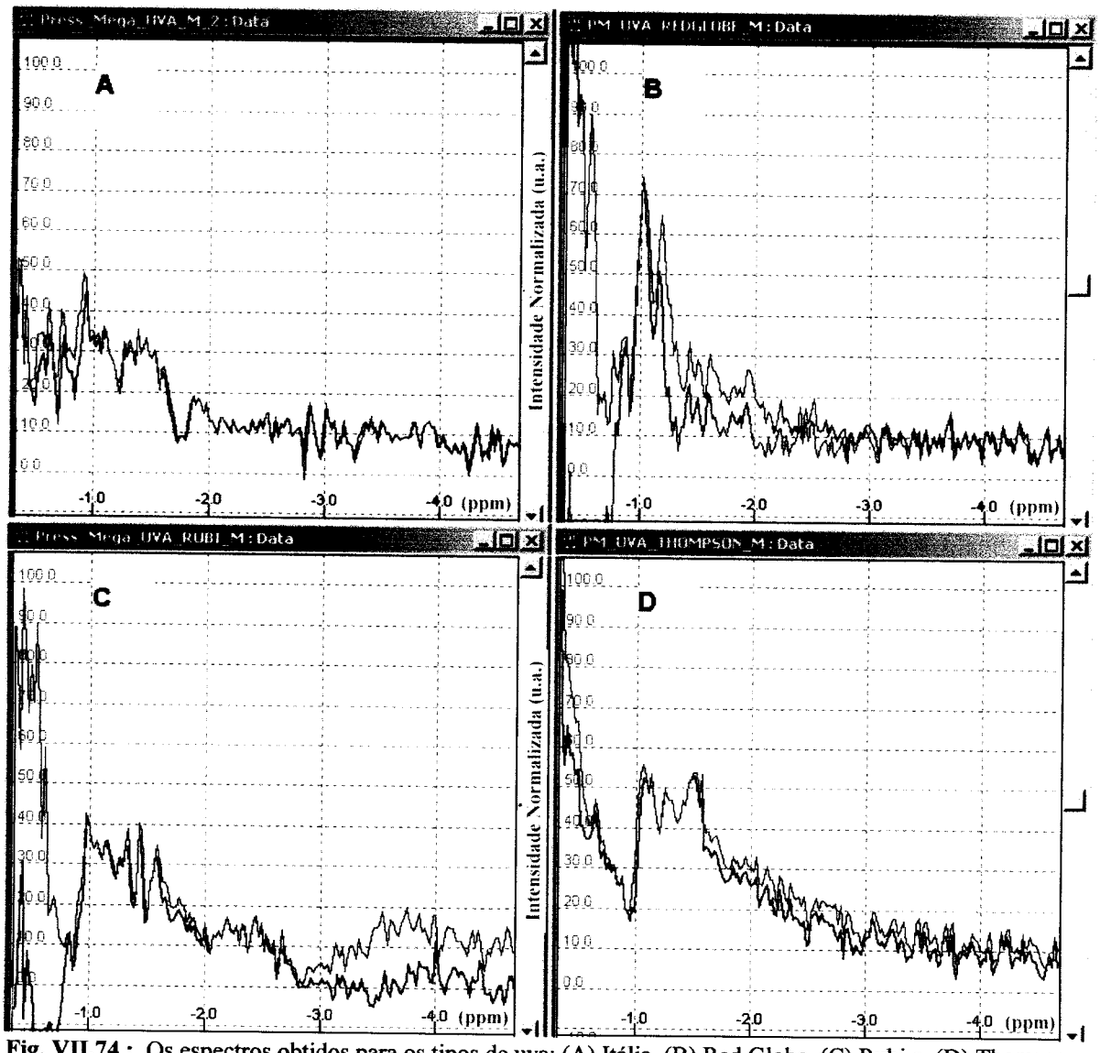

Fig. VII.74 : Os espectros obtidos para os tipos de uva: (A) Itália, (B) Red Globe, (C) Rubi e (D) Thompson, no seu estágio de maturação plena.

A medida da porcentagem de sólidos solúveis pelo método BRIX, utilizando o refratômetro portátil, foi utilizada e resultou nos valores para os tipos de uva: (A) Itália: 14,6%, (B) Red Globe: 11%, (C) Rubi: 17,6% e (D) Thompson: 21%, no seu estágio de maturação plena.

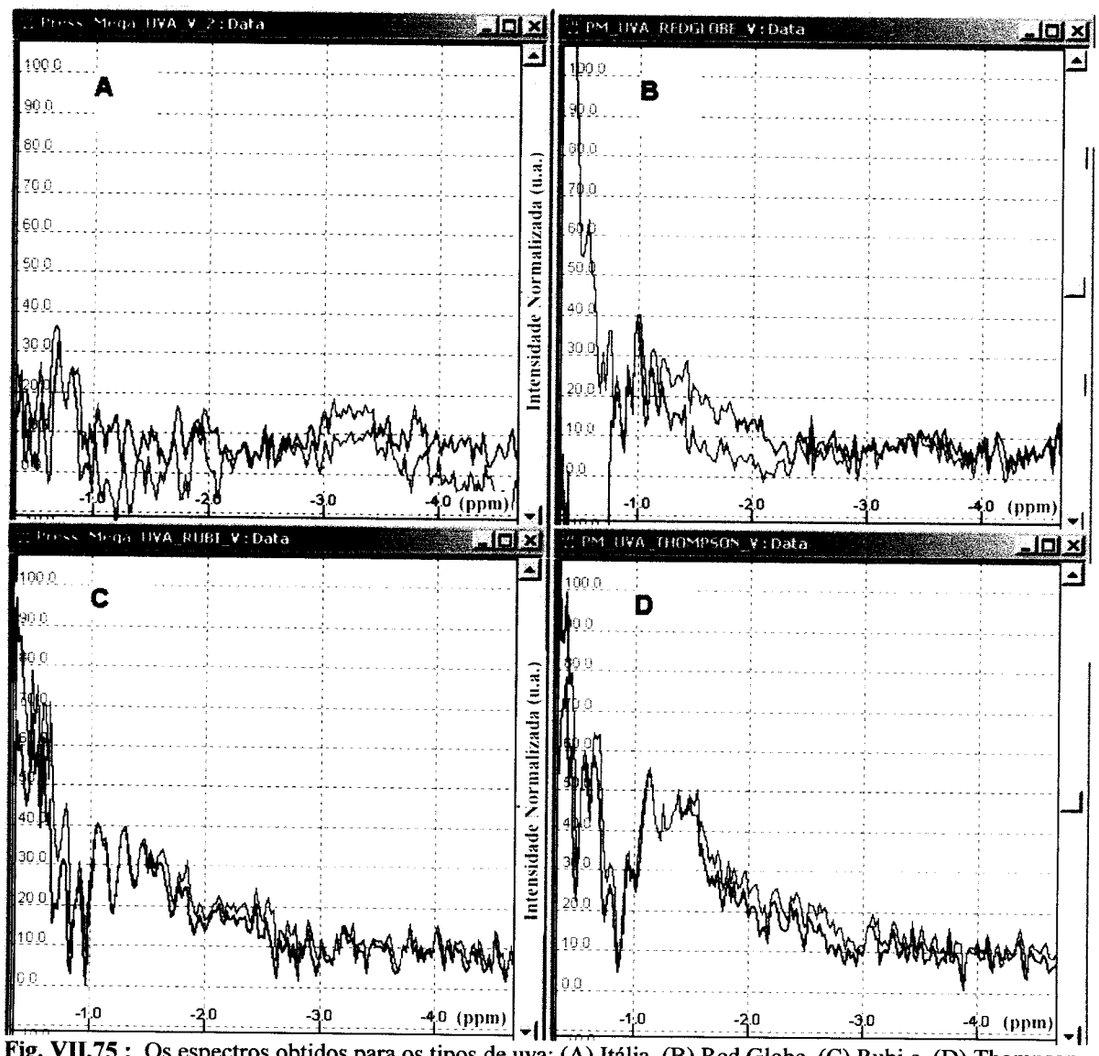

Fig. VII.75 : Os espectros obtidos para os tipos de uva: (A) Itália, (B) Red Globe, (C) Rubi e (D) Thompson, no seu estágio de maturação verde.

A medida da porcentagem de sólidos solúveis pelo método BRIX, utilizando o refratômetro portátil, foi utilizada e resultou nos valores para os tipos de uva: (A) Itália: 11,8%, (B) Red Globe: 7%, (C) Rubi: 13,2% e (D) Thompson: 19,2%, no seu estágio de maturação verde.

VII.6 Considerações finais

As seqüências implementadas, *MEGA-PRESS* e *MEGA-STEAM*, funcionaram e foram empregadas de maneira satisfatória, apesar das dificuldades experimentais encontradas. As seqüências estão ilustradas na **FIG.VII.76**. A espectroscopia localizada por ^{1}H *MRS* aplicada em frutas intactas foi satisfatória até esbarrar em problemas como a perda de

homogeneidade devido à variação local da suscetibilidade magnética, que é uma característica de cada fruta devido as suas diferenças histológicas, e que tende a se agravar à medida que se buscam campos magnéticos mais intensos.

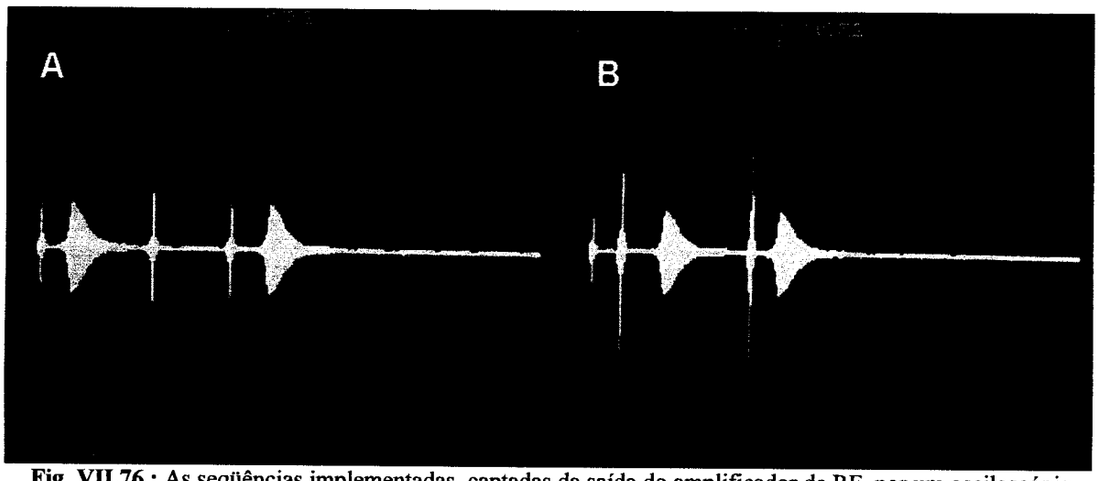

Fig. VII.76 : As seqüências implementadas, captadas da saída do amplificador de RF, por um osciloscópio TekTronix TDS380: (A) *MEGA-STEAM* e (B) *MEGA-PRESS.*

Conclusões

Como resultado geral, pudemos constatar que os métodos propostos de supressão de solvente e de localização de volumes, mostraram-se eficientes na observação dos açúcares próximos, objetivo principal deste trabalho. A correlação dos teores de açúcar com a medida BRIX de sólidos solúveis totais (SST) foram satisfatórias, mesmo sem se alcançar um *status* de alta resolução. Para as frutas onde o efeito da variação de susceptibilidade se apresentou como um obstáculo entendemos que estes métodos têm que ser aperfeiçoados, com a inclusão de procedimentos que visem a contornar aqueles efeitos. Os pulsos adiabáticos na sua tarefa de suprimir o sinal do solvente comportaram-se satisfatoriamente, apesar da necessidade de se fazer um grande número de médias, que resultou numa recuperação da borda do pico do solvente. Uma solução para contornar a necessidade de médias pode ser a inclusão da outra classe de supressão em conjunto com MEGA, como a CHESS no início de cada seqüência, de forma que na atuação da supressão seletiva em freqüência não haja necessidade de se aplicar *crushers* e *spoilers* intensos. Ainda, um estudo mais aprofundado na construção de funções com bordas mais acentuadas e que ainda mantenham a condição de adiabaticidade é um caminho a se procurar.

Numa perspectiva, métodos de edição espectral que tem sido comumente usados em alta resolução talvez façam a diferença em campos como o de 2T, pois auxiliaria enormemente a correção de fase e o ajuste de linha de base para picos que talvez passem despercebidos.

Referências

1. BrukerBiospin, *ALMANAC 2004.* Bruker, 2004.
2. Hinshaw, W.S. and A.H. Lent, *An introduction to NMR imaging: from de Bloch equation to the imaging equation.* Proceedings of the IEEE, 1983. **71**(3): p. 338-350.
3. Bonagamba, T.J., *Seleção de planos em tomografia por ressonância magnética nuclear,* . 1986, DFCM-IFQSC-USP.
4. Panepucci, H. and A. Tannús, *The principles of magnetic imaging.* Publicação interna, IFSC-USP, 1994.
5. Panepucci, H., *et al.*, *Tomografia por ressonância magnética nuclear: novas imagens do corpo.* Ciência Hoje, 1985. **4**(20): p. 46-56.
6. Slichter, C.P., *Principles of magnetic resonance.* 3rd ed. Springer Series in Solid-State Sciences. 1990, New York: Springer-Verlag.
7. Abragam, A., *Principles of nuclear magnetism.* 1989, New York: Oxford University Press.
8. Morris, P.G., *Nuclear magnetic resonance imaging in medicine and biology.* 1985, New York: Oxford University Press.
9. Mansfield, P. and P.G. Morris, *NMR imaging in biomedicine.* 1982, New York: Academic Press.
10. Callaghan, P.T., *Principles of Nuclear Magnetic Resonance Microscopy.* 1995, Oxford: Clarendon Press.
11. Fukushima, E. and S.B.W. Roeder, *Experimental pulse NMR - a nuts and bolts approach.* 1981: Addison-Wesley Publishing Company.
12. Jin, J., *Electromagnetic Analysis and Design in Magnetic Resonance Imaging.* 1998: CRC Press.
13. Tannús, A., *Desenvolvimento de tecnologia de tomografia por ressonância magnética nuclear-TORM,* . 1987, DFCM-IFQSC-USP.

14. Beckmann, N., *Geração de imagens por ressonância magnética nuclear*, . 1986, DFCM-IFQSC-USP.

15. Foerster, B., *Técnicas de aquisição rápida em tomografia por ressonância magnética nuclear*, . 1994, DFCM-IFQSC-USP.

16. Vidoto, E.L.G., *Projeto de transdutores e otimização do sistema de recepção do tomógrafo de RMN de campo magnético ultra baixo*, in *DFI-IFSC*. 1995, USP: São Carlos.

17. Martins, M.J., *Desenvolvimento de um Tomógrafo de Ressonância Magnética: Integração e Otimização*, in *Departamento de Física e Ciência dos Materiais*. 1995, USP: São Carlos.

18. Zucchi, M.R., *Implementação da técnica de espectroscopia in vivo por RMN e sua aplicação na fisiologia do exercício*, . 1997, DFI-IFSC-USP.

19. de Azevedo, E.R., *Efeitos do movimento em imagens por RMN e implementação das técnicas "gradient moment nulling" e pré-saturação espacial para redução de artefatos relacionados ao movimento*, . 1998, DFI-IFSC-USP.

20. Portugal, R.V., *Interface gráfica para um sistema de imagens por ressonância magnética*, . 1998, DFI-IFSC-USP.

21. Foerster, B.U., *Técnicas de espectroscopia localizada in vivo*, . 1999, DFI-IFSC-USP.

22. Xavier, R.F., *Desenvolvimento e Construção de Bobinas de Gradiente com Blindagem Ativa (Active Shielding) com Aplicação em Imagens por RMN*, in *FFI - IFSC*. 2000, USP: São Carlos. p. 109.

23. Vidoto, E.L.G., *Projeto e Construção de um Equipamento de Imagens por Ressonância Magnética para Uso Clínico e em Pesquisa*, in *DFI-IFSC*. 2001, USP: São Carlos-SP.

24. Carvalho Neto, J.T.d., *Descrição Analítica da Magnetização Induzida pela Metodologia GMAX*, in *DFI-IFSC*. 2003, USP: São Carlos-SP.

25. Paiva, F.F., *Metodologia de Imagens de NMR que Utilizam um Único Pulso Adiabático de Inversão*, in *DFI-IFSC*. 2004, USP: São Carlos-SP.

26. Bloch, F., W.W. Hansen, and M. Packard, *Nuclear induction*. Phys. Rev., 1946. **69**: p. 127.

27. Brigham, E.O., *The Fast Fourier Transform*. 1974: Prentice-Hall.

28. Mariette, F., *Relaxation RMN et IRM: un couplage indispensable pour l'étude des produits alimentaires.* C. R. Chimic, 2004. **7**: p. 221-232.

29. Fabri, D., M.A.K. Williams, and T.K. Halstead, *Water T_2 relaxation in sugar solutions.* Carbohydrate Research, 2005. **340**: p. 889-905.

30. Ernst, R.R., G. Bodenhausen, and A. Wokaun, *Principles of Nuclear Magnetic Resonance in One and Two Dimensions.* 1997 ed. 1987, New York: Oxford University Press Inc.

31. Purcell, E.M., H.C. Torrey, and R.V. Pound, *Resonance absorption by nuclear magnetic moments in a solid.* Phys. Rev., 1946. **69**: p. 37.

32. Baum, J., R. Tycko, and A. Pines, *Broadband and adiabatic inversion of a two-level system by phase-modulated pulses.* Phys. Rev. A, 1985. **32**: p. 3435.

33. Shaka, A.J. and A. Pines, *Symmetric phase-alternating composite pulses.* J. Magn. Reson., 1983. **71**: p. 495-503.

34. Baum, J., R. Tycko, and A. Pines, *Broadband population inversion by phase modulated pulses.* J Chem Phys, 1983. **79**: p. 4643-4647.

35. Tannús, A. and M. Garwood, *Improved performance of frequency-swept pulses using offset-independent adiabaticity.* J. Magn. Reson. A, 1996. **120**: p. 133-137.

36. Tannús, A. and M. Garwood. *Reducing the RF power requirements of multislice imaging using a single adiabatic frequency swept inversion pulse.* in *4th Scientific Meeting of the International Society for Magnetic Resonance in Medicine.* 1996. New York, NY.

37. Mescher, M., *et al.*, *Solvent Suppression Using Selective Echo Dephasing.* J. Magn. Reson. A, 1996. **123**: p. 226-229.

38. Hwang, T.-L., *et al.*, *Reduction of sideband intensities in adiabatic decoupling using modulation generated through adiabatic R-variation (MGAR).* J Magn Reson A, 1996. **121**: p. 221-226.

39. Hwang, T.-L., *et al. Optimization of broadband decoupling using adiabatic pulses.* in *Experimental NMR Conference (ENC).* 1996. Asilomar, CA, USA.

40. Mescher, M., A. Tannús, and M. Garwood. *A new single-shot technique for Flow Imaging.* in *International Society of Magnetic Resonance 5th Meeting.* 1997. Vancouver, BC.

41. Tannús, A. and M. Garwood. *High sensitivity Burst imaging using adiabatic constant phase DANTE pulse.* in *ENC Conference.* 1997. Orlando, FL - USA.

42. Ugurbil, K., M. Garwood, and M.R. Bendall, *Amplitude and frequency modulated pulses to achieve 90° plane rotations with inhomogeneous B_1 fields.* J Magn Reson, 1987. **72**: p. 177-185.

43. Bendall, M.R., *et al.*, *Adiabatic Refocusing Pulse Which Compensates for Variable rf Power and Off-Resonance Effects.* Magn. Reson. Med., 1987. **4**: p. 493-499.

44. Conolly, S., D. Nishimura, and A. Macovski, *A Selective Adiabatic Spin-Echo Pulse.* J. Magn. Reson., 1989. **83**: p. 324-334.

45. Staewen, R.S., *et al.*, *3-D FLASH imaging using a single surface coil and a new adiabatic pulse, BIR-4.* Invest Radiol, 1990. **25**: p. 559-567.

46. Garwood, M. and Y. Ke, *Symmetric pulses to induce arbitrary flip angles with compensation for RF inhomogeneity and resonance offsets.* J Magn Reson, 1991. **94**: p. 511-525.

47. de Graaf, R.A., K. Nicolay, and M. Garwood, *Single-shot, B_1-insensitive slice selection with a gradient-modulated adiabatic pulse, BISS-8.* Magn Reson Med, 1996. **35**: p. 652-657.

48. Hwang, T.-L., P.C.M. van Zijl, and M. Garwood, *Broadband adiabatic refocusing without phase distortion.* J Magn Reson, 1997. **124**: p. 250-254.

49. Norris, D.G. and A. Haase, *Variable Excitation Angle AFP Pulses.* Magn. Reson. Med., 1989. **9**: p. 435-440.

50. Silver, M.S., R.I. Joseph, and D.I. Hoult, *Highly selective $\pi/2$ and π pulse generation.* J Magn Reson, 1984. **59**: p. 347-351.

51. Hioe, F.T., *Solution of Bloch equations involving amplitude and frequency modulations.* Phys. Rev. A, 1984. **30**: p. 2100-2103.

52. Bottomley, P.A., *Selective Volume Method for Performing Localized NMR Spectroscopy*, . 1984: US.

53. Bottomley, P.A., T.B. Foster, and R.D. Darrow, *Depth-Resolved Surface-Coil Spectroscopy (DRESS) for in Vivo ^1H, ^{31}P, and ^{13}C NMR.* Journal of Magnetic Resonance, 1984. **59**: p. 338-342.

54. Bottomley, P.A., *et al.*, *In vivo solvent-suppressed localized hydrogen nuclear magnetic resonance spectroscopy: A window to metabolism?* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1985. **82**: p. 2148-2152.

55. Bottomley, P.A. and C.J. Hardy, *Two-Dimensional Spatially Selective Spin Inversion and Spin-Echo Refocusing with a Single Nuclear Magnetic Resonance Pulse.* J. Appl. Phys., 1987. **62**(10): p. 4284-4290.

56. Bottomley, P.A., *Spatial Localization in NMR Spectroscopy in Vivo*, in *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1987, New York Academy of Sciences: New York. p. 333-348.

57. Frahm, J., *et al.*, *Stimulated Echo Imaging.* J. Magn. Reson., 1985. **64**: p. 81-93.

58. Frahm, J., K.-D. Merboldt, and W. Hänicke, *Localized Proton Spectroscopy Using Stimulated Echoes.* J. Magn. Reson., 1987. **72**: p. 502-508.

59. Choi, C.G. and J. Frahm, *Localized Proton MRS of the Human Hippocampus: Metabolite Concentrations and Relaxation Times.* Magn. Reson. Med., 1999. **41**: p. 204-207.

60. Ordidge, R.J., A. Connelly, and J.A.B. Lohman, *Image-Selected In vivoSpectroscopy (ISIS). A New Technique for Spatially Selective NMR Spectroscopy.* J. Magn. Reson., 1986. **66**: p. 283-294.

61. Hoult, D.I., J. Magn. Res., 1979. **33**(183).

62. Bendall, M.R. and R.E. Gordon, *Depth and Refocusing Designed for Multipulse NMR with Surface Coils.* J. Magn. Reson., 1983. **53**: p. 365.

63. Garwood, M., *et al.*, *A Modified Rotating Frame Experiment Based on a Fourier Series Widow Function. Application to in Vivo Spatially Localized NMR Spectroscopy.* J. Magn. Reson., 1985. **65**: p. 239-251.

64. Garwood, M., *et al.*, *Improved Fourier Series Windows for Localization in in Vivo NMR Spectroscopy.* J. Magn. Reson., 1985. **65**: p. 510-515.

65. Garroway, A.N., P.K. Grannell, and P. Mansfield, J. Phys. C, 1974. **C7**: p. L457.

66. Lauterbur, P.C., *et al.*, Proc. 18th Ampere Congress, 1974. **1**: p. 27.

67. Hahn, E.L., *Spin echos.* Phys. Rev., 1950. **77**(5): p. 746.

68. Haase, A., *et al.*, *^1H NMR chemical shift selective (CHESS) imaging.* Phys Med Biol, 1985. **30**: p. 341-344.

69. Ernst, T. and J. Henning, *Improved Water Supression for Localized in Vivo ^1H Spectroscopy.* J. Magn. Reson., Series B, 1995. **106**: p. 181.

70. Moonen, C.T.W. and P.C.M. van Zijl, *Highly Effective Water Suppression for in Vivo Proton NMR Spectroscopy (DRYSTEAM).* J. Magn. Reson., 1990. **88**: p. 28-41.

71. Doddrell, D.M., *et al.*, *Water Signal Elimination in Vivo, Using "Suppression by Mistimed Echo and Repetitive Gradient Episodes".* J. Magn. Reson., 1986. **70**: p. 176-180.

72. Ogg, R.J., P.B. Kingsley, and J.S. Taylor, *WET, a T1- and B1- insensitive Water-Suppression Method for in Vivo localized 1H NMR Spectroscopy.* J. Magn. Reson., Serie B, 1994. **104**: p. 1-10.

73. Murdoch, J.B. and D.A. Lampman. *Beyond WET and DRY: Optimized Pulses for Water Suppression.* in *Proceedings of the SMRM 12th Annual Meeting.* 1993.

74. Piotto, M., V. Saudek, and V. Sklenár, *Gradient-Tailored Excitation for Single-Quantum NMR Spectroscopy of Aqueous Solutions. J Biomol NMR*, 1992. **2**: p. 661-665.

75. Sklenar, V., *et al.*, *Gradiente-Tailored Water Suppression for ^{1}H-^{15}N HSQC Experiments Optimized to Retain Full Sensitivity.* J. Magn. Reson., Serie A, 1993. **102**: p. 241-245.

76. Hwang, T.L. and A.J. Shaka, *Water Suppression That Works. Excitation Sculpting Using Arbitrary Waveforms and Pulsed Field Gradients.* Journal of Magnetic Resonance Series A, 1995. **112**: p. 275.

77. Mescher, M., *et al.*, *Simultaneous in Vivo Spectral Editing and Water Suppression.* NMR in Biomed., 1998. **11**: p. 266-272.

78. Abbott, J.A., *Quality Measurement of Fruits and Vegetables.* Postharvest Biol. Technol., 1999. **15**: p. 207-225.

79. www.qmcweb.org, *Revista Eletrônica do Departamento de Química - UFSC,* .

80. Eads, T.M. and R.G. Bryant, *High-Resolution Proton NMR Spectroscopy of Milk, Orange Juice, and Apple Juice with Efficient Suppression of the Water Peak.* J. Agric. Food Chem., 1986. **34**: p. 834-837.

81. Cho, S.I., *et al.*, *Sugar Content Measurement in Fruit Tissue Using Water Peak Suppression in High Resolution ^{1}H Magnetic Resonance.* J. Food Sci., 1991. **56**(4): p. 1091-1094.

82. Ni, Q.W. and T.M. Eads, *Liquid-Phase Composition of Intact Fruit Tissue Measured by High-Resolution Proton NMR.* J. Agric. Food. Chem., 1993. **41**: p. 1026-1034.

83. Ni, Q.W. and T.M. Eads, *Analysis by Proton NMR of Changes in Liquid-Phase and Solid-Phase Components During Ripening of Banana.* J. Agric. Food. Chem., 1993. **41**: p. 1035-1040.

84. Ni, Q.W. and T.M. Eads, *Low-Speed Magic-Angle-Spinning Carbon-13 NMR of Fruit Tissue.* J. Agric. Food. Chem., 1992. **40**: p. 1507-1513.

85. Chudek, J.A. and G. Hunter, *Magnetic Resonance Imaging of Plants.* Prog. Nuc. Magn. Reson. Spect., 1997. **31**: p. 43-62.

86. Clark, C.J., *et al.*, *Application of Magnetic Resonance Imaging to pre- and post-harvest studies of fruits and vegetables.* Postharvest Biol. Technol., 1997. **11**: p. 1-21.

87. Gil, A.M., *et al.*, *Study of the Compositional Changes of Mango During Ripening by Use of Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy.* J. Agric. Food Chem., 2000. **48**: p. 1524-1536.

88. Raffo, A., *et al.*, *Ripening of Banana Fruit Monitored by Water Relaxation and Diffusion ^{1}H-NMR Measurements.* Food Chemistry, 2005. **89**: p. 149-158.

89. Chen, P., *et al.*, *Maturity Evaluation of Avocados by NMR Methods.* J. Agric. Eng. Res., 1993. **55**: p. 177-187.

90. Pope, J.M., D. Jonas, and R.R. Walker, *Choice of Soft Pulse Shapes for Signal Excitation in Chemical Shift Selective Imaging.* Magn. Reson. Imaging, 1995. **13**(5): p. 763-766.

91. Xia, Y. and L.W. Jelinski, *Imaging Low-Concentration Metabolites in the Presence of a Large Background Signal.* J. Magn. Reson., Serie B, 1995. **107**: p. 1-9.

92. Barreiro, P., *et al.*, *Mealiness Assessment in Apples and Peaches Using MRI techniques.* Magn. Reson. Imaging, 2000. **18**: p. 1175-1181.

93. Burdon, J. and C. Clark, *Effect of Postharvest Water Loss on 'Hayward' Kiwifruit Water Status.* Postharvest Biol. Technol., 2001. **22**: p. 215-225.

94. Gall, G.L., m. Puaud, and I.J. Colquhoun, *Discrimination Between Orange Juice and Pulp Wash by 1H Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy: Identification of Marker Compounds.* J. Agric. Food Chem., 2001. **49**: p. 580-588.

95. Press, W.H., *et al.*, *Numerical Recipes in C: The Art of Scientific Computing*, ed. n. ed. 1992, Cambridge: Cambridge University Press.

96. Turner, R., *A target field approach to optimal coil design.* J.Phys. D: Appl. Phys., 1986. **19**(8): p. L147-151.

97. Panepucci, H., *et al. Optimization of Gradient Coils using the Fast Simulated Annealing Method.* in *Fourth Mexican Symposium 2000 - AIP Conference Proceedings 538* -. 2000. Mérida, Yucatán, México.